

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der  
Ludwig–Maximilians–Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar, FRCPath

Einfluss posttranslatiionaler Modifikationen auf die  
Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von  
Georg Nübling  
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Armin Giese
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Maggie Walter Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Christian Haass Prof. Dr. med. Christoph Schmitz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Benedikt Bader
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	12.07.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Tau, $\alpha$ -Synuklein und neurodegenerative Erkrankungen . . . . .	1
1.1.1	Das Protein Tau . . . . .	2
1.1.2	Das Protein $\alpha$ -Synuklein . . . . .	4
1.1.3	Gemeinsames Auftreten von Tau und $\alpha$ -Synuklein in neurodegenerativen Erkrankungen . . . . .	5
1.2	Die Rolle von Metallionen in der Alzheimer'schen Erkrankung . . . . .	7
1.2.1	Aluminium . . . . .	8
1.2.2	Eisen . . . . .	13
1.3	Tau als Phosphoprotein und die Rolle der GSK-3 $\beta$ . . . . .	14
1.3.1	Tau als Phosphoprotein . . . . .	14
1.3.2	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . . . . .	16
1.4	Matrix Metalloproteinasen und die Alzheimer'sche Erkrankung . . . . .	20
1.4.1	Vorkommen und Funktion . . . . .	20
1.4.2	Limitierte Proteolyse des Tau-Proteins bei M. Alzheimer . . . . .	21
1.4.3	MMP-1, -3 und -9 in ZNS und Alzheimer . . . . .	22
1.5	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	22
1.6	Ziele der Arbeit . . . . .	23
1.6.1	Einfluss von Metallionen und organischen Lösungsmitteln auf die Tau-Aggregation . . . . .	24
1.6.2	Einfluss der Phosphorylierung auf die Aggregationsneigung des Tau- Proteins . . . . .	24
1.6.3	Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein . . . . .	25
1.6.4	Inhibitoren der Tau-Aggregation . . . . .	25
1.6.5	Einfluss der limitierten Proteolyse auf die Tau-Aggregation . . . . .	25
1.6.6	Antikörper in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Material . . . . .	27
2.1.1	Materialien, Chemikalien, Puffer, technische Geräte und Software . . . . .	27
2.1.2	Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	27
2.1.3	Proteine und biologisches Material . . . . .	28
2.1.4	Antikörper . . . . .	28

---

2.2	Methoden . . . . .	30
2.2.1	Proteinexpression . . . . .	30
2.2.2	Gelelektrophorese und <i>Western blot</i> . . . . .	31
2.2.3	Proteinbestimmung . . . . .	33
2.2.4	Proteinmarkierung . . . . .	34
2.2.5	Evaluation der fluoreszenzmarkierten Proteine . . . . .	35
2.2.6	Protein-Phosphorylierung . . . . .	36
2.2.7	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	37
2.2.8	Statistik . . . . .	42
2.2.9	Massenspektroskopie und Datenanalyse . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Proteinexpression und Proteinmarkierung . . . . .	44
3.1.1	Proteinexpression . . . . .	44
3.1.2	Proteinmarkierung . . . . .	45
3.2	Phosphorylierung des Tau-Proteins . . . . .	46
3.3	Analyse des phosphorylierten Tau-Proteins . . . . .	46
3.3.1	Aggregationsanalyse . . . . .	46
3.3.2	Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein . . . . .	49
3.3.3	Koaggregation von Tau Oligomeren mit monomerem $\alpha$ -Synuklein . . . . .	50
3.4	Inhibitoren der Tau-Aggregation . . . . .	54
3.5	Antikörper . . . . .	58
3.5.1	Phosphoryliertes Tau-Protein und Antikörper . . . . .	58
3.5.2	Synuklein-Antikörper . . . . .	59
3.6	Matrix-Metalloproteinasen . . . . .	64
3.6.1	Aggregations-Analyse . . . . .	64
3.6.2	Analyse der limitierten Proteolyse . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
4.1	Einfluss der Phosphorylierung auf die Tau-Aggregation und Koaggregation mit $\alpha$ -Synuklein . . . . .	73
4.1.1	Tau-Aggregation . . . . .	73
4.1.2	Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein . . . . .	74
4.2	Effekte der limitierten Proteolyse des Tau-Proteins durch Matrix-Metalloproteinasen . . . . .	77
4.3	Inhibitoren der Tau-Aggregation . . . . .	81
4.4	Einsatz von Antikörpern in der SIFT-Methode . . . . .	82
4.5	Ausblick . . . . .	83
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
	<b>A Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>B Materialien, Chemikalien, Puffer, technische Geräte und Software</b>	<b>89</b>
<b>C Tabellarische Darstellung der <i>phospho</i>-Tau Versuche</b>	<b>98</b>
<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Tau: Struktur des Proteins . . . . .	2
2.1	Messaufbau InsightReader . . . . .	38
2.2	Autokorrelation: schematische Darstellung . . . . .	40
3.1	Aufreinigung des Tau-Proteins . . . . .	44
3.2	Western Blot des phosphorylierten Tau-Proteins . . . . .	47
3.3	Tau Aggregationsanalyse . . . . .	48
3.4	Einfluss von SDS auf die Tau-Aggregation . . . . .	49
3.5	Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Syn Monomeren . . . . .	51
3.6	Koaggregation von Tau Oligomeren und $\alpha$ -Syn Monomeren . . . . .	52
3.7	Kinetik der <i>phospho</i> -Tau Versuche . . . . .	53
3.8	IMPY: Strukturformel . . . . .	54
3.9	IMPY: Inhibition der Tau-Aggregation 1 . . . . .	55
3.10	IMPY: Inhibition der Tau-Aggregation 2 . . . . .	56
3.11	IMPY: Inhibition der Tau-Aggregation 3 . . . . .	57
3.12	Voruntersuchung Tau-Antikörper . . . . .	58
3.13	Detektion phosphorylierten Tau-Proteins mit AT-8 . . . . .	59
3.14	Detektion von $\alpha$ -Syn mit 15G7 . . . . .	61
3.15	Detektion von $\alpha$ -Syn Oligomeren mit 15G7 . . . . .	63
3.16	Tau-Proteolyse mit Proteinase K . . . . .	65
3.17	Tau-Aggregation nach limitierter Proteolyse . . . . .	66
3.18	Tau-Fragmente nach limitierter Proteolyse . . . . .	67
3.19	Tau-Fragmente nach limitierter Proteolyse mit MMP-1 . . . . .	68
3.20	Schema Tau-Proteolyse . . . . .	70
3.21	Massenspektrometrie des Tau-Proteins nach limitierter Proteolyse . . . . .	71

# Tabellenverzeichnis

1.1	Tauopathien und Synukleinopathien . . . . .	6
2.1	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	27
2.2	FCS-Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	28
2.3	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Proteine. . . . .	28
2.4	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und sonstiger biologischer Materialien. . . . .	29
2.5	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. . . . .	29
2.6	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele. . . . .	32
2.7	Markierungsansatz der verwendeten Proteine . . . . .	34
2.8	Phosphorylierungsansatz des Tau-Proteins . . . . .	36
3.1	FCS-Messung der Proteinlösungen nach Markierung. . . . .	45
3.2	Quantifizierung der Protein-Markierung . . . . .	46
3.3	FCS-Analyse der fluoreszenzmarkierten Tau-Antikörper . . . . .	58
3.4	FCS-Analyse der fluoreszenzmarkierten Antikörper . . . . .	60
A.1	Abkürzungen . . . . .	88
B.1	Materialien . . . . .	91
B.2	Chemikalien . . . . .	93
B.3	Puffer . . . . .	96
B.4	Technische Geräte . . . . .	97
C.1	Tau-Aggregation SIFT . . . . .	99
C.2	Tau-Aggregation Kreuzkorrelation . . . . .	100
C.3	Tau und $\alpha$ Syn Koaggregation SIFT . . . . .	101
C.4	Tau und $\alpha$ Syn Koaggregation Kreuzkorrelation . . . . .	102
C.5	Tau Oligomer und $\alpha$ Syn Monomer Koaggregation SIFT . . . . .	103
C.6	Tau Oligomer und $\alpha$ Syn Monomer Koaggregation Kreuzkorrelation . . . . .	104

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Tau, $\alpha$ -Synuklein und neurodegenerative Erkrankungen

Ablagerungen der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) sind zentrale histopathologische Merkmale zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen. Während der Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) die Kortikobasale Degeneration (CBD), die Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP) und die Frontotemporale Demenz mit Parkinson-Symptomatik (FTDP-17) zusammen mit anderen, selteneren Erkrankungen die Gruppe der Tauopathien begründen, also Erkrankungen, in denen Ablagerungen des Tau-Proteins immunhistochemisch nachgewiesen werden können, wird die Gruppe der Synukleinopathien im Wesentlichen von der Parkinson'schen Erkrankung (PD), der Demenz mit Lewy-Bodies (DLB) und der Multiplen Systematrophie (MSA) bestimmt.

Die Proteine Tau und  $\alpha$ -Syn weisen, trotz unterschiedlicher Größe, Primärstruktur, Funktion und subzellulärer Lokalisation, einige Gemeinsamkeiten auf. So zeigen beide Proteine in Lösung keine Sekundärstruktur [1, 2], und in beiden Fällen ist ein zentraler hydrophober Abschnitt des Proteins die Kernstruktur der pathologischen Fibrillisation [3, 4]. Beide Proteine kommen im Zytoplasma von Neuronen vor, sind dort im Krankheitsfall in Form pathologischer Aggregate nachweisbar [5, 6] und durchlaufen ähnliche post-translationale Modifikationen. So können beide Proteine phosphoryliert [7, 8], nitriert [9, 10], ubiquitiniert [11, 12] und trunkiert werden [13, 14]. Welchen Einfluss diese verschiedenen Modifikationen auf die Aggregationseigenschaften der Proteine ausüben und inwiefern sie relevant für die Pathogenese der verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sind, ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und bis heute noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit der Untersuchung der Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins auf Einzelmolekül-Ebene. Untersucht wurden insbesondere der Einfluss von Phosphorylierung und limitierter Proteolyse auf die Tau-Aggregation, sowie modulierende Eigenschaften organischer Lösungsmittel und Metallionen. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe haben sich bereits ausführlich mit den Aggregationseigenschaften des  $\alpha$ -Syn befasst, weshalb in dieser Arbeit vorwiegend seine Rolle als Koaggregations-Partner

des Tau-Proteins untersucht wird. Nachfolgend werden die beiden Proteine mit Schwerpunkt auf das Tau-Protein vorgestellt, um anschließend ihr gemeinsames Vorkommen in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen zu erläutern. In späteren Kapiteln der Einleitung wird der bisherige Kenntnisstand über den Einfluss von Aggregationsmodulatoren und post-translationalen Modifikationen vorwiegend in Hinblick auf das Tau-Protein und der häufigsten mit ihm vergesellschafteten Erkrankung, der Alzheimer-Demenz, zusammengefasst.

### 1.1.1 Das Protein Tau

Die Primärstruktur des Tau-Proteins untergliedert sich in einen sauren N-terminalen Anteil mit bis zu zwei Insertionen von 29 Aminosäuren Länge ( $N_{0-2}$ ), einen prolinreichen Mittelteil und eine basische *repeat*-Region nahe des C-Terminus, die aus drei oder vier 31-32 Aminosäuren langen *pseudorepeats* ( $R_{3/4}$ ) besteht. Dies ermöglicht sechs Isoformen des Tau-Proteins, die alle im adulten Hirn vorkommen, eine Länge von 351 ( $N_0R_3$ ) bis 441 ( $N_2R_4$ ) Aminosäuren aufweisen und deren Expression durch alternatives Spleissen der Exons 2, 3 und 10 gesteuert wird [15, 16]. Alle Isoformen des Tau-Proteins weisen einen sehr geringen Anteil ( $\sim 15\%$ ) hydrophober und einen hohen Anteil basischer Aminosäuren auf, was die gute Löslichkeit und die fehlende Sekundärstruktur (*random coil*) dieser Proteinfamilie erklärt [17, 18]. Diese *random coil* Struktur bedingt auch die hohe Temperatur- und Säurestabilität von Tau.

Funktionell lässt sich das Tau-Protein in eine *microtubule-binding* Domäne und eine Projektionsdomäne untergliedern [19]. Für die Bindung an Mikrotubuli wurde das *Klauen*-Modell entwickelt, demzufolge die drei bzw. vier *pseudorepeats* das katalytische Zentrum für die Tubulin-Anlagerung darstellen, während die *Klauen* P2 (S198-L243 in der längsten Isoform) und R' (K369-S400) für die feste Bindung des Proteins an die Mikrotubuli verantwortlich sind [20] (siehe Abb. 1.1).

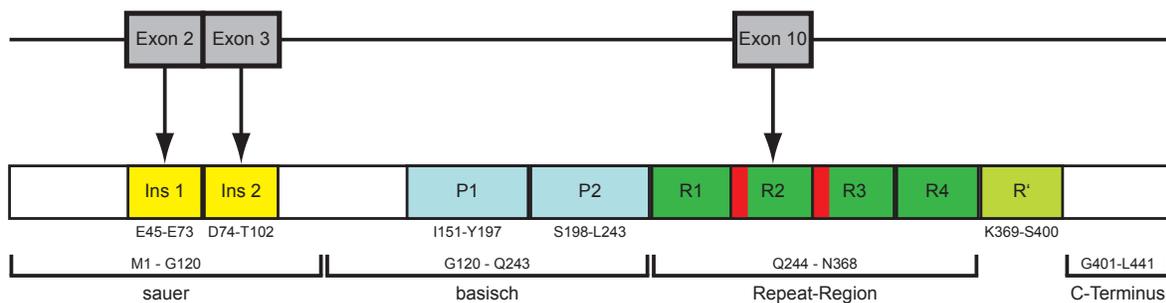


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Tau-Proteins. Die sechs Isoformen werden durch alternatives Spleissen der Exons 2, 3 und 10 generiert. Die *repeat*-Region mit den beiden Hexapeptiden 275VQIINK280 und 306VQIVYK311 (rot markiert) fungiert sowohl als Bindungsdomäne für Mikrotubuli als auch als zentrale Einheit der Fibrillisation. Die anliegende prolinreiche Region P2 und die Region R' festigen nach dem *Klauen*-Modell die Bindung an des Proteins an die Mikrotubuli.

Die Projektionsdomäne (M1-Y197) ragt von den Mikrotubuli fort in das Zytoplasma und behält dabei größtenteils seine ungeordnete Struktur [21]. Sie reguliert möglicherweise den Abstand der Mikrotubuli zueinander [22], oder dient als Bindungsstelle für Kinasen, Phosphatasen oder die Plasmamembran [23–25].

Allen Tauopathien ist das Auftreten von Tau-Einschlüssen gemein, die aus geraden oder gewundenen Filamenten bestehen, deren Grundbaustein wiederum das Protein Tau ist. Die gewundenen Filamente (*paired helical filaments*, PHF) sind aus zwei helikal ineinander verwundenen Polymersträngen aufgebaut und weisen je nach Grunderkrankung unterschiedliche Morphologien auf [26, 27]. Im Falle der Alzheimer'schen Erkrankung gleichen die PHF in ihrer Grundstruktur gewundenen Bändern mit einem Durchmesser von 10-20 nm und einer Halbperiode von 80 nm [28]. Die PHF der Pick'schen Erkrankung zeigen hingegen geringfügig größere Durchmesser und eine Halbperiode von ca. 200 nm [26, 27].

Die *repeat*-Domäne wurde bereits früh als Zentrum der PHF-Formation identifiziert [3]. Weitere Studien zeigten, dass die isolierte *repeat*-Domäne schneller zu PHF aggregiert als das gesamte Protein [29, 30], und dass hierzu die drei *repeats* der kürzeren Tau-Isomere ausreichen [31]. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass alle sechs Isoformen des Tau-Proteins in PHF, die aus AD-Gehirnen isoliert wurden, nachweisbar sind [32].

Die fehlende Sekundärstruktur des Tau-Proteins und seine gute Löslichkeit machten dessen Fähigkeit zur Polymerisation lange Zeit unerklärlich. Erst die Entdeckung der beiden Hexapeptide 275VQIINK280 (PHF6\*) und 306VQIVYK311 (PHF6) in den *pseudorepeats* R2 und R3, die zur Ausbildung kurzer  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen befähigt sind, konnte zur Klärung dieser Frage beitragen [33–36]. Einerseits konnte gezeigt werden, dass Prolin-Insertionen in beide Hexapeptide die Fähigkeit der *repeat*-Domäne zur PHF-Formation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufheben [35, 37, 38]. Prolin-Insertionen verhindern die Ausbildung kurzer, zur Fibrillisation essentieller  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen in den Hexapeptiden. Andererseits ist bereits das isolierte PHF6-Fragment nach N-terminaler Acetylierung und C-terminaler Amidierung zur Ausbildung gerader Filamente befähigt, und die Kombination mit einem gleichermaßen modifizierten Fragment 309VYK311 resultiert in PHF-artigen, gewundenen Filamenten [39].

Die einzelnen Aggregationsschritte vom Tau-Monomer bis hin zu PHF sind bis heute nicht im Detail geklärt. Laborexperimentell gibt es verschiedene Ansätze zur Induktion der Tau-Aggregation, die sich auch hinsichtlich des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes unterscheiden.

Tau selbst neigt in Abwesenheit von Aggregations-Induktoren wie Heparin oder Arachidonsäure nur in sehr hohen Konzentrationen zur Autopolymerisation [30]. Der Prozess der PHF-Formation wurde als Nukleations-Elongations-Prozess beschrieben, da geringe Mengen an PHF-Fragmenten die Fibrillisation von Tau-Monomeren bei Proteinkonzentrationen ermöglichen, in denen die Monomere spontan keine Fibrillen bilden [40]. Die PHF-Fragmente scheinen also als Nukleations-*seeds* für monomeres Tau-Protein zu fungieren.

Ein experimenteller Ansatz der Tau-Fibrillisation ist die Koinkubation des Proteins mit polyanionischen Faktoren wie Heparin. Bezüglich der Reaktionsdynamik scheint die Fi-

brillisation in Gegenwart von Heparin ein kontinuierlicher Prozess zu sein. Hierbei bilden sich initial heterogene transiente Di- und Trimere, aus denen sich kontinuierlich Oligomere höherer Ordnung generieren [41]. In diesem System wurde auch die Rolle von Disulfid-Brücken zwischen den Cystein-Resten des Tau-Proteins ausführlich untersucht. Diese scheinen jedoch lediglich einen beschleunigenden Einfluss auf die Aggregation auszuüben, ihre Abwesenheit verhindert die Polymerisation nicht [41].

Anders als Heparin führen anionische Mizellen z.B. aus Arachidonsäure zur raschen Ausbildung von Aggregations-Nuklei binnen Minuten. Diese frühen Nuklei sind im Thioflavin T Assay, nicht jedoch elektronenmikroskopisch nachweisbar [33]. Nach längerer Inkubation bilden sich auch in Gegenwart von Arachidonsäure fibrilläre Tau-Aggregate [42, 43].

*In vivo* konnten Maeda et al. zeigen, dass elektronenmikroskopisch nachweisbare, granuläre Tau-Oligomere in Alzheimer-Gehirnen bereits ab Braak-Stadium I detektiert werden können, also vor dem Auftreten von Neurofibrillären Tangles (NFTs) im frontalen Kortex [44]. Diese granulären Oligomere bestehen aus etwa 40 Tau-Proteinen. Interessanterweise fanden sich in höheren Braak-Stadien keine höheren Konzentrationen dieser Oligomere, allerdings vermehrt NFTs. Dies lässt eine bestimmte Schwellenkonzentration der Oligomere zur NFT-Bildung vermuten.

Die Untersuchung früher Oligomerisationsprozesse des Tau-Proteins ist von erheblicher Bedeutung, da sich die Hinweise mehren, dass nicht NFTs, sondern Oligomere die pathophysiologisch relevante toxische Form der Tau-Aggregate sein könnten. So konnten Wittmann et al. zeigen, dass Tau-Überexpression in einem Drosophila-Modell zu neuronalem Zellverlust führt, lange bevor NFTs in den Zellen nachweisbar waren [45]. Untersuchungen an Mäusen ergaben, dass intrazelluläre Transportvorgänge in Zellen gestört waren, die bereits hyperphosphoryliertes Tau, jedoch keine NFTs aufwiesen [46]. An einem anderen Mausmodell mit induzierbarer Tau-Überexpression konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der Tau-Überexpression weitere neuronale Zellschäden verhinderte, während die Gesamtzahl der nachweisbaren NFTs nicht abnahm [47]. Diese Arbeiten zeigen, dass die Untersuchung initialer Aggregationsprozesse des Tau-Proteins von großer Bedeutung für das Verständnis früher pathophysiologischer Vorgänge bei verschiedenen Tauopathien sein kann.

### 1.1.2 Das Protein $\alpha$ -Synuklein

$\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) ist ein deutlich kleineres Protein als Tau. Die Sequenz seiner 140 Aminosäuren ist auf Chromosom 4q21.3 - 4q22 codiert, das Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns [4, 48, 49]. Mit den anderen Mitgliedern der Synuklein-Familie ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) hat das  $\alpha$ -Syn eine *repeat*-Region im N-Terminus und eine Reihe saurer Aminosäuren im C-terminalen Bereich gemein [4]. Der zentrale Unterschied zu den übrigen Synukleinen besteht in der sogenannten *non A $\beta$ -component* (NAC) Domäne im Zentrum des Proteins, die durch ihren hydrophoben Charakter die Autopolymerisation des Proteins ermöglicht [4]. Ähnlich dem Tau-Protein weist auch  $\alpha$ -Syn keine feste Sekundärstruktur auf [2]. Im Gegensatz zu Tau aggregiert das Protein jedoch ohne Kofaktoren spontan *in vitro*, was womöglich seiner geringen Größe und der damit verbundenen Exponiertheit der zentralen NAC-Domäne zugeschrieben werden kann [50]. Weitere Faktoren, die die Polymerisation von  $\alpha$ -Syn zu

Thioflavin-positiven fibrillären Aggregaten ähnlich denen in Lewy Bodies fördern, sind erhöhte Temperatur, saures Milieu und hohe Konzentration des Proteins [51–53].

Immunhistochemisch ist  $\alpha$ -Syn in zahlreichen Hirnregionen wie Thalamus, Hippocampus, Striatum, Cerebellum, Bulbus olfaktorius und Neokortex nachzuweisen [4]. Hierbei ist es insbesondere im präsynaptischen Terminus der Neuronen zu finden [54], wo ihm vermutlich eine Rolle bei synaptischen Funktionen wie der Regulation des Dopamin-Pools, aber auch der synaptischen Plastizität sowie in der Zellentwicklung zukommt [55–57]. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Protein 14-3-3 wurde auch eine Chaperone-Funktion des  $\alpha$ -Syn vermutet, beispielsweise als Inhibitor von MAP-Kinasen (Mikrotubuli-assoziiertes Protein) [58, 59].

Unstrittig ist die zentrale Rolle des Proteins in der Pathophysiologie der Parkinson'schen Erkrankung. In genetischen Studien an Familien mit hereditärer Parkinson-Erkrankung konnte gezeigt werden, dass eine Duplikation des Genlokus für  $\alpha$ -Syn zu einem Krankheitsbild führt, das sich klinisch nicht vom idiopathischen Parkinson-Syndrom unterscheidet [60]. Eine Triplikation des Genlokus hingegen führt zu einem verfrühten Krankheitsbeginn und geht gehäuft mit dementieller Entwicklung einher [61, 62]. Darüber hinaus sind mittlerweile mehrere Punktmutationen des  $\alpha$ -Syn-Gens bekannt, die ebenfalls zu familiären Parkinson-Syndromen führen und eine erhöhte Aggregationsneigung aufweisen [51]. Über die Ursachen der pathologischen Aggregation des Proteins herrscht noch weitgehend Unklarheit. Zwar wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die die Aggregation des Proteins fördern, wie beispielsweise ein Fragment des A $\beta$ -Peptids, Tubulin, zelluläre Polyamine oder langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren [63–66]. Auch konnte gezeigt werden, dass membrangebundenes  $\alpha$ -Syn vermehrt aggregiert und als *seed* zur Formierung größerer zyttoplasmatischer Aggregate fungiert [67]. Von besonderem Interesse ist, dass Eisenionen, die auch in Lewy Bodies nachweisbar sind [68], zur vermehrten  $\alpha$ -Syn-Aggregation *in vitro* und in Zellkultur führen [69–72]. Insgesamt ist jedoch unklar, welche Gewichtung den verschiedenen proaggregatorischen Faktoren in der Genese der Synukleinopathien zukommt.

### 1.1.3 Gemeinsames Auftreten von Tau und $\alpha$ -Synuklein in neurodegenerativen Erkrankungen

Der Nachweis der Proteine Tau und  $\alpha$ -Syn in Ablagerungen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen führte zu deren Klassifikation als „Tauopathien“ oder „Synukleinopathien“. Wenngleich diese Einteilung aus histopathologischer Sicht zunächst sinnvoll erscheint, mehren sich doch sowohl im klinischen als auch im histologischen Bereich die Anzeichen dafür, dass beide Erkrankungsgruppen Überschneidungspunkte aufweisen.

#### *Klinische Überschneidung von Tauopathien und Synukleinopathien*

Mehrere Studien konnten zeigen, dass Parkinson-typische extrapyramidalmotorische Symptome bei Alzheimer-Patienten deutlich häufiger auftreten als in der gleichaltrigen Durchschnittsbevölkerung, mit Koinzidenzraten bis zu 92% [73–75]. Umgekehrt scheint das Auftreten oder die Verschlechterung einer Parkinson-Symptomatik ein Risikofaktor für die

Tauopathien	Synukleinopathien
M. Alzheimer	M. Parkinson
Kortikobasale Degeneration	Demenz mit Lewy Bodies
Progressive supranukleäre Blickparese	Multiple Systematrophie
Silberkornkrankheit ( <i>agyrophilic grain disease</i> , AGD)	
Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17)	
M. Pick	
M. Lytico-Bodig	

Tabelle 1.1: tabellarische Auflistung häufiger Tauopathien und Synukleinopathien [78].

Entwicklung einer Demenz zu sein [76, 77].

Andere Erkrankungen, die klassisch als Tauopathien deklariert werden, treten regelmäßig mit Parkinson-Symptomen in Erscheinung. Zu ihnen gehören neben CBD und PSP auch die FTDP-17, sowie weitere seltene Erkrankungen wie die Dementia pugilistica [78].

Betrachtet man die Gruppe der Synukleinopathien, so zeigt sich ein ganz ähnliches Bild. Je nach Alter zeigen Patienten mit M. Parkinson eine Prävalenz dementieller Symptome von 40% bis 70% und sind somit etwa sechsmal häufiger betroffen als das Vergleichskollektiv [79–81].

In Tabelle 1.1 ist eine Übersicht über die häufigsten Tauopathien und Synukleinopathien aufgeführt.

#### *Histopathologische Überschneidung von Tauopathien und Synukleinopathien*

Da die vorliegende Arbeit sich mit Aggregation und Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn beschäftigt, ist deren histologische Lokalisation in verschiedenen Erkrankungen von besonderem Interesse. Die beiden Proteine wurden 1986 und 1993 erstmalig mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, Tau als Hauptbestandteil der Neurofibrillären Tangles,  $\alpha$ -Syn als *non-A $\beta$  component* (NAC) der amyloiden Plaques in Alzheimer-Gehirnen [5, 82, 83]. Erst als  $\alpha$ -Syn 1997 als Hauptkomponente der M. Parkinson- und DLB-typischen Lewy Bodies identifiziert wurde, rückte das Protein als mögliche pathophysiologische Ursache neurodegenerativer Erkrankungen in das Interesse der Forscher [6].

Mittlerweile zeigt sich, dass die strenge histopathologische Unterscheidung der Tauopathien und Synukleinopathien möglicherweise wenig sinnvoll ist. So finden sich in 60% der histologisch gesicherten Alzheimer-Fälle auch  $\alpha$ -Syn-positive Lewy Bodies, während diese nur in 13% der Gehirne von Patienten ohne bekannte kognitive Beeinträchtigung nachweisbar sind [84, 85]. In ähnlicher Weise waren  $\alpha$ -Syn-positive Ablagerungen in PSP, FTDP-17, Down Syndrom mit Alzheimer-Demenz und M. Lytico-Bodig nachweisbar [86–89].

Wenig überraschend erscheint vor diesem Hintergrund die Tatsache, dass bis zu 40% der klinisch gesicherten PD-Fälle und sogar 87% der Gehirne von DLB-Patienten die CERAD-Kriterien (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) für die pathologische Diagnose der Alzheimer-Demenz erfüllen [90–92].

Zur Rechtfertigung von Koaggregationsstudien von entscheidender Bedeutung ist der pa-

rallele Nachweis von Tau- und  $\alpha$ -Syn-positiven Einschlüssen in derselben Zelle. Dies gelang einerseits bei M. Alzheimer [93–95], PSP [86], M. Lytico-Bodig [87] und PD [96, 97] für nebeneinander existierende Aggregate in Neuronen, während eine solche Kolo-kalisation in der Frontotemporalen Demenz nicht nachweisbar war [98]. Darüber hinaus zeigten mehrere immunhistochemische Studien, dass  $\alpha$ -Syn auch in NFTs und glialen Einschlüssen von AD, PSP und CBD sowie in Pick Bodies nachgewiesen werden kann [99]. Umgekehrt fanden sich in einer Studie an Gehirnen von DLB-Patienten in bis 40% aller Lewy Bodies auch Tau-Epitope, sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum der Einschlüsse [96]. Wenngleich diese Proteine also offensichtlich auch eigenständig zur Formierung größerer Aggregate befähigt sind, legt der gemeinsame Nachweis in ein und denselben Einschlüssen die Vermutung nahe, dass sie wechselseitig die Aggregationsneigung des anderen Proteins verstärken.

#### *Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein in vitro*

Eine neuere Studie konnte die proaggregatorische Interaktion von Tau und  $\alpha$ -Syn *in vitro* nachweisen. Giasson et al. [50] konnten zeigen, dass die Autopolymerisation des Tau-Proteins, die gewöhnlich Induktoren wie Heparin benötigt, auch durch Koinkubation des Proteins mit  $\alpha$ -Syn induziert werden kann. Umgekehrt führt die Gegenwart jeder der sechs Isoformen des Tau-Proteins zur Aggregation des  $\alpha$ -Syn bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als in Lösungen, die nur Synuklein enthalten. Diese beiden Beobachtungen konnten mit  $\beta$ -Synuklein nicht reproduziert werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen überdies, dass die meisten so entstandenen Fibrillen nur eines der beiden Proteine enthielten [50]. Es waren aber auch heterogene Fibrillen zu beobachten, die abschnittsweise aus Tau oder  $\alpha$ -Syn zusammengesetzt waren. Solche Beobachtungen wären einerseits dadurch zu erklären, dass sich kurze Fibrillen-Fragmente aus Tau und  $\alpha$ -Synuklein aneinander anlagern. Andererseits ist auch denkbar, dass Interaktionen bereits auf Monomer-Ebene stattfinden, oder Oligomere des einen Proteins als Aggregations-*seeds* des Anderen fungieren. Zur Klärung dieser Fragestellung werden in der hier vorgelegten Arbeit auch diese frühen Koaggregationsprozesse von Tau und  $\alpha$ -Syn näher untersucht.

## 1.2 Die Rolle von Metallionen in der Alzheimer'schen Erkrankung

Metallionen kommen überall in der Natur in nahezu allen biologischen Systemen vor. Einige von ihnen, wie Eisen, Kupfer oder Zink erfüllen essentielle Aufgaben im Organismus, beispielsweise als katalytisches Zentrum von Enzymen, während von anderen Metallen, wie Blei oder Aluminium, keine physiologische Funktion bekannt ist. Allen Metallen gleich ist jedoch die Eigenschaft, toxische Wirkungen zu entfalten, wenn ihre Homöostase im Organismus gestört ist [100]. Im Bereich der Tauopathien und Synukleinopathien könnten besonders Aluminium und Eisen eine besondere pathophysiologische Rolle spielen, auf die

in den nachfolgenden Kapiteln im Detail eingegangen wird.

### 1.2.1 Aluminium

Aluminium ist eines der häufigsten Elemente auf der Erde. Mit einem Anteil von etwa 8 Gewichtsprozent an der Erdkruste sind lediglich Sauerstoff und Silizium häufiger [101]. Als Alumosilikat findet sich Aluminium vorwiegend in Ton, Gneis und Granit. Im Trinkwasser sowie in den meisten Lebensmitteln kommt Aluminium als Spurenelement vor [101]. Eine mögliche Beteiligung des Aluminiums an der Pathogenese oder Progression der Alzheimer'schen Erkrankung hat in den vergangenen Jahrzehnten zu intensiver Forschung in vielfältigen experimentellen Systemen und einer großen Anzahl epidemiologischer Studien geführt. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen inhomogen, was im Bereich der experimentellen Forschung auch an der komplexen Biochemie des Aluminiums liegen mag.

#### Biochemie und Physiologie des Aluminiums

Die Biochemie des Aluminiums stellt eine deutliche Hürde bei der Untersuchung möglicher Auswirkungen erhöhter  $\text{Al}^{3+}$ -Konzentrationen auf den Organismus dar. Im sauren Milieu ( $\text{pH} < 5,0$ ) liegt Aluminium hauptsächlich als Oktahydral-Hexahydrat  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  vor und erfährt mit steigendem pH zunehmend Deprotonierungen. In neutralem Milieu liegt überwiegend das unlösliche Aluminium-Hydroxid  $[\text{Al}(\text{OH})_3]$  vor. Bei  $\text{pH} > 6,2$  dominiert als lösliche Form das Tetrahedral-Aluminat  $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ , das jedoch auch bei höherem pH lediglich einen Bruchteil des gesamten Aluminiums ausmacht [102]. So liegen bei Zugabe eines  $\text{Al}^{3+}$ -Salzes in einer Konzentration von 1 mmol/l zu einer wässrigen Lösung bei pH 7,4 lediglich 8  $\mu\text{mol/l}$  als lösliches Tetrahedral-Aluminat, der Rest fast ausschließlich als Aluminium-Hydroxid vor [102].

In experimentellen Modellen muss die Verwendung phosphathaltiger Puffer vermieden werden, da Aluminium mit Phosphat ein unlösliches Salz bildet [102].

Mit der Nahrung nimmt der Mensch je nach Essgewohnheiten und Wohnort täglich zwischen 2,5 und 13 mg Aluminium auf, wovon jedoch nur ein Bruchteil im Gastrointestinaltrakt resorbiert wird [101]. Bei gewöhnlicher Zusammensetzung übersteigt der Aluminiumgehalt der festen Nahrung den des Trinkwassers um etwa das Zehnfache [103]. Die Resorption aus Trinkwasser überwiegt die aus fester Nahrung geringfügig, in beiden Fällen liegt sie jedoch unter 0,5% [104, 105].

In der Blutbahn ist Transferrin der stärkste Bindungspartner des Metalls [102]. Resorbiertes Aluminium wird in verschiedenen Organen, vorwiegend jedoch in Knochen und Lunge eingelagert. Das Gehirn enthält lediglich ca. 1% des Körper-Aluminiums [101]. Wenngleich die Blut-Hirn-Schranke nur eine geringe Permeabilität für das Metall besitzt [106], wurden mittlerweile Carrier-Systeme wie der Transferrin-vermittelte Transport oder der Monocarboxylat-Transporter identifiziert, die den Übertritt des Aluminiums über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen [107, 108]. Die C2-Isoform des Transferrins ist dabei überdurch-

schnittlich häufig bei Alzheimer-Patienten mit spätem Krankheitsbeginn nachweisbar [109]. Die Blut-Hirn-Schranke ist jedoch nicht die einzig mögliche Eintrittspforte des Aluminiums ins ZNS. Perl et al. zeigten bereits 1987, dass das Metall auch über das olfaktorische System ins Gehirn gelangen kann und dann im entorhinalen Kortex und im Hippocampus nachweisbar ist [110]. Diese Erkenntnis führte die Aluminium-Exposition über die Atemluft, beispielsweise in Gießereien, als mögliche Quelle Aluminium-induzierter Neuropathien ein, und nährte das wissenschaftliche Interesse an der Aufdeckung möglicher Zusammenhänge zwischen Aluminium und der Alzheimer'schen Erkrankung.

### Aluminium und die Alzheimer'sche Erkrankung

Erstmalig trat Aluminium bereits 1897 als neurotoxische Substanz in Erscheinung. Nach Verabreichung hoher Aluminiumdosen an Hunde und Katzen fand Döllken eine vorwiegend zentralnervös neurotoxische Wirkung des Metalls, begleitet von zentralen Reizerscheinungen [111]. Ein Zusammenhang zwischen Aluminium und der Alzheimer'schen Erkrankung wurde jedoch erst im Jahr 1965 hergestellt, als Klatzo und Terry nach intrathekaler Injektion von Aluminiumsalzen Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*) in Hirnschnitten adulter Hasen nachweisen konnten [112, 113]. Mittlerweile sind zahlreiche Wirkmechanismen bekannt, über die Aluminium eine Rolle in der Pathogenese oder der Progression der Alzheimer'schen Erkrankung spielen könnte.

### Pathologische Wirkungen des Aluminiums im ZNS

Aluminium beeinflusst die Zellphysiologie im ZNS auf vielfältige Weise. Im Nukleus führt das Metall beispielsweise zu Konformationsänderungen des Chromatins und verändert die Expression verschiedener Proteine wie Tubulin, *amyloid precursor protein* (APP), RNA-Polymerase oder des Transferrin-Rezeptors [114]. Auch Veränderungen im Energiemetabolismus, der Freisetzung von Neurotransmittern, des axonalen Transports oder der Beschaffenheit von Zellmembranen wurden in verschiedenen experimentellen Modellen beobachtet [114].

Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind die Interaktionen von Aluminium mit Tau und anderen Proteinen. Eine Besonderheit des Aluminiums liegt beispielsweise in seiner Fähigkeit, andere Metallionen wie  $Mg^{2+}$  oder  $Cu^{2+}$  aus Proteinbindungsstellen zu verdrängen und so als Inhibitor metallionenabhängiger Enzyme zu fungieren [115]. Des Weiteren kann Aluminium auch direkt an die Reste der Aminosäuren Tyrosin und Histidin sowie an phosphorylierte Aminosäuren binden [114].

Die Interaktion mit Aluminium kann bei einigen Proteinen auch zu Konformationsänderungen führen. Dies betrifft neben Proteinen wie Transferrin, Calmodulin oder Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) auch solche, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, wie beispielsweise  $\alpha$ -Synuclein oder  $A\beta$  [114]. Eine weitere Einflussmöglichkeit des Aluminiums auf das Protein Tau besteht in der Modifikation des Phosphorylierungsstatus des Proteins. So konnte sowohl eine Inhibition der Tau-Dephosphorylierung als auch eine Aluminium-vermittelte nichtenzymatische Phospho-Inkorporation in experi-

mentellen Modellen nachgewiesen werden [116,117]. Letztere ging mit einem proaggregatorischen Effekt des Aluminiums auf das Protein Tau einher [117], wobei möglicherweise die bereits bei Neurofilament beobachtete Fähigkeit des Aluminiums zur  $\beta$ -Faltblatt-Induktion eine Rolle spielen könnte [118].

Da sich die hier vorliegende Arbeit hauptsächlich mit dem Tau-Protein befasst, werden im nachfolgenden Abschnitt die bisherigen Erkenntnisse zur Interaktion von Aluminium und Tau in verschiedenen experimentellen Modellen zusammengefasst.

### Interaktion von Aluminium und Tau in verschiedenen experimentellen Modellen

#### *In vitro*

Ein Einfluss von Aluminium auf die Tau-Aggregation konnte mittlerweile in zahlreichen *in vitro* Modellen belegt werden. Während sich in manchen Studien bereits ein proaggregatorischer Effekt des Metalls auf unphosphoryliertes Protein zeigte [119], konnten andere Arbeitsgruppen eine Tau-Aggregation lediglich bei pseudophosphoryliertem [120] oder hyperphosphoryliertem PHF-Tau [121, 122], nicht jedoch bei unphosphoryliertem Protein nachweisen. Li et al. zeigten eine 3,5fach erhöhte Aggregationsneigung des Tau-Proteins nach Phosphorylierung [123]. Mehrere Autoren stellten überdies fest, dass sich in Gegenwart von Aluminium nicht die Alzheimer-typischen PHF, sondern amorphe Aggregate bilden [119, 122, 124]. Neben der Tau-Aggregation könnte Aluminium überdies die Expression von Tau fördern. Versuche an kultivierten Neuronen aus dem Cortex von Ratten zeigten, dass die Langzeit-Applikation von Aluminium zur Akkumulation von Tau und A $\beta$  führt [125, 126]. Andere Arbeitsgruppen fanden Hinweise auf eine Induktion der Tau-Phosphorylierung [127] bzw. eine verminderte Dephosphorylierung des Proteins in Gegenwart von Aluminium [116].

#### *Untersuchungen an Präparaten von AD-Patienten*

NFTs sind eines der zentralen neuropathologischen Merkmale der Alzheimer'schen Erkrankung. Um die Relevanz der *in vitro* akquirierten Daten für die eigentliche Erkrankung zu prüfen, haben zahlreiche Forschungsgruppen Untersuchungen an post-mortem Präparaten neuropathologisch gesicherter Alzheimer-Fälle durchgeführt.

Bezüglich des Aluminiumgehalts in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gibt es widersprüchliche Daten. Während einige Gruppen keinen Unterschied zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollen feststellen konnten [128, 129], fanden andere einen erhöhten Aluminiumgehalt in Gehirnen von AD-Patienten [130, 131]. In mehreren Studien gelang der Nachweis erhöhter Al-Konzentrationen im Hippocampus verglichen mit anderen Hirnregionen [128] bzw. gegenüber Kontrollschnitten gesunder Patienten [132]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Aluminium im Laufe des Lebens im Gehirn akkumuliert [133].

Mit verschiedenen Untersuchungsmethoden wie Laser-Mikrosonden Massenspektrometrie (LAM-MA) [134] oder einer Kombination aus Röntgenspektrometrie und Elektronen-Mikroskopie (EM) [135] konnten Aluminium und NFTs in Neuronen von Alzheimer-Gehirnen kolokalisiert werden. Walton zeigte mit einer eigens entwickelten Färbetechnik, dass Aluminium

mit NFTs im frühen wie fortgeschrittenen Stadium der Zelldegeneration im Zytoplasma vergesellschaftet ist [136].

Andere Arbeitsgruppen demonstrierten, dass Hirnschnitte von AD-Patienten nach Inkubation mit Aluminiumlösung eine selektiv verminderte Immunreaktivität für Tau aufweisen [121]. Mit Hilfe von Chelatoren konnte nachgewiesen werden, dass die Tau-Immunreaktivität un behandelter Hirnschnitte durch Aluminium vermindert wird [137]. Dies legt die Vermutung nahe, dass Aluminium direkt an Tau-Protein in NFTs von Alzheimer-Gehirnen bindet und so Antigene gängiger Tau-Antikörper maskiert.

### *In vivo*

Klatzo und Terry fanden bereits 1965 neurofibrilläre Ablagerungen in Hirnschnitten adulter Hasen nach intrazerebraler Injektion von Aluminium-Chlorid [112,113]. Jedoch zeigten sich bereits damals strukturelle Unterschiede zwischen den so erzeugten Ablagerungen und den Alzheimer-typischen NFTs [112]. Erste immunologische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Aluminium-induzierte Neurofibrillen im Gegensatz zu den vorwiegend aus Tau-Protein bestehenden Alzheimer-NFTs lediglich aus Neurofilament bestehen [138]. Spätere Arbeiten konnten jedoch außerdem Immunreaktivität auf phosphoryliertes Tau,  $A\beta$ ,  $\alpha$ -1-Antichymotrypsin und Ubiquitin demonstrieren, allesamt Proteine, die sich auch in den Fibrillen der Alzheimer'schen Erkrankung nachweisen lassen [139–141]. Savoury et al. zeigten darüber hinaus, dass ab Tag 3 nach Aluminium-Injektion zunächst unphosphoryliertes, ab Tag 6-8 schließlich phosphoryliertes Tau-Protein nachweisbar ist [141]. Solche Aluminium-induzierten Ablagerungen treten dabei in denselben Hirnregionen auf wie die NFTs der Alzheimer'schen Erkrankung [142], und ältere Versuchstiere zeigten sich vulnerabler für Al-induzierte Schäden als junge [143]. Studien an Ratten zeigten, dass Aluminium, das zusammen mit PHF-Tau intrazerebral injiziert wurde, den Abbau des PHF-Tau verzögerte und die Einlagerung von  $A\beta$  und Ubiquitin in die Tau-Aggregate förderte [121]. Nach oraler Gabe von Aluminium zeigten Mäuse eine Aluminium-Anreicherung im Gehirn sowie Neurodegeneration und eine Akkumulation phosphorylierten Tau-Proteins [144,145], wengleich andere Arbeitsgruppen dies an Hasen nicht nachweisen konnten [146].

Obwohl auch die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen nicht zuletzt wegen unterschiedlicher Untersuchungstechniken insgesamt inhomogen waren, so weisen sie in der Summe doch auf einen Zusammenhang zwischen Tau-Aggregation und Aluminium-Exposition hin.

### **Epidemiologischer Zusammenhang von Aluminium und M. Alzheimer**

Neben laborexperimenteller Forschung wurden auch zahlreiche epidemiologische Studien zur Klärung eines möglichen ätiologischen Zusammenhangs zwischen Aluminium und Alzheimer durchgeführt. Eine zentrale Fragestellung war hierbei eine mögliche Verbindung zwischen dem Aluminiumgehalt im Trinkwasser und der Inzidenz kognitiver Beeinträchtigung. In mehr als 15 Studien zeigte sich hierbei ein Zusammenhang zwischen Demenz und Aluminiumgehalt des Trinkwassers [147]. Eine Studie in England und Wales zeigte beispielsweise ein 1,5faches Erkrankungsrisiko in Gegenden, deren Trinkwasser mehr

als 0,11 mg/l Aluminium enthielt, gegenüber Regionen mit einem Trinkwassergehalt von unter 0,01 mg/l. Dieser Zusammenhang zeigte sich für keine andere neurologische Erkrankung außer der Alzheimer-Demenz [148]. Forbes et al. konnten nachweisen, dass neben niedrigen Aluminium-Spiegeln im Trinkwasser auch hohe Fluorid-Konzentrationen und ein neutraler pH einen protektiven Effekt auf die Entwicklung kognitiver Beeinträchtigung haben [149,150]. Andere Forschungsgruppen fanden wiederum keinen Zusammenhang zwischen Aluminiumgehalt des Trinkwassers und der Alzheimer-Demenz [147,151]. Wettstein et al. untersuchten insgesamt 800 Probanden im Alter von 81-85 Jahren, die in den letzten 15 Jahren in Gebieten mit einem Aluminiumgehalt des Trinkwassers von 0,1 mg/l bzw. 0,004 mg/l gelebt hatten. Zwischen beiden Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied der kognitiven Fähigkeiten feststellen [152]. Trotz der heterogenen Ergebnislage empfahl die WHO einen Grenzwert von 0,2 mg/l Aluminium im Trinkwasser [153]. Die „US Environmental Protection Agency“ setzte 1985 einen Grenzwert von 0,05 mg/l fest, die „European Economic Community“ beschloss 0,2 mg/l als oberen Grenzwert [147]. Die Entdeckung des olfaktorischen Systems als möglichem Aufnahmeweg von Aluminium aus der Atemluft initiierte eine Reihe von Studien, die sich mit dem Expositionsrisiko von Berufsgruppen wie Schweißern oder Gießereiarbeitern befassten. Auch in diesen Studien ergab sich ein heterogenes Bild. Während einige Forschungsgruppen beispielsweise leichte kognitive Störung (*mild cognitive impairment*, MCI) [154], verminderte psychomotorische Reaktion [155] oder Störungen in Kurzzeitgedächtnis und Lernen nachweisen konnten [156], zeigten andere Studien keinen Zusammenhang zwischen kognitiver Beeinträchtigung und Aluminiumexposition [157–159]. Insgesamt ermöglichen die bisherigen epidemiologischen Ergebnisse keine eindeutige Bestätigung einer kausalen Rolle des Aluminiums in der Pathogenese oder Progression der Alzheimer'schen Erkrankung, können diese jedoch auch nicht widerlegen.

### **Aluminium als therapeutischer Ansatzpunkt der Alzheimer'schen Erkrankung**

Wenngleich der Kausalzusammenhang zwischen M. Alzheimer und Aluminium noch unzureichend geklärt ist, so gab es doch bereits vereinzelt Versuche, durch Senkung der Aluminiumlast des Körpers die Progredienz der Alzheimer-Demenz zu unterbinden. Zwei Studien wiesen auf eine mögliche protektive Rolle von Silikat im Trinkwasser hin. In beiden Studien traten kognitive Symptome vorwiegend bei Patienten auf, deren Trinkwasser niedrige Silika-Spiegel enthielt [160,161]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Silikat die renale Elimination von Aluminium fördert [162].

Ein weiterer Ansatz beschäftigte sich mit Chelatoren als therapeutischer Option. Nach intramuskulärer Injektion des Chelators Deferoxamin Mesylat verlangsamte sich der Verlust der Fertigkeiten des täglichen Lebens, der üblicherweise mit der Alzheimer-Demenz einhergeht [163]. Allerdings konnte der Chelator die Progression der Erkrankung insgesamt nicht verzögern, und die Studie gilt aufgrund methodischer und statistischer Schwächen insgesamt als umstritten [164]. Im Tiermodell war Aluminium-induzierte Neurodegeneration zwar partiell durch Deferoxamin reversibel, eine prophylaktische Wirkung zeigte die Substanz jedoch nicht [165]. Schlussendlich konnte sich Deferoxamin auch aufgrund der

fehlenden Möglichkeit zur oralen Substitution, der hohen Therapiekosten und Nebenwirkungen als Therapeutikum nicht durchsetzen [164].

### 1.2.2 Eisen

Da Aluminium und Eisen ähnliche Liganden [166] sowie gemeinsame Mechanismen des extra- und intrazellulären Transports aufweisen [107], wurde auch die Rolle dreiwertiger Eisenionen in Bezug auf die Alzheimer'sche Erkrankung bereits in mehreren Studien untersucht. In post-mortem Präparaten von Alzheimer-Patienten war ein erhöhter Eisengehalt in Hippocampus und Amygdala gegenüber Kontrollpräparaten nachweisbar [167, 168]. Auch *in vivo* konnte ein erhöhter Eisengehalt in den Basalganglien, nicht jedoch im frontalen Cortex von Alzheimer-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen werden [169]. Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass sowohl  $\text{Fe}^{3+}$  als auch  $\text{Fe}^{2+}$  in NFTs nachweisbar ist [134, 170, 171]. Smith et al. fanden als mögliche Ursache der Fehlverteilung von Eisen im Gehirn einen erhöhten Gehalt des Eisen-Regulationsproteins 2 (*iron regulatory protein 2*, IRP-2) in Neuronen von Alzheimer-Gehirnen, insbesondere in unmittelbarer Nähe intraneuronaler NFTs [172].

Eine Vielzahl von Studien schreibt die mögliche Rolle des Eisens in der Alzheimer'schen Erkrankung vor allem der Tatsache zu, dass redox-aktive Eisenionen den oxidativen Stress in Zellen erhöhen und so zur Nervenzellschädigung beitragen können [171, 173, 174]. Auch eine Interaktion von Aluminium und Eisen bei der Erzeugung oxidativen Stresses wurde von einigen Autoren postuliert [175, 176].

Für die vorliegende Arbeit von größerer Bedeutung sind jedoch die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, die zeigen konnten, dass  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen einen proaggregatorischen Effekt auf PHF-Tau [122] sowie auf  $\alpha$ -Syn ausüben [177].

Ähnlich den Erkenntnissen zu Aluminium konnten Yamamoto et al. zeigen, dass  $\text{Fe}^{3+}$  Epitope phospho-Tau spezifischer Antikörper maskiert. Nach Dephosphorylierung findet hingegen keine Maskierung Tau-spezifischer Antikörper statt, die Eisenbindung scheint also vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abhängig zu sein [122]. Darüber hinaus induzierte  $\text{Fe}^{3+}$  im Gegensatz zu  $\text{Fe}^{2+}$  die Aggregation von PHF-Tau, nicht jedoch von dephosphoryliertem oder rekombinantem, unphosphoryliertem Tau-Protein [122]. Die Aggregation erfolgt hierbei konzentrationsabhängig bereits in Konzentrationen, die unter physiologischen Bedingungen im Gehirn vorherrschen. Setzten die Forscher aus Alzheimer-Gehirnen isoliertes, aggregiertes PHF-Tau reduzierenden Bedingungen aus, so zeigte sich eine Auflösung der Aggregate unter Freisetzung von  $\text{Fe}^{2+}$  [122].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen  $\text{Al}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  besteht in der Stabilität der Bindung an das Protein und der gebildeten Aggregate: während die  $\text{Fe}^{3+}$ -induzierte Aggregation und die Maskierung der PHF-Tau Epitope unter reduzierenden Bedingungen reversibel sind, bleiben sie bei  $\text{Al}^{3+}$  auch im reduzierenden Milieu bestehen. Schlussendlich zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass auch die  $\text{Fe}^{3+}$ -induzierten Aggregation keine paarigen Filamente, sondern amorphe Aggregate hervorbringt [122].

## 1.3 Tau als Phosphoprotein und die Rolle der GSK-3 $\beta$

### 1.3.1 Tau als Phosphoprotein

Das Protein Tau wurde bereits 1977, damals in seiner Rolle als Mikrotubuli-stabilisierender Faktor, als Phosphoprotein identifiziert [7]. Größere Bedeutung wurde dieser Tatsache allerdings erst später beigemessen, als sich herausstellte, dass Tau die Hauptkomponente der Alzheimer-typischen NFTs ist, und dass das Protein in diesen Filamenten in hyperphosphoryliertem Zustand vorliegt [82, 178].

#### Physiologische und pathologische Phosphorylierung des Tau-Proteins

Mittlerweile ist bekannt, dass Tau zwar auch im gesunden Gehirn etwa 2-3 Phosphate pro Proteinmolekül inkorporiert, in der Alzheimer'schen Erkrankung jedoch neben erhöhten Mengen des Proteins auch ein pathologisches Phosphorylierungsmuster mit etwa 2-4fach erhöhtem Phosphatgruppenspiegel vorliegt [179–182]. Auch konnte durch immunzytochemische Methoden nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung des Proteins zumindest teilweise bereits vor der Ausbildung von NFTs stattfindet, was eine Beteiligung der Phosphorylierung am Prozess der Fibrillenbildung denkbar macht [183]. Im Liquor von Alzheimer-Patienten ist darüber hinaus ein erhöhter Gehalt an phosphoryliertem Tau nachweisbar. Hierbei korreliert der Anteil an Phospho-Tau mit dem neuropathologischen Stadium [184]. In einer Studie eignete sich die Thr<sub>231</sub>-Phosphorylierung des im Liquor enthaltenen Tau-Proteins zur Differentialdiagnose von Alzheimer und Demenz mit Lewy-Bodies, die Thr<sub>181</sub>-Phosphorylierung zur Abgrenzung der Frontotemporalen Demenz [185].

Mittlerweile sind zahlreiche Alzheimer-spezifische Phosphorylierungsstellen des Tau-Proteins bekannt. Antikörper gegen spezifische Phospho-Epitope, wie der auch in dieser Arbeit verwendete AT-8 (Ser<sub>202</sub>, Thr<sub>205</sub>), sowie AT-100 (Ser<sub>199</sub>, Ser<sub>202</sub>, Thr<sub>205</sub>, Thr<sub>212</sub>, Ser<sub>214</sub>) oder AD-2 (Ser<sub>396</sub>, Ser<sub>404</sub>) werden neben anderen in der neuropathologischen Diagnostik der Alzheimer'schen Erkrankung eingesetzt [186–188]. Mit ähnlichen Antikörpern gelingt auch der Nachweis phosphorylierten Tau-Proteins in anderen Tauopathien wie etwa in den Pick'schen Körperchen, der FTDP-17 oder den NFTs der Kortikobasalen Degeneration oder der Progressiven Supranukleären Blickparese [189]. Auch konnte gezeigt werden, dass einige Tau-Mutationen der Frontotemporalen Demenz zu erhöhter Phosphorylierung des Proteins führen [190].

#### Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Tau-Phosphorylierung

Auch im gesunden Gehirn ist das Protein Tau zu einem gewissen Grad phosphoryliert [180]. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Phosphorylierung des Tau-Proteins auch physiologische Funktionen erfüllt.

Dem Tau-Protein kommt eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung von Mikrotubuli zu [191]. Die Bindung des Proteins an Mikrotubuli wird hierbei durch Phosphorylierung spezifischer

Proteinabschnitte gesteuert. Während die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren vorwiegend in der *repeat*-Region zu starker Dissoziation des Proteins von Mikrotubuli führt und *in vitro* sogar deren Destabilisierung zur Folge haben kann [192, 193], haben Phosphorylierungen außerhalb dieser Region nur einen geringen inhibitorischen Einfluss auf die Bindung des Tau-Proteins an Mikrotubuli [16, 194]. Als mögliche Enzyme einer solchen Phosphorylierung kommen vor allem Cdk5 und die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in Betracht, die beide intrazellulär mit Mikrotubuli kolokalisiert sind [195, 196]. Der beschriebene disruptive Effekt auf Mikrotubuli kann auch durch hyperphosphoryliertes, aus AD-Gehirnen aufgereinigtes Tau-Protein erzeugt werden [197]. Auch wurde beobachtet, dass hyperphosphoryliertes, lösliches Tau-Protein andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) von Mikrotubuli sequestrieren kann und so deren Stabilität sowie den axonalen Transport stört [190, 198, 199]. Fibrilläres, hyperphosphoryliertes Protein Tau hat hingegen keinen destabilisierenden Einfluss [200]. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Alzheimer-typisches, hyperphosphoryliertes Tau-Protein ursächlich an der in Gehirnen von AD-Patienten beobachteten abnormen Mikrotubuli-Ausrichtung und dem gestörten axonalen Transport beteiligt ist [201–203].

Die Stabilisierung von Mikrotubuli spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Aussprossung von Neuriten. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Ausbildung von Zellfortsätzen bei Neuronen stark von der Phosphorylierung spezifischer Tau-*sites* abhängig ist. Die *Mikrotubuli Affinitäts-regulierende Kinase 2* (MARK2) phosphoryliert *sites*, die die Bindung des Proteins an Mikrotubuli regulieren. Inhibiert man diese Phosphorylierung, führt dies zur Retraktion bzw. verminderten Aussprossung von Neuriten [204, 205]. Daraus schlossen die Forscher, dass eine temporäre Ablösung des Tau-Proteins von Mikrotubuli zur Ausbildung solcher Nervenzellfortsätze vonnöten ist. Die Inaktivierung der Kinase GSK-3 $\beta$ , die die Phosphorylierung von Tau-Motiven außerhalb der *repeat*-Region vermittelt, führte zur Aussprossung von Neuriten [206], während die Aktivierung des Enzyms die Retraktion von Neuriten zur Folge hatte [207, 208].

Schlussendlich vermindert die Phosphorylierung des Tau-Proteins auch dessen Degradation, beispielsweise durch Calpain [209, 210]. Dieser Mechanismus stellt ein weiteres Erklärungsmodell des erhöhten Tau-Pools in AD-Neuronen dar.

### Tau-Kinasen

Für einige Enzyme konnte bisher gezeigt werden, dass sie die Phosphorylierung des Tau-Proteins vermitteln. Diese Tau-Kinasen können anhand ihrer Ziel motive auf dem Protein in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppe der Prolin-gelenkten Proteinkinasen (*prolin-directed protein kinases*, PDPK) umfasst neben der GSK-3 $\beta$  [211–214] auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK 1/2) [215, 216], die Jun N-terminale Kinase (JNK1) [217] und die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk5 und Cdc2 [196, 218].

Die Gruppe der nicht Prolin-gelenkten Proteinkinasen (NPDPK) beinhaltet unter anderem die Enzyme Protein Kinase A (PKA) [187, 219], Casein Kinase 1/2 [220, 221] und MARK [193]. Letztere phosphoryliert Tau an KXGS-Motiven, die sich auch in der *repeat*-Region des Proteins (Ser<sub>262</sub>) finden [192]. Über die pathophysiologische Bedeutung vieler

dieser Kinasen herrscht jedoch weitgehend Unklarheit. Die meisten Arbeiten beschäftigten sich bisher mit dem Einfluss der Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ , die auch in dieser Arbeit Verwendung fand und in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt wird.

### 1.3.2 Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$

#### Enzym, Funktion, Regulation

Die erste bekannte und namensgebende Funktion der GSK-3 $\beta$  war die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Glykogen Synthase [222]. Die GSK-3 liegt in zwei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) vor, die von verschiedenen Genen kodiert werden, aber 85% Sequenzhomologie aufweisen [223]. Bis heute konnten zahlreiche weitere Substrate vor allem im Bereich der Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die durch GSK-3 $\beta$  meist inhibiert werden [224–228]. Eine Ausnahme bildet hier der Transkriptionsfaktor p53, dessen Aktivität durch GSK-3 $\beta$  gesteigert wird [229].

Die Glykogen Synthase Kinase wird dabei selbst durch zahlreiche Systeme moduliert. Die Aktivierung der GSK-3 $\beta$  erfolgt über ihre Phosphorylierung an Ser<sub>9</sub>, ihre Inaktivierung findet in gleicher Weise an Tyr<sub>216</sub> statt [230, 231].

Zu den Inhibitoren der GSK-3 $\beta$  zählt unter anderem auch die Kinase Akt, deren Aktivierung z.B. durch Insulin und IGF-1 erfolgt und mit einer erhöhten Überlebensrate von Zellen in Verbindung gebracht wurde [232–234]. Auch die Kinase Cdk-5, die neben der GSK auch das Protein Tau phosphoryliert, übt einen direkten inhibitorischen Einfluss auf das Enzym aus [235–237]. Andere Autoren wiederum konnten darstellen, dass bestimmte Tau-*sites* nur nach vorangegangener Phosphorylierung nahegelegener Proteinabschnitte durch Cdk-5 Substrate der GSK-3 $\beta$  sind [238]. Dieser Vorgang der sequentiellen Phosphorylierung wird als *priming* bezeichnet. Andere direkte oder indirekte GSK-Inhibitoren, die auch Tau als Substrat haben, sind PKA und MAP-Kinase [239, 240].

Auf der Seite der Aktivatoren fungiert die Tyrosin-Kinase fyn als mögliche Verbindung zwischen A $\beta$ - und Tau-Pathologie. Bei A $\beta$  handelt es sich um ein extrazelluläres amyloidogenes Protein, dem ebenfalls eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des M. Alzheimer zugeschrieben wird. In neuronaler Zellkultur aktiviert fyn die GSK-3 $\beta$  und somit die Tau-Phosphorylierung nach kurzer Zellbehandlung mit Insulin [241], und auch nach Inkubation mit A $\beta$  findet sich eine fyn-vermittelte transiente Erhöhung der Tau-Phosphorylierung [242]. Neben diesen ersten Hinweisen gibt es zahlreiche weitere Belege für eine Schlüsselrolle der GSK-3 $\beta$  in der pathologischen Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, die nachfolgend zusammengefasst werden.

#### GSK-3 $\beta$ und Tau

##### *GSK generiert Alzheimer-typische Phosphorylierungsmuster*

Die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch GSK-3 $\beta$  wurde bereits in zahlreichen experimentellen Modellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, von denen einige hier kurz vorgestellt werden [213, 243–245]. Die Antigene zahlreicher phospho-Tau spezifischer An-

tikörper, die in der Alzheimer-Diagnostik eingesetzt werden, lassen sich *in vitro* und *in vivo* mit dem Enzym allein oder in Kombination mit anderen Kinasen generieren.

In Mäusen führte die Expression einer aktiveren Form der GSK-3 $\beta$  zu vermehrtem Nachweis des AT-8 Epitops [246]. In einem anderen Versuch waren Hirnhomogenate GSK-3 $\beta$  + hTau40 transgener Mäuse positiv für die Epitope der Antikörper AT-8, AT-180 und AD-2, im Gegensatz zu Kontrollen [245].

In Zellkultur konnten nach Aktivierung von GSK-3 $\beta$  acht für PHF-Tau typische Epitope nachgewiesen werden [212]. An Kulturen hippokampaler Hirnschnitte konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität der Kinase mit einer Phosphorylierung der Epitope der Tau-Antikörper PHF-1 und Tau-1 einhergeht [247]. Im zellfreien Modell gelang die Generierung des AT-100 Epitops durch sequentielle Phosphorylierung mit GSK-3 $\beta$  und PKA [187]. Reynolds et al. konnten mittels Nanoelektrostpray Massenspektrometrie nach *in vitro* Phosphorylierung des Proteins mit GSK-3 $\beta$  neun phospho-*sites* identifizieren, die auch bei PHF-Tau phosphoryliert sind. Sämtliche der in dieser Studie identifizierten *sites* sind auch in PHF-Tau nachweisbar [248].

Wenngleich diese Ergebnisse eine pathophysiologische Rolle der Glykogen Synthase Kinase nahelegen, muss man berücksichtigen, dass das Tau-Protein auch im normalen Gehirn z.T. an PHF-typischen *sites* phosphoryliert ist, wenngleich in sehr viel geringerem Ausmaß [249]. Der Nachweis, dass GSK-3 $\beta$  diese Phosphorylierungsmuster erzeugen kann, ist daher kein endgültiger Beweis für eine Beteiligung des Enzyms an der Pathophysiologie der Alzheimer'schen Erkrankung.

#### *GSK-3 $\beta$ ist mit Alzheimer-typischen neuropathologischen Veränderungen kolokalisiert*

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  mit neurodegenerativen Veränderungen assoziiert ist. In Hirnschnitten Tau + Amyloid Precursor Protein (APP) transgener Mäuse konnte GSK mit NFTs und granulovakuolärer Degeneration kolokalisiert werden [250]. *Western blot* Untersuchungen an Hirnhomogenaten von Alzheimer-Patienten zeigten, dass GSK-3 $\beta$  mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein assoziiert ist [189]. Zahlreiche Studien an Hirnschnitten konnten nicht nur nachweisen, dass das Enzym bei Alzheimer-Patienten mit NFTs kolokalisiert und seine Aktivität leicht erhöht ist [251,252]. Es erwies sich auch, dass die aktive Form der GSK-3 $\beta$  mit *pre-tangle* Tau im Zytoplasma kolokalisiert ist [253], und dass ihre Ausbreitung im AD-Gehirn parallel zur fibrillären Tau-Pathologie mit dem Schweregrad der Neurodegeneration zunimmt. [254]. Ferrer et al. zeigten überdies, dass die GSK auch mit Tau-positiven histopathologischen Korrelaten anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie Progressiver Supranukleärer Blickparese, Kortikobasaler Degeneration und Morbus Pick assoziiert ist [189].

#### *GSK-3 $\beta$ induziert PHF-Formation*

Die Kolokalisation der GSK mit pathologischen Tau-Aggregaten macht die Vermutung, dass die Kinase ursächlich an der Formation von NFTs beteiligt ist, wahrscheinlicher.

Im zellfreien System konnte an rekombinantem und aus AD-Gehirnen aufgereinigtem Tau gezeigt werden, dass die GSK-3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierung die Aggregation beschleunigt und zur Formierung PHF-artiger Aggregate führt [255–257], wobei andere Autoren

nur einen milden Effekt der Kinase feststellen konnten [194]. Darüber hinaus fördert die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  die Zusammenlagerung präformierter Fibrillen zu NFT-artigen Bündeln [258].

Durch Punktmutation von Serin zu Glutamat kann die Phosphorylierung eines Proteins an spezifischen Stellen vorgetäuscht werden. Eine solche Pseudophosphorylierung von Ser<sub>396</sub> und Ser<sub>404</sub>, die beide auch durch GSK phosphoryliert werden können, führt *in vitro* zu beschleunigter Aggregation und zur Ausbildung PHF-artiger Fibrillen [259].

In Hefepilzkulturen vermittelt das GSK-Analog Mds1 Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins [260]. Auch in einem Drosophila-Modell zeigen sich nach Tau-Überexpression und Phosphorylierung durch ein GSK-Analogon NFT-artige Ablagerungen [261]. Einige GSK + Tau transgene Mausmodelle zeigen eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins [245, 262], während NFT-Formation nur in wenigen Modellen erreicht wird [263].

#### *GSK, Tau und $\alpha$ -Synuklein*

Auch dem  $\alpha$ -Synuklein scheint eine Rolle bei der Phosphorylierung des Tau-Proteins zuzukommen. Jensen et al. konnten an Hirnproben von Alzheimer-Patienten nachweisen, dass  $\alpha$ -Syn an die *repeat*-Region des Tau-Proteins bindet und dessen Phosphorylierung durch Protein Kinase A stimuliert [264]. Eine andere Arbeitsgruppe fand eine zentrale Rolle von  $\alpha$ -Syn bei der GSK-vermittelten Phosphorylierung des Tau-Proteins in verschiedenen Parkinson-Modellen, die das Zellgift 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bzw. sein Abbauprodukt 1-Methyl-4-phenyl-pyridin (MPP<sup>+</sup>) zur Induktion Parkinson-ähnlicher Pathologien nutzen. In Zellkultur steigt nur in Gegenwart von  $\alpha$ -Syn der Anteil an aktivierter GSK-3 $\beta$ , während die Gesamtmenge des Enzyms unverändert bleibt. Ohne  $\alpha$ -Syn bewirkte MPP<sup>+</sup> keine Erhöhung der aktiven GSK, und folglich auch keine gesteigerte Tau-Phosphorylierung [265]. Inhibition der GSK mit Lithium oder einem spezifischen GSK-Inhibitor verlängerte das Überleben der Zellen und verminderte sowohl die Phosphorylierung des Tau-Proteins als auch die Akkumulation von  $\alpha$ -Syn [265]. Die Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass Tau,  $\alpha$ -Syn und GSK in Zellkultur heterotrimere Komplexe bilden, und dass die Tau-GSK-Interaktion in Gegenwart von  $\alpha$ -Syn gesteigert ist [265].

Im Mausmodell kann der Grad an aktiver GSK und somit die Tau-Phosphorylierung sowohl durch MPTP als auch durch Überexpression humanen  $\alpha$ -Synukleins gesteigert werden, während das Zellgift in  $\alpha$ -Syn-*knockout*-Mäusen keine derartige Wirkung zeigt. Auch hier blieb in jedem Fall die Gesamtmenge an GSK unverändert. In post-mortem Präparaten von PD-Patienten fand die Arbeitsgruppe ebenfalls vermehrt aktive GSK [265].

#### *Zusammenhänge zwischen Alzheimer und Dysregulation der GSK-3 $\beta$ -vermittelten Tau-Phosphorylierung*

Die Aktivität der GSK-3 $\beta$  wird in der Alzheimer'schen Erkrankung auf vielfältige Weise beeinflusst. In Zellkultur führt beispielsweise die Expression von APP-Fragmenten zur Überexpression von GSK-3 $\beta$  [266].

Auch konnte an Hirnschnitten von Alzheimer-Patienten ein erhöhte Aktivität der GSK festgestellt werden [252, 253], wobei andere Arbeitsgruppen dies nicht verifizieren konnten [211].

Die Identifikation einer GSK-3 $\beta$  Isoform, die mit spät einsetzender Alzheimer-Erkrankung assoziiert ist, stärkt den Verdacht eines pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen Enzym und Erkrankung [267].

Die Aktivität des Enzyms bzw. die Zahl der GSK-erzeugten phospho-*sites* kann jedoch auch indirekt moduliert werden. So erhöht die Glykosylierung des Tau-Proteins dessen Phosphorylierung durch Cdk-5 und GSK-3 $\beta$  [268], und ist insgesamt erhöht in Gehirnen von Alzheimer-Patienten [269].

Aber auch eine verminderte Dephosphorylierung kann eine Erhöhung des hyperphosphorylierten Tau-Pools zur Folge haben. Tau wird hauptsächlich durch PP2A und zu geringem Anteil durch PP1, PP5 und PP2B dephosphoryliert [270]. Mehrere Studien zeigten, dass die Dephosphorylierung des Tau-Proteins in AD-Gehirnen durch verminderte mRNA-Expression oder Aktivität der Phosphatasen herabgesetzt ist [271–274]. Neben anderen Mechanismen scheint auch die aberrante Glykosylierung des Tau-Proteins in AD-Gehirnen seine Dephosphorylierung zu vermindern [275].

Die pathologische Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins ist somit Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Tau-Kinasen, Phosphatasen, und Modulatoren der Enzymaktivität. Insgesamt machen die vorgestellten Ergebnisse eine Schlüsselrolle der GSK-3 $\beta$  in der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in verschiedenen Tauopathien wahrscheinlich.

#### *GSK-3 $\beta$ und Lithium - Möglichkeiten therapeutischer Intervention*

Seit Lithium 1996 als relativ spezifischer Inhibitor der GSK-3 $\beta$  identifiziert wurde [276, 277], haben zahlreiche Arbeitsgruppen die Substanz bezüglich ihres Effekts auf die Tau-Phosphorylierung untersucht. Die Inhibition der GSK-3 $\beta$  durch Lithium wurde in Zellkultur durch Phosphorylierung des Enzyms und verminderte Expression vermittelt [278, 279]. Sowohl in neuronaler Zellkultur [280] als auch in Ratten [281] konnte gezeigt werden, dass Lithium die Phosphorylierung des Tau-Proteins mindert. *In vitro* hatte diese Inhibition die Anlagerung von Tau an Mikrotubuli und damit deren Stabilisierung und Wachstum zur Folge [282]. In Tau-transgenen Mäusen führte die Behandlung mit Lithium nicht nur zu verminderter Tau-Phosphorylierung und Aggregation, sondern minderte bei frühem Therapiebeginn auch die axonale Schädigung und motorische Störungen [283, 284].

In einer Pilotstudie an Patienten mit milder kognitiver Störung führte eine 10-wöchige Lithiumgabe nicht zur Reduktion von phospho-Tau bzw. gesamt-Tau im Liquor [285]. Eine andere Studie wiederum konnte zeigen, dass Patienten während oder nach Lithium-Behandlung signifikant bessere Ergebnisse im *mini mental state examination* Test (MMSE) erzielten [286]. Bisher ist die Studienlage zum therapeutischen Nutzen von GSK-Inhibitoren jedoch noch unzureichend.

Insgesamt deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine zentrale Rolle sowohl der Tau-Phosphorylierung als auch des Enzyms GSK-3 $\beta$  in der Pathogenese der Tauopathien hin. Aus diesem Grund wurde dieses Enzym auch in dieser Studie zur Untersuchung der Auswirkungen der Tau-Phosphorylierung auf Aggregationsprozesse in Lösungen niedriger Molarität gewählt.

## 1.4 Matrix Metalloproteinasen und die Alzheimer'sche Erkrankung

### 1.4.1 Vorkommen und Funktion

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind eine Gruppe strukturverwandter Zink-abhängiger Endopeptidasen, die vorwiegend für die Degradierung von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) bekannt sind [287]. Die MMP-Familie umfasst bisher 25 bekannte Enzyme, die sich nach ihren Substraten in fünf Hauptgruppen untergliedern lassen:

Kollagenasen (MMP-1, -8, -13), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -10), Matrilysine (MMP-7, -26) und membrangebundene MMP (*membrane type* = MT-MMP 14-17, 23-25) [288]. Matrix-Metalloproteinasen werden als Präpro-Enzyme synthetisiert und als Zymogene sezerniert. Alle MMP bestehen aus den fünf Grundbausteinen Signalpeptid - Propeptid - katalytische Einheit - *linker* - hämopexinartige Domäne. Lediglich MMP-7 und -23 besitzen keine hämopexinartige Domäne, und MMP-21 weist keinen *linker* auf. Darüber hinaus verfügen einige MMP über weitere funktionelle Einheiten wie z.B. transmembran-Domänen [287]. Die enzymatische Aktivität der Zymogene wird durch die Interaktion zwischen katalytischer Einheit und Propeptid inhibiert. Hierbei ligiert ein zentrales Cystein des Propeptids ein für die katalytische Aktivität entscheidendes Zink-Atom, was zur Inaktivierung des gesamten Enzyms führt [289, 290].

MMP spielen in vielfältigen physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Gewebeumbau und -reparatur, Angiogenese und Morphogenese eine tragende Rolle, mit komplexer Regulation auf der Transkriptionsebene durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine [291, 292]. Ihre proteolytische Aktivität unterliegt ebenfalls einer strengen Regulation durch Zymogen-Aktivierung,  $\alpha$ -Makroglobulin und TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinasen) [287].

Matrix-Metalloproteinasen spielen auch in zahlreichen pathologischen Prozessen eine Rolle. So konnte beispielsweise eine Beteiligung von MMP-9 an Rupturereignissen atherosklerotischer Carotisplaques nachgewiesen werden [293], und die Gelatinasen MMP-2 und -9 waren überexprimiert in Biopsieproben von Plattenepithelkarzinomen des Oesophagus [294]. Weitere Erkrankungen, in denen eine Beteiligung von MMP nachgewiesen wurde, umfassen Asthma [295], Arthritis [296], zahlreiche weitere maligne Entitäten [297, 298] sowie ZNS-Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder neurodegenerative Erkrankungen [299, 300].

Lange Zeit standen die extrazellulären Funktionen der Matrix-Metalloproteinasen im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Mittlerweile gibt es jedoch zahlreiche Hinweise, die auf eine Rolle der MMP als Modulatoren von Proteinen der Zelloberfläche und Regulatoren intrazellulärer Prozesse hindeuten. So wurde beispielsweise die aktive 45 kDa-Form von MMP-1 im Nukleus und an der Außenfläche von Mitochondrien zahlreicher Zelltypen einschließlich Zellen glialen Ursprungs nachgewiesen. Das Expressionslevel variierte hierbei je nach Zellzyklusphase, was auf eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus

hindeuten könnte [301]. An Neuroblastomzellen war auch eine zentrale Rolle von MMP-9 am Zellzyklus nachweisbar. Hierbei zeigten sich spezifische intrazelluläre Verteilungsmuster des Enzyms in Abhängigkeit vom Zellzyklus, und seine Inhibition verzögerte die Mitose und verlangsamte so die Proliferation [302]. Die aktive Form von MMP-3 spielt eine tragende Rolle bei der stressinduzierten Apoptose dopaminerger Neuronen [303]. In humanen Leberzellen konnte MMP-3 in Zytosol und Nukleus in Proben normaler und zirrhotischer Organe nachgewiesen werden, wobei die aktive Form des Enzyms lediglich in den Nuklei lokalisiert war. Des Weiteren fand sich MMP-3 in Nukleus und Zytosol kultivierter hepatischer Myofibroblasten und HepG2-Zellen, wo die katalytische Aktivität des Enzyms zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt [304]. Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte ausserdem eine kurze Peptidsequenz innerhalb der MMP-3, die für die Translokation in den Nukleus entscheidend ist (*nuclear localisation signal*, NLS). Potentielle NLS fanden sich auch in einigen anderen MMP (u.a. MMP-1, -2, -8, -10). Ein intrazellulärer Nachweis liegt darüber hinaus für MMP-2, -11 und -14 vor [305–307].

### 1.4.2 Limitierte Proteolyse des Tau-Proteins bei M. Alzheimer

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass das Protein Tau in neurodegenerativen Erkrankungen neben anderen post-translationalen Modifikationen auch C-terminal trunziert wird. Dabei ist das Protein Substrat unterschiedlicher Proteasen, von denen bisher Calpain und einige Caspasen, vor allem aber Caspase-3, identifiziert wurden [308–310]. Verschiedene Caspasen spalten ein kurzes C-terminales Peptid hinter Position Asp<sub>421</sub> ab, und das entstehende Tau<sub>421</sub>-Fragment ist in der Mehrzahl der NFTs in AD-Gehirnen nachweisbar, findet sich jedoch nicht in Gehirnen gesunder Kontrollen [311–313]. Der Gehalt an Tau<sub>421</sub> in NFTs korreliert mit dem Grad an klinischen Symptomen, und das trunzierte Protein zeigt *in vitro* eine vermehrte Polymerisation gegenüber intaktem Tau [311, 312, 314]. Ein weiteres AD-spezifisches proaggregatorisches Fragment des Tau-Proteins ist Tau<sub>391</sub> [259, 315]. Der Nachweis dieses Fragments in AD-Gehirnen ist limitiert auf fortgeschrittenere Krankheitsstadien und korreliert in seiner Häufigkeit sowohl mit den Braak-Kriterien der histopathologischen AD-Diagnostik als auch mit der klinischen Symptomatik [13, 314]. Bis heute konnte die für dieses Fragment verantwortliche Protease jedoch nicht identifiziert werden [316]. Hierbei kommen zahlreiche Enzyme in Betracht, da Proteasen generell ungefaltete Proteine als Substrat bevorzugen [317].

Die beschriebenen Fragmente sind neben der Alzheimer'schen Erkrankung auch bei PSP, CBD sowie in Pick Bodies nachweisbar [318–320]. Insgesamt wird jedoch noch kontrovers diskutiert, ob die limitierte Proteolyse eher in frühen oder in späten Stadien der Tau-Aggregation auftritt, und welchen Stellenwert sie in der Pathophysiologie der Tauopathien einnimmt [321–324]. Weitere Proteasen und Fragmente müssen identifiziert und das Zusammenspiel von Tau-Trunkierung und anderen post-translationalen Veränderungen wie der Phosphorylierung genauer untersucht werden, um die Bedeutung der limitierten Proteolyse besser einstufen zu können. Von besonderer Bedeutung erscheint hierbei die Erkenntnis, dass extrazelluläre Aggregate trunzierten Tau-Proteins von Neuronen aufgenommen und auf benachbarte Neuronen übertragen werden können, wo sie die Formierung

fibrillärer Aggregate auslösen [325, 326]. In Anbetracht dieser Mechanismen erscheint es notwendig, auch extrazelluläre Proteasen hinsichtlich proaggregatorischer Einflüsse auf das Tau-Protein zu untersuchen.

### 1.4.3 MMP-1, -3 und -9 in ZNS und Alzheimer

Im ZNS werden Matrix-Metalloproteinasen von Astroglia, Mikroglia und Neuronen synthetisiert [327–329]. Ein erhöhter Grad an MMP wurde in kortikalen und hippocampalen Hirnproben [330] sowie im peripheren Blut von Alzheimer-Patienten nachgewiesen [329]. In Hirnproben von Alzheimer-Patienten ist MMP-9 immunhistochemisch in hippocampalen Neuronen [300] sowie in NFTs, senilen Plaques und Gefäßwänden nachweisbar [327]. Seine Synthese kann sowohl durch  $A\beta$  [331, 332] als auch durch Il-6 und TNF- $\alpha$  induziert werden [333–336]. Dies ist von besonderem Interesse, da sowohl Il-6 als auch TNF- $\alpha$  in Gehirn [337–340] und peripherem Blut [341–343] von Alzheimer-Patienten erhöht sind. Beide Faktoren werden nach Stimulation durch  $A\beta$  von Mikroglia und Astrozyten sezerniert [344–346]. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von MMP-9 in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung liefert seine Fähigkeit, monomeres und fibrilläres  $A\beta$ -Peptid *in vitro* und Plaques *in situ* zu degradieren [300, 347].

Eine Überexpression von MMP-3 konnte in Hirnproben von Alzheimer-Patienten im unmittelbaren Umfeld seniler Plaques nachgewiesen werden, wobei dies im Hippocampus geringer ausgeprägt war [348]. Außerdem wird das Enzym in Astrozyten und Neuronen überexprimiert, die zuvor mit  $A\beta_{1-40}$  behandelt wurden [349]. Auch die Expression von MMP-3 kann durch Il-6 und TNF- $\alpha$  stimuliert werden [350, 351]. Von Bedeutung erscheint außerdem die Tatsache, dass MMP-3 die zymogenen Formen von MMP-1, 8, 9 und 13 aktivieren kann [348].

Eine erhöhte Expression von MMP-1 konnte post-mortem im frontalen, parietalen und okzipitalen Kortex von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden [330]. Ähnlich den zuvor beschriebenen Enzymen kann auch die Synthese von MMP-1 durch Il-6 induziert werden [350, 352]. Im Falle von TNF- $\alpha$  ist dies auch möglich, erfordert jedoch, zumindest in Monozyten, die Präsenz eines weiteren Faktors, GM-CSF [353].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier besprochenen MMP im Gehirn von Alzheimer-Patienten in pathologisch veränderten Arealen überexprimiert werden, und dass ihre Synthese durch Zytokine stimuliert werden kann, die ebenfalls topisch wie systemisch bei AD-Patienten erhöht sind. Ausserdem scheinen sie eine Rolle in der Homöostase der senilen Plaques zu spielen. Ein Zusammenhang mit der Tau-Pathologie wurde bisher nicht untersucht.

## 1.5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie ist ein relativ junges Verfahren zur Erfassung des Diffusionsverhaltens einzelner Moleküle. Die Technik macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Moleküle in Lösungen nicht statisch sind, sondern sich nach der Brown'schen Moleku-

larbewegung in permanenter Bewegung befinden, abhängig von Molekülgröße, Temperatur und Zähigkeit des Mediums. Betrachtet man einen statischen, freien Fokus innerhalb einer Lösung, lassen die Schwankungen der lokalen Molekülkonzentration Rückschlüsse auf Anzahl, Diffusionszeit und damit auch Größe dieser Moleküle zu [354].

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), *fluorescence intensity distribution analysis* (FIDA) und *Scanning for intensely fluorescent targets* (SIFT) basieren auf dieser Technologie. Diese Verfahren nutzen wahlweise einen oder zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge, um fluoreszenzmarkierte Partikel in Lösungen in einem begrenzten Fokus anzuregen. Angeregte Partikel emittieren wiederum Photonen, die von Avalanche Einzelphotonendetektoren für beide Emissionswellenlängen getrennt aufgezeichnet werden.

Im Falle der FCS findet ein statischer Laserfokus von etwa 1 fl Volumen Anwendung, in dem Partikel angeregt werden können. Deren gemessene Emissionswerte lassen über verschiedene Auswertungsmethoden Aussagen über Diffusionszeit, Partikelzahl und -größe zu. In der Zweikanal-FCS werden zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, deren Foci sich komplett überlagern. Dies lässt neben Einzelanalysen der unterschiedlich markierten Partikel auch Aussagen über deren Interaktion in der Lösung zu. Der besondere Vorteil der FCS gegenüber den meisten anderen Methoden der Proteinanalytik liegt auch darin, dass Partikel selbst in subpicomolarer Konzentration noch detektiert werden können [355]. Im Gegensatz zu zahlreichen *in vitro* Methoden und Überexpressions-Modellen erlaubt dies eine Analyse des Partikelverhaltens in physiologischen Konzentrationen.

Bei pathophysiologischen Aggregationsvorgängen entstehen mitunter sehr große Aggregate, wie beispielsweise die Alzheimer-typischen PHF. Betrachtet man Lösungen mit sehr geringer Partikelkonzentration, sinkt die Wahrscheinlichkeit, solch große Aggregate in einem begrenzten Zeitintervall in einem kleinen Fokus zu erfassen. Bei der SIFT-Methode wird das untersuchte Volumen maximiert, indem der Fokus durch das Probengefäß määndriert. Dies erlaubt die Detektion seltener, großer Aggregate selbst in femto- bis attomolarer Konzentration [356, 357]. Der mobile Fokus erlaubt allerdings keine Aussage über die Diffusionszeit dieser Teilchen, sodass die Aggregatgröße über ihre Signalintensität bestimmt werden muss.

Eine detaillierte Beschreibung des Messaufbaus sowie der unterschiedlichen Auswertungsmethoden findet sich in Kapitel 2.2.7 und in Abbildung 2.1 im Material- und Methodenteil dieser Arbeit.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Die Einflüsse auf die Aggregation des Tau-Proteins in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sind vielfältig. Wenngleich die zahlreichen bisherigen Untersuchungen zu Metallionen, Phosphorylierung und limitierter Proteolyse eine Beteiligung dieser Faktoren als wahrscheinlich erscheinen lassen, ist deren genaue Bedeutung in der Pathogenese der Tauopathien bislang nicht eindeutig geklärt.

Die mangelnde Aggregationsneigung des Tau-Proteins in Abwesenheit fibrillogener Fakto-

ren macht in den meisten *in vitro* und *in vivo* Studien die Verwendung von Überexpressionsmodellen nötig, die selten die tatsächlichen Konzentrationen des Proteins in Neuronen von Alzheimer-Patienten widerspiegeln können. Auch sind die verwendeten Methoden wie Thioflavin T Assay oder Elektronenmikroskopie wenig sensitiv für die Detektion früher Aggregationsereignisse auf Einzelmolekül-Ebene.

Da sich in jüngster Zeit vermehrt Hinweise ergeben haben, dass insbesondere kleine Oligomere die pathophysiologisch bedeutsame Aggregat-Spezies verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen sein könnten, wurde in der hier vorliegenden Arbeit versucht, mit Hilfe der hochsensitiven konfokalen Einzelmolekül-Spektroskopie frühe Oligomerisationsprozesse in nanomolaren Lösungen von Tau und  $\alpha$ -Synuklein sowie den Einfluss verschiedener modulierender Faktoren auf diese Prozesse darzustellen. Nachfolgend werden die einzelnen untersuchten Punkte kurz erläutert.

### 1.6.1 Einfluss von Metallionen und organischen Lösungsmitteln auf die Tau-Aggregation

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Induktoren der Tau-Aggregation. Von besonderem Interesse war hierbei der Einfluss von Metallionen, organischen Lösungsmitteln und Detergenzien. Hierbei sollte geklärt werden:

- Verändern sich die Aggregationsneigung des Tau-Proteins im membranahen Milieu?
- Üben Metallionen einen Einfluss auf die Tau-Aggregation aus?
- Wirken Effekte von organischen Lösungsmitteln und Metallionen möglicherweise synergistisch oder antagonistisch?
- Unterscheiden sich die so generierten Aggregate in ihrer Stabilität gegenüber Detergenzien.

### 1.6.2 Einfluss der Phosphorylierung auf die Aggregationsneigung des Tau-Proteins

Tau liegt in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen in hyperphosphorylierter Form vor. Vielfach wurde spekuliert, ob und in welcher Weise die Tau-Phosphorylierung einen proaggregatorischen Einfluss auf das Protein haben könnte und welchen Enzymen hier eine Schlüsselrolle zukommt. In dieser Arbeit werden Auswirkungen der Phosphorylierung durch die Kinase GSK-3 $\beta$  vorgestellt, die vielfach mit der Tau-Pathophysiologie in Verbindung gebracht wurde. Daher sollte untersucht werden:

- Beeinflusst die Phosphorylierung das Aggregationsverhalten des Proteins auf der Oligomer-Ebene?
- Unterscheidet sich die Wirkung von organischen Lösungsmitteln und Metallionen von der am unphosphorylierten Protein?

### 1.6.3 Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein

Mehrere Autoren konnten bereits eine Interaktion von Tau und  $\alpha$ -Synuklein demonstrieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage:

- Interagieren Tau und  $\alpha$ -Syn in Lösungen niedriger Molarität?
- Welchen Einfluss übt hier der Einsatz organischer Lösungsmittel, Metallionen und der Tau-Phosphorylierung aus?
- Welchen Einfluss haben diese Faktoren auf die Anlagerung des Synukleins an präformierte Tau-Oligomere?

### 1.6.4 Inhibitoren der Tau-Aggregation

Seit längerer Zeit werden in verschiedenen Versuchsanordnungen Substanzen erprobt, die die Aggregation des Tau-Proteins unterbinden und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen sollen. In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht:

- Welchen Einfluss hat die Substanzgruppe der Imidazol[1,2- $\alpha$ ]Pyridin-Derivate (IM-PY) auf die Aggregation des Tau-Proteins in Gegenwart organischer Lösungsmittel?

### 1.6.5 Einfluss der limitierten Proteolyse auf die Tau-Aggregation

Bekannt ist, dass Tau in Neuronen durch Caspase-3 und Calpain degradiert wird, und dass diese limitierte Proteolyse womöglich einen proaggregatorischen Einfluss hat. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der limitierten Proteolyse des Tau-Proteins durch die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, -3 und -9 untersucht, die zwar bereits mit der Alzheimer'schen Erkrankung, nicht jedoch mit der Tau-Pathologie in Zusammenhang gebracht wurden. Es sollte geprüft werden:

- Ist Tau ein Substrat dieser MMP?
- Sind für die einzelnen MMP spezifische Proteolyse-Muster erkennbar?
- Übt die limitierte Proteolyse einen proaggregatorischen Einfluss auf das Tau-Protein aus?

### 1.6.6 Antikörper in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie

Die Verwendung von Antikörpern in der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie hätte großes Potential in der Diagnostik verschiedener Erkrankungen, besonders in Fällen, in denen geringe Probenmengen und wenig Antigen zur Verfügung stehen. Wie spezifisch Antigen-Antikörper-Interaktionen mit dieser Technik nachgewiesen werden können ist bis jetzt noch nicht klar. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage:

- Kann mit Hilfe spezifischer Antikörper auf Einzelmolekül-Ebene zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Protein Tau unterschieden werden?
- Kann mit Hilfe spezifischer Antikörper zwischen monomerem und oligomerem  $\alpha$ -Synuklein unterschieden werden?

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

In diesem Kapitel sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, Proteine, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe sowie sonstige biologische Materialien aufgelistet.

#### 2.1.1 Materialien, Chemikalien, Puffer, technische Geräte und Software

In Anhang 1 finden sich außerdem Auflistungen der verwendeten Materialien (Tabelle B.1), Chemikalien (Tabelle B.2), Pufferlösungen (Tabelle B.3), sowie technischen Geräte und Software (Tabelle B.4). Bei sämtlichen Chemikalien wurde auf Erwerb der höchsten verfügbaren Reinheit geachtet, alle Materialien wurden, soweit möglich, vor Gebrauch autoklaviert. Basis aller verwendeten Lösungen und Puffer war demineralisiertes, über ein Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitetes Wasser.

#### 2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Für FCS- und SIFT-Analysen wurden die zu untersuchenden Proteine mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert.

Abkürzung	Farbstoff	Hersteller	Molekulargewicht
Alexa <sup>488</sup>	Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester	Molecular Probes (Eugene, USA)	643 g/mol
Alexa <sup>647</sup>	Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester	Molecular Probes (Eugene, USA)	~1300 g/mol

Tabelle 2.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Alexa-Succinimidylester binden hauptsächlich an primäre Aminogruppen von Lysinresten und an die endständige Aminogruppe des N-Terminus des jeweiligen Proteins. In

geringem Maße gehen sie Bindungen mit aromatischen Aminen, Hydroxy- und Phenolgruppen ein. Um eine Hydrolyse in areaktive Säuren zu vermeiden, wurden Stammlösungen der hydrophilen Fluorophore mit 100% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) hergestellt. Die FCS-Eigenschaften der freien Farbstoffe in einer Verdünnung von ca. 2 nM in 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Farbstoff	Absorptionsmax. [nm]	Emissionsmax. [nm]	Anregung [kHz]	CPP [μs]	$T_{diff}$
Alexa <sup>488</sup>	495	519	488 nm, 200 μW	27	170
Alexa <sup>647</sup>	650	665	633 nm, 300 μW	16	250

Tabelle 2.2: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe in der FCS-Analyse; Diffusionszeit und Zählrate (CPP, *counts per particle*) bei einer definierten Anregungsintensität.

### 2.1.3 Proteine und biologisches Material

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine (Tabelle 2.3) und sonstige biologische Materialien (Tabelle 2.4) aufgeführt.

Abkürzung	Protein	Quelle	Molekulargewicht	c [mg/ml]
Tau	humanes Protein Tau Isoform 5 (1N4R)	eigene Herstellung	42967 g/mol	1,44
α-Syn	humanes α-Synuklein	M. Habeck (ZNP, München)	14460 g/mol	1,0
β-Syn	humanes β-Synuklein	A. Giese (ZNP, München)	14288 g/mol	1,0
BSA	bovines Serum-Albumin	Sigma (St.Louis, MO, USA)	~66 kg/mol	1,0

Tabelle 2.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Proteine.

### 2.1.4 Antikörper

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Antikörper aufgelistet (siehe Tabelle 2.5). Antikörper für *Western blot* Analysen wurden gemäß Herstellerangaben verdünnt. Antikörper für FCS Analysen wurden mit Hilfe einer Sephadex G-15 Säule (GE Healthcare) in PBS\* (siehe Tabelle B.3) umgepuffert und anschließend fluoreszenzmarkiert (siehe Kapitel 2.2.4).

biologisches Material	Quelle	LOT
GSK-3 $\beta$ Phosphokinase 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	upstate (New York, USA)	28408AU
Proteinase K	Sigma (St. Louis, USA)	
Trypsin	Sigma (St. Louis, USA)	
Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1)	Sigma (St. Louis, USA)	
Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3)	Sigma (St. Louis, USA)	
Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9)	Sigma (St. Louis, USA)	11K1507
Tau Isoform 5 cDNA	Manuela Neumann (ZNP München)	
BL 21 (DE3) RIL E.coli - Kulturen	Brigitte Kraft (ZNP München)	

Tabelle 2.4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und sonstiger biologischer Materialien.

Antikörper	Antigen	Quelle	Konzentration	LOT
T-46	humanes Protein Tau	Invitrogen (Carlsbad, USA)	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	307689
AT-8	humane Alzheimer PHF Epitop: p-Ser <sub>202</sub> , p-Thr <sub>205</sub>	Pierce Endogen (Rockford, USA)	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	HJ106852
A-11	A $\beta$ -Oligomer (polyklonal)	BIOSOURCE (Camarillo, CA)	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0600B
6E10	humanes A $\beta$ -Peptid	Acris Antibodies (Hiddenhausen)	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6L36106
15G7	humanes $\alpha$ -Synuklein	E. Kremmer (Helmholtz-Zentrum München)	2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
	Sekundärantikörper "Goat anti mouse"	Sigma (St.Louis, MO, USA)		
	Sekundärantikörper "Goat anti rat"	Sigma (St.Louis, MO, USA)		

Tabelle 2.5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

## 2.2 Methoden

Im Folgenden werden alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Methoden aufgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Methoden selbst bzw. unter Anleitung durchgeführt.

### 2.2.1 Proteinexpression

#### Tau

Die Expression rekombinanten Tau-Proteins Isoform 5 erfolgte in drei Schritten:

- Transformation und Selektion thermisch kompetenter BL21 (DE3) RIL E.coli Bakterien
- Expressionsinduktion und mechanische Lyse der Bakterienkultur
- Aufreinigung des Tau-Proteins aus dem Zelllysat

#### *Transformation und Selektion*

Der zur Transformation benötigte Tau-Vektor wurde freundlicherweise von Manuela Neumann (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, ZNP München) zur Verfügung gestellt. Die Transformation thermisch kompetenter BL21 (DE3) RIL E.coli Bakterien erfolgte durch Zugabe des Vektors, anschließende Inkubation für zehn Minuten bei 4° C, Erhitzen auf 42° C für drei Minuten und abschließendes Abkühlen auf 4° C für zwei Minuten. Danach erfolgte eine 60-minütige Inkubation in LB-Medium (siehe Tabelle B.3) ohne Antibiotikazusatz bei 37° C und Agitation. Die Kultur wurde anschließend für fünf Minuten bei 5000 U/min pelletiert, das Pellet resuspendiert und auf vorgewärmten, ampicillin- und chloramphenicolbeimpften LB-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht konnten mehrere transformierte Klone in eine weitere Übernacht-Kultur in ampicillin- und chloramphenicolbeimpftes LB-Medium überführt werden, die bei 37° C und Agitation inkubiert wurde.

#### *Expression und mechanische Lyse der Bakterienkultur*

Am Folgetag wurden 2x500 ml rich LB-Medium mit der Übernacht-Kultur beimpft und bei 37° C und Agitation inkubiert. Hierbei wurde regelmäßig die optische Dichte bei 600 nm bestimmt (OD600). Bei Erreichen einer OD600 von 0,81 bzw. 0,80 nach ca. fünf Stunden wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Nach weiteren 150 Minuten wurde die Bakterienkultur bei 5000 U/min für zehn Minuten pelletiert (Sorvall Evolution RC Zentrifuge), in 26 ml EP-Puffer (siehe Tabelle B.3) unter Zugabe des Proteaseinhibitors Complete Mini (Roche) resuspendiert und mechanisch mit einer French-Press-Apparatur (Thermo IEC) lysiert.

### *Aufreinigen des Tau-Proteins aus dem Zelllysat*

Der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 27.000 g und anschließende Sterilfiltration des Überstandes durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filtropur S-Filter (Sarstedt) abgetrennt. Das im Filtrat gelöste Tau-Protein wurde in einer FPLC-Anlage (Äkta Prime, Amersham) in einer P11 Phosphozellulose-Kationenaustauschersäule gebunden und über einen Salzgradienten 100-300 mM NaCl in EP eluiert (siehe Tabelle B.3). Hiervon wurden Fraktionen zu 2-5 ml asserviert. Anschließend wurden mit Hilfe des Anti-Tau Primäran antikörpers T46 die Fraktionen mit einem hohen Gehalt an Tau-Protein im *Western blot* identifiziert und vereinigt. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine dreistufige Fällung mit Ammoniumsulfat durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die vereinigten Tau-Fraktionen mit Ammoniumsulfat gesättigt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 50.000 rpm für zehn Minuten wurde das Pellet in EP resuspendiert und 1 Vol gesättigte EP-Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in EP\*\* (siehe Tabelle B.3) resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde für fünf Minuten bei 95° C denaturiert und über eine mit TRIS-Puffer äquilibrierte PD10-Säule umgepuffert. Für die Versuche zur limitierten Proteolyse durch MMP, Proteinase K und Trypsin wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt über eine HiLoad 26/60 Säule (Sephadex 75 prep grade, GE-Healthcare, Uppsala) mit Hilfe der FPLC-Anlage durchgeführt. Abschließend wurde die Reinheit der Probe mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe Kapitel 2.2.2) mit anschließender Coomassie Brilliant Blau Färbung sowie einem weiteren *Western blot* mit dem Anti-Tau Antikörper T46 verifiziert.

### **$\alpha$ -Synuklein**

Das Gen für humanes  $\alpha$ -Synuklein wurde in einem pET-5a Vektor analog zur Tau-Synthese in einen E.coli BL21 (DE3) RIL Bakterienstamm eingeführt. Dieser wurde vier Stunden mit IPTG induziert und durch Gefrieren, Auftauen und anschließende Sonifikation lysiert. Das Lysat wurde 15 Minuten bei 95° C inkubiert, die Zellbestandteile durch Zentrifugation mit 17.000 g abzentrifugiert und der Überstand auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde das Protein über einen 25 mM - 500 mM Salzgradienten eluiert und die vereinigten  $\alpha$ -Synuklein Fraktionen abschließend mit einer Sephacryl S-200 Gelfiltration von Salzurückständen befreit.

Die Expression und Aufreinigung von  $\alpha$ -Synuklein erfolgte durch Dr. Johannes Levin und Felix Schmidt am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, München.

## **2.2.2 Gelelektrophorese und *Western blot***

### *SDS-PAGE*

Zur näheren Charakterisierung von Proteinen sowie zu deren Konzentrationsbestimmung wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Chemikalie	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung 30%	1,6 ml	8 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-
Trenngelpuffer	-	5 ml
H <sub>2</sub> O	5,7 ml	6,7 ml
SDS-Lösung 10%	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	7 $\mu$ l	6,7 $\mu$ l
APS 10%	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteinlösungen nach Zugabe von Laemmli-Puffer für zehn Minuten bei 95° C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem (Biorad) unter Zugabe von Laufpuffer (siehe Tabelle B.3). Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und zunächst durch Anlegen einer Spannung von 80 V ca. 30 Minuten im Sammelgel verdichtet. Die Auftrennung erfolgte im Trenngel für ca. 80 Minuten bei 140 V. Als Referenz für Proteingrößen wurde der Proteinmarker PageRuler (Fermentas, Canada) eingesetzt.

#### *Coomassie Brilliant Blau Färbung*

Zur Visualisierung können die aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbung unspezifisch angefärbt werden. Hierzu wurde das Trenngel für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Agitation in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht bei 4° C und Agitation in Entfärberlösung gewaschen. Die so sichtbar gemachten Banden ermöglichen eine Einschätzung der Größe und Konzentration des jeweiligen Proteins.

#### *Western blot*

Sollte das aufgetrennte Protein durch Antikörper näher charakterisiert werden, so wurde anstelle einer Coomassie-Färbung eine *Western blot* Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die aufgetrennten Proteine in einer Blot-Apparatur (Hofer Semiphor Semidry, Amersham Biosciences) auf eine Immobilon PVDF-Membran (siehe Tabelle B.1) mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m übertragen. Die Membran wurde zuvor in 100% Methanol aktiviert und mit Blotpuffer äquilibriert. Anschließend erfolgte der Proteintransfer bei 0,56 mA / cm<sup>2</sup> Gel für 90 Minuten. Freie Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden nach dem Transfer durch einstündige Inkubation in PBS-Tween mit 5% Milchpulver geblockt, die Membran anschließend mit PBS-Tween gewaschen. Der für die Fragestellung geeignete Primärantikörper wurde entsprechend Herstellerangaben in PBS-Tween verdünnt und auf die Membran gegeben, die Inkubation erfolgte bei 4° C über Nacht. Am Folgetag wurde die Membran durch vier 15-minütige Waschzyklen mit PBS-Tween von freiem Primärantikörper gereinigt. Zur Visualisierung des Primärantikörpers wurde ein jeweils passender,

an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper entsprechend Herstellerangaben in PBS-Tween verdünnt und auf die Membran aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für drei Stunden bei Raumtemperatur. Nach Wiederholung des Waschvorganges wurde die Membran für fünf Minuten in AP-Puffer (siehe Tabelle B.3) äquilibriert. Die Detektion der antikörpermarkierten Banden erfolgte mit CDP-Star, einem Substrat der alkalischen Phosphatase, das nach Spaltung ein Lumineszenzsignal abgibt. Die Detektion dieses Signals erfolgte mit Hilfe einer Chemocam Hr 16 3200 Kamera (Intas). Die endgültige Färbung der Membran erfolgte durch Inkubation in AP-Puffer mit 1,75 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP), 3,375 mg Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 0,7% Dimethylformamid (DMF) bis zur gewünschten Bandenintensität. Abschließend wurde die Reaktion durch Abwaschen der Färbelösung mit demineralisiertem Wasser gestoppt.

### 2.2.3 Proteinbestimmung

#### *Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)*

Zur Bestimmung der Konzentration des rekombinant hergestellten Tau-Proteins wurde der BCA-Assay verwendet. Das Prinzip des BCA-Assays beruht auf der Tatsache, dass Peptidbindungen sowie die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan in der Lage sind, zweiwertige Kupfer-Ionen zu reduzieren ( $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \longrightarrow \text{Cu}^+$ ). Im alkalischen Milieu formt Bicinchoninsäure mit den einwertigen Kupfer-Ionen blauviolette Komplexe, deren Absorptionsverhalten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 562 nm (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) Rückschlüsse auf die vorliegende Proteinkonzentration zulässt. Im Gegensatz zu anderen Methoden der Proteinbestimmung wie dem Bradford-Assay, der Biuret-Methode und der Lowry-Reaktion liefert diese Methode konstantere Ergebnisse und wird weniger durch zugesetzte Detergentien beeinflusst [358]. Vorbereitend wurde zunächst die Kupfersulfat-Lösung 1:50 in BCA-Lösung verdünnt. Die Tau-Proteinprobe wurde in Verdünnungen von 1:1 und 1:10 eingesetzt, als Eichreihe diente eine sechsstufige BSA-Verdünnungsreihe (1,0 - 0,0 mg/ml). Im Ansatz wurden Tau- und BSA-Proben 1:15 in Kupfersulfat-BCA-Lösung verdünnt, drei Minuten auf einem Minishaker durchmischt und anschließend für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Absorption bei 562 nm wurde in Dreifachansätzen bestimmt und arithmetisch gemittelt.

#### *AIDA-Analyse*

Eine weitere Möglichkeit der Proteinbestimmung ist die digitale Quantifizierung eines Coomassie-gefärbten und eingescannten SDS-PAGE Gels. Hierzu wurde zunächst eine SDS-PAGE einer dreistufigen BSA-Verdünnungsreihe von 0,1 - 1 mg/ml und der Proteinprobe in einer Verdünnung von 1:1 und 1:10 durchgeführt und das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (siehe Kapitel 2.2.2). Das gefärbte Gel wurde anschließend mit Hilfe eines Epson TWAIN Scanners digitalisiert, wobei Helligkeit und Kontrastierung vom Gerät automatisch optimiert und nicht manuell verändert wurden. In der AIDA-Software wurden zunächst die Regionen der BSA-Verdünnungsreihe, der Proteinproben und des Gelhinter-

grundes manuell definiert. Die Software subtrahierte die Intensität des Gelhintergrundes von der Intensität der Probenregionen. Anschließend konnte die Intensität der Proteinproben mit der der BSA-Verdünnungsreihe verglichen werden. Das Programm ermittelt daraus die Proteinkonzentration als ein Vielfaches der BSA-Konzentration.

### 2.2.4 Proteinmarkierung

#### *Tau, $\alpha$ -Synuklein, $\beta$ -Synuklein*

Zur weiteren Analyse wurden sämtliche Proteine sowie die in Tabelle 2.5 aufgeführten Antikörper mit Alexa-488-O-Succinimidylestern und / oder Alexa-647-O-Succinimidylestern fluoreszenzmarkiert. Diese Farbstoffe binden an primäre Aminogruppen der Proteine. Die Zusammensetzung der verschiedenen Markierungsansätze findet sich in nachfolgender Tabelle. Um das Reaktionsmilieu für die Bindung der Succinimidylester zu optimieren, wurde der Ansatz in 50 mM TRIS-Puffer mit  $\text{NaHCO}_3$  auf einen pH von 7,5-8,5 eingestellt.

Protein	Farbstoff / Protein	Ansatz	Konzentration
hTau46	4:1	hTau46	30 $\mu\text{M}$
		Alexa <sup>488/647</sup>	120 $\mu\text{M}$
		$\text{NaHCO}_3$	100 mM
$\alpha$ -Synuklein	2:1	$\alpha$ -Synuklein	63 $\mu\text{M}$
		Alexa <sup>488/647</sup>	126 $\mu\text{M}$
		$\text{NaHCO}_3$	100 mM
$\beta$ -Synuklein	2:1	$\beta$ -Synuklein	63 $\mu\text{M}$
		Alexa <sup>488/647</sup>	126 $\mu\text{M}$
		$\text{NaHCO}_3$	100 mM

Tabelle 2.7: Markierungsansatz der verwendeten Proteine

Die Markierungsansätze wurden in oben genannter Zusammensetzung über Nacht bei 4° C inkubiert. Am Folgetag wurden zunächst PD10-Säulen mit 25 ml TRIS-Puffer 50 mM äquilibriert, anschließend die Markierungs-Ansätze auf die Säulen aufgetragen und die markierten Proteine mit 1,4 Vol TRIS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 500  $\mu\text{l}$  gesammelt und die Fraktionen einzeln mit der FCS-Methode bezüglich Proteinkonzentration, Diffusionszeit und Gehalt an freiem Farbstoff evaluiert. Lag der Gehalt an freiem Farbstoff in keiner Fraktion  $\leq 30\%$ , wurde der Reinigungsschritt wiederholt. Fraktionen mit  $\leq 30\%$  freiem Farbstoff und geeigneten Proteinkonzentrationen wurden vereinigt, sofort aliquotiert und bei -80° C lichtgeschützt gelagert.

#### *Antikörper*

In dieser Arbeit fanden die Tau-Antikörper T46 und AT-8, der  $\text{A}\beta$ -Antikörper 6E10 sowie die Synuklein-Antikörper 15G7 und der anti-Oligomer-Antikörper A11 Anwendung (vgl.

Tabelle 2.5). Da die verwendeten Antikörper in sehr geringen Volumina vorlagen, erfolgte deren Fluoreszenzmarkierung über Sephadex Microspin Säulen. Hierzu wurde zunächst eine Sephadex-G15 Säule mit PBS\*-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde 20  $\mu\text{l}$  Antikörper-Lösung aufgetragen, zentrifugiert und mit 10  $\mu\text{l}$  PBS\*-Puffer und erneuter Zentrifugation eluiert. Dieser Schritt diente der Reinigung und Umpufferung des Antikörpers.

Der so aufgereinigte Antikörper (ca. 30  $\mu\text{l}$ ) wurde nun einem Markierungsansatz mit einer Endkonzentration von 125 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,0125% NP40 und 39  $\mu\text{M}$  (488) bzw. 20  $\mu\text{M}$  (647) Alexa-O-Succinimidylester zugeführt. Der Markierungsansatz wurde über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Wahl der Farbstoffmenge erfolgte empirisch, da die genaue Konzentration der Antikörper nach Umpufferung nicht bekannt war.

Die Aufreinigung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers erfolgte in gleicher Weise über eine Sephadex-G50 Microspin Säule. Zur Evaluation der Antikörper-Markierung wurde eine Konzentrationsreihe des fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit der FCS-Methode evaluiert. Ziel war auch hier ein prozentualer Anteil des freien Farbstoffes von < 30%.

### 2.2.5 Evaluation der fluoreszenzmarkierten Proteine

#### *freier Farbstoff*

Um den Anteil ungebundener Fluorophore in der markierten Proteinlösung zu ermitteln, wurden direkt nach der Fluoreszenzmarkierung FCS-Messungen der Proben durchgeführt. Diesen Messungen wurden 0,2% SDS zugegeben, um Proteinadhäsion an die Wand des Reaktionsgefäßes zu unterbinden. Als Referenzwert diente eine Lösung unkonjugierter Farbstoffe, die in TRIS 50 mM vermessen wurde.

Mit Hilfe der FCS+plusEval-Software (siehe Kapitel 2.2.7) wurden zunächst die Diffusionszeiten der freien Farbstoffmoleküle in der Referenzlösung ermittelt. Bei der Auswertung der Proteinlösungen wurde dem Programm die Diffusionszeit des freien Farbstoffs vorgegeben. Das Programm errechnete mit dieser Vorgabe die Diffusionszeit einer zweiten Komponente in der Lösung, also die des markierten Proteins. Das markierte Protein weist aufgrund seines höheren Molekulargewichts deutlich höhere Diffusionszeiten als der freie Farbstoff auf. Das Programm ermittelte darüber hinaus den prozentualen Anteil der beiden Komponenten sowie die Teilchenzahl in der Lösung.

#### *Markierungsverhältnis*

Der Anteil der Fluorophore pro Protein wurde indirekt über eine Teilchenzahlbestimmung nach Proteinverdau mit Proteinase-K bestimmt. Diese Serin-Protease spaltet Peptidbindungen an der carboxylischen Seite von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren bis zu einer minimalen Peptidgröße von vier Aminosäuren [359]. Nach Bestimmung des Anteils freier Fluorophore wurden die Proben bei einer Proteinase K Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für zwei Stunden bei 37° C und Agitation inkubiert. Anschließend wurde eine FCS-Messung durchgeführt. Aus dem Anstieg der Teilchenzahl vor und nach dem Verdau ließ sich die Anzahl an Fluorophoren pro Proteinmolekül unter Berücksichtigung des freien Farbstoffes wie folgt berechnen:

$$\frac{(NT_1 - (NT_0 * (\%T_{diff1} / 100)))}{(NT_0 - (NT_0 * (\%T_{diff1} / 100)))}$$

NT<sub>0</sub> = Teilchenzahl vor Proteinase-K Verdau

NT<sub>1</sub> = Teilchenzahl nach Proteinase-K Verdau

%T<sub>diff1</sub> = Anteil freier Fluorophore vor Protein-Verdau

### 2.2.6 Protein-Phosphorylierung

Untersuchungen an Gehirnen verstorbener Alzheimer-Patienten zeigten, dass das Tau-Protein bei diesen Patienten in einer hyperphosphorylierten Form vorliegt (siehe Kapitel 1.3.1). Um den *in vitro* Aggregationsansatz des Tau-Modells näher an die Pathophysiologie des M. Alzheimer heranzuführen, wurde das rekombinant hergestellte, fluoreszenzmarkierte Tau-Protein mit Hilfe der Protein-Kinase GSK-3 $\beta$  *in vitro* phosphoryliert (im Weiteren als pTau bezeichnet). Um im folgenden Phosphorylierungseffekte von Effekten durch Inkubation und Pufferzusätze unterscheiden zu können, wurde parallel ein Scheinphosphorylierungsansatz durchgeführt (im Weiteren als *mock* Phosphorylierung bzw. mTau bezeichnet), der sämtliche Puffer und Zusätze des Phosphorylierungsansatzes bis auf das Enzym GSK-3 $\beta$  enthielt.

Im Phosphorylierungs-Ansatz wurde ein Verhältnis von 0,018 U GSK-3 $\beta$  / pmol Tau-Protein angestrebt [255]. Das Enzym lag in einer Konzentration von 200  $\mu$ g/ml in GSK-Puffer vor, bei einer vom Hersteller angegebenen Aktivität von 1000 U/mg. Der Assay wurde zweimal durchgeführt und setzte sich wie in Tabelle 2.8 dargestellt zusammen.

Assay	Protein	Ansatz
1	Tau <sup>488</sup>	9,8 $\mu$ l Tau <sub>488</sub> 5 $\mu$ l P <sub>Phos</sub> 8fach 25 $\mu$ l GSK-3 $\beta$ Stammlösung / P <sub>GSK</sub>
	Tau <sup>647</sup>	9,2 $\mu$ l Tau <sub>647</sub> 5 $\mu$ l P <sub>Phos</sub> 8fach 25 $\mu$ l GSK-3 $\beta$ Stammlösung / P <sub>GSK</sub>
2	Tau <sup>488</sup>	19,6 $\mu$ l Tau <sub>488</sub> 5 $\mu$ l P <sub>Phos</sub> 15fach 50 $\mu$ l GSK-3 $\beta$ Stammlösung / P <sub>GSK</sub>
	Tau <sup>647</sup>	18,3 $\mu$ l Tau <sub>647</sub> 5 $\mu$ l P <sub>Phos</sub> 15fach 50 $\mu$ l GSK-3 $\beta$ Stammlösung / P <sub>GSK</sub>

Tabelle 2.8: Phosphorylierungsansatz des Tau-Proteins

Die so zusammengesetzten Proben wurden für 20 Stunden bei 30° C und Agitation inkubiert. Abschließend wurde die Phosphorylierung im *Western blot* verifiziert. Hierzu diente der Nachweis eines Bandenshifts bei den phosphorylierten Tau-Proben gegenüber scheinphosphorylierten und nicht phosphorylierten Proben. Darüber hinaus konnte die Phosphorylierung im SIFT-Assay mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5.1).

### 2.2.7 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Das Konzept der fluoreszenzbasierten konfokalen Einzelmolekülspektroskopie ist seit über 30 Jahren bekannt [360–362]. Seine praktische Anwendung gelang jedoch erst mit Hilfe der in den 90er Jahren entwickelten Lasertechnologie [363, 364]. In dieser Arbeit wurde diese Technologie in Form eines Insight II Readers der Firma Evotec (Hamburg) verwendet, dessen Aufbau, Funktionsweise und Analysemöglichkeiten nachfolgend erläutert werden.

#### Aufbau und Funktionsweise des Insight II Readers

Dem Aufbau nach ist der Insight-Reader ein konfokales Mikroskop, das das Signal zweier Laser unterschiedlicher Wellenlänge auf einen Fokus von etwa 1 fl abbildet und die Emissionen so angeregter Fluoreszenzfarbstoffe für jeden Kanal einzeln aufzeichnet.

#### *Strahlengang*

Theoretisches Konzept und praktische Umsetzung des konfokalen Messaufbaus sind bereits bei Schwille et al. ausführlich beschrieben [365, 366]. In der hier verwendeten Form dienen als Lichtquellen ein Argon-Ionen-Laser der Wellenlänge 488 nm und ein Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm. Deren Signal wird zunächst in einem Dichroidspiegel vereint und über einen zweiten Dichroidspiegel sowie eine optional aktivierbare *beam scanner* Apparatur (siehe unten) in ein Wasserimmersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur geleitet. Dieses fokussiert das Laserlicht annähernd konzentrisch durch den Glasboden eines Probenträgers in das zu untersuchende Volumen. Der Fokus des Argon-Lasers hat hierbei einen Durchmesser von  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  und wird komplett in den  $\sim 0,65 \mu\text{m}$  durchmessenden Fokus des Helium-Neon-Lasers abgebildet. Aufgrund der gestreckten Form des Fokus ergibt sich ein Gesamtfokussvolumen von etwa 1 fl.

Im Fokus angeregte Fluorophore, in dieser Arbeit die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa<sup>488</sup> und Alexa<sup>647</sup>, emittieren ihrerseits ein Signal. Dieses durchläuft den Strahlengang des Laserlichts rückläufig und wird am ersten Dichroidspiegel vom Laser-Signal getrennt. Nachfolgend ist in den Strahlengang eine Lochblende (pinhole) von 70  $\mu\text{m}$  Durchmesser eingearbeitet, die das Signal aus dem Anregungsfokus vom unspezifischen Hintergrundsignal der Lösung trennen soll. Die Position des Pinholes ist in Abb. 2.1 dargestellt und entspricht der des Zwischenbildes eines normalen Lichtmikroskops. Schlussendlich wird das Emissionssignal durch einen weiteren Dichroidspiegel aufgetrennt und an zwei separaten Avalanche Photodioden (APD) detektiert. Das so ermittelte Signal wird an einen Rechner übermittelt und kann mit verschiedenen Analyse-Programmen ausgewertet werden, die weiter unten

im Detail vorgestellt werden.

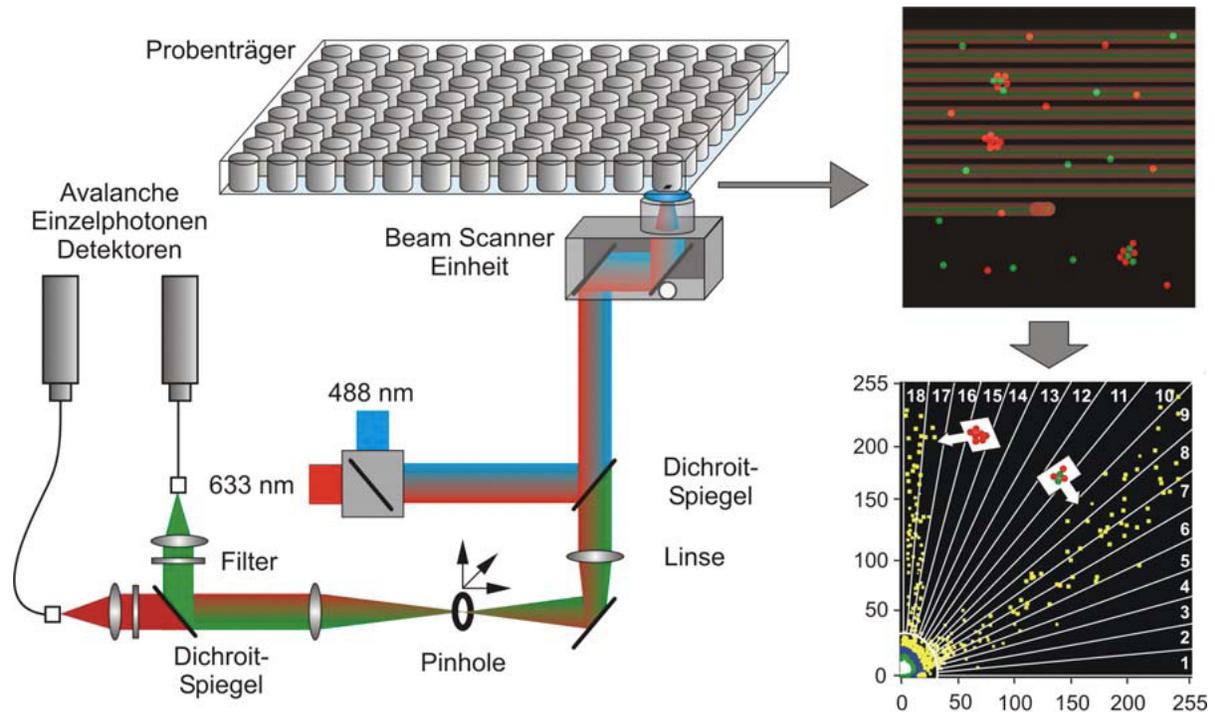


Abbildung 2.1: Messaufbau des Insight-Readers. Das Signal zweier Laser (Wellenlänge 488 nm / 633 nm) wird in einem Dichroit-Spiegel vereint und in das Messvolumen geleitet. Das von den angeregten Fluorophoren emittierte Signal wird auf gleichem Wege zurückgeleitet, über einen zweiten Dichroit-Spiegel getrennt und von zwei Photodetektoren aufgezeichnet. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale sind mehrere Filter sowie ein *pinhole* in den Strahlengang eingearbeitet. Durch Zuschalten der *beam scanner* Einheit kann der Fokus in gleichbleibender Höhe durch das Messvolumen mäandrieren, was die Detektion seltener, großer Aggregate ermöglicht.

### *SIFT*

Während die FCS mit einem stationären Fokus arbeitet, wird bei der SIFT-Methode ein großes Messvolumen gescannt. Die hierfür benötigte *beam scanner* Einheit lässt sich optional zuschalten und besteht aus einem mobilen Spiegelsystem, das mit variabler Frequenz und Amplitude, im Falle dieser Arbeit 50 Hz und 100  $\mu\text{m}$ , oszilliert. Zusätzlich wurde das Probengefäß über Mikroschrittmotoren um 2000  $\mu\text{m}$  verschoben, sodass der mobile Fokus in konstanter Höhe durch das Probenvolumen mäandriert (siehe Abb. 2.1) [69, 356].

## Justage

Um konstante und vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten, müssen die Intensität des Anregungslichtes, die Fokusgröße und die optimale Position des Pinholes möglichst konstant gehalten werden. Diese Parameter müssen vor jeder Messreihe neu kalibriert werden. Hierzu wurde ein Justage-Protokoll entwickelt, das vor jeder Messreihe durchgeführt und dessen Messwerte dokumentiert wurden.

20 Minuten vor dem Start der Justage wurden die beiden Laserquellen eingeschaltet, um eine gleichmäßige Laserleistung zu gewährleisten. Mit Hilfe eines Photodetektors und manuell einstellbaren Filtersystemen wurde die Anregungsintensität auf 200  $\mu\text{W}$  für den Argon-Laser und 300  $\mu\text{W}$  für den Helium-Neon-Laser eingestellt.

Nun wurde eine Eichlösung mit unkonjugierten Alexa<sup>488</sup>- und Alexa<sup>647</sup>-Farbstoffen in ein Probengefäß gegeben. Diese Farbstoffe besitzen bekannte und konstante Diffusions- und Emissionseigenschaften und eignen sich daher für die Justage. Mit Hilfe einer zuschaltbaren Kamera wurde die Position des Laserfokus 150  $\mu\text{m}$  oberhalb des Glasbodens des Probengefäßes verifiziert. Die Software FCS+Plus\_control der Firma Evotech erlaubte nun die Darstellung eines Justage-Parameters in Echtzeit, der *counts per particle* (CPP). Die CPP gibt an, wie viele Photonen pro Farbstoffmolekül detektiert werden und ist hauptsächlich ein Parameter für die korrekte Positionierung des Pinholes und die Fokusschärfe. Die control-Software sucht automatisch nach einer idealen Pinhole-Positionierung, der Erfolg dieser Suche spiegelt sich in einem Ansteigen der CPP wider.

Abschließend wurde eine FCS-Messung der Justageprobe durchgeführt und ausgewertet. Hierbei wurden CPP-Werte von  $\geq 30$  (488) bzw.  $\geq 20$  (647) als Kriterien einer guten Justage gewertet. Außerdem wurde die Diffusionszeit ( $t_{diff}$ ) der Fluorophore analysiert, da eine zu hohe  $t_{diff}$  Zeichen eines unscharf abgebildeten Fokus ist.  $t_{diff}$ -Werte von  $170 \pm 10$  ms für Alexa<sup>488</sup> und  $250 \pm 10$  ms für Alexa<sup>647</sup> waren hierbei akzeptabel.

## Analyseverfahren

Zur Analyse der ermittelten Daten standen die Programme FCS+Plus\_Evaluation 2.0, SIFT-2D, pooling\_ntp2D-FIDA und 2D-Fida zur Verfügung (alle Evotec technologies, Hamburg). Dieses Softwarepaket bietet verschiedene Analysemethoden, die eine Auswertung der Versuche mit jeweils unterschiedlichem Schwerpunkt ermöglichen.

### *Autokorrelation*

Die Autokorrelations-Funktion dient dazu, Fluoreszenzsignale zu identifizieren, die von Partikeln im Fokus emittiert werden. Solche Partikel führen für die Dauer ihres Diffusionsweges durch den Fokus zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, einem sog. *burst*. Die Autokorrelations-Funktion unterteilt hierzu das aufgezeichnete Signal in Zeitintervalle von  $\geq 50$  ns, die im Weiteren als *bins* bezeichnet werden. Für jedes *bin* wird die Informa-

tion „Photonen detektiert“ gleich 1, die Information „keine Photonen detektiert“ gleich 0 gesetzt. Nun werden die aufgezeichneten Werte verschiedener *bins*, die in definiertem zeitlichen Abstand zueinander liegen, miteinander multipliziert. Dieser zeitliche Abstand wird als Korrelationszeit bezeichnet. *Bins* mit einer Korrelationszeit von 50 ns sind direkt benachbart, bei 100 ns liegt je ein *bin* zwischen den beiden zu Multiplizierenden usw. Diese Multiplikationen werden über die gesamte Dauer der Messung ausgeführt und an der durchschnittlichen Fluoreszenz normiert. Wie in Abb. 2.2 schematisch dargestellt ist, erlaubt die Autokorrelationsfunktion somit die Differenzierung von *bursts* von einem gleichmäßigen oder zufällig verteilten Signal. Des Weiteren liefert diese Analyse-Methode Aussagen über die Dauer und Häufigkeit solcher *bursts*, woraus sich wiederum die Anzahl und Diffusionszeit der emittierenden Teilchen berechnen lassen. Mit Hilfe einer mathematischen Annäherung, auch *fit* genannt, können so Aussagen über bis zu vier verschiedene Partikel-Spezies pro Kanal getroffen werden. Die Qualität des *fits* ist am Parameter  $\chi^2$  ersichtlich, der die Übereinstimmung zwischen *fit* und Autokorrelationskurve widerspiegelt. Der Einsatz multipler Variablen kann jedoch potenziell die Robustheit des *fits* negativ beeinflussen.

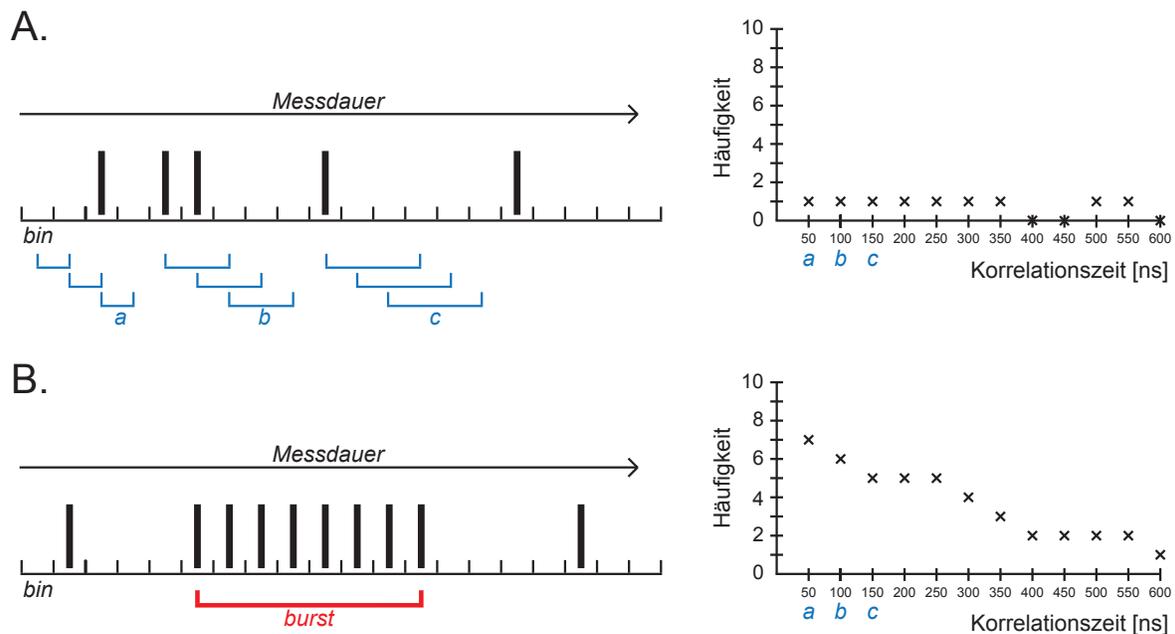


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zum Grundprinzip der Autokorrelations-Analyse. Die Zeitachse ist in *bins* zu je 50 ns unterteilt. Die senkrechten Balken stellen gemessene Photonen dar. *a* / *b* / *c* stellen beispielhaft Korrelationszeiten von 50, 100 und 150 ns dar. Rechts sind die gemessenen Ereignisse je Korrelationszeit aufgetragen. A. Zufällig verteiltes Signal ohne *burst*. Die Autokorrelations-Kurve ist konstant niedrig. B. Das mit *Fluorophor* markierte Intervall stellt den Durchtritt eines fluoreszierenden Partikels durch den Fokus, also einen *burst* dar. Entsprechend steigen die Autokorrelations-Werte gegenüber dem Hintergrund an.

### *Kreuzkorrelation*

Die Autokorrelation erlaubt Aussagen zu einfarbigen Fluorophoren, da sie die Daten der beiden APD getrennt voneinander auswertet. Will man Informationen über die Interaktion verschiedenfarbig markierter Partikel erhalten, so benötigt man eine weitere Funktion der FCS+Plus\_Evaluation Software, die Kreuzkorrelation (*cross correlation*, CC).

Die Kreuzkorrelation ist der Autokorrelationsfunktion mathematisch nahezu identisch, multipliziert jedoch die *bins* eines Kanals mit den *bins* des Anderen. Die Amplitude der Kreuzkorrelations-Kurve ist ein Maß für die Menge an gemischt fluoreszierenden Teilchen. Bei Kenntnis der Amplituden der Autokorrelationsfunktionen der beiden einzelmarkierten Teilchenspezies und damit ihrer Konzentrationen, lässt sich unter bestimmten Bedingungen aus der Kreuzkorrelationsamplitude die absolute Konzentration der doppelt markierten Teilchen in der untersuchten Lösung berechnen.

Diese Form der Datenanalyse kann auf SIFT-Messungen angewendet werden, was aufgrund der hohen Sensitivität der SIFT-Methode für große, seltene Partikel von besonderem Interesse ist.

### *Fluorescence intensity distribution analysis*

Die Fluorescence intensity distribution analysis (FIDA) dient der Analyse der spezifischen Helligkeit einzelner fluoreszierender Moleküle bzw. Aggregate. Dies geschieht durch statistische Analyse von Photonenzahlen, die in definierten Zeitsegmenten (*bins*, üblicherweise 40  $\mu$ s) erfasst werden. Die FIDA weist eine besondere Stärke bei heterogenen Partikelmischungen auf, da in der statistischen Analyse bis zu vier verschiedene Komponenten erfasst werden. Die Unterscheidung der verschiedenen Partikelspezies basiert darauf, dass jede Spezies eine spezifische Helligkeit ( $q_x$ , [kHz]) und eine spezifische Konzentration im Fokus ( $c_x$ ) aufweist, die gemeinsam die Intensität der Fluoreszenz ( $I_x$ , [kHz]) bestimmen. Verschiedene Partikelspezies werden in der FIDA also charakterisiert nach ihrer Konzentration, die der Teilchenzahl der Autokorrelations-Analyse entspricht, und ihrer spezifischen Helligkeit, die der CPP der Autokorrelations-Analyse entspricht. Auch bei der FIDA-Analyse gibt der Parameter  $Chi^2$  die Qualität der Näherungsfunktion (*fit*) wieder.

### *SIFT-2D*

Die SIFT-2D Analyse ist ein Auswertungsverfahren, das auf den Ergebnissen der 2D-FIDA-Analyse (*fluorescence intensity distribution analysis*) beruht. Die FIDA-Methode unterteilt den Datensatz einer SIFT-Messung ähnlich der Autokorrelations-Funktion in *bins*, allerdings im Falle dieser Arbeit von 40  $\mu$ s. Die Software analysiert nun, in wie vielen *bins* welche Anzahl an Photonen gemessen wurde. Außerdem summiert sie alle gemessenen Photonen zur Gesamthelligkeit ( $I_{total}$ ) der Probe auf. Da große Partikel mehr Helligkeit aussenden als Kleine, kann nun die Gesamthelligkeit in die spezifische Helligkeit ( $I_{1-4}$ ) von bis zu vier Partikeltypen unterteilt werden, die sich zusammensetzt aus der Zahl der emittierten

Photonen pro Partikelart (q) und deren Konzentration (c):

$$I_{total} = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 = c_1 * q_1 + c_2 * q_2 + c_3 * q_3 + c_4 * q_4$$

Diese Analyse erfolgt analog zur Autokorrelation anhand eines *fits*, bei dem die Zahl der zu ermittelnden Partikeltypen frei gewählt werden kann und dessen Qualität sich im Wert  $Chi^2$  widerspiegelt [367].

Die SIFT-2D Analyse verwendet nun die FIDA-Daten aus beiden Kanälen und trägt sie in ein Histogramm mit  $[\text{photons/bin}]_{488}$  als Abszisse und  $[\text{photons/bin}]_{647}$  als Ordinate auf. In diesem Histogramm erscheinen also kleine bzw. monomere Partikel nahe dem Ursprung, einfarbige Aggregate finden sich entlang der Achsen, zweifarbige Aggregate liegen in der Mitte des Histogramms.

Das Histogramm kann nun in beliebig viele Segmente zerlegt und die Photonen pro Segment gezählt werden. Für Aggregationsanalysen bietet es sich an, die ursprungsnahen, monomeren Partikel in einem eigenen Segment zu erfassen. Das restliche Histogramm wurde in dieser Arbeit in 18 Segmente unterteilt, also  $5^\circ$  pro Segment. Dies ermöglicht die Unterscheidung einfarbiger Aggregate in den achsennahen Segmenten von gemischten Aggregaten in der Mitte des Histogramms.

Auch lässt die Position der gemischten Aggregate innerhalb des Histogramms Aussagen über die Zusammensetzung der Aggregate zu. Bei einem 1:1 Verhältnis Alexa<sup>488</sup>- und Alexa<sup>647</sup>-markierter Partikel im Aggregat streut das Signal bei annähernd identischer Helligkeit der Fluorophore um die Winkelhalbierende des Histogramms, ein Überwiegen einer Teilchenart hat eine Deviation in Richtung der zugehörigen Achse zur Folge.

### 2.2.8 Statistik

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurde das Signifikanzniveau durch einen zweiseitigen ungepaarten T-Test nach Durchführung des Levene-Test zur Prüfung der Varianzgleichheit ermittelt. Bei den Untersuchungen zur SDS-Stabilität von Tau-Aggregaten wurde ein gepaarter T-Test angewendet. Zur Analyse der Tau-Aggregation nach limitierter Proteolyse wurde eine ANOVA durchgeführt. Als post-hoc Analyse wurde ein Tukey-Test angewendet. Bei allen Versuchen wurde im Falle multipler Testungen eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben, stellen die Diagramme den Mittelwert aller Versuche mit *standard error of the mean* dar.

## 2.2.9 Massenspektroskopie und Datenanalyse

### Massenspektroskopie

Unsere Versuche zu Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Tau ergaben, dass Tau ein Substrat der Matrix-Metalloproteinasen-1, -3 und -9 ist. Um die durch limitierte Proteolyse entstehenden Fragmente näher zu beschreiben, wurden Lösungen unmarkierten Tau-Proteins für eine Stunde bei 37° C mit MMP-1, -3, oder -9 (33 µg/ml) bzw. Proteinase K oder Trypsin (40 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Proteinlösungen für 15 min bei 95° C inkubiert, um die Proteasen zu inaktivieren. Der weitere Transport der Proben erfolgte auf Trockeneis nach Kühlung auf -80° C.

Anschließend wurden je 5 µl der Protein-Lösungen mit Hilfe von C4 *reversed phase* Pipettenspitzen (ZipTip, Milipore) entsalzt und konzentriert. Die Peptide wurden mit 2 µl gesättigter 2-Cyan-3-(4-hydroxyphenyl)Acrylsäure-Lösung mit 50% Acetonitril und 0,3% Trifluoressigsäure (Sigma) eluiert und auf einer hydrophoben MALDI-Probenplatte (Applied Biosystems) aufgetragen. Die Massenspektren wurden auf einem Voyager-DE STR Time of Flight (TOF) Massenspektrometer (Applied Biosystems) im linearen Modus mit externer Kalibrierung aufgezeichnet.

Die Probenvorbereitung bis zum Transport erfolgte eigenständig. Die Durchführung der Massenspektroskopie durch Dr. Lars Israel am Zentrallabor für Proteinanalytik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

### Datenanalyse

Die Datenanalyse der Massenspektroskopie erfolgte mit Hilfe der Software Data Explorer Version 4.3 (Applied Biosystems, Darmstadt) und GPMAW Version 5.11 (Lighthouse data, Odense). Diese Software ermöglicht es, den in der Massenspektroskopie ermittelten Proteingrößen bestimmte Fragmente in einer definierten Proteinsequenz zuzuordnen. Dem Programm wurde die Aminosäure-Sequenz der humanen Tau-Isoform 5 vorgegeben. Jede in der Massenspektroskopie nach limitierter Proteolyse ermittelte Proteingröße, die in > 50% der Proben, nicht jedoch in der Kontrolle nachweisbar war, wurde daraufhin in der Aminosäure-Sequenz des Tau-Proteins gesucht. Im ersten Durchgang wurden nur Fragmente akzeptiert, die den N- oder C-Terminus des Proteins beinhalten. In den so ermittelten Fragmenten wurden erneut alle in der Massenspektroskopie ermittelten Proteingrößen gesucht. Sämtliche auf diese Weise ermittelten Fragmente sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Proteinexpression und Proteinmarkierung

#### 3.1.1 Proteinexpression

##### Protein Tau

In dieser Arbeit sollten vor allem die Aggregationseigenschaften der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht werden. Für diese Analysen wurde die Tau-Isoform 5 in *E.coli* BL 21 (DE3) RIL Bakterien expriert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1). Abbildung 3.1 zeigt ein Coomassie-Gel des gereinigten Tau-Proteins. Nach der Aufreinigung wurde das Protein im *western blot* unter Verwendung des Antikörpers T46 (siehe Tabelle 3.3), der alle humanen Tau-Isoformen detektiert, als Protein Tau identifiziert (siehe Abb. 3.1).

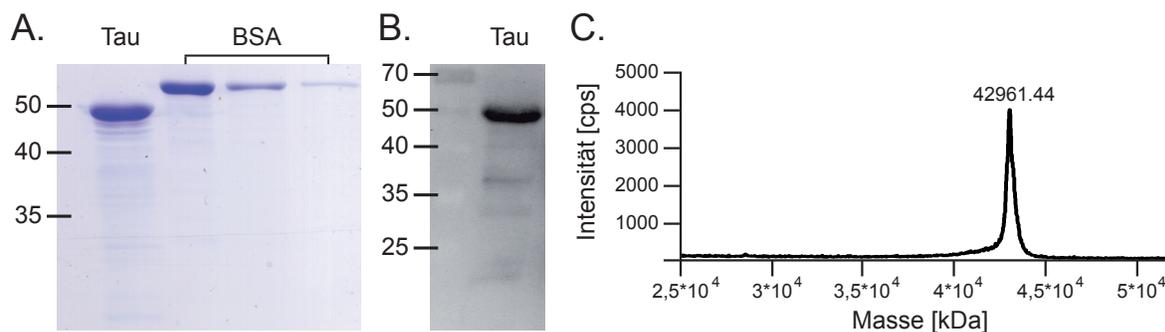


Abbildung 3.1: A. Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE. Die linke Spur zeigt das aufgereinigte Protein Tau, die drei rechten Spuren eine BSA-Verdünnungsreihe der Konzentrationen 1,0 / 0,3 / 0,1 mg/ml. B. *Western blot* des aufgereinigten Tau-Proteins mit dem Antikörper T46. C. Massenspektroskopie des aufgereinigten Tau-Proteins.

Abschließend wurde die Konzentration der Tau-Lösung mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt. Als Referenz diente hierbei eine sechsstufige Verdünnungsreihe bovines Serum-Albumins (BSA) der Konzentrationen 0,0 - 1,0 mg/ml in Intervallen von 0,2 mg. Die Bestimmung erfolgte im dreifach-Ansatz, die Konzentration der Tau-Lösung wurde mit  $1,44 \text{ mg/ml} \pm 0,11$  (Standardabweichung) berechnet

### $\alpha$ -Synuklein, $\beta$ -Synuklein

Die Proteine  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) und  $\beta$ -Synuklein ( $\beta$ -Syn) wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. Armin Giese (ZNP München) bereitgestellt.

### 3.1.2 Proteinmarkierung

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) arbeitet mit zwei Lasern verschiedener Wellenlänge, die Fluoreszenzfarbstoffe in Lösungen niedriger Molarität anregen können. Diese Fluoreszenz kann über zwei getrennte Detektoren gemessen werden. Um die Proteine  $\alpha$ -Syn und Tau für die FCS nutzbar zu machen, wurden Aliquots der Proteinlösungen die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa-488-Succinimidylester und Alexa-647-Succinimidylester beigelegt, sodass sich ein Protein / Farbstoff Verhältnis von 1/4 für Tau und 1/2 für  $\alpha$ -Syn ergab. Anschließend wurden freie Farbstoffmoleküle mit Hilfe einer PD10-Säule abgetrennt und die resultierenden Proteinlösungen mit Hilfe der FCS überprüft. Die FCS kann hierbei unter Zuhilfenahme einer Eichlösung aus freiem Farbstoff über dessen Diffusionszeit den Anteil an freiem Farbstoff in der Proteinlösung ermitteln. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Protein	Protein/Farbstoff im Markierungs- ansatz	Anteil Protein [%]	Anteil freier Farbstoff [%]	Diffusions- zeit Protein [ $\mu\text{s}$ ]
Tau <sup>488</sup>	4/1	70,4	29,6	1227
Tau <sup>647</sup>	4/1	74,3	25,7	1662
$\alpha$ -Syn <sup>488</sup>	2/1	92,4	7,6	925
$\alpha$ -Syn <sup>647</sup>	2/1	84,6	15,4	1514

Tabelle 3.1: FCS-Messung der Proteinlösungen nach Markierung.

Anschließend wurde die Zahl der Farbstoffmoleküle ermittelt, mit der jedes Protein durchschnittlich markiert ist. Hierzu wurde fluoreszenzmarkiertes Tau-Protein bzw.  $\alpha$ -Syn vor und nach vollständigem Verdau mit Proteinase K mit Hilfe der FCS analysiert. Durch die Proteolyse entstehen kleine Protein-Fragmente, die im Idealfall ein Farbstoffmolekül pro Fragment gebunden haben. Hierdurch kommt es zum Anstieg der Teilchenzahl (N) und zum Abfall der Diffusionszeit der Teilchen. Die Ratio N nach / N vor PK-Verdau gibt die

Anzahl der Fluoreszenzmoleküle pro Protein vor der Proteolyse wieder (Tabelle 3.2).

Protein	N ( $T_0$ )	N ( $T_1$ )	Fluorophore pro Tau-Protein ( $T_1 / T_0$ )	Diffusionszeit $T_0$ [ $\mu$ s]	Diffusionszeit $T_1$ [ $\mu$ s]
Tau <sup>488</sup>	5,65	15,59	3,49	1227	602
Tau <sup>647</sup>	3,74	10,05	3,27	1662	707
$\alpha$ -Syn <sup>488</sup>	2,87	8,69	3,19	925	415
$\alpha$ -Syn <sup>647</sup>	6,03	17,78	3,30	1514	488

Tabelle 3.2: FCS-Messung der Proteinlösungen vor ( $T_0$ ) und nach ( $T_1$ ) Verdau mit Proteinase K. Die Berechnung der Anzahl an Fluorophoren pro Tau-Protein erfolgte gemäß der Formel im Abschnitt 2.2.5

Im *Western blot* detektiert der Tau-Antikörper T46 fluoreszenzmarkiertes Protein Tau problemlos (Abb. 3.2). Zur Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Tau-Fraktionen wurden zwei BCA-Assays sowie eine AIDA-Analyse eines eingescannten Coomassie-Gels durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3). Im Mittel ergaben diese Versuche eine Konzentration von 0,61 mg/ml für Tau<sup>488</sup> und 0,65 mg/ml für Tau<sup>647</sup>.

## 3.2 Phosphorylierung des Tau-Proteins

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer intraneuronalen Akkumulation des Tau-Proteins einher. Im Falle der Alzheimer-Demenz liegt das Tau-Protein in hyperphosphoryliertem Zustand vor. Neben anderen Proteinkinasen ist hierfür vorwiegend das Enzym Glykogen-Synthase-Kinase  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) verantwortlich (siehe Kapitel 1.3.2). Um die Auswirkungen der Hyperphosphorylierung auf die Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins untersuchen zu können, wurde fluoreszenzmarkiertes Tau für 20 Stunden mit GSK- $3\beta$  inkubiert, eine Kontroll-Lösung enthielt alle Komponenten und Puffer dieses Reaktionsansatzes bis auf die Kinase selbst (siehe Kapitel 2.2.6). Die *Western blot* Analyse mit dem Tau-Antikörper T46 (Abb. 3.2) zeigt deutlich einen Bandenshift des phosphorylierten Tau-Proteins gegenüber dem GSK $3\beta$ -freien Ansatz. Letzterer läuft auf Höhe des normalen, fluoreszenzmarkierten Tau-Proteins.

## 3.3 Analyse des phosphorylierten Tau-Proteins

### 3.3.1 Aggregationsanalyse

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Aggregationseigenschaften des phosphorylierten (pTau) mit denen des scheinphosphorylierten Tau-Proteins (mTau, siehe Kapitel 2.2.6)

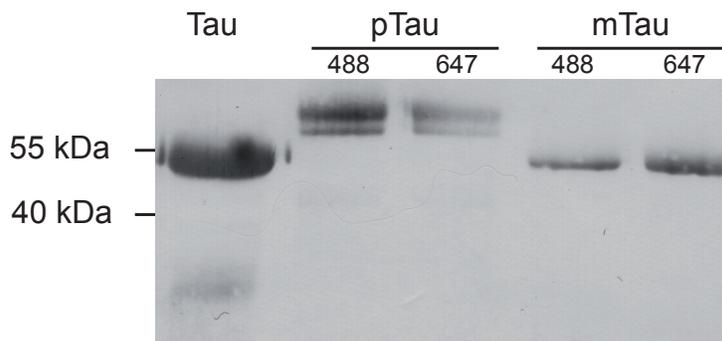


Abbildung 3.2: *Western blot* des Phosphorylierungsansatzes. Aufgetragen sind Protein Tau<sup>647</sup> (Tau) als Kontrolle sowie phosphoryliertes (pTau) und scheinphosphoryliertes, fluoreszenzmarkiertes Tau (mTau). Während Tau und mTau sich hinsichtlich ihrer Laufhöhe nicht unterscheiden, zeigt das phosphorylierte Protein einen deutlichen Bandenshift.

verglichen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass organische Lösungsmittel wie DMSO und dreiwertige Metallionen wie  $\text{Al}^{3+}$  einen starken proaggregatorischen Einfluss auf Tau in nanomolaren Lösungen haben und zur Ausbildung verschiedener Aggregattypen führen [368]. In vier Versuchen wurden daher die Aggregationseigenschaften von pTau und mTau in Gegenwart von 1% DMSO, 10  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  und Kombinationen der beiden Aggregationsinduktoren quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der SIFT- und der Kreuzkorrelations-Analyse. Da die Kreuzkorrelation frühe Aggregationsprozesse sensitiver detektiert, sind im Folgenden nur Kreuzkorrelations-Daten abgebildet. Die SIFT-Analyse ergab vergleichbare Ergebnisse und ist tabellarisch im Anhang angefügt (Tabellen C.1, C.2).

Auch in dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass 1% DMSO die Aggregation von Tau induziert. Das Protein mTau zeigt dabei eine deutlich höhere Aggregationsneigung als pTau ( $p < 0,001$ , Abb. 3.3 A.). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem organischen Lösungsmittel Ethanol erzielt (siehe Tabellen C.1, C.2). Im zeitlichen Verlauf zeigt sich die DMSO-induzierte Tau-Aggregation als kontinuierlicher, linearer Prozess (Abb. 3.7).

In Gegenwart von 10  $\mu\text{l}$   $\text{Al}^{3+}$  hingegen aggregiert das phosphorylierte Protein deutlich stärker ( $p < 0,05$ ). Hierbei liegt das Aggregationsniveau für mTau und pTau über dem der organischen Lösungsmittel, die Aggregation erfolgt überwiegend binnen der ersten 15 Minuten und erreicht dann ein stabiles Niveau (Abb. 3.7).

Die Kombination von  $\text{Al}^{3+}$  und DMSO zeigt bei mTau einen geringen synergistischen Effekt, pTau aggregiert jedoch auch unter diesen Bedingungen stärker ( $p < 0,05$ ).

In der SIFT-2D Analyse zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Oligomer-Spezies in Abhängigkeit vom verwendeten Induktor. Während DMSO-induzierte Aggregate aus wenigen Proteinen bestehen, entstehen in Gegenwart von  $\text{Al}^{3+}$  große, intensiv fluoreszierende Oligomere (Abb. 3.3 B). Eine FIDA der Fluoreszenzintensität der Tau-Aggregate ergab in Gegenwart von DMSO Oligomere, die bei pTau aus 5-17, bei mTau aus 25-60 Molekülen bestehen (nicht gezeigt).  $\text{Al}^{3+}$  führt zur Ausbildung von Aggregaten aus durchschnittlich 100 Molekülen innerhalb der ersten 15 Minuten.

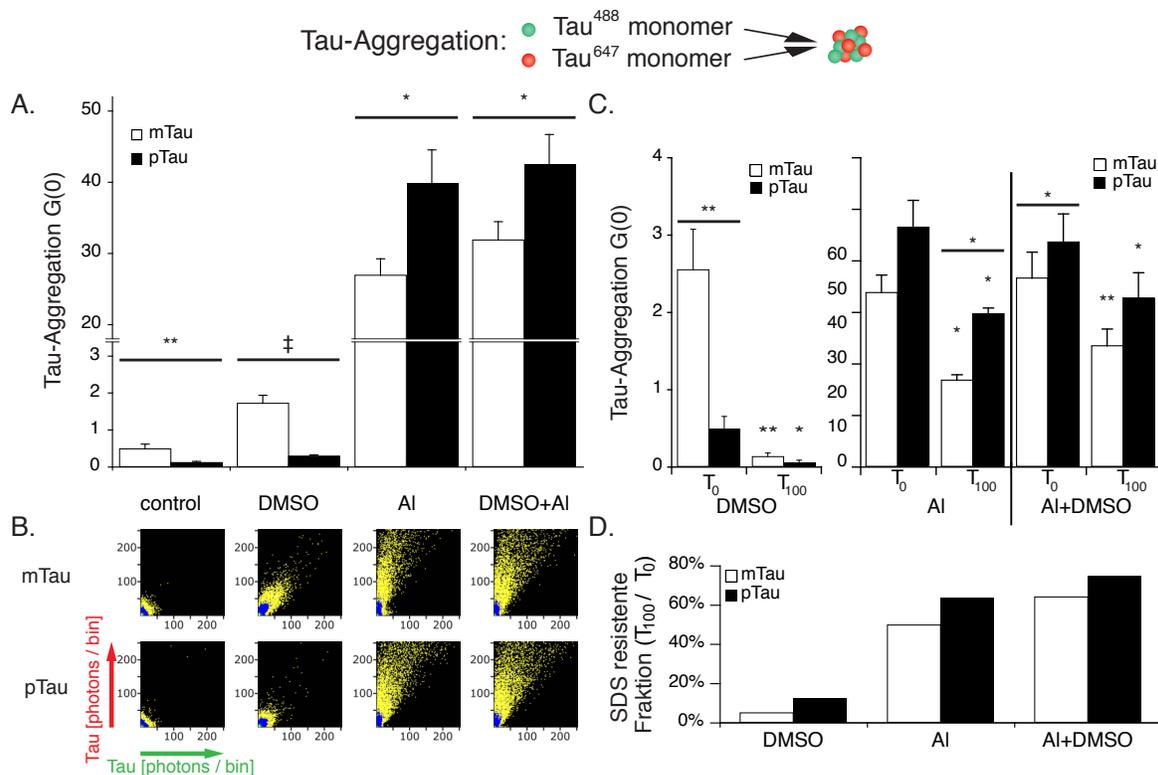


Abbildung 3.3: Aluminium induziert die Formation SDS-stabiler Tau Oligomere insbesondere nach Phosphorylierung des Proteins. A. 10  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  induziert eine deutlich stärkere Aggregation von Tau als 1% DMSO. In Gegenwart von DMSO aggregiert mTau stärker als pTau, während  $\text{Al}^{3+}$  eine stärkere Aggregation von pTau induziert (n=4; 15 Proben). B. 2D-Histogramme der detektierten Photonen zeigen, dass DMSO zur Ausbildung kleinerer Oligomere führt als  $\text{Al}^{3+}$ . C. Quantifizierung der gebildeten Aggregate vor ( $T_0$ ) und 100 min nach ( $T_{100}$ ) Zugabe von SDS. Symbole über den Fehlerbalken zeigen signifikante Unterschiede zwischen  $T_0$  und  $T_{100}$ , Symbole über den breiten Balken signifikante Unterschiede zwischen mTau und pTau (n=2; 7 Proben). D. SDS-resistente Fraktion, berechnet als  $T_{100}/T_0$ .  $\text{Al}^{3+}$ -induzierte Aggregate zeigen eine höhere Resistenz als DMSO-Induzierte. Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ‡ =  $p < 0,001$ .

Im Anschluss an die Aggregationsstudien wurde das Verhalten der gebildeten Tau Oligomere nach Zugabe von 0,2% SDS untersucht. Vorversuche zeigten, dass SDS die DMSO-induzierte Aggregation von pTau und mTau ab einer Konzentration von  $\geq 0,05\%$  inhibiert (Abb. 3.4).

Im Hauptversuch wurde jeder Probe nach Abschluss der Aggregationsmessung SDS in einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben. Der Ansatz wurde nach 100 Minuten erneut gemessen ( $T_{100}$ ). Anschließend wurde die Kreuzkorrelations-Amplitude des letzten Meanders der Aggregationsmessung ( $T_0$ ) mit  $T_{100}$  verglichen (Abb. 3.3 C). Hierbei zeigt sich eine deutliche Reduktion der DMSO-induzierten Aggregate auf  $< 20\%$  (SDS-resistente Fraktion, Abb. 3.3 D).  $\text{Al}^{3+}$ -induzierte Aggregate weisen hingegen eine deutlich höhere Resistenz

gegen SDS auf.

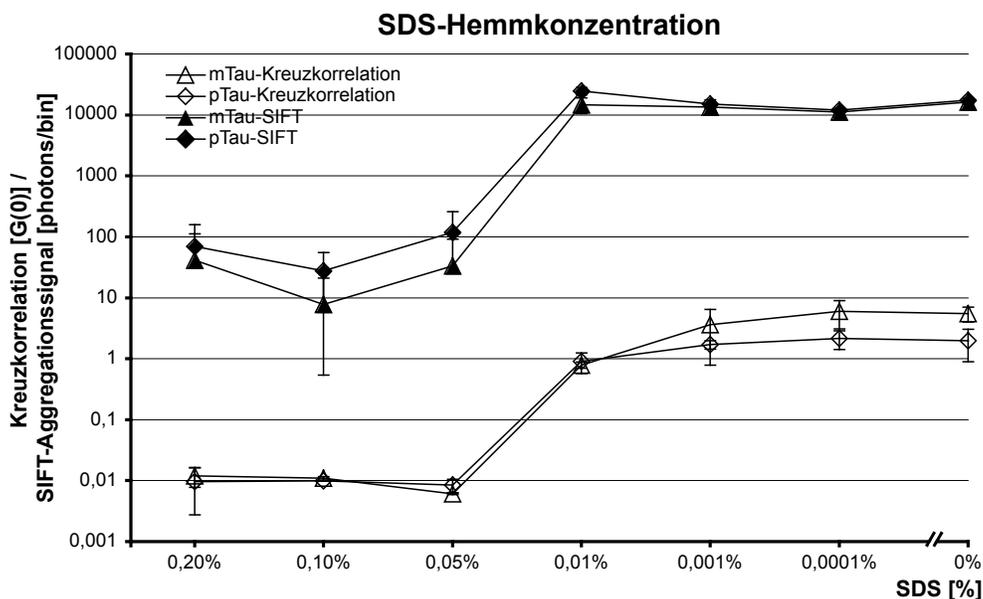


Abbildung 3.4: Tau-Aggregation in Gegenwart von SDS in absteigender Konzentration, induziert durch 1% DMSO. Sowohl für pTau als auch für mTau liegt die minimale Hemmkonzentration bei  $\geq 0,05\%$  SDS

### 3.3.2 Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein

Pathologische Aggregate der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein können in einigen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.1.3). Da es sich in beiden Fällen um zytoplasmatische Proteine handelt, die teilweise auch gemeinsame Aggregate bilden, sind Interaktionen zwischen diesen Proteinen von besonderem pathophysiologischen Interesse. In der folgenden Versuchsreihe wurde die Koaggregation monomeren  $\alpha$ -Synukleins<sup>647</sup> ( $\alpha$ -Syn<sup>647</sup>) mit monomeren pTau<sup>488</sup> und mTau<sup>488</sup> in Gegenwart von 1% DMSO und dreiwertigen Metallionen in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  untersucht. Auch hier sind ausschließlich Kreuzkorrelations-Daten abgebildet, die SIFT-Daten zeigten im Allgemeinen vergleichbare Ergebnisse und sind tabellarisch im Anhang angefügt (siehe Tabellen C.3, C.4).

In Abwesenheit von Aggregationsinduktoren zeigt sich nahezu keine Interaktion der beiden Proteine (Abb. 3.5). DMSO induziert die Koaggregation von pTau und mTau mit  $\alpha$ -Syn, wobei die Phosphorylierung des Tau-Proteins keinen signifikanten Unterschied bewirkt. Die Koaggregation erfolgt vorwiegend in den ersten 15 Minuten und erreicht dann ein stabiles Niveau (Abb. 3.7).

In Gegenwart dreiwertiger Metallionen zeigt pTau eine deutlich ausgeprägtere Koaggregationsneigung als mTau ( $\text{Fe}^{3+}$   $p < 0,001$ ;  $\text{Al}^{3+}$   $p < 0,001$ ). Bei Kombination von Metallionen

und DMSO gleicht sich das Koaggregationsniveau von mTau dem des pTau an, ein signifikanter Unterschied besteht hierbei nur noch bei der Kombination von  $\text{Al}^{3+}$  + DMSO ( $p < 0,05$ ). Die Kombination der beiden Induktoren führt außerdem zur schnelleren Ausbildung von Koaggregaten, insbesondere bei mTau (Abb. 3.7).

Auch in dieser Versuchsreihe zeigt die SIFT-2D Auswertung einen deutlichen Unterschied der gebildeten Koaggregate in Abhängigkeit vom Induktor. So erscheinen vor allem  $\text{Al}^{3+}$ -induzierte Oligomere deutlich größer als solche, die sich in Gegenwart von 1% DMSO formieren.

Um die Stabilität der so entstandenen Tau und  $\alpha$ -Syn Koaggregate zu prüfen, wurde den Koaggregations-Experimenten nach Abschluss der oben dargestellten Messung SDS in einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben und der Ansatz nach 100 Minuten erneut gemessen ( $T_{100}$ , Abb. 3.5 B). Die letzte Messung des Aggregationsansatzes wurde hierbei als Ausgangswert verwendet ( $T_0$ ). Während nach SDS-Zugabe weniger als 10% der DMSO-induzierten Koaggregate verbleiben, zeigen die Metallionen-induzierten Aggregate eine zumindest partielle Persistenz in SDS (Abb. 3.5 C). Wenngleich die SDS-resistente Fraktion bei  $\text{Fe}^{3+}$  am höchsten erscheint, ist zu beachten, dass die Gesamtzahl der resistenten Aggregate bei  $\text{Al}^{3+}$  aufgrund des insgesamt höheren Koaggregationsniveaus deutlich größer ist.

### 3.3.3 Koaggregation von Tau Oligomeren mit monomerem $\alpha$ -Synuklein

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen bereits, dass sich die Koaggregationsneigung von pTau und mTau mit  $\alpha$ -Syn je nach verwendetem Aggregations-Induktor unterscheidet. In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob dieser Unterschied auch bei präformierten Tau Oligomeren besteht. Hierzu wurden pTau<sup>488</sup> und mTau<sup>488</sup> in Gegenwart von 1% DMSO und 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  bzw.  $\text{Al}^{3+}$  für 90 Minuten vorinkubiert und anschließend monomeres  $\alpha$ -Synuklein<sup>647</sup> zugegeben. Wie in den vorangegangenen Kapiteln sind ausschließlich Kreuzkorrelations-Daten abgebildet, die SIFT-Daten zeigten im Allgemeinen vergleichbare Ergebnisse und sind tabellarisch im Anhang angefügt (siehe Tabellen C.5, C.6).

In dieser Versuchsreihe zeigt sich eine Induktion der Koaggregation von Tau Oligomeren und monomerem  $\alpha$ -Syn durch 1% DMSO ( $p < 0,05$ ), die bei mTau stärker ausgeprägt ist als bei pTau ( $p < 0,05$ , Abb. 3.6 A). Auch hier erfolgt die Oligomerisation überwiegend während der ersten 15 Minuten und erreicht dann ein stabiles Niveau (Abb. 3.7).

In Gegenwart der Metallionen, und besonders von  $\text{Al}^{3+}$ , zeigt sich hingegen ein höheres Koaggregationsniveau von pTau und  $\alpha$ -Syn ( $\text{Fe}^{3+}$   $p < 0,01$ ;  $\text{Al}^{3+}$   $p < 0,001$ ). Auch in dieser Versuchsreihe konnte das Koaggregationsniveau von pTau und mTau durch Kombination von DMSO und Metallionen angeglichen werden, im Fall von  $\text{Al}^{3+}$  war der Unterschied jedoch nach wie vor signifikant ( $p < 0,01$ ).

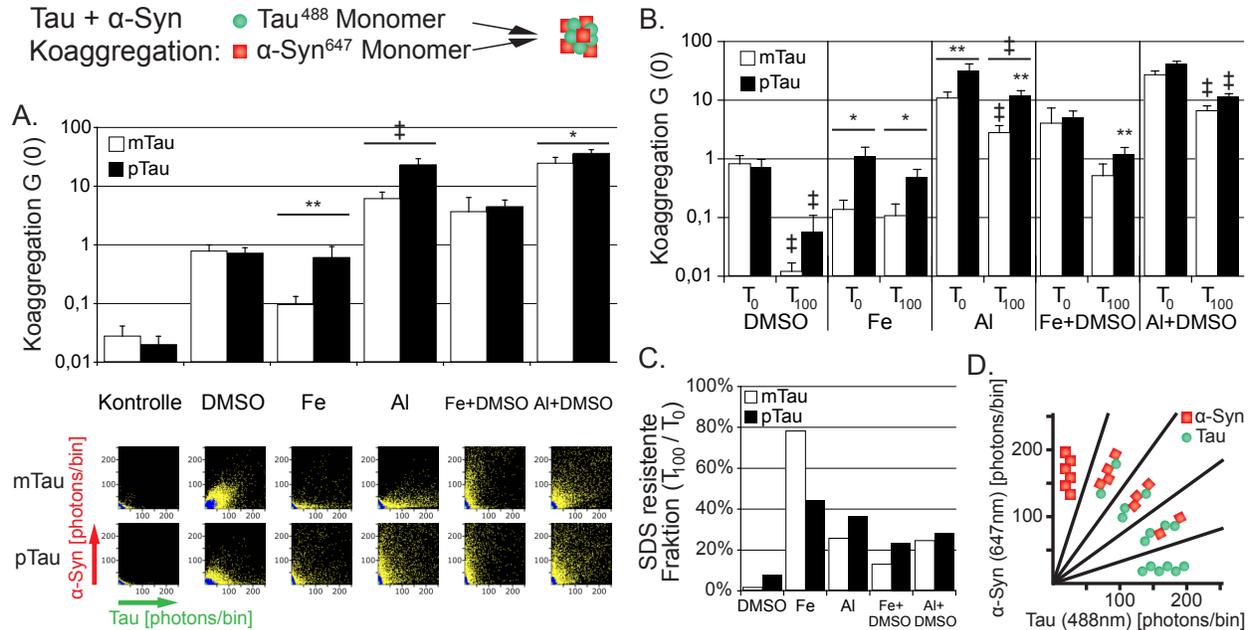


Abbildung 3.5: Al<sup>3+</sup> bewirkt eine stärkere Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn als DMSO und Fe<sup>3+</sup>, insbesondere nach Phosphorylierung des Tau-Proteins. A. 1% DMSO und 10  $\mu$ M Fe<sup>3+</sup> zeigen milde proaggregatorische Effekte, Al<sup>3+</sup> bewirkt eine starke Koaggregation der Proteine. 2D-Histogramme zeigen die Ausbildung größerer Aggregate in Gegenwart von Al<sup>3+</sup> gegenüber DMSO, während dieser Effekt bei Fe<sup>3+</sup> weniger deutlich ausgeprägt ist. B. Quantifizierung der gebildeten Koaggregate vor (T<sub>0</sub>) und 100 min nach (T<sub>100</sub>) Zugabe von SDS. Symbole über den Fehlerbalken zeigen signifikante Unterschiede zwischen T<sub>0</sub> und T<sub>100</sub>, Symbole über den breiten Balken signifikante Unterschiede zwischen mTau und pTau. C. SDS-resistente Fraktion, berechnet als T<sub>100</sub>/T<sub>0</sub>. Metallionen-induzierte Koaggregate zeigen eine höhere Resistenz als DMSO-Induzierte. D. Schematische Darstellung des Erscheinungsbildes monochromer und gemischter Aggregate in der SIFT-2D Analyse. Monochrome Aggregate sind entlang der Achsen, gemischte Aggregate in der Mitte des Histogramms abgebildet. Signifikanzniveau: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; ‡ = p < 0,001. n = 4; 16 Proben.

Ähnlich der Versuchsreihe mit monomerem Tau zeigt sich auch hier ein Unterschied der gebildeten Oligomere in der SIFT-2D Auswertung. So induzieren Metallionen, und insbesondere  $\text{Al}^{3+}$ , die Formation deutlich größerer Koaggregate von Tau und  $\alpha$ -Syn als DMSO. Darüber hinaus führt die Kombination der beiden Induktorklassen zur rascheren Ausbildung von Koaggregaten (Abb. 3.7).

Aufgrund des deutlichen Unterschiedes der Koaggregation von pTau und mTau wurde auch hier die Aggregatstabilität durch Zugabe von SDS getestet. Während nach SDS-Zugabe weniger als 10% der DMSO-induzierten Koaggregate verbleiben, zeigen die Metallionen-induzierten Aggregate eine zumindest partielle Resistenz gegen SDS (Abb. 3.6 B,C).

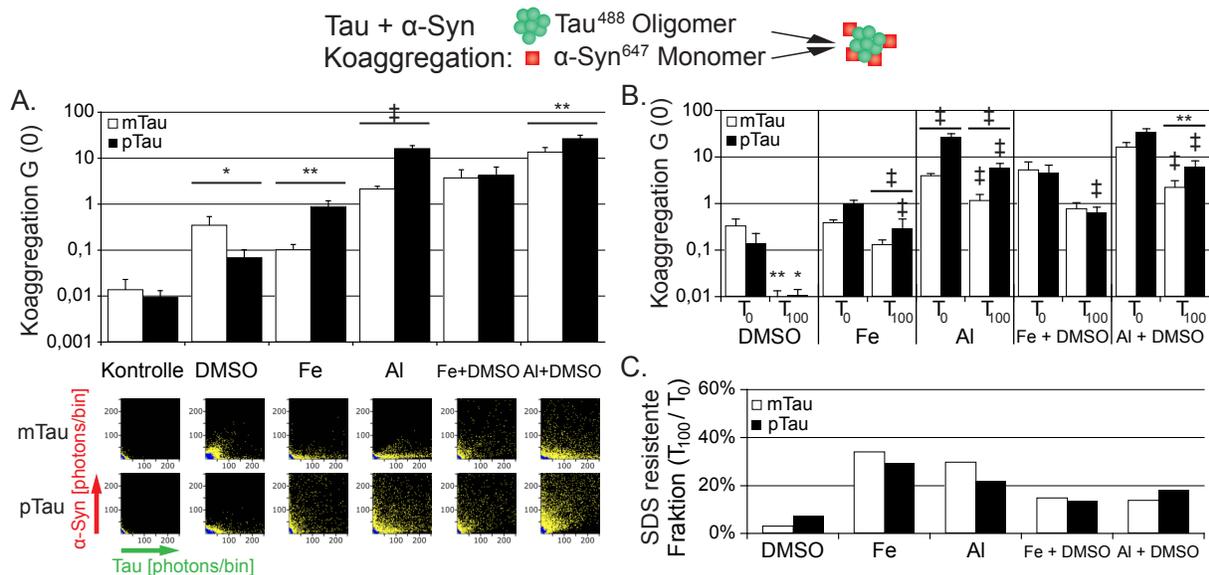
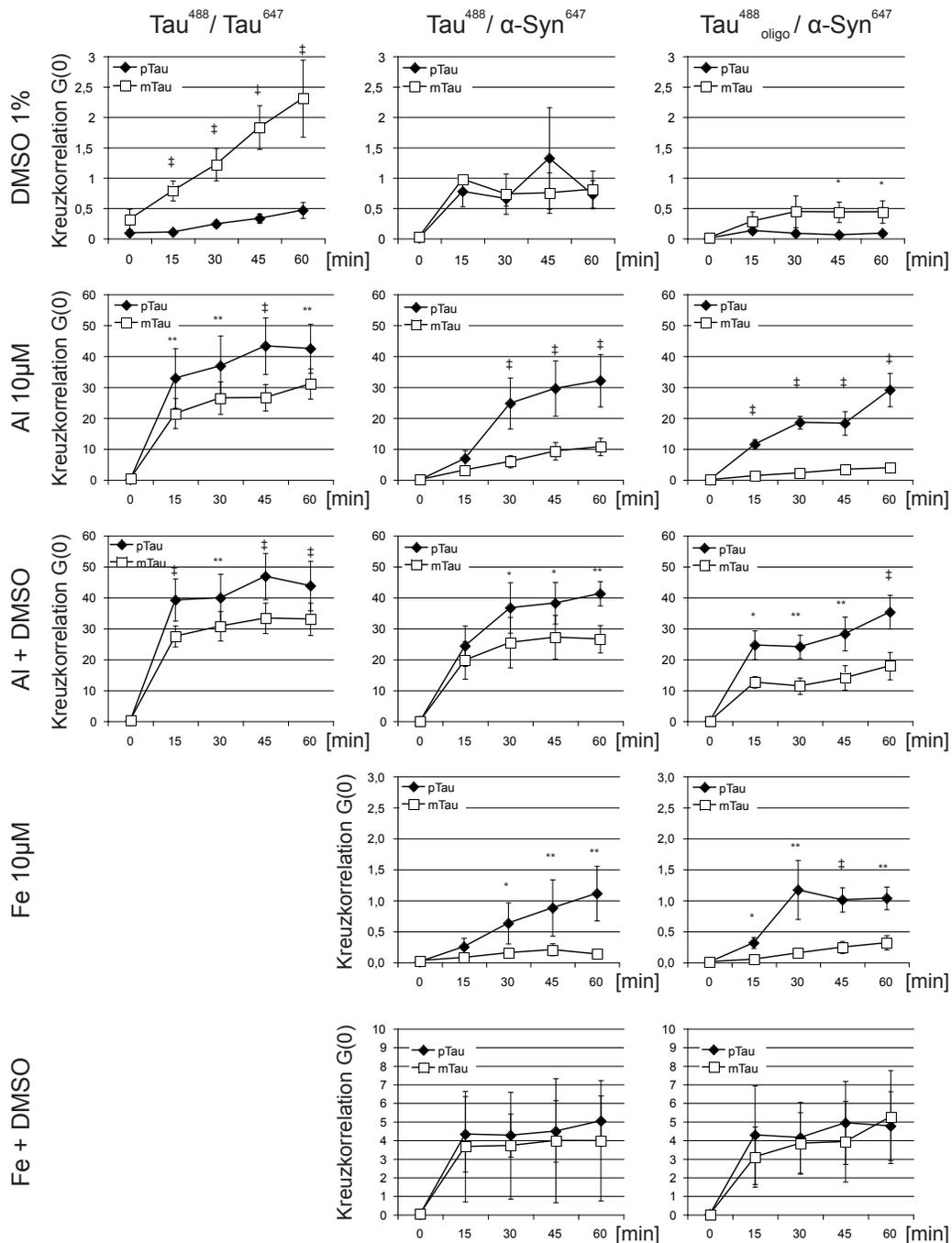


Abbildung 3.6: In Gegenwart von Metallionen koaggregiert monomeres  $\alpha$ -Syn stärker mit pTau Oligomeren. A. 1% DMSO und 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  zeigen einen milden proaggregatorischen Effekt,  $\text{Al}^{3+}$  hingegen induziert eine deutliche Koaggregation besonders von pTau und  $\alpha$ -Syn. 2D-Histogramme zeigen die Ausbildung größerer Aggregate in Gegenwart von  $\text{Al}^{3+}$  gegenüber DMSO, während dieser Effekt bei  $\text{Fe}^{3+}$  weniger deutlich ausgeprägt ist. B. Quantifizierung der gebildeten Koaggregate vor ( $T_0$ ) und 100 min nach ( $T_{100}$ ) Zugabe von SDS. Symbole über den Fehlerbalken zeigen signifikante Unterschiede zwischen  $T_0$  und  $T_{100}$ , Symbole über den breiten Balken signifikante Unterschiede zwischen mTau und pTau. C. SDS-resistente Fraktion, berechnet als  $T_{100}/T_0$ . Metallionen-induzierte Koaggregate zeigen eine höhere Resistenz als DMSO-Induzierte. Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ‡ =  $p < 0,001$ .  $n = 5$ ; 20 Proben.



Abbildungung 3.7: Kinetik der Aggregations- und Koaggregationsversuche mit phosphoryliertem Protein Tau und  $\alpha$ -Synuklein. In Spalte Tau<sup>488</sup>/Tau<sup>647</sup> ist die Tau-Aggregation, in Spalte Tau<sup>488</sup>/ $\alpha$ -Syn<sup>647</sup> die Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn Monomeren abgebildet. Die Kinetik der Koaggregation von Tau Oligomeren mit monomeren  $\alpha$ -Syn ist in Spalte Tau<sup>488</sup><sub>oligo</sub>/ $\alpha$ -Syn<sup>647</sup> dargestellt. Signifikanzniveau: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; ‡ = p < 0,001.

## 3.4 Inhibitoren der Tau-Aggregation

In dieser Versuchsreihe sollten Substanzen (*compounds*) identifiziert werden, die die Aggregation des Tau-Proteins *in vitro* inhibieren können. Hierzu wurden 9 *compounds* aus der Gruppe der Imidazol[1,2- $\alpha$ ]Pyridin-Derivate (IMPY) ausgewählt und in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  und 10 nM getestet. IMPYs verfügen über ein zentrales Gerüst mit zwei variablen Resten  $R_1$  und  $R_2$ , die mit unterschiedlichen Substituenten konjugiert werden können (siehe Abb. 3.8).

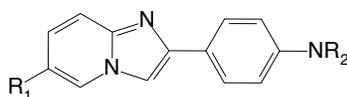


Abbildung 3.8: Grundgerüst der Imidazol-Pyridin-Derivate. An die Positionen  $R_1$  und  $R_2$  können unterschiedliche Substituenten konjugiert werden.

Die *compounds* wurden in den oben angegebenen Konzentrationen in 50 mM TRIS, 1% DMSO vorgelegt, eine oligomerfreie Lösung aus Tau<sup>488</sup> und Tau<sup>647</sup> in gleichem Verhältnis zugegeben und die Messung gestartet. Testreihen in 50 mM TRIS mit und ohne 1% DMSO wurden in jedem Versuch als *high control* und *low control* mitgeführt. Es wurden immer vier Substanzen pro Versuch im vierfach-Ansatz getestet, insgesamt wurde jede Substanz viermal untersucht. In der Auswertung wurde die *low control* (TRIS 50 mM) gleich 0%, die *high control* (TRIS 50 mM + 1% DMSO) gleich 100% gesetzt.

Um eine Störung der Messung durch die *compounds* selbst auszuschließen, erfolgte eine Leermessung der Substanzen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ . Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl der ausgewählten *compounds* eine messbare Eigenfluoreszenz besitzt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in einem weiteren Schritt das Kreuzkorrelations- und SIFT-Signal der *compounds* mit dem der *high controls* (Tau + 1% DMSO) aller durchgeführten Versuche verglichen. Alle *compounds* mit Ausnahme der Substanz BSc 2948 zeigten in der Kreuzkorrelations-Analyse einen der Tau-Lösung vergleichbaren Kreuzkorrelations-Wert. In der SIFT-Analyse erreichten lediglich die Substanzen BSc 2890, BSc 3702 und BSc 3912 Signalstärken bei 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , die denen der Tau-Lösung vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Auswertung im Hauptversuch mit der SIFT-Analyse bei einer maximalen *compound*-Konzentration von 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  durchgeführt.

Im Hauptversuch wurden zunächst fünf Substanzen mit unterschiedlichen  $R_1$ -Substituenten und einem Pyrrolidin an  $R_2$  untersucht (Abb. 3.9, Substituenten siehe Abb. 3.11). Hierbei zeigen sich Ethin und Methylthioether als wirksamste Substituenten an Position  $R_1$ . Weder das Halogen Fluor noch eine Methyl- oder Nitrogruppe vermögen das Aggregationsniveau auf unter 50% der *high control* zu senken.

In einem weiteren Schritt wurden drei Substanzen mit den R<sub>2</sub>-Substituenten Iod, Amin und Diethylamin getestet, von denen das Diethylamin die stärkste Wirkung zeigt (siehe Abb. 3.9). Als R<sub>1</sub>-Substituent dient hierbei das Halogen Iod.

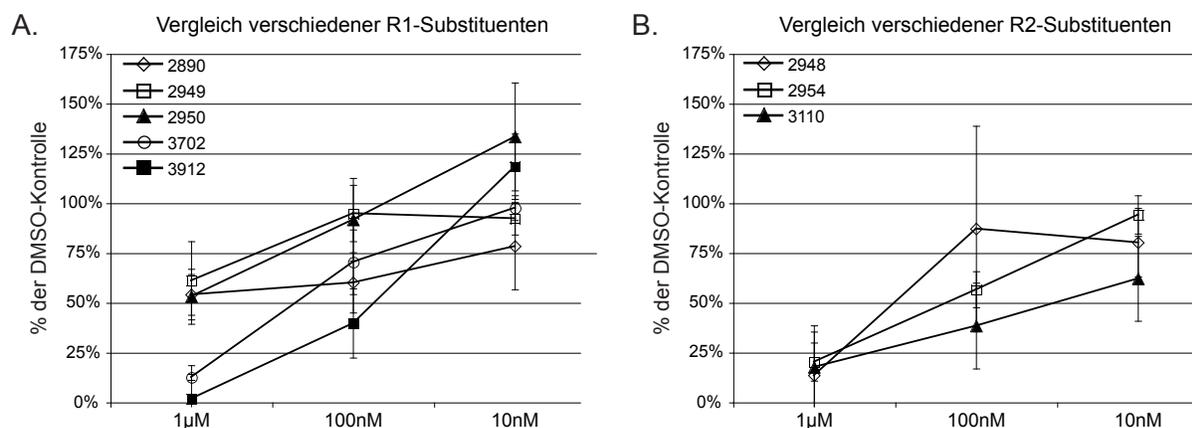


Abbildung 3.9: Inhibition der Tau-Aggregation durch verschiedene IMPYs. A. Unter den R<sub>1</sub>-Substituenten zeigen sich die Substanzen BSc3912 und BSc3702 am wirksamsten. B. Die getesteten R<sub>2</sub>-Substituenten erweisen sich allesamt als wirksam, am effektivsten senkt die Substanz BSc 2948 die Tau-Aggregation.

Da die Substanz BSc 3702 sehr gute und stabile antiaggregatorische Eigenschaften aufweist, wurde ihr R<sub>2</sub>-Substituent durch ein Dimethylamin ersetzt. Hierdurch konnte jedoch keine weitere Steigerung des antiaggregatorischen Effekts erzielt werden (siehe Abb. 3.10).

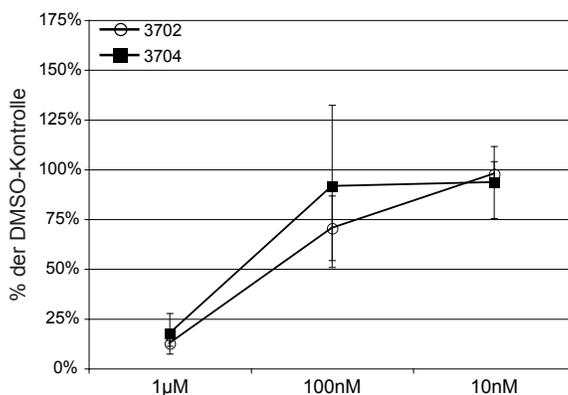


Abbildung 3.10: Inhibition der Tau-Aggregation durch BSc3702 und BSc3704.

Im abschließenden Vergleich der getesteten *compounds* erweisen sich Substanzen mit Pyrrolidin an R<sub>2</sub> am effektivsten, wobei sämtliche der getesteten Substanzen mit dem

Halogen Iod an R<sub>1</sub> ebenfalls gute antiaggregatorische Eigenschaften aufweisen (siehe Abb. 3.11). Die Substanz BSc 2889 mit mit einem Pyrrolidin an R<sub>2</sub> und Iod an R<sub>1</sub> stand zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht zur Verfügung.

Sämtliche *compounds* senkten das Aggregationsniveau des Tau-Proteins signifikant ab ( $p < 0,001$ ), bei der minimalen Konzentration von 10 nM bestand bei keiner der getesteten Substanzen ein signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle.

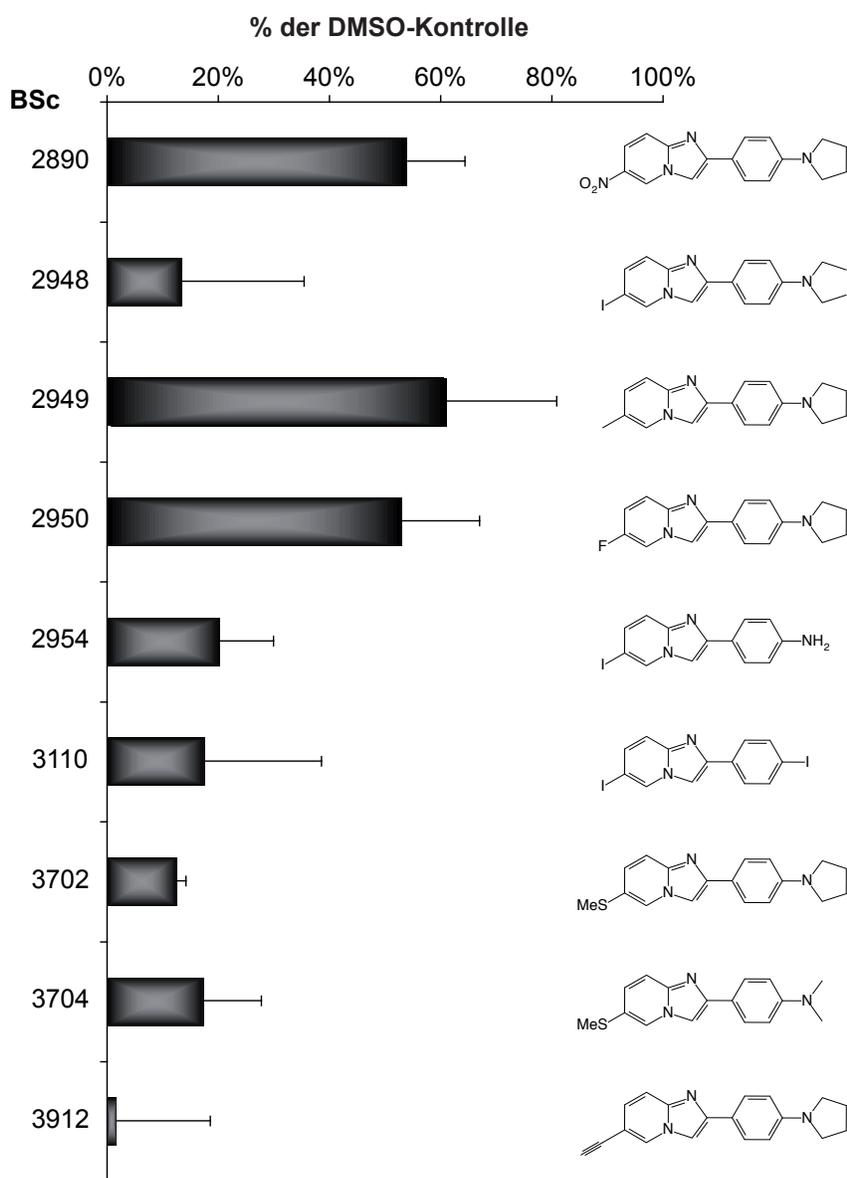
Inhibition der Tau-Aggregation durch IMPYs (1  $\mu$ M Endkonzentration)

Abbildung 3.11: Darstellung des antiaggregatorischen Effekts aller getesteten *compounds* bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M/ml. Die Substanzen BSc 3912 und BSc 3702 zeigen die höchste antiaggregatorische Wirkung.

## 3.5 Antikörper

In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob mit Hilfe der SIFT-Methode spezifische Antigen-Antikörper-Interaktionen in Proteinlösungen niedriger Molarität detektiert werden können.

### 3.5.1 Phosphoryliertes Tau-Protein und Antikörper

Der Antikörper AT-8 detektiert spezifisch phosphoryliertes Tau-Protein und wird routinemäßig in der Alzheimer-Diagnostik verwendet. Um zu prüfen, ob mit dem Antikörper phosphoryliertes von scheinphosphoryliertem Protein in niedrig-molaren Lösungen unterschieden werden kann, wurden zunächst die in Tabelle 3.3 aufgeführten Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa<sup>488</sup> markiert, aufgereinigt und mit der FCS-Methode auf ihre Reinheit geprüft.

Antikörper	Antigen	Diffusionszeit [ $\mu$ s]	Reinheit [%]
T46 <sup>488</sup>	Protein Tau (alle Isoformen)	1312,41	91,22
AT-8 <sup>488</sup>	phosphoryliertes Protein Tau	1455,28	84,68
6E10 <sup>488</sup>	A $\beta$	1324,24	93,18

Tabelle 3.3: FCS-Analyse der fluoreszenzmarkierten Tau-Antikörper.

In einer Voruntersuchung an unphosphoryliertem, fluoreszenzmarkiertem Tau ließ sich mit der SIFT-Methode bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Antikörpern T46 und AT-8 darstellen. T46 zeigt eine deutliche Koaggregationsneigung mit Tau. In Gegenwart von AT-8 formieren sich hingegen fast ausschließlich monochrome Tau-Aggregate (Abb. 3.12).

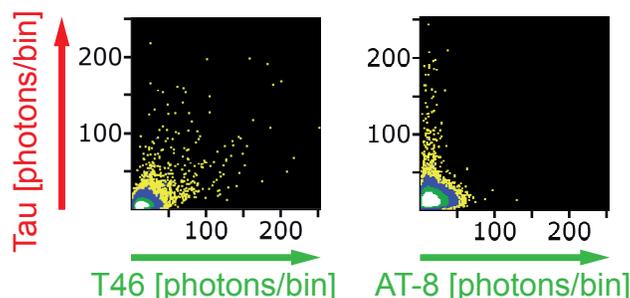


Abbildung 3.12: SIFT-2D Darstellung der Koaggregation von AT-8 und T46 mit fluoreszenzmarkiertem Tau-Protein in Gegenwart von 1% DMSO.

Im Hauptversuch wurden die Antikörper T46, AT-8 und 6E10 sowohl mit phosphoryliertem (pTau) als auch mit scheinphosphoryliertem Tau-Protein (mTau) in 50 mM TRIS, 1% DMSO inkubiert. Der A $\beta$ -Antikörper 6E10 wurde als Negativkontrolle mitgeführt, um unspezifische Aggregationsvorgänge auszuschließen. Die Untersuchung erfolgte mit der SIFT-Methode im vierfach-Ansatz und wurde insgesamt drei Mal ausgeführt.

Der Phosphorylierungs-unabhängige Antikörper T46 zeigt sowohl mit pTau als auch mit mTau ein deutlich stärkeres Koaggregationssignal als die Negativkontrolle (mTau  $p < 0,001$ ; pTau  $p < 0,01$ , Abb. 3.13). Es entstanden mehr gemischte Aggregate mit mTau, wobei die Analyse der Gesamthelligkeit zeigte, dass mTau in etwa 1,5-fach höherer Konzentration vorlag als pTau (nicht gezeigt). Die Antikörper T46 und AT-8 weisen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Koaggregation mit pTau auf. AT-8 bindet nicht an mTau, das Koaggregationssignal bewegt sich hier im Rahmen der Negativkontrolle und ist signifikant geringer als das von pTau ( $p < 0,01$ ).

### 3.5.2 Synuklein-Antikörper

Zur Detektion von  $\alpha$ -Synuklein wurden die Antikörper 15G7, 6E10 und A11 zunächst fluoreszenzmarkiert und aufgereinigt. Tabelle 3.4 zeigt die Analyse der aufgereinigten Antikörper sowie deren Antigen.

Antikörper	Antigen	Diffusionszeit [ $\mu$ s]	Reinheit [%]
15G7 <sup>488</sup>	$\alpha$ -Syn	1178,03	89,65
15G7 <sup>647</sup>	$\alpha$ -Syn	1460,54	84,50
6E10 <sup>488</sup>	A $\beta$	1324,24	93,18
A11 <sup>488</sup>	Protein-Oligomer	1306,25	92,13

Tabelle 3.4: FCS-Analyse der fluoreszenzmarkierten Synuklein-Antikörper. Die unterschiedliche Diffusionszeit von 15G7<sup>488</sup> und 15G7<sup>647</sup> erklärt sich aus dem abweichenden Fokusdiameter bei 633 nm Wellenlänge.

In dieser Versuchsreihe sollte einerseits überprüft werden, ob die spezifische Bindung des Antikörpers 15G7 an  $\alpha$ -Syn in niedrig-molarer Lösung mit Hilfe von FCS und SIFT detektiert werden kann. Der A $\beta$ -spezifische Antikörper 6E10 wurde als Kontrolle mitgeführt. Andererseits wurde geprüft, ob der Oligomer-spezifische Antikörper A11 [369] DMSO- oder Fe<sup>3+</sup>-induzierte Synuklein Oligomere erkennt.

Hierzu wurden Alexa<sup>488</sup>-fluoreszenzmarkierte Antikörper mit Alexa<sup>647</sup>-markiertem  $\alpha$ -Synuklein in folgenden Lösungen inkubiert:

1. 50 mM TRIS pH 7,0 (n=3)
2. 50 mM TRIS pH 7,0 + 1% DMSO (n=3)
3. 50 mM TRIS pH 7,0 + 1% DMSO + 10  $\mu$ M Fe<sup>3+</sup> (n=2)

Die SIFT-2D und Kreuzkorrelations-Analyse ergaben hierbei eine hohe Koaggregation für

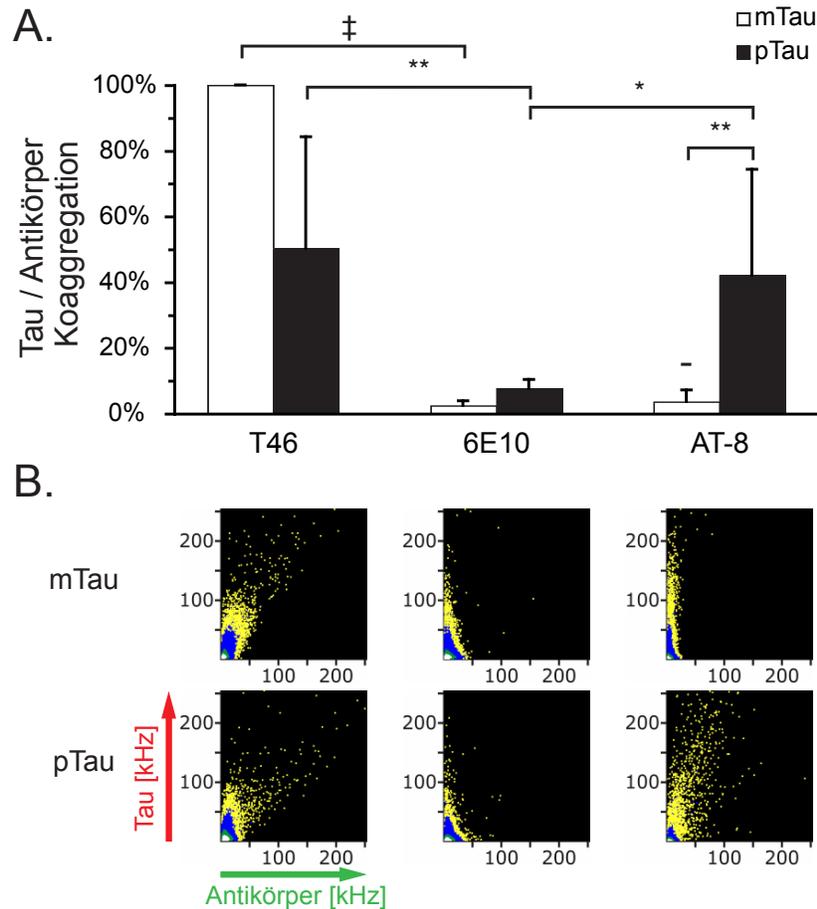


Abbildung 3.13: Selektive Detektion von pTau<sup>647</sup> und mTau<sup>647</sup> durch T46<sup>488</sup> und AT-8<sup>488</sup>. A. SIFT-Analyse der Antikörper/Tau Interaktion, normiert gegen das Koaggregations-Signal von T46<sup>488</sup> und mTau<sup>647</sup>. Während T46 sowohl pTau als auch mTau detektiert, ist eine Interaktion von AT-8 nur mit pTau messbar. Der A $\beta$ -Antikörper 6E10 detektiert weder pTau noch mTau. Die Symbole über den breiten Balken zeigen das Signifikanzniveau je Antikörper zwischen pTau und mTau, die Symbole über den Fehlerbalken das Signifikanzniveau zwischen Tau-Antikörper und zugehöriger 6E10-Kontrolle an. Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ‡ =  $p < 0,001$ .  $n=3$ . B. SIFT-2D Histogramme der Antikörper/Tau Interaktion. T46 zeigt Interaktion mit pTau und mTau, in Gegenwart von 6E10 erscheinen nur monochrome Tau-Aggregate. Der Antikörper AT-8 erkennt nur phosphoryliertes Tau-Protein.

15G7 und  $\alpha$ -Synuklein in allen getesteten Lösungen. Der Antikörper 6E10 hingegen koaggregiert nicht mit  $\alpha$ -Syn in 50 mM TRIS mit/ohne 1% DMSO. In Gegenwart von 10  $\mu$ M  $\text{Fe}^{3+}$  zeigt sich in einem der beiden Versuche eine erhöhte Koaggregation von 6E10 und  $\alpha$ -Synuklein. Der Oligomer-Antikörper A11 zeigt keine Koaggregation mit  $\alpha$ -Synuklein in allen getesteten Lösungen (Abb. 3.14).

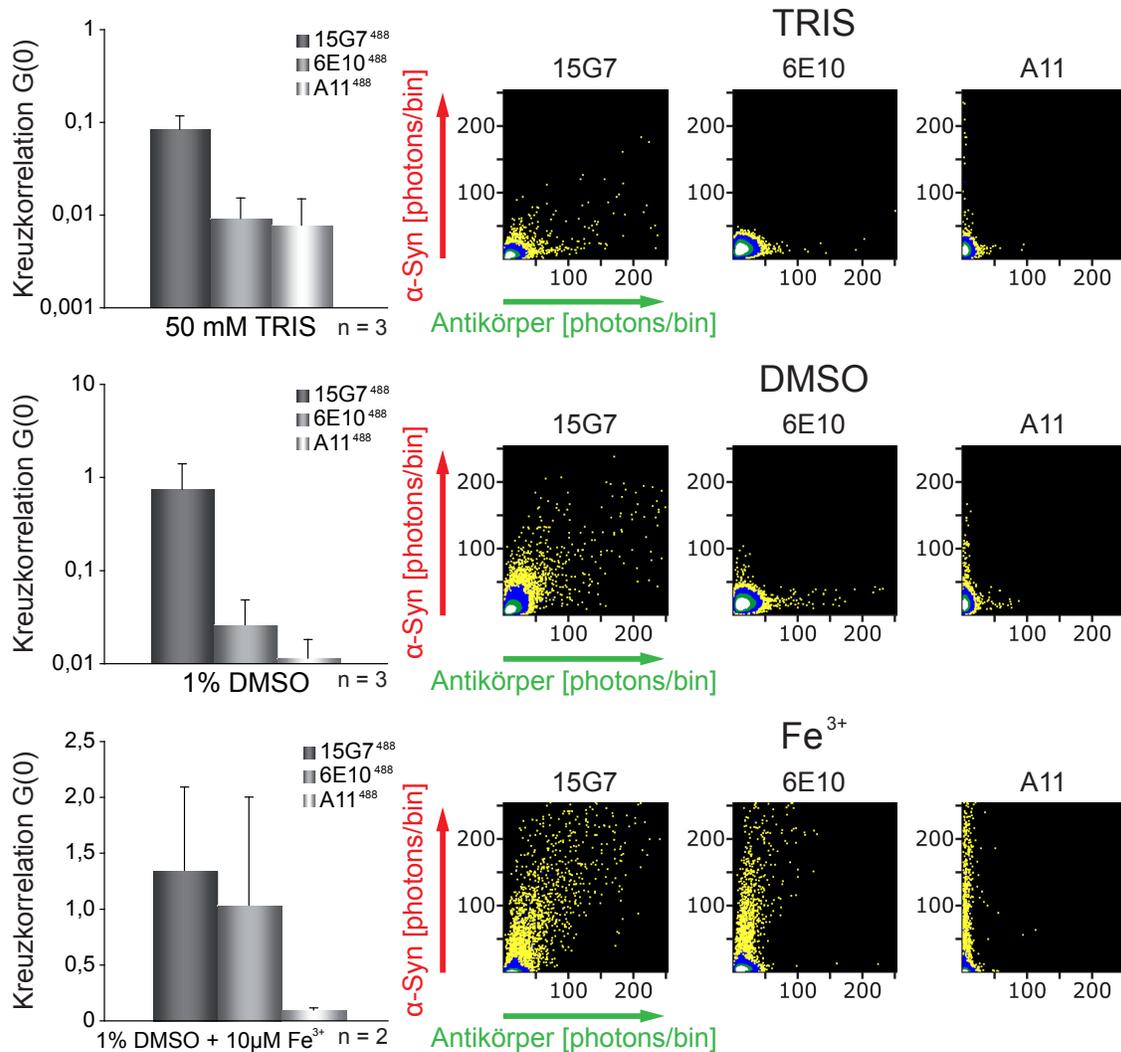


Abbildung 3.14: Koaggregation von  $\alpha$ -Synuklein und Antikörpern. Links: Kreuzkorrelations-Analyse der Koaggregation. 15G7 zeigt eine deutliche Erhöhung des Aggregationsniveaus, während A11 etwa in Höhe der Negativkontrolle 6E10 liegt. Rechts: SIFT-2D-Analyse der Koaggregation. Im Gegensatz zu 15G7 bilden 6E10 und A11 keine bichromen Aggregate.

Ein alternatives Verfahren zum Nachweis von Interaktionen verschiedener Proteine ist die Analyse der Diffusionszeit fluoreszenzmarkierter Proteine in Gegenwart nicht markierter Proteine. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Antikörper 15G7, 6E10 und A11 in Gegenwart unmarkierten  $\alpha$ -Synukleins getestet. Hierbei wurden neben monomerem  $\alpha$ -Synuklein in 50 mM TRIS auch Synuklein Fibrillen und die Synuklein Oligomere LZ1 und LZ2 getestet, die von der Arbeitsgruppe Kostka folgendermaßen hergestellt wurden:

LZ1: 150 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  + 5% Ethanol +  $\alpha$ -Synuklein 0,2 mg/ml

LZ2: 150 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  + 5% Ethanol + 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  +  $\alpha$ -Synuklein 0,2 mg/ml

Die  $\alpha$ -Syn-Fibrillen wurden freundlicherweise von Dr. Johannes Levin zur Verfügung gestellt.

Getestet wurden die oben genannten Antikörper in folgenden Kombinationen:

A11<sup>488</sup> + 15G7<sup>647</sup>; 6E10<sup>488</sup> + 15G7<sup>647</sup>; 15G7<sup>647</sup>. Die Verwendung verschiedenfarbig markierter Antikörper in derselben Lösung sollte zeigen, ob das enthaltene unmarkierte Protein lediglich von einem oder von beiden Antikörpern erkannt wurde.

Während die Diffusionszeit des Antikörpers 15G7 in allen Versuchsreihen in Gegenwart von LZ1, LZ2 und Fibrillen anstieg, blieb die Diffusionszeit von A11 und 6E10 stabil (Abb. 3.15).

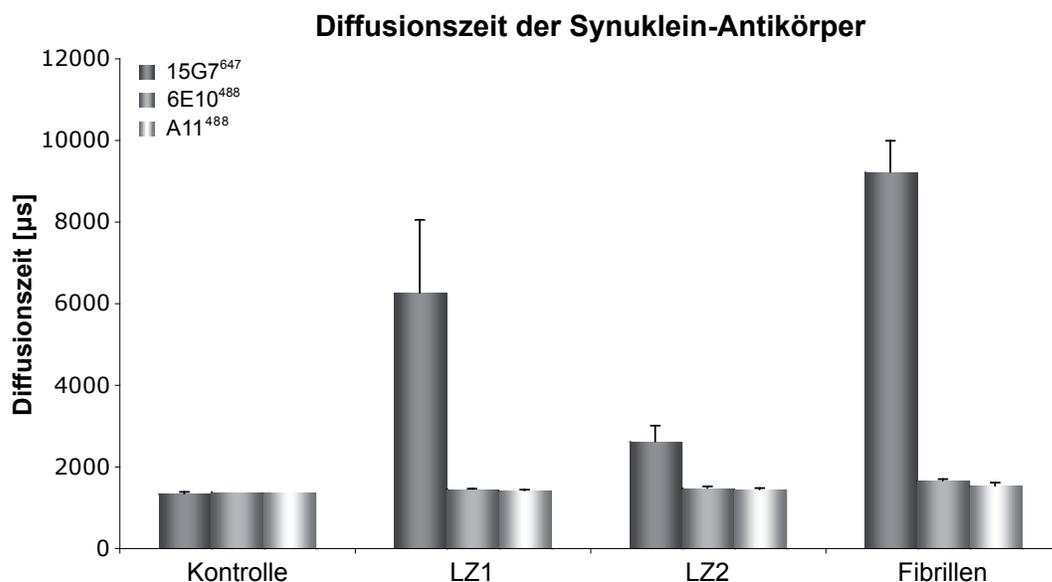


Abbildung 3.15: FCS-Analyse der Koaggregation von Antikörpern und  $\alpha$ -Syn. Die Diffusionszeit erhöht sich lediglich bei 15G7 in Gegenwart von Oligomeren oder Fibrillen.

## 3.6 Matrix-Metalloproteinasen

Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnet eine Gruppe von derzeit 25 bekannten Proteasen, denen ein Eisen-Ion im katalytischen Zentrum gemeinsam ist. Verschiedene MMP spielen bei inflammatorischen, malignen und degenerativen Prozessen eine zentrale Rolle. Besonders die Enzyme MMP-1, MMP-3 und MMP-9 wurden bereits mit dem Morbus Alzheimer sowie anderen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, jedoch ist ihre genaue Funktion in der Pathogenese dieser Erkrankungen noch weitgehend unklar (siehe Kapitel 1.4.3).

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass MMP-1 und MMP-3 durch limitierte Proteolyse einen proaggregatorischen Effekt auf das amyloidogene Protein des Morbus Parkinson, das  $\alpha$ -Synuklein, ausüben. In weiterführenden Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von MMP-1, -3 und -9 auf die Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins untersucht.

### 3.6.1 Aggregations-Analyse

Zunächst wurde untersucht, ob die proteolytische Spaltung des Tau-Proteins in der FCS detektiert werden kann. Hierzu wurde eine Proteinlösung aus Tau<sup>488</sup> und Tau<sup>647</sup> für 60 Minuten bei 37° C mit einer Verdünnungsreihe der Proteinase K (PK) inkubiert und anschließend in Gegenwart von 0,2% SDS gemessen. SDS sollte hierbei eine mögliche Aggregation der Proteinfragmente unterbinden. Abbildung 3.16 zeigt die parallele Zunahme von Gesamthelligkeit und Teilchenzahl bei zeitgleicher Abnahme der Diffusionszeit in Gegenwart von PK. Die Zunahme der Gesamthelligkeit nach proteolytischem Verdau ist ein regelhaft beobachtetes Phänomen und wird durch die Freisetzung der Fluorophore aus größeren Proteinen erklärt. Dieser Effekt wird als *dequenching* bezeichnet. Da die Gesamthelligkeit am wenigsten von Aggregationsprozessen beeinflusst wird und sowohl in der SIFT- also auch in der FCS-Analyse als Parameter zur Verfügung steht, wurde sie in den Aggregationsversuchen als Maß der Proteolyse verwendet.

Anschließend wurde geprüft, ob das Protein Tau durch limitierte Proteolyse zu vermehrter Aggregation angeregt werden kann. Hierzu wurde eine Proteinlösung aus Tau<sup>488</sup> und Tau<sup>647</sup> erstellt, für eine Stunde bei 37° C mit Konzentrationsreihen von MMP-1, -3, -9 sowie PK und Trypsin inkubiert und anschließend mit Hilfe der SIFT-Methode in 50 mM TRIS 1% DMSO analysiert. Es zeigt sich ein signifikanter proaggregatorischer Effekt von MMP-1 und -9, während MMP-3, PK und Trypsin in höheren Konzentrationen zu einer Abnahme der Aggregation führen (Abb. 3.17). Alle getesteten Proteasen induzieren in der SIFT-Analyse außerdem einen Anstieg der Gesamthelligkeit.

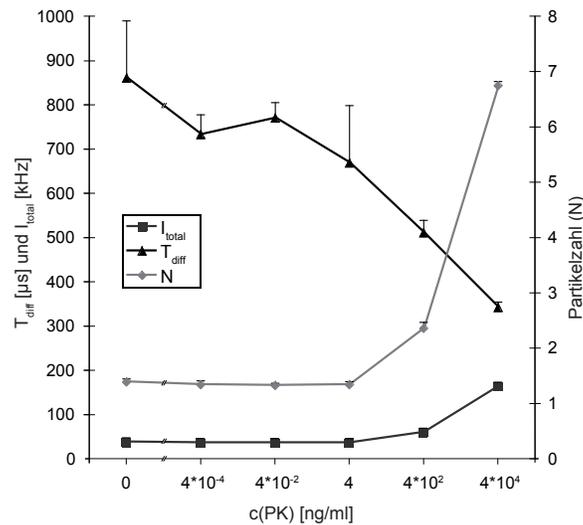


Abbildung 3.16: FCS-Analyse des Tau-Proteins nach limitierter Proteolyse durch Proteinase K. In niedrigen Konzentrationen fallen Gesamthelligkeit und Teilchenzahl ab, während die Diffusionszeit zunimmt. Gezeigt sind Messwerte des grünen Kanals (488 nm).

### 3.6.2 Analyse der limitierten Proteolyse

#### SDS-PAGE

Aufgrund der unterschiedlichen Auswirkungen der getesteten Proteasen auf die Aggregation des Tau-Proteins wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob sich für die einzelnen Proteasen charakteristische Proteolyse-Muster identifizieren lassen. Hierzu wurde unmarkiertes Protein Tau in einer Konzentration von 0,2 mg/ml für eine Stunde bei 37° C mit Verdünnungsreihen der einzelnen Proteasen inkubiert. Anschließend wurde eine SDS-PAGE der Proben durchgeführt und die Gele mit Coomassie Blau gefärbt. Für MMP-1, -3 und -9 wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt.

Für MMP-3 und MMP-9 finden sich hierbei hochspezifische Proteolyse-Muster (Abb. 3.18), die in beiden Versuchen identisch erscheinen (nicht gezeigt). MMP-1 zeigt in beiden Versuchen keine im Coomassie-Gel eindeutig sichtbaren Spaltprodukte. Jedoch findet sich im *Western blot* mit anschließender NBT-BCIP-Färbung (siehe Kapitel 2.2.2) eine Bande, die im Coomassie-Gel von der Protease überlagert und in der Tau-Kontrolle nicht nachweisbar ist (Abb. 3.19).

Der Verdau des Tau-Proteins mit Proteinase K und Trypsin führt in hohen Konzentrationen zu Fragmenten, die aufgrund ihrer geringen Größe in diesem Gel-System nicht mehr darstellbar sind. Erst bei Konzentrationen von 4 ng/ml für PK und 0,4 µg/ml für Trypsin lassen sich Spaltprodukte erkennen, die in der SIFT-Analyse jedoch keinen proaggregatorischen Effekt haben (Abb. 3.18).

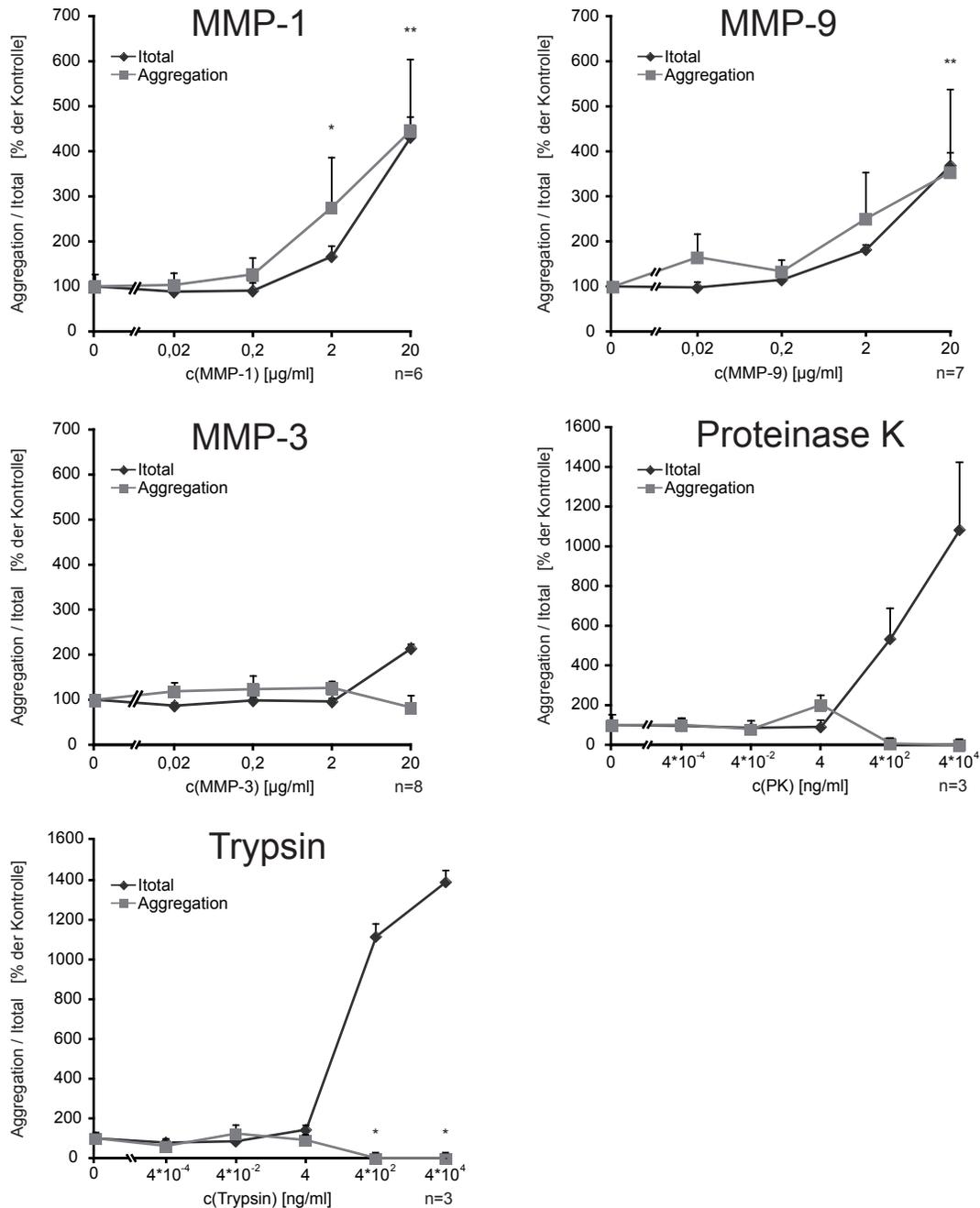


Abbildung 3.17: Aggregations-Analyse des Tau-Proteins nach limitierter Proteolyse. Während MMP-1 und MMP-9 zu einem deutlichen Anstieg der Gesamthelligkeit und der Aggregation führen, steigt bei MMP-3, PK und Trypsin lediglich die Gesamthelligkeit, die Aggregation hingegen ist gegenüber der Kontrolle vermindert. Die Anzahl der durchgeführten Versuche ist rechts unter dem jeweiligen Diagramm angegeben, alle Versuche wurden in Drei- bzw. Vierfach-Ansätzen durchgeführt. Dargestellt sind signifikante Abweichungen der Tau-Aggregation vom Wert der Kontrolle ( $c(X) = 0 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $\text{ng/ml}$ ). Signifikanzniveau: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; † =  $p < 0,001$ .

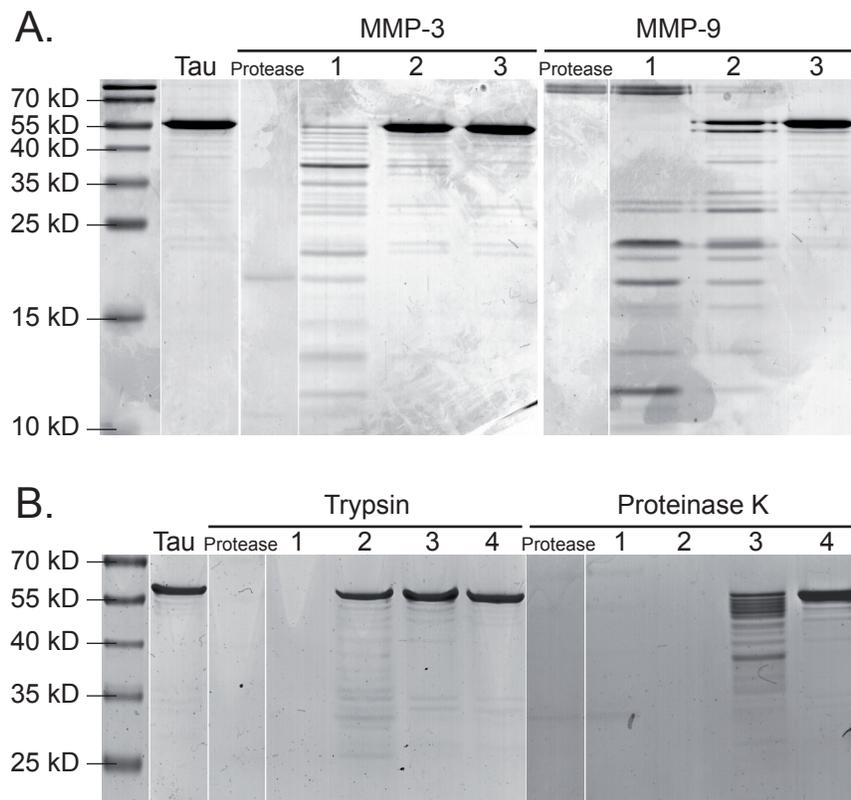


Abbildung 3.18: Coomassie-Gel des Tau-Proteins nach Verdau mit verschiedenen Proteasen. Tau = Tau-Kontrolle ohne Protease; Protease = Protease ohne Tau. A. Produkte der limitierten Proteolyse nach Inkubation mit MMP-3 und MMP-9 in Konzentrationen von 1 = 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2 = 3,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 3 = 0,33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Es zeigen sich spezifische Bandenmuster der verschiedenen Proteasen. B. Produkte der limitierten Proteolyse nach Inkubation mit Trypsin und Proteinase K in Konzentrationen von 1 = 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2 = 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3 = 4 ng/ml und 4 = 0,04 ng/ml. Hohe Konzentrationen von PK und Trypsin lysieren Tau vollständig.

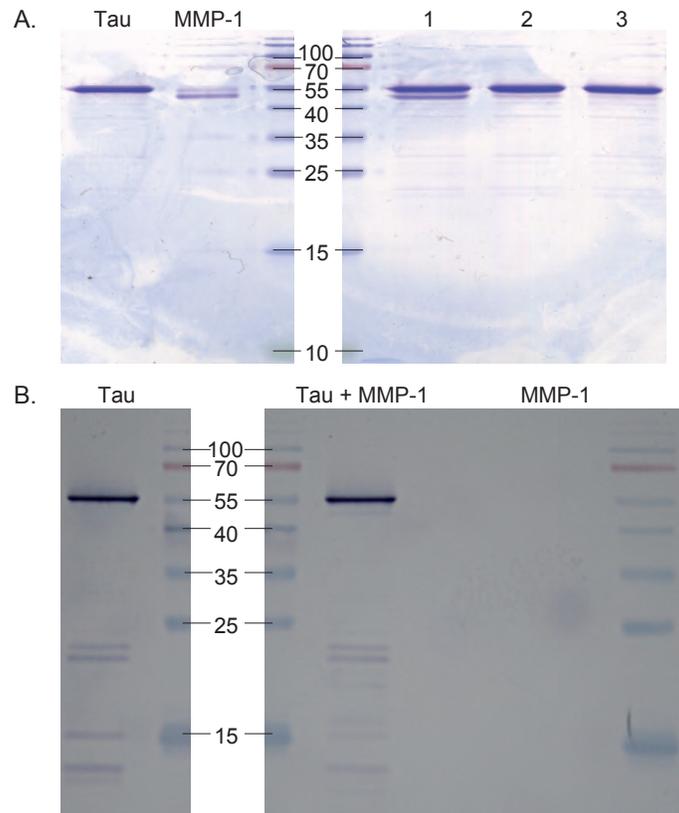


Abbildung 3.19: Verdau des Tau-Proteins mit MMP-1 in Coomassie-Gel und *Western blot* nach Anfärbung mit NBT-BCIP. Tau = Protein Tau ohne Protease, MMP-1 = Protease ohne Tau-Protein. A. Die Spuren 1 bis 3 zeigen das Resultat der limitierten Proteolyse mit Enzymkonzentrationen von 33 µg/ml, 3,3 µg/ml und 0,33 µg/ml im Coomassie-Gel. Hier finden sich keine sichtbaren Spaltprodukte des Tau-Proteins. B. Die Spur Tau + MMP-1 zeigt den Verdau mit 33 µg/ml MMP-1 im *Western blot*. Hier lassen sich Banden ausmachen, die in der Kontrolle nicht vorhanden sind.

### Massenspektroskopie

Um die in der SDS-PAGE nach limitierter Proteolyse dargestellten Tau-Banden näher zu charakterisieren, wurde unmarkiertes Protein Tau mit Trypsin, PK, sowie MMP-1, -3 und -9 für eine Stunde bei 37° C inkubiert und anschließend in der Massenspektroskopie gemessen. Es zeigten sich für jede Protease spezifische Massen-Peaks, die im Weiteren mit den Software-Paketen Data Explorer (Applied Biosciences, Darmstadt) und GPMW (Lighthouse data, Odense) analysiert wurden. Diese Software kalkuliert aus Massenspektroskopie-Daten und einer vorgegebenen Aminosäure-Sequenz, welche Fragmente der Sequenz für die einzelnen Massen-Peaks in Frage kommen. Der erlaubte Fehler bei der Massen-Abweichung wurde hierbei mit 0,1% vorgegeben. Es wurden nur Massen-Peaks in die Analyse aufgenommen, die in > 50% der Proben nachweisbar und in der Tau-Kontrolle ohne Protease nicht vorhanden waren. Abbildung 3.20 zeigt eine schematische Darstellung des Tau-Proteins mit den identifizierten potenziellen Schnittstellen. Die *repeat*-Region ist grün hervorgehoben. MMP-9 und MMP-1 generieren wenig bzw. keine Schnittstellen in der *repeat*-Region. Die Massen aller identifizierten potenziellen Tau-Fragmente sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

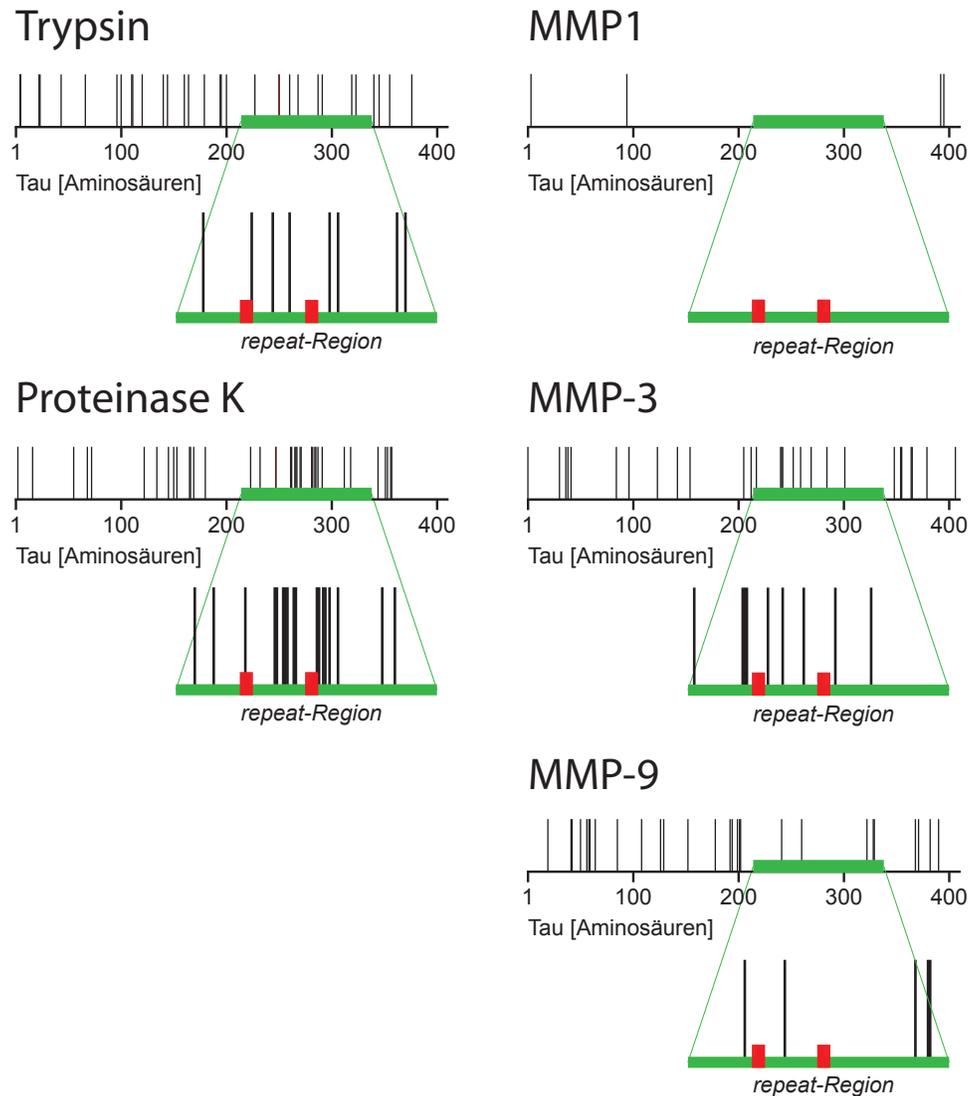


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des Tau-Proteins und der Lokalisation der kalkulierten Schnittstellen. Die *repeat-Region* ist grün gekennzeichnet, potenzielle Schnittstellen sind als senkrechte schwarze Balken dargestellt. Die roten Balken repräsentieren die Hexapeptide 275VQIINK280 und 306VQIVYK311, die als essenziell für die Tau-Fibrillation angesehen werden. Während MMP-3, PK und Trypsin zahlreiche Schnittstellen in der *repeat-Region* und insbesondere in oder nahe der Hexapeptide aufweisen, zeigen MMP-1 und -9 kaum proteolytische Aktivität in dieser Region.

Trypsin			Proteinase K			MMP-3			MMP-9			MMP-1		
Masse [Da]	Proben	Fragment	Masse [Da]	Proben	Fragment	Masse [Da]	Proben	Fragment	Masse [Da]	Proben	Fragment	Masse [Da]	Proben	Fragment
5174,10	3/3	181 - 228	5036,73	3/3	314 - 358	5765,68	2/3	207 - 260	5824,51	2/3	330 - 383	10054,48	2/3	1 - 95
5375,90	3/3		5158,03	2/3		5767,57	2/3	98 - 155	5824,98	2/3	52 - 109	10055,23	2/3	303 - 396
5672,36	3/3	325 - 377	5428,89	2/3	70 - 123	5859,49	2/3	86 - 143	6795,97	2/3	22 - 86	41070,66	2/3	1 - 393
5677,33	2/3	146 - 201	5490,80	2/3		5868,49	2/3	356 - 412	6804,30	3/3	60 - 127	41077,67	2/3	4 - 396
5749,52	3/3		5549,74	2/3		5869,05	2/3	40 - 97	6804,56	2/3	110 - 179	41409,07	2/3	1 - 396
6638,67	3/3		5559,57	2/3	182 - 233	5927,59	2/3	156 - 213	6807,93	2/3	180 - 242			
7006,00	3/3		5639,21	3/3	358 - 412	8792,30	2/3	38 - 124	10104,15	2/3				
7014,66	3/3		5752,92	3/3	18 - 73	8858,42	2/3		13488,51	3/3	204 - 330			
7160,91	2/3		5755,49	3/3	301 - 352	9480,68	2/3	125 - 218	13488,93	3/3	66 - 200			
7372,85	2/3		5935,81	2/3	168 - 224	9486,96	2/3	32 - 124	13492,51	3/3	44 - 179			
7532,70	3/3	25 - 97	5939,57	2/3	355 - 412	9487,88	2/3	261 - 349	13497,51	2/3	22 - 153			
7544,60	2/3	270 - 341	5942,77	2/3	264 - 319	10150,54	3/3	2 - 97	13511,74	2/3	61 - 195			
7660,88	3/3	24 - 97	6138,82	3/3	353 - 412	10154,54	3/3	144 - 241	13568,80	3/3	60 - 195			
8153,30	3/3	270 - 346	6157,52	2/3	1 - 56	10157,62	3/3	261 - 355	13569,74	3/3	58 - 193			
8154,04	3/3	98 - 180	6402,62	2/3		10161,56	2/3	271 - 365	13582,50	3/3	131 - 261			
8363,36	3/3	112 - 195	7027,84	2/3	356 - 412	10162,79	2/3	207 - 302	13585,63	3/3	203 - 330			
8363,36	3/3	113 - 196	7145,43	3/3	4 - 69	10202,01	2/3	43 - 143	13605,67	2/3	43 - 179			
10142,63	2/3	6 - 101	7147,37	3/3	182 - 248	10211,60	2/3	144 - 242	13606,59	2/3	243 - 369			
10151,84	3/3	197 - 292	7151,08	2/3	293 - 358	10213,55	2/3	286 - 380	13611,76	2/3	196 - 323			
10157,62	3/3	262 - 356	7151,12	3/3	289 - 354	10217,69	2/3	156 - 253	13783,59	2/3	262 - 391			
10159,93	3/3	45 - 145	7476,82	3/3	1 - 69	10268,65	2/3	144 - 243	13792,80	3/3	243 - 372			
13106,09	2/3		7479,53	3/3	286 - 354	10281,74	3/3	1 - 97	13795,03	3/3	58 - 195			
13301,23	2/3	162 - 288	7691,73	2/3	70 - 146	10285,79	3/3	261 - 356	18261,58	2/3	1 - 179			
13301,31	2/3	166 - 292	7693,75	2/3	284 - 354	10289,73	3/3	271 - 366	20031,54	2/3	66 - 261			
13304,19	2/3	122 - 251	7694,74	2/3	288 - 358	11902,26	2/3		20031,97	2/3	196 - 383			
13310,13	2/3	98 - 228	7699,47	2/3	273 - 345	12071,74	2/3	156 - 270	20063,65	2/3	1 - 195			
13318,26	2/3	142 - 269	7781,82	3/3	287 - 358	12080,71	2/3	125 - 242	27121,85	2/3	1 - 261			
16303,23	2/3	68 - 228	7788,85	3/3	272 - 345	12080,86	2/3	243 - 355	27135,73	2/3	154 - 412			
16318,71	3/3	166 - 320	7790,87	3/3	283 - 354	29496,44	2/3	125 - 407						
			7791,65	3/3	74 - 151	29513,56	2/3	98 - 380						
			7866,45	3/3	57 - 135									
			7875,24	3/3	1 - 73									
			9468,84	2/3	267 - 354									
			9656,98	2/3	263 - 352									
			9657,02	2/3	269 - 358									
			9666,59	2/3	74 - 170									
			9670,62	2/3	70 - 166									
			9770,18	3/3	268 - 358									
			9794,44	2/3	182 - 272									
			9795,97	2/3	320 - 412									
			9799,18	2/3	264 - 354									
			9804,71	2/3	57 - 154									
			11046,04	3/3	70 - 181									
			11046,98	3/3	57 - 167									

Abbildung 3.21: Massenspektroskopie des Tau-Proteins nach limitierter Proteolyse. Aufgeführt sind die massenspektroskopisch identifizierten Molekulargewichte der Tau-Fragmente sowie die zugehörigen kalkulierten Protein-Sequenzen. Zwei Fragmente, die die *repeat*-Region fast vollständig beinhalten, sind gelb gekennzeichnet.  $n = 3$ .

# Kapitel 4

## Diskussion

Pathologische Aggregate der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) sind seit langem als sensitive und spezifische Marker in der histopathologischen Diagnostik verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen etabliert [78, 183]. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien haben darüber hinaus deutliche Hinweise geliefert, dass den Proteinen auch eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen zukommt [59, 177, 197, 370, 371]. In jüngerer Zeit mehren sich zudem die Hinweise, dass weniger die diagnostisch im Vordergrund stehenden fibrillären Aggregate, sondern vielmehr oligomere Vorformen die pathophysiologisch relevante Aggregatspezies dieser Proteine darstellen könnten [45–47].

Aus diesem Grund beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe bereits seit längerem mit der Detektion früher Aggregationsprozesse von Tau und  $\alpha$ -Syn. Hierzu finden die *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie* (FCS) und *Scanning for intensely fluorescent targets* (SIFT) Anwendung, die Oligomere fluoreszenzmarkierter Proteine bereits in attomolarer Konzentration detektieren können und auch zur Untersuchung von Interaktionen unterschiedlicher Proteine geeignet sind [69, 356, 357].

In Vorgängerarbeiten wurde der Einfluss von Metallionen und organischen Lösungsmitteln auf die Aggregationseigenschaften der beiden Proteine detailliert untersucht. Die hier vorgelegte Arbeit bestätigt nochmals frühere Ergebnisse und beschäftigt sich in weiterführenden Experimenten mit den Auswirkungen post-translationaler Modifikationen des Tau-Proteins, wie Phosphorylierung oder limitierter Proteolyse, auf dessen Aggregation und Koaggregation mit  $\alpha$ -Syn. Darüber hinaus werden mögliche diagnostische und therapeutische Implikationen von FCS und SIFT untersucht.

## 4.1 Einfluss der Phosphorylierung auf die Tau-Aggregation und Koaggregation mit $\alpha$ -Synuklein

### 4.1.1 Tau-Aggregation

Bisherige *in vitro* Studien ergaben kein einheitliches Bild über die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins. Bis heute wurde der Einfluss diverser potentieller Tau-Kinasen bereits in verschiedenen etablierten Aggregations-Modellen des Proteins untersucht. Eine pathophysiologisch bedeutsame Rolle könnte hierbei der Glykogen Synthase Kinase  $3\beta$  zukommen (GSK- $3\beta$ , siehe Kapitel 1.3), die auch in dieser Arbeit Anwendung fand.

Da das Tau-Protein in Abwesenheit von Aggregations-Induktoren nur eine geringe Autopolymerisationsneigung aufweist [30], wurden in der Vergangenheit diverse Induktoren der Tau-Fibrillisation für *in vitro* Experimente etabliert. Bei Anwendung polyanionischer Aggregationsinduktoren wurden sowohl pro- als auch anti-aggregatorische Auswirkungen der Tau-Phosphorylierung durch GSK- $3\beta$  berichtet [194, 255, 256, 372, 373]. Dieses Modell entstand aus der Beobachtung, dass die Tau-Aggregation möglicherweise mit anionischen Membranoberflächen in Verbindung steht. So konnten Zellmembranen in Hirnschnitten von AD-Patienten als möglicher Ursprung von PHF ausgemacht werden, und anionische Mizellen induzieren die Tau-Aggregation *in vitro* [42, 374]. In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen fanden organische Lösungsmittel als Induktor der Tau-Aggregation Anwendung, die durch Veränderung der dielektrischen Konstante wässriger Lösungen ein membranahes Milieu simulieren [375].

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Tau-Phosphorylierung einen fördernden Einfluss auf die Tau-Aggregation in Gegenwart von  $\text{Al}^{3+}$  hat [120, 123] bzw. sogar notwendige Voraussetzung einer solchen Aggregation ist [121, 122, 137]. Die Rolle des Aluminiums in der Pathogenese der Tauopathien wird bereits seit längerem untersucht. Klatzo et al. fanden bereits 1965 NFT-artige Strukturen in Gehirnen von Hasen, denen zuvor Aluminium intrathekal appliziert wurde [112, 113]. Trotz zahlreicher Studien in den letzten 55 Jahren wird die pathophysiologische Bedeutung des Aluminiums jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert [101].

Auf Einzelpartikel-Ebene ist der Einfluss der Phosphorylierung auf das Verhalten des Tau-Proteins in Gegenwart verschiedener pro-aggregatorischer Substanzen nach wie vor unklar, da die bisher verwendeten Techniken wie Elektronenmikroskopie, Thioflavin T *assay*, SDS-PAGE und *Western blot* solche frühen Interaktionen nur unzureichend darstellen können. Darüber hinaus benötigen diese Methoden in der Regel supraphysiologische Konzentrationen an Protein und Aggregations-Induktoren. Solche Bedingungen generieren möglicherweise unphysiologische Ergebnisse, da Tau-Protein in hohen Konzentrationen bereits ohne Induktor zur Autopolymerisation neigt [29, 376].

Ähnliche Probleme finden sich auch bei vielen Studien, die die Auswirkungen des Aluminiums auf die Tau-Aggregation untersuchen. In vielen Fällen finden hierbei millimolare Konzentrationen des Metallions Anwendung [120, 122, 377]. Die meisten Studien zum Alu-

miniumgehalt im Gehirn Gesunder und AD-Patienten ergaben jedoch Werte unter  $10 \mu\text{g/g}$  Hirnmasse (Trockengewicht, entspricht etwa  $60 \mu\text{mol/kg}$  Feuchtgewicht) [128,133,378,379].

In der hier vorgelegten Arbeit zeigt sich ein modulierender Einfluss der Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  auf die Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins. Durch Verwendung der FCS wurde die Konzentration von Tau (ca.  $15 \text{ nM}$ ) und  $\text{Al}^{3+}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) physiologischen Bedingungen angenähert.

$\text{Al}^{3+}$  führt zur raschen Formation großer Tau-Aggregate (ca. 100 Moleküle), besonders nach Phosphorylierung des Proteins (pTau). Organische Lösungsmittel wie DMSO oder Ethanol hingegen induzieren die Ausbildung kleinerer Oligomere, und werden durch Phosphorylierung des Tau-Proteins in ihrer Wirkung abgeschwächt. Die großen, durch  $\text{Al}^{3+}$  getriggerten Aggregate zeigen darüber hinaus eine starke Resistenz nach Zugabe von 0,2% SDS, wohingegen sich die kleineren, DMSO-induzierten Aggregate unter diesen Bedingungen größtenteils auflösen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Tau Oligomere im membranahen Milieu entstehen können, und dass solche Aggregate möglicherweise einen instabilen Charakter aufweisen. Durch Phosphorylierung wird die Aggregationsneigung des Tau-Proteins unter diesen Bedingungen abgeschwächt, möglicherweise durch das Vorhandensein zusätzlicher negativer Ladungen am Protein.  $\text{Al}^{3+}$ -getriggerte Aggregate hingegen zeigen eine hohe Stabilität und entstehen vermehrt nach Phosphorylierung des Proteins. Diese Aggregate könnten daher insbesondere bei Erkrankungen mit pathologischer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins bereits in geringer Konzentration als *seeds* der Tau-Fibrillisation fungieren, wie dies bereits für andere Oligomer-Spezies demonstriert wurde [326]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass solche Aggregations-*seeds* des Tau-Proteins aus dem extrazellulären Raum in Neuronen aufgenommen werden und sogar zwischen Zellen weitergegeben werden können [325]. Die differentielle Wirkung der Phosphorylierung auf die Tau-Aggregation in Gegenwart organischer Lösungsmittel und Aluminium, sowie die abweichende Größe der resultierenden Aggregate, lassen unterschiedliche Aggregationsmechanismen der verschiedenen Induktoren vermuten. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass organische Lösungsmittel Konformationsänderungen des Tau-Proteins bewirken, die dessen Aggregationsneigung erhöhen [380]. Im Zuge der Aluminium-induzierten Aggregation waren hingegen keine Konformationsänderungen nachweisbar [381].

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Arbeit die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch GSK-3 $\beta$  als Modulator der Tau-Aggregation bereits in nanomolaren Proteinkonzentrationen. Die vermehrte Aggregation von pTau in Gegenwart von  $\text{Al}^{3+}$ , sowie die hohe Stabilität der resultierenden Aggregate, lassen darüber hinaus eine mögliche Rolle des Metallions in der Pathogenese verschiedener Tauopathien vermuten.

### 4.1.2 Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Synuklein

Schon seit längerem ist bekannt, dass Aggregate von  $\alpha$ -Synuklein und Tau in Neuronen bei verschiedenen Erkrankungen kolokalisiert sein können [87,93,97]. Neuere Studien konnten

zeigen, dass beide Proteine auch gemeinsam in histopathologischen Befunden wie Lewy-Körperchen oder neurofibrillären *tangles* (NFT) nachweisbar sind [96,99]. Allerdings gestaltet sich die Untersuchung direkter Interaktionen der beiden Proteine bislang als schwierig, da sich gemischte Aggregate unterschiedlicher Proteine mit herkömmlichen Methoden der Aggregationsanalyse wie Thioflavin T Assay oder Elektronenmikroskopie (EM) kaum unterscheiden lassen.

Giasson et al. zeigten, dass Tau und  $\alpha$ -Syn sich gegenseitig in ihrem Aggregationsverhalten beeinflussen. So induziert die Zugabe geringer Mengen monomeren  $\alpha$ -Synukleins die Ausbildung fibrillärer Tau-Strukturen, und Tau wiederum beschleunigt die Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein [50]. Zwar sind vergleichbare Phänomene als *molecular crowding* bekannt. Allerdings lagen die von Giasson et al. verwendeten Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn etwa 100fach unterhalb der für *molecular crowding* benötigten Konzentration [382–384], und der gezeigte Effekt auf die Tau-Fibrillisation war nicht mit vergleichbaren Konzentrationen von  $\beta$ -Synuklein oder einer Antiaggregations-Mutation des  $\alpha$ -Synukleins zu erzeugen [50]. Darüber hinaus detektierte die Arbeitsgruppe im EM Filamente, die sowohl aus Tau und  $\alpha$ -Synuklein bestanden, und bewiesen so erstmals eine direkte Interaktion der Proteine bei der Fibrillisation.

Um das Zusammenspiel von Tau und  $\alpha$ -Syn auf Einzelmolekül-Ebene zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit gemischten Proteinlösungen aus Tau<sup>488</sup> und  $\alpha$ -Syn<sup>647</sup> verschiedene Aggregations-Induktoren zugesetzt und auch der Einfluss der Tau-Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  untersucht.

### Koaggregation von Tau und $\alpha$ -Syn Monomeren

#### *Organische Lösungsmittel*

Organische Lösungsmittel wie DMSO verändern die dielektrische Konstante wässriger Lösungen und imitieren so ein membranahes Milieu [375]. Da die Entstehung AD-typischer NFTs bereits des öfteren mit Plasmamembranen in Zusammenhang gebracht wurden [23, 42, 374, 385], erschien es von Interesse, den Einfluss von DMSO auf Interaktionen von Tau und  $\alpha$ -Syn zu untersuchen.

Während die beiden Proteine in Abwesenheit von Aggregations-Induktoren keine Koaggregationsneigung aufweisen, induziert DMSO in einer Konzentration von 1% die Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn. Liegen die Proteine bei Versuchsbeginn als Monomere vor, zeigt sich kein Unterschied zwischen phosphoryliertem (pTau) und unphosphoryliertem (mTau) Tau-Protein im Koaggregationsverhalten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Proteine Tau und  $\alpha$ -Syn im membranahen Milieu interagieren und gemeinsame Aggregate bilden können. Solche gemischten Aggregate könnten als *seeds* die Fibrillisation beider Proteine induzieren. Ob solche Oligomere den Fibrillisations-Prozess tatsächlich beschleunigen, muss jedoch in weiteren Versuchen geklärt werden.

### *Aluminium*

Vergleichbar den Versuchen zur Tau-Aggregation zeigt sich  $\text{Al}^{3+}$  als stärkster Induktor der Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn, die durch Phosphorylierung des Tau-Proteins noch verstärkt wird.  $\text{Al}^{3+}$  wurde bereits in anderen Studien als stärkster Induktor der Tau- und  $\alpha$ -Syn-Aggregation identifiziert [70, 386].

Der Einfluss von Phosphorylierung und Metallionen auf die Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Synuklein wurde bisher noch nicht untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass  $\text{Al}^{3+}$  in Konzentrationen, die denen im AD-Gehirn nahekommen (siehe Kapitel 4.1.1), ein starker Induktor der Koaggregation dieser Proteine ist. Die vorherige Phosphorylierung des Tau-Proteins durch GSK-3 $\beta$  verstärkt diesen Effekt zusätzlich. Dies bringt die pathologische Hyperphosphorylierung, die bereits früh in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung stattfindet [183], und den bisher kontrovers diskutierten Einfluss des Aluminiums in einen neuen Zusammenhang. Bisher war lediglich bekannt, dass  $\alpha$ -Synuklein die Phosphorylierung des Tau-Proteins fördern kann [264]. In Parkinson-Modellen *in vitro* und *in vivo* erhöhte  $\alpha$ -Syn den Gehalt an aktiver GSK-3 $\beta$  und phosphoryliertem Protein Tau [265]. Die pathologische Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins wurde in mehreren Studien als fördernd oder sogar notwendig für Aluminium-induzierte Tau-Aggregation identifiziert [120–123, 137].

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse erweitern das Interaktionsspektrum von Tau,  $\alpha$ -Synuklein, GSK-3 $\beta$  und Aluminium. So könnte die pathologische Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins dazu führen, dass vermehrt  $\text{Al}^{3+}$ -induzierte *cross-seeds* aus Tau und  $\alpha$ -Syn entstehen, die die Fibrillisation beider Proteine beschleunigen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu zeigen, ob die gemischten Oligomere aus Tau und  $\alpha$ -Syn tatsächlich zur Ausbildung von Fibrillen führen.

### *Eisen*

Von großem Interesse ist auch der Einfluss von  $\text{Fe}^{3+}$  auf die Koaggregation der beiden Proteine. Nachdem der Fokus vieler Arbeiten lange Zeit auf Aluminium lag, rücken dreiwertige Eisenionen in jüngerer Zeit in das Interesse einiger Forschungsgruppen. Dabei weisen die beiden Metalle erhebliche Übereinstimmungen auf. Bei beiden handelt es sich um trivalente Metallionen, deren Bindungspartner und intra- wie extrazelluläre Transportmechanismen sich weitgehend überschneiden [107, 122, 166]. In AD-Gehirnen ist der Eisengehalt in Hippocampus und Amygdala erhöht [167, 168], und sowohl  $\text{Fe}^{2+}$  als auch  $\text{Fe}^{3+}$  sind in AD-typischen NFTs nachweisbar [134, 170, 171].

Yamamoto et al. zeigten, dass  $\text{Fe}^{3+}$  spezifisch an hyperphosphoryliertes Tau bindet und dessen Aggregation induziert [122], ein Wirkmechanismus, der zuvor bei Aluminium identifiziert wurde [121, 137].  $\text{Fe}^{3+}$ -induzierte Aggregate erweisen sich jedoch als weniger stabil als die durch Aluminium gebildeten [122]. Elektronenmikroskopisch weisen die in Gegenwart von Eisen gebildeten Aggregate hohe Ähnlichkeit zu den bei Aluminium beobachteten amorphen Aggregaten auf [119, 122, 124].

Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen zu  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\alpha$ -Synuklein. Das Metallion induziert die  $\alpha$ -Syn-Aggregation *in vitro* [70, 177, 387] und in Zellkultur [388]. Außerdem ist die Eisen-Konzentration der *Substantia nigra* von PD-Patienten erhöht, während

sein Bindungspartner, das Ferritin, erniedrigt ist [389].

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine mögliche neue Rolle von  $\text{Fe}^{3+}$  in der Pathogenese von Tauopathien und Synukleinopathien auf. Zwar wurde für die Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein bereits ein proaggregatorischer Effekt des Metalls in getrennten Ansätzen nachgewiesen [122, 388]. Im Falle des Tau-Proteins wurden jedoch Konzentrationen eingesetzt, die den von Ponka et al. ermittelten intrazellulären Eisengehalt von  $1,5 \mu\text{M}$  670fach überstiegen [390]. Ein Einfluss des Metalls auf die Koaggregation der beiden Proteine wurde bisher noch nicht untersucht. In unseren Studien induzierte  $\text{Fe}^{3+}$  in annähernd physiologischer Konzentration die Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Synuklein. Die vorhergehende Phosphorylierung von Tau förderte diesen Effekt zusätzlich, ebenso wie der Zusatz von 1% DMSO. Das Verhalten von  $\alpha$ -Syn im membranahen Milieu ist von besonderem Interesse, da das Protein in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$  Membranporen bildet, die möglicherweise eine zellschädigende Wirkung haben [177]. Welche pathophysiologische Bedeutung  $\text{Fe}^{3+}$  induzierten, gemischten Aggregaten aus Tau und  $\alpha$ -Syn zukommt, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

### Koaggregation von Tau Oligomeren und monomerem $\alpha$ -Syn

Die von Giasson et al. beobachteten gemischten Fibrillen aus Tau und  $\alpha$ -Syn zeigen im Immuno-EM meist Abschnitte, die nur aus Tau-Protein zu bestehen scheinen, gefolgt von Segmenten aus  $\alpha$ -Syn [50]. Um zu klären, ob Tau-Oligomere als *seeds* der Synuklein-Aggregation fungieren können, oder ob sich bei den von Giasson et al. beobachteten Strukturen lediglich Fragmente von Tau- und  $\alpha$ -Syn-Fibrillen aneinandergelagert haben, wurden in einer weiteren Versuchsreihe präformierten Tau-Oligomeren monomeres  $\alpha$ -Syn zugegeben.

In diesen Versuchen zeigt DMSO ebenfalls einen fördernden Effekt auf die Koaggregation von Tau und  $\alpha$ -Syn, wobei Oligomere aus unphosphoryliertem Tau (mTau) eine höhere Koaggregationsneigung aufweisen als solche aus phosphoryliertem Protein (pTau).

Vergleichbar der Interaktion von monomerem Tau und  $\alpha$ -Syn zeigen  $\text{Al}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  einen stärkeren Effekt auf die Koaggregation von pTau-Oligomeren mit  $\alpha$ -Syn als bei mTau.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Tau-Oligomere als *seeds* der Synuklein-Aggregation dienen können.

## 4.2 Effekte der limitierten Proteolyse des Tau-Proteins durch Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) galten lange Zeit als einfache Degradierungs-Enzyme der extrazellulären Matrix. Die komplexe Regulation dieser heterogenen Enzymgruppe sowie ihre Beteiligung an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Gewebeumbau und -reparatur, Angiogenese und Morphogenese wurden erst nach und nach bekannt [291, 292]. Auch ihre Beteiligung an der Pathogenese verschiedenster

Erkrankungen wie Asthma, Arthritis, Malignomen sowie ZNS-Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen ist mittlerweile erwiesen [295–300].

Neuere Forschungsarbeiten erweitern beständig die Liste der bekannten Substrate dieser Enzymgruppe, das sogenannte Degradom. Mittlerweile zählen auch viele intrazelluläre Proteine zu dieser Liste, und auch die Rolle der MMP als Regulatoren komplexer Signalwege wird zunehmend erkannt [391–393]. Zusammen mit dem vermehrten Nachweis intrazellulärer Aktivität verschiedener MMPs eröffnen diese Erkenntnisse die Möglichkeit, dass der Enzymgruppe eine Rolle bei intrazellulären Abbauprozessen und Signalkaskaden zukommt [301, 304].

In der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang eine mögliche Beteiligung von MMP-1, -3 und -9 an der pathologischen Aggregation des Tau-Proteins untersucht. Diese Enzyme werden in Gehirnen von AD-Patienten überexprimiert [300, 330, 348] und scheinen eine Rolle bei der Degradation von A $\beta$ -Peptid zu spielen [300, 347, 394]. Eine Beteiligung an der Tau-Pathologie wurde nach dem aktuellen Wissensstand unseres Labors noch nicht untersucht.

### Tau ist Substrat von MMP-1, -3 und -9

Bislang ist das Protein Tau nicht als Substrat von MMP-1, -3 oder -9 bekannt. Zunächst wurde daher die proteolytische Wirkung dieser Enzyme auf Tau bei verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe von Gelelektrophorese, Massenspektroskopie und SIFT untersucht. In der SDS-PAGE zeigt sich, dass MMP-3 und -9 ein spezifisches, exakt reproduzierbares Bandenmuster generieren. Mit steigender Enzymkonzentration entstehen kleinere Fragmente, was eine schrittweise Degradation des Volllängen-Proteins vermuten lässt (siehe Abb. 3.18). MMP-1 zeigte in zwei Versuchen keine im Coomassie-Gel erkennbaren Spaltprodukte. Eine *Western blot* Analyse ergab geringe Konzentrationen eines großen Tau-Fragments (Abb. 3.19).

Analoge Versuche mit Proteinase K (PK) und Trypsin zeigten eine wesentlich höhere Aktivität dieser Proteasen bei vergleichbaren Konzentrationen. Sie degradieren Tau vollständig, Bandenmuster sind erst bei Konzentrationen nachweisbar, die um den Faktor 100 (PK) bzw. 10 (Trypsin) niedriger liegen als bei den MMP.

Auch in der Massenspektroskopie zeigen sich spezifische Degradationsmuster der Enzyme. Mit Hilfe der Software-Pakete Data Explorer und GPMAW (siehe Tabelle B.4) erfolgte die Zuordnung der identifizierten Massen-Peaks nach Proteolyse zu Abschnitten auf dem Tau-Protein. Diese Auswertung ergab ein sehr homogenes Schnittmuster für Trypsin, wohingegen PK überwiegend im Bereich der *repeat*-Region des Tau-Proteins aktiv ist. Während MMP-9 vorwiegend in der N-terminalen Region des Proteins Schnittstellen aufweist, zeigt MMP-3 vermehrte Aktivität im C-terminalen Bereich, insbesondere in der *repeat*-Region. Vergleichbar den Resultaten der SDS-PAGE wurden für MMP-1 nur wenige Schnittstellen identifiziert, die allesamt außerhalb der *repeat*-Region liegen.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss betont werden, dass die vorliegenden Schnittstellen einer Software-Analyse von Massenspektroskopie-Daten entstammen. Es handelt sich also um mögliche, keineswegs aber um zwingend tatsächlich existente Schnittstellen.

Auffällig ist jedoch, dass die Proteasen Trypsin, PK und MMP-3 eine relativ hohe Aktivität in der *repeat*-Region aufweisen, während MMP-9 und MMP-1 in diesem Proteinabschnitt wenig Schnittstellen zeigen. Insgesamt zeigte sich eine nur mäßige proteolytische Aktivität von MMP-1 in SDS-PAGE und Massenspektroskopie im Gegensatz zur SIFT. Die *repeat*-Region wurde bereits früh als zentraler Abschnitt der Tau-Fibrillisation identifiziert. Insbesondere die beiden Hexapeptide 275VQIINK280 und 306VQIVYK311 scheinen essentielle Abschnitte zur Fibrillenbildung zu sein [33–36], und Trypsin, PK und MMP-3 weisen alle Schnittstellen in oder unmittelbar neben diesen Hexapeptiden auf. MMP-9 hingegen zeigt eine geringere Aktivität in diesem Proteinabschnitt. Stattdessen haben MMP-9 und -1 eine C-terminale Schnittstelle bei Aminosäure v391 bzw. s393. Das so generierte Fragment weist eine hohe Ähnlichkeit mit dem Fragment Asp421 auf (entspricht Asp392 bei Tau Isoform 5), das bereits histologisch mit der Tau-Pathologie assoziiert wurde und auch zu vermehrter Fibrillisation des Proteins *in vitro* führt [311, 312, 323]. Zudem fanden sich nach proteolytischem Verdau mit MMP-9 zwei Fragmente, die die *repeat*-Region fast vollständig enthalten. Wenngleich es sich bei den hier vorgestellten Ergebnissen um hypothetische Schnittstellen handelt, so ist ein differentieller Einfluss der verschiedenen Proteasen auf die Aggregation des Tau-Proteins durchaus denkbar.

Auch mittels SIFT konnte die Proteolyse des Tau-Proteins durch die Enzyme Trypsin, PK, sowie MMP-1, -3 und -9 verifiziert werden. In der SIFT-Analyse spiegelt sich die Degradation des Tau-Proteins im Anstieg der Gesamthelligkeit wider, was für alle untersuchten Proteasen nachgewiesen werden konnte. Exemplarisch wurde auch eine FCS-Analyse eines PK-Verdaus durchgeführt. Diese bestätigt das SIFT-Ergebnis, da durch die Degradation des Proteins die Teilchenzahl und Gesamthelligkeit zunehmen, die Diffusionszeit hingegen entsprechend abnimmt. Die abweichenden Ergebnisse von Elektrophorese und SIFT im Hinblick auf MMP-1 erklären sich womöglich durch die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse in den Versuchsansätzen. Die etwa um den Faktor  $10^3$  geringere Konzentration des Tau-Proteins im SIFT-Ansatz resultiert in einem relativen Überschuss der Protease, was einen höheren Anteil degradierten Tau-Proteins zur Folge haben könnte. Andererseits ist auch ein Einfluss der Proteinmarkierung nicht auszuschließen, da nur im SIFT-Ansatz fluoreszenzmarkiertes Protein verwendet wurde.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Tau ein mögliches Substrat von MMP-3, -9 und vermutlich auch MMP-1 ist, dass diese Enzyme spezifische Proteolysemuster bilden, und dass die Tau-Affinität von MMP-3 und -9 vermutlich die der MMP-1 übersteigt.

### Limitierte Proteolyse mit MMP-1 und MMP-9 steigert die Aggregationsneigung von Tau

Bisherige Studien zeigten, dass bereits eine geringe C-terminale Trunkierung des Tau-Proteins dessen Polymerisationsneigung erheblich steigern kann [311]. Bislang wurden vorwiegend Caspasen als mögliche Erzeuger solcher Fragmente nachgewiesen [311–313]. Andere Studien demonstrierten einen aggregationssteigernden Effekt bislang unbekannter Proteasen in Neuronen [395].

Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, ist die Aggregationsneigung von Tau nach

limitierter Proteolyse mit MMP-1 und -9 signifikant gesteigert (siehe Abb. 3.17). Die Degradation des Proteins mit MMP-3, PK oder Trypsin hatte in hohen Enzymkonzentrationen hingegen einen inhibitorischen Effekt auf die Tau-Polymerisation. Dies belegt, dass Proteolyse nicht generell, sondern nur durch Generierung spezifischer Tau-Fragmente proaggregatorisch wirkt.

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse die spezifische Fragmentierung des Tau-Proteins durch MMP-1, -3 und -9. Im Gegensatz zu PK, Trypsin und MMP-3 haben MMP-1 und -9 einen proaggregatorischen Einfluss auf das Protein, was ihre Beteiligung an der Pathogenese der Tauopathien möglich erscheinen lässt.

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Frage nach dem Ort der limitierten Proteolyse. Matrix-Metalloproteinasen sind vorwiegend als Enzyme der extrazellulären Matrix bekannt, die zumeist als zymogene Vorform sezerniert werden [289]. Dies macht eine extrazelluläre Fragmentierung des Tau-Proteins wahrscheinlich. Das Tau-Protein liegt in vitalem Hirngewebe jedoch intrazellulär vor, und auch NFTs stellen zunächst intrazelluläre Tau-Aggregate dar, die sich erst nach Absterben des Neurons in der extrazellulären Matrix befinden [136]. Insofern erscheint ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen MMP-induzierter Tau-Aggregation und neurodegenerativen Erkrankungen auf den ersten Blick nicht gegeben. Frost et al. konnten jedoch zeigen, dass extrazelluläre Tau-Oligomere von Neuronen aufgenommen werden und dort die Tau-Aggregation beschleunigen. Solche Tau-*seeds* können sogar über einen bisher unbekanntem Mechanismus interzellulär übertragen werden [325]. Vor diesem Hintergrund ist denkbar, dass MMP-induzierte Tau-Oligomere von Neuronen aufgenommen werden und dann intrazellulär die pathologische Aggregation des Proteins fördern. Da hierzu jedoch extrazelluläres Tau-Protein vonnöten ist, könnte dieser Mechanismus lediglich einen beschleunigenden Einfluss auf die Tau-induzierte Neurodegeneration haben.

Andererseits mehren sich Hinweise auf eine intrazelluläre Aktivität verschiedener MMP. Asahina et al. konnten zeigen, dass MMP-9 in AD-Gehirnen im Zytoplasma von Neuronen nachgewiesen werden kann und teilweise mit NFTs kolokalisiert ist. [327]. Des Weiteren wurde beispielsweise die aktive 45 kDa-Form von MMP-1 im Nukleus und an der Außenfläche von Mitochondrien zahlreicher Zelltypen, einschließlich Zellen glialen Ursprungs nachgewiesen [301]. Eine neuere Studie demonstrierte eine zentrale Rolle von MMP-9 im Zellzyklus von Neuroblastomzellen [302]. Die aktive Form von MMP-3 spielt eine tragende Rolle bei der stressinduzierten Apoptose dopaminergischer Neuronen [303]. In humanen Leberzellen konnte MMP-3 in Zytosol und Nukleus in Proben normaler und zirrhotischer Organe nachgewiesen werden, wobei die aktive Form des Enzyms lediglich in den Nuklei lokalisiert war. Des Weiteren fand sich MMP-3 in Nukleus und Zytosol kultivierter hepatischer Myofibroblasten und HepG2-Zellen, wo die katalytische Aktivität des Enzyms zu einer Erhöhung der Apoptoserate führte [304]. Ein intrazellulärer Nachweis liegt darüber hinaus für MMP-2, -11 und -14 vor [305–307].

Angesichts dieser Erkenntnisse erscheint es denkbar, dass verschiedene MMP möglicherweise auch in Neuronen eine aktive Rolle ausüben und folglich auch an der Tau-Pathologie beteiligt sein könnten. Definitive Aussagen zu einer solchen Beteiligung bedürfen jedoch eines *in vivo* Nachweises der Tau-Fragmentierung durch MMP in Neuronen.

### 4.3 Inhibitoren der Tau-Aggregation

Wenngleich die genaue Pathophysiologie der Alzheimer'schen Erkrankung und anderer Tauopathien bislang unzureichend geklärt ist, sprechen einige Hinweise für eine zentrale Rolle der Tau-Aggregation in diesen Erkrankungen. So korreliert der Grad an histologisch nachweisbarer Tau-Pathologie mit dem Grad der kognitiven Einschränkungen [396–398]. Im Tiermodell konnte der Grad kognitiver Defizite von APP-transgenen Mäusen (*amyloid precursor protein*) deutlich gesenkt werden, indem ihre Tau-Expression unterdrückt wurde [371].

Es wurden daher schon vermehrt Anstrengungen unternommen, Inhibitoren der Tau-Aggregation zu identifizieren, die den klinischen Verlauf der Tauopathien günstig beeinflussen könnten. Bisherige *screening*-Untersuchungen brachten verschiedene Substanzklassen wie Anthraquinone, Phenylthiazolyl-Hydrazide, Polyphenole, Phenothiazine und Quinoxaline hervor, die die Tau-Aggregation zum Teil bereits im mikromolaren Bereich inhibieren [399–401, 401, 402]. Allerdings beruhten diese Untersuchungen größtenteils auf dem Thioflavin T *assay*, der zwar zur Detektion von Tau-Fibrillen, nicht jedoch für den Nachweis kleinerer Oligomere geeignet ist. Auch wurden häufig hohe Konzentrationen des Proteins (bis 1 mM) [401] bzw. proaggregatorischer Tau-Fragmente verwendet [399, 402].

Taniguchi et al. zeigten überdies, dass einige Substanzen, die die Tau-Fibrillisation inhibieren, zur Anhäufung oligomerer Zwischenformen führen [401]. In jüngerer Zeit mehren sich jedoch die Hinweise, dass nicht Tau-Fibrillen, sondern Oligomere die pathophysiologisch bedeutsame Form des Proteins darstellen könnten [37, 46, 403].

FCS und SIFT detektieren Oligomere fluoreszenzmarkierter Proteine hochsensitiv und sind für Hochdurchsatz-*screening* geeignet [356, 404]. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss einer neuen Substanzklasse, der Imidazol[1,2- $\alpha$ ]Pyridin-Derivate (IMPY), auf die Aggregationseigenschaften des Tau-Proteins mit Hilfe dieser Verfahren untersucht.

Erste Versuche ergaben, dass die meisten IMPYs eine geringe Eigenfluoreszenz besitzen, die in den getesteten Konzentrationen mit der Kreuzkorrelations-Analyse, nicht jedoch mit der SIFT-Analyse interferiert. Daher wurde für die Datenauswertung lediglich die SIFT-Analyse verwendet. Von den neun getesteten Substanzen senkten sechs in einer Konzentration von 1  $\mu$ M die Tau-Aggregation unter 25% der Kontrolle (1% DMSO). In einer Konzentration von 10 nM erzielte keine der Substanzen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Auffällig an dieser Versuchsreihe ist, dass hier vorwiegend durch Modifikation der R<sub>1</sub>-Substituenten die antiaggregatorischen Eigenschaften der Substanzen modifizierbar waren. Durch Variation der R<sub>2</sub>-Substituenten konnten keine deutlichen Veränderungen der Wirksamkeit herbeigeführt werden.

Dieser Pilotversuch zeigt, dass SIFT als primäre *screening*-Methode für Inhibitoren der Tau-Oligomerisation geeignet sind. In Kombination mit etablierten *screening*-Verfahren wie dem Thioflavin T *assay* oder *in vivo* Modellen kann diese Methode somit sinnvoll für die präklinische Suche nach therapeutisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden.

## 4.4 Einsatz von Antikörpern in der SIFT-Methode

Antikörper dienen als Hilfsmittel verschiedenster diagnostischer Verfahren, wie z.B. Histopathologie, *Western blot* und ELISA. Während sie in der Neuropathologie schon lange zur Diagnostik verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie M. Alzheimer oder M. Parkinson dienen, fehlt es noch weitgehend an verlässlichen Biomarkern für die *in vivo* Diagnostik dieser Erkrankungen. Zur Vorhersage der Progression einer Milden Kognitiven Einschränkung (*mild cognitive impairment*, MCI) zum Vollbild der Alzheimer'schen Erkrankung liefert die Bestimmung des Liquor-Gehaltes von  $A\beta_{42}$ , gesamt-Tau und phospho-Tau<sup>180</sup> Ergebnisse von akzeptabler Sensitivität [405–408]. Allerdings dienen diese Marker lediglich der Diagnosefindung, sind zur Verlaufskontrolle jedoch ungeeignet [409]. Hier zeigen sich andere Verfahren wie FDG-PET wirksamer, die allerdings in näherer Zukunft aufgrund des hohen technischen Aufwandes und der damit verbundenen Kosten kaum flächendeckend eingesetzt werden können [409].

### *Spezifischer Nachweis von Protein Tau*

SIFT könnte im Bereich der Antikörper-vermittelten Diagnostik gewinnbringend eingesetzt werden, da die Methode Probenanalyse im Hochdurchsatz-Verfahren erlaubt, Proben von wenigen  $\mu\text{l}$  benötigt und Fluoreszenzpartikel hochsensitiv detektieren kann. In Vorgängerarbeiten konnte schon gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Typisierung verschiedener Influenza-Vakzine genutzt werden können [368]. In der hier vorliegenden Arbeit gelang die Detektion von Protein Tau mit dem Antikörper T46 bei Proteinkonzentrationen von etwa 8 nM, wohingegen der als Negativkontrolle mitgeführte  $A\beta$ -Antikörper 6E10 kein Protein detektierte. Mit Hilfe des phospho-Tau spezifischen Antikörpers AT-8 gelang darüber hinaus die Differenzierung zwischen unphosphoryliertem und phosphoryliertem Protein. Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass ein spezifischer Nachweis von Proteinen und post-translationalen Modifikationen in nanomolarer Konzentration möglich ist, was SIFT auch für Liquorstudien interessant macht.

### *Spezifischer Nachweis von $\alpha$ -Synuklein*

Eine weitere Versuchsreihe beschäftigte sich mit der spezifischen Nachweisbarkeit von  $\alpha$ -Synuklein. Hierbei fanden der  $\alpha$ -Syn spezifische Antikörper 15G7 [410], der  $A\beta$ -Antikörper 6E10 (Negativkontrolle), sowie der anti-Oligomer-Antikörper A11 Anwendung. Kaye et al. zeigten, dass der Antikörper A11 spezifisch Oligomere amyloidogener Proteine einschließlich  $\alpha$ -Synuklein, jedoch keine Monomere detektiert [369]. In den hier vorgestellten Versuchen detektierte 15G7 sensitiv monomeres und oligomeres  $\alpha$ -Syn<sup>647</sup> sowie monomeres, oligomeres und fibrilläres, unmarkiertes  $\alpha$ -Syn. A11 detektierte erwartungsgemäß weder Monomere noch Fibrillen, allerdings auch keine der getesteten Oligomere. Das völlige Fehlen jeglicher Antigen-Antikörper-Interaktion von A11 wirft die Frage auf, ob die Fluoreszenzmarkierung hier solche Interaktionen unterbindet.

Zusammenfassend zeigt sich die SIFT-Methode als geeignet, um nicht nur Proteine, sondern auch post-translationalen Modifikationen wie die Tau-Phosphorylierung detektieren.

Da hierzu lediglich nanomolare Konzentrationen des Zielproteins vonnöten sind, könnten diese Methoden in Zukunft möglicherweise zur Entwicklung sensitiver Biomarker verschiedenster Erkrankungen eingesetzt werden.

## 4.5 Ausblick

Die hier vorgelegte Arbeit erweitert die Einsatzmöglichkeiten von FCS und SIFT speziell hinsichtlich der Untersuchung post-translationaler Modifikationen des Tau-Proteins, wie Trunkierung und Phosphorylierung. Die so gewonnenen Ergebnisse können möglicherweise zum Verständnis der Tau-Pathologie beitragen. Insbesondere die Möglichkeit, den Einfluss post-translationaler Modifikationen auf die Interaktion verschiedener Proteine zu untersuchen, eröffnet zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten im diagnostischen, prätherapeutischen und pathophysiologischen Bereich. Nachdem der Einfluss der Proteinkinase GSK-3 $\beta$  auf die Interaktionen von Tau und  $\alpha$ -Synuklein in dieser Arbeit ausführlich untersucht wurde, wäre auch der Einfluss anderer Kinasen wie cdk5 von hoher pathophysiologischer Relevanz. Weitere Bereiche der Protein-Protein-Interaktion, deren Untersuchung auf Einzelmolekül-Ebene relevant wäre, könnten zum Beispiel die Wechselwirkung von Tau und Tubulin sein. Auch andere post-translationalen Modifikationen wie Nitrierung oder Ubiquitinierung wären mittels FCS und SIFT zu untersuchen.

Im therapeutischen Bereich stellt die hier vorgelegte Arbeit einen neuen Assay zum *screening* neuer Aggregations-Inhibitoren vor. Neben DMSO könnten hierbei weitere Induktoren wie Arachidonsäure, Eisen oder Aluminium Anwendung finden. Angesichts der Fülle verfügbarer chemischer Substanzen besteht in diesem Bereich noch hohes Potential für zukünftige Arbeiten.

Die hier vorgestellten Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zeigen, dass FCS und SIFT potenziell auch im diagnostischen Bereich sinnvoll einsetzbar sind. Besondere Aufmerksamkeit verdienen beispielsweise Liquoruntersuchungen von AD-Patienten, bei denen derzeit bereits phosphoryliertes Tau<sup>180</sup> diagnostisch eingesetzt wird. Möglicherweise könnte die Liquordiagnostik zukünftig um die hier vorgestellten hochsensitiven Verfahren erweitert werden.

# Zusammenfassung

Pathologischen Aggregaten der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein wird eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen zugeschrieben. In jüngerer Zeit mehren sich die Hinweise, dass nicht die mikroskopisch sichtbaren fibrillären Aggregate, sondern kleinere Oligomere die pathophysiologisch relevante Aggregat-Spezies bei diesen Erkrankungen darstellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tau und  $\alpha$ -Synuklein sich gegenseitig in ihrem Aggregationsverhalten beeinflussen können, was eine Interaktion dieser Proteine auf Einzelmolekülebene vermuten lässt.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden frühe Aggregationsprozesse des Tau-Proteins sowie dessen Interaktion mit  $\alpha$ -Synuklein mit Hilfe der *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie* (FCS) und *Scanning for Intensely Fluorescent Targets* (SIFT) unter pathophysiologisch, diagnostisch und therapeutisch relevanten Gesichtspunkten untersucht. Diese Methoden erlauben die Detektion einzelner fluoreszenzmarkierter Proteine in nanomolaren Lösungen und liefern multiple Parameter zur Charakterisierung sowohl einzelner Moleküle als auch von Aggregaten. Insbesondere sind dynamische Interaktionen verschiedener Proteine durch Anwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe in hoher zeitlicher Auflösung detektierbar.

Ein Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen des Tau-Proteins gelegt. Die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch GSK-3 $\beta$  zeigt einen fördernden Einfluss auf dessen Oligomerisationsbereitschaft in Gegenwart von Aluminium, mindert jedoch die Aggregation in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Die in Gegenwart von Al<sup>3+</sup> entstehenden Oligomere weisen eine hohe Resistenz gegenüber ionischen Detergenzien auf.

Nach limitierter Proteolyse mit Matrix Metalloproteinase (MMP) -1 und -9, nicht jedoch mit MMP-3, Proteinase K oder Trypsin besteht ebenfalls eine vermehrte Aggregationsneigung des Proteins. Hierbei generiert jede der Proteasen spezifische Tau Fragmente, die mit Hilfe von SDS-PAGE und Massenspektroskopie näher charakterisiert wurden. Nach limitierter Proteolyse mit MMP-9 konnten Fragmente identifiziert werden, die das Kernstück der fibrillären Tau-Aggregate, die *repeat*-Domäne, fast vollständig enthalten. Vor dem Hintergrund neuerer Erkenntnisse, die zeigen, dass Tau-Pathologie aus dem extrazellulären Milieu in Neuronen übertragen werden kann, erscheint die Generation pro-aggregatorischer Tau-Fragmente durch extrazelluläre Proteasen von erheblicher Bedeutung.

Darüber hinaus ist eine spezifische Interaktion von Tau und  $\alpha$ -Synuklein auf Einzelmolekülebene nachweisbar. In nanomolarer Konzentration zeigen die Proteine keine Tendenz

zur Koaggregation im Zeitrahmen weniger Stunden. Die Koaggregation der beiden Proteine kann jedoch sowohl durch organische Lösungsmittel als auch durch die Metallionen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Al}^{3+}$  induziert werden, wobei Letztere zur Ausbildung größerer gemischter Aggregate führen, die eine hohe Resistenz gegen ionische Detergenzien aufweisen. Die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch GSK-3 $\beta$  erhöhte die Koaggregationsneigung der beiden Proteine in Gegenwart dreiwertiger Metallionen.

Im Hinblick auf diagnostische Einsatzmöglichkeiten von FCS und SIFT zeigt sich, dass Tau und  $\alpha$ -Synuklein in nanomolaren Lösungen mit Hilfe spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper nachweisbar sind. Auch posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  lassen sich mit Hilfe solcher Antikörper detektieren. Die Detektion posttranslativaler Modifikationen im nanomolaren Konzentrationsbereich eröffnet neue Möglichkeiten, z.B. im Bereich der für einige neurodegenerative Erkrankungen bislang noch wenig nutzbaren Liquor-Diagnostik.

Im Bereich der therapeutischen Anwendung wurden einige Vertreter einer neuen Klasse niedermolekularer Substanzen, die Imidazol[1,2- $\alpha$ ]Pyridin-Derivate (IMPY), hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften auf die Tau-Oligomerisation untersucht. Einige der untersuchten Substanzen erwiesen sich bereits als potente Inhibitoren der Tau-Aggregation. Der Messaufbau des InsightReaders erlaubt künftig die Anwendung dieses Assays im Hochdurchsatz-Verfahren, um umfassende Substanz-Datenbanken zu untersuchen. Dies ermöglicht eine Vorauswahl potenzieller Inhibitoren z.B. für weiterführende tierexperimentelle Untersuchungen.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit weitere Erkenntnisse über den Einfluss posttranslativaler Modifikationen auf die Aggregationseigenschaften der Proteine Tau und  $\alpha$ -Synuklein sowie deren Interaktion auf Einzelmolekül-Ebene. In Anknüpfung an frühere Ergebnisse erweisen sich FCS und SIFT als geeignete Methoden zur Untersuchung früher Aggregationsprozesse und können zur Erforschung pathophysiologischer, diagnostischer und therapeutischer Aspekte neurodegenerativer Erkrankungen beitragen.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
$\alpha$ -Syn	$\alpha$ -Synuklein
AD	Alzheimer'sche Erkrankung (Alzheimer's disease)
Akt	Proteinkinase B
APD	Avalanche Photodiode
AT-8	phospho-Tau spezifischer Antikörper
BCA	Bichionin-Säure (bichioninic acid)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, artifizielles chromogenes Substrat der Alkalischen Phosphatase
BSA	bovines Serum-Albumin
BSc	Bezeichnung für eine Gruppe chemischer Compounds
CBD	Kortikobasale Degeneration
CC	Kreuzkorrelation (cross correlation)
Cdc	Cell division cycle Kinase
CDK5	Cyclin-abhängige Kinase 5
CPP	counts per particle
DLB	Demenz mit Lewy-Bodies
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
EP	Elusionspuffer
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

*fortgesetzt auf folgender Seite ...*

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>	
Abkürzung	Erläuterung
FDG-PET	<sup>18</sup> Fluor-desoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FIDA	fluorescence intensity distribution analysis
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus mit Verbindung zu Chromosom 17
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GSK-3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
IGF-1	insuline-like growth factor 1
IMPY	Imidazol-Pyridin-Derivat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Itotal	Gesamthelligkeit der gemessenen Fluoreszenz
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LZ1/2	$\alpha$ -Synuklein Oligomere, die unter definierten Bedingungen generiert werden (siehe Kapitel 3.5)
MALDI ToF	Matrox-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation kombiniert mit Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (time of flight)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MARK2	Serin/Threonin Protein Kinase
MCI	mild cognitive impairment
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMSE	Mini Mental State Examination
MPP+	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MSA	Multiple Systematrophie
mTau	mock-phosphoryliertes Protein Tau
MT-MMP	Membran-Typ Matrix-Metalloproteinase
NAC	non-A $\beta$ component
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NPDPK	non-proline-directed protein kinase
OD600	Optische Dichte bei einer Anregungs-Wellenlänge von 600 nm
PBS	phosphate buffered saline
PD	Parkinson'sche Erkrankung (Parkinson's disease)
PDPK	proline-directed protein kinase
<i>fortgesetzt auf folgender Seite ...</i>	

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>	
Abkürzung	Erläuterung
PHF	paired helical filament
PK	Proteinase K
PKA	Proteinkinase A
PP1/PP5	Protein Phosphatase 1/5
PP2A/B	Protein Phosphatase 2 A/B
PSP	Progressive supranukleäre Blickparese
pTau	phosphoryliertes Protein Tau
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIFT	scanning for intensely fluorescent targets
T-46	Tau-spezifischer Antikörper
tdiff	Diffusionszeit
TIMP	tissue inhibitor of Metalloproteinasen
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tryp	Trypsin
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabelle A.1: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen.

# Anhang B

## Materialien, Chemikalien, Puffer, technische Geräte und Software

Material	Hersteller	LOT
Adhesive Folie (PE), zertifiziert RNase-, DNasefrei epT.I.P.S. Reloads 0,1-10 $\mu$ l 2-200 $\mu$ l 50-1000 $\mu$ l Evotec NC 384/30 $\mu$ l Reaktionsplatten Evotec NC 96/30 $\mu$ l Reaktionsplatten	G.Kisker GbR  Eppendorf AG (Hamburg)  Evotec technologies (Hamburg)  Evotec technologies (Hamburg)	070306-000  W129628N V125830M W129641M
Filtropur S 0,20 $\mu$ m steril Filtropur S 0,45 $\mu$ m steril HiLoad 26/60 Sephadex 75 prep grade column Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit	Sarstedt (Nümbrecht) Sarstedt (Nümbrecht) GE-Healthcare (Uppsala) GE Healthcare (Buckinghamshire)	020136 040074 0127028  359092
Immobilon-P transfer membranes Filter type: PVDF Pore size: 0,45 $\mu$ m cut size: 26,5 cm * 3,75 m Lower Filter (small) 35 $\mu$ m pore size Microfuge Tube Polyallomer Tint:	Millipore    MoBiTec Beckman Instruments Inc. Spinco Division	K6KN8780X

*fortgesetzt auf folgender Seite ...*

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>		
Material	Hersteller	LOT
natural 1,5 ml for Beckman Optima TLX		P70418
Mobicols 1 ml	MoBiTec	
Parafilm M laboratory film	American National Can (Chicago,IL)	
PCR Tubes 0.2 ml	Eppendorf AG (Hamburg)	V126016N
PCR-Platten 96-well high profile, 0,2 ml	G.Kisker GbR	05-07-88151505
PD-10 columns Sephadex G 25 M	GE-Healthcare (Uppsala)	311404
Pipetten	VWR	
5 ml		O06O0372027
10 ml		N26N1791014
25 ml		O38O2632052
steril, einzeln verpackt		
Protein LoBind Tube	Eppendorf AG (Hamburg)	
1,5 ml		X131506H
0,5 ml		W130769R
Quali-PCR-Tube-Caps, transparent zertifiziert RNase-, DNase-, pyrogenfrei, Streifen je 8	G.Kisker GbR	060127-042
Quali-PCR-Tube-Streifen, transparent 0,2 ml zertifiziert RNase-, DNase-, pyrogenfrei, Streifen je 8	G.Kisker GbR	060530-043
Röhre	Sarstedt (Nümbrecht)	
15ml		7044001
50ml		7044201
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG (Hamburg)	
1,5 ml		W129556M
0,5 ml		V1265360O
0,2 ml		W129291M
Sorvall centrifuge tubes, PA, 12 ml	SORVALL (Kendro Laboratory Products)	7D12NA508LS286
Stericup Filter Unit	Milipore	

*fortgesetzt auf folgender Seite ...*

---

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>		
Material	Hersteller	LOT
GP Express PLUS Membrane 0,22 $\mu$ M UVette Starter-Set for Spectrophotometer 80 Stc.	Eppendorf AG (Hamburg)	R7EN47299 24290

Tabelle B.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Materialien. Soweit möglich, wurden alle Materialien vor Verwendung autoklaviert.

Chemikalien	Hersteller	LOT
Acrylamide-bis 30% (37,5:1) ready-to-use solution for electrophoresis	Merck (Darmstadt)	L56024839632
Adenosine 5-Triphosphate Disodium Salt SigmaUltra C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 5 g	Sigma (St.Louis, MO, USA)	024K7016
Aluminiumchlorid-Hexahydrat AlCl <sub>3</sub> pro analysi > 97%, 250 g	Bernd Kraft GMBH (Duisburg)	1127669
APS Ammoniumpersulfat	Sigma (St.Louis, MO, USA)	082K1135
Bactotrypton		
Benzamidin C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> HCl		
Bicinchoninic Acid Solution 1 l	Sigma (Protokoll: TPRO-562)	100K5302
BCIP		
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat		
BRIJ-35	Thermo Scientific (Rockford, IL)	
Polyoxyethylen(23)laurylether		
CDP-Star, ready-to-use 2x50 ml	Roche (Mannheim)	93443120
Cu(II)Sulfat Pentahydrat 4% Lösung 25 ml	Sigma (Protokoll: TPRO-562)	80K5004
DMF N,N-Dimethylformamide C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO 500 ml	Sigma (St.Louis, MO, USA)	59H364315
DMSO Methyl sulfoxide, 99.7% C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Acros organics (Geel, Belgium)	A0208798001
DTT		
EGTA	Sigma (St.Louis, MO, USA)	24H5709
EthyleneGlycol-bis( $\beta$ -Aminoethyl Ether) N,N,N,N Tetraacetic acid 100 g		
Eisenchlorid-Hexahydrat FeCl <sub>3</sub> pro analysi, 250 g	Merck (Darmstadt)	B0249643817
Glycerol C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Merck (Darmstadt)	K26627609925
HCl	Merck (Darmstadt)	0C264225
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe)	14678034
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma (St.Louis, MO, USA)	025K5408

*fortgesetzt auf folgender Seite ...*

Fortsetzung von vorheriger Seite		
Chemikalien	Hersteller	LOT
Mercaptoethanol C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Sigma (Steinheim, GER)	062K0115
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat 1 kg	Merck (Darmstadt)	A 406233 242
Milk powder blotting grade 1 kg	Carl Roth (Karlsruhe)	34681195
Natriumchlorid >99,5%	Carl Roth (Karlsruhe)	15894097
NBT 4-Nitro blue tetrazolium chloride	Roche (Mannheim)	9335420
C <sub>40</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> , 5g		
NP-40	New England BioLabs	0105
nonyl-phenoxypropylpolyethoxyethanol		
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein	Fermentas Life sciences	
Ladder 2x250 µl	(Burlington, Canada)	
PBS Tablets 20 Stc.	Calbiochem	D00001479
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid		
SDS ultra pure 500 g	Carl Roth (Karlsruhe)	14463375
Sucrose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Carl Roth (Karlsruhe)	48361907
TEMED	Sigma (St.Louis, MO,	112K0586
(N,N,N,N-Tetramethylenediamine)	USA)	90K1699
TRIS-Base	Carl Roth (Karlsruhe)	22787172
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
TWEEN 20 1 kg	Carl Roth (Karlsruhe)	13461831
Thioflavin T	Sigma (St.Louis, MO,	81K3643
	USA)	

Tabelle B.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. Bei Kauf wurde auf höchstmöglichen verfügbaren Reinheitsgrad geachtet.

Name	Abkürzung	pH	Zusammensetzung	Konzentration
TRIS-Puffer	TRIS	7,0	TRIS-Base	50 mM
TRIS-Puffer Stammlösung	TRIS <sub>S</sub>	7,0	TRIS-Base	0,5 M
TRIS-Puffer + NP40	TRIS*	7,0	TRIS-Base NP-40	50 mM 0,01%
TRIS-Puffer + NP40	TRIS**	7,0	TRIS-Base NP-40	50 mM 0,001%
Phosphat-gepufferte Salzlösung	PBS / 1fach PBS	7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl KCl	10 mM 140 mM 2,7 mM
PBS + NP40	PBS*	7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl KCl NP40	10 mM 140 mM 2,7 mM 0,1%
PBS + TWEEN	PBS-TWEEN	7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl KCl TWEEN 20	10 mM 140 mM 2,7 mM 0,1%
Phosphorylierungs- Puffer	P <sub>Phos</sub>	7,64	HEPES EGTA MgCl <sub>2</sub> ATP	40 mM 5 mM 3 mM 2 mM
GSK-Puffer	P <sub>GSK</sub>	7,5	TRIS-Base NaCl EGTA BRIJ-35 Sucrose PMSF Benzamidine Mercaptoethanol	50 mM 150 mM 0,1 mM 0,03% 270 mM 0,2 mM 1 mM 0,1%
Dimethyl-Sulfoxid	DMSO		C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	99,7%
Sammegel-Puffer		6,8	TRIS-Base	0,5 M
Trenngel-Puffer		8,8	TRIS-Base	1,5 M
Luria-Bertani Medium	LB-Medium		Bactotrypton Hefeextrakt NaCl	1% 0,5% 85,6 mM

fortgesetzt auf folgender Seite ...

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>				
Name	Abkürzung	pH	Zusammensetzung	Konzentration
rich Luria-Bertani Medium	rich LB-Medium		Bactotrypton Hefeextrakt NaCl Glycerol autoklavieren, kurz vor Verwendung nachfolgendes zusetzen Glukose K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> Ampicillin Chloramphenicol	1% 0,5% 85,6 mM 2%
Elusions-Puffer	EP		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> EGTA DTT	50 mM 1 mM 1 mM
EP + NaCl	EP*		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> EGTA DTT	50 mM 1 mM 1 mM
EP + NaCl / Mercaptoethanol	EP**		NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> EGTA DTT	30 mM 50 mM 1 mM 1 mM
Thioflavin T Laufpuffer	ThT		NaCl Mercaptoethanol Thioflavin T TRIS-Base Glycin SDS	30 mM 1% 100 μM 0,125 M 0,96 M 0,1%
Blotpuffer			TRIS-Base Glycin SDS	0,025 M 0,192 M 0,1%
AP-Puffer			Methanol TRIS-Base NaCl MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	20% 100 mM 100 mM 5 mM
<i>fortgesetzt auf folgender Seite ...</i>				

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>				
Name	Abkürzung	pH	Zusammensetzung	Konzentration
Laemmli-Puffer 5fach	Laemmli	6,8	SDS Glycerol $\beta$ -Mercaptoethanol Bromophenol-Blau TRIS-Base	10% 50% 25% 0,01% 0,3125 M
Entfärber-Lösung			Ethanol reinst $C_2H_4O_2$	25% 8%
Coomassie-Lösung				
NBT-Lösung	NBT		DMF NBT	75% 75 mg/ml
BCIP-Lösung	BCIT		DMF BCIP	100% 50 mg/ml

Tabelle B.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Puffer. Bei der Herstellung wurde auf höchstmögliche Sterilität geachtet.

Geräte	Hersteller	Seriennummer
FLUOstar OPTIMA Combination measurement head: Absorbance 384 optic + Fluorescence 96 optic Luminescence 96 optic	BMG Labtech (Offenburg)	413-0653 11-310 11-330
BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)	RS 232 C
LS 55 Luminescence Spek- trometer	Perkin Elmer (Waltham, MA)	LS55-058626
Insight Research Reader	Evotec Biosystems AG (Hamburg)	Rr_03_08, Rr_04_06
French Press Pressure cell press	Thermo IEC (Needham Heights, MA)	
Hoefler SemiPhor Semidry	Amersham Biosciences (Nmbrecht, GER)	
Optima MAX-XP Ultra- centrifuge (Rotor: TLA-55)	Beckman Coulter GMBH (Fullerton, CA)	CTZ07H02
Sorvall Discovery 90SE Ul- tracentrifuge	Kendro Laboratory Pro- ducts (Langenselbold)	40329544
Mini Protean 3 electropho- resis system	Biorad (Hercules, CA))	
MPH120 pH Meter	Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach, Schweiz)	217537
Chemocam HR 16 3200 Chemoluminiszenz-Kamera	Intas (Göttingen)	29210320
ChemoStar Software Versi- on 0.2.17	Intas (Göttingen)	
FCS+plus Eval Software Version 2.0	Evotec (Hamburg, GER)	
SIFT-2D Software	Evotec (Hamburg, GER)	
FIDA-Analyze Software	Evotec (Hamburg, GER)	
pooling_ntp2D-FIDA Soft- ware	Evotec (Hamburg, GER)	
FCS+plus control Software	Evotec (Hamburg, GER)	
DataExplorer Software Ver- sion 4.3	Applied Biosystems (Darm- stadt, GER)	
GPMAW Software Version 5.11	Lighthouse data (Odense, DNK)	

## Anhang C

### Tabellarische Darstellung der *phospho*-Tau Versuche

## pTau

	TRIS	DMSO 10%	DMSO 1%	EtOH 10%	SDS 0,2%	NP40 0,1%	AI	DMSO + AI
<b>pTau</b>								
TRIS	1,00	80,65	7,29	3,33	0,55	1,74	45,72	47,87
DMSO 10%	0,01	1,00	0,09	0,04	0,01	0,02	0,57	0,59
DMSO 1%	0,14	11,06	1,00	0,46	0,08	0,24	6,27	6,56
EtOH 10%	0,30	24,21	2,19	1,00	0,16	0,52	13,73	14,37
SDS 0,2%	1,82	147,1	13,30	6,07	1,00	3,18	83,39	87,30
NP40 0,1%	0,57	46,25	4,18	1,91	0,31	1,00	26,22	27,45
AI	0,02	1,76	0,16	0,07	0,01	0,04	1,00	1,05
DMSO + AI	0,02	1,68	0,15	0,07	0,01	0,04	0,96	1,00
<b>mTau</b>								
TRIS	0,22	17,69	1,60	0,73	0,12	0,38	10,03	10,50
DMSO 10%	0,01	0,60	0,05	0,02	0,004	0,01	0,34	0,35
DMSO 1%	0,03	2,66	0,24	0,11	0,02	0,06	1,51	1,58
EtOH 10%	0,05	3,89	0,35	0,16	0,03	0,08	2,20	2,31
SDS 0,2%	0,09	7,54	0,68	0,31	0,05	0,16	4,27	4,47
NP40 0,1%	0,15	12,22	1,11	0,50	0,08	0,26	6,93	7,25
AI	0,02	1,90	0,17	0,08	0,01	0,04	1,07	1,12
DMSO + AI	0,02	1,81	0,16	0,07	0,01	0,04	1,03	1,08
<b>mTau</b>								
TRIS	1,00	29,59	6,65	4,55	2,35	1,45	9,34	9,75
DMSO 10%	0,03	1,00	0,22	0,15	0,08	0,05	0,32	0,33
DMSO 1%	0,15	4,45	1,00	0,68	0,35	0,22	1,40	1,47
EtOH 10%	0,22	6,50	1,46	1,00	0,52	0,32	2,05	2,14
SDS 0,2%	0,43	12,60	2,83	1,94	1,00	0,62	3,98	4,15
NP40 0,1%	0,69	20,44	4,60	3,14	1,62	1,00	6,45	6,74
AI	0,11	3,17	0,71	0,49	0,25	0,16	1,00	1,04
DMSO + AI	0,10	3,03	0,68	0,47	0,24	0,15	0,96	1,00
	TRIS	DMSO 10%	DMSO 1%	EtOH 10%	SDS 0,2%	NP40 0,1%	AI	DMSO + AI

## mTau

Tabelle C.1: Vergleich der Aggregation phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der SIFT-Auswertung.

## pTau

	TRIS	DMSO 10%	DMSO 1%	EtOH 10%	SDS 0,2%	NP40 0,1%	AI	DMSO + AI
<b>pTau</b>								
TRIS	1,000	16,49	2,542	2,102	0,083	0,536	355,6	378,8
DMSO 10%	0,061	1,000	0,154	0,127	0,005	0,032	21,56	22,97
DMSO 1%	0,393	6,487	1,000	0,827	0,033	0,211	139,9	149,0
EtOH 10%	0,476	7,846	1,210	1,000	0,039	0,255	169,2	180,2
SDS 0,2%	12,06	198,8	30,65	25,34	1,000	6,458	4287,4	4567,4
NP40 0,1%	1,867	30,79	4,746	3,924	0,155	1,000	663,9	707,2
AI	0,003	0,046	0,007	0,006	0,0002	0,002	1,000	1,065
DMSO + AI	0,003	0,044	0,007	0,006	0,0002	0,001	0,939	1,000
<b>mTau</b>								
TRIS	0,234	3,858	0,595	0,492	0,019	0,125	83,19	88,63
DMSO 10%	0,044	0,727	0,112	0,093	0,004	0,024	15,67	16,69
DMSO 1%	0,065	1,080	0,166	0,138	0,005	0,035	23,29	24,81
EtOH 10%	0,097	1,595	0,246	0,203	0,008	0,052	34,38	36,63
SDS 0,2%	3,708	61,14	9,425	7,793	0,308	1,986	1318,4	1404,5
NP40 0,1%	0,569	9,384	1,447	1,196	0,047	0,305	202,3	215,6
AI	0,004	0,069	0,011	0,009	0,0003	0,002	1,484	1,580
DMSO + AI	0,004	0,058	0,009	0,007	0,0003	0,002	1,253	1,334
<b>mTau</b>								
TRIS	1,000	5,309	3,572	2,420	0,063	0,411	56,08	66,42
DMSO 10%	0,188	1,000	0,673	0,456	0,012	0,077	10,53	12,51
DMSO 1%	0,280	1,486	1,000	0,677	0,018	0,115	15,70	18,59
EtOH 10%	0,413	2,194	1,476	1,000	0,026	0,170	23,18	27,45
SDS 0,2%	15,85	84,14	56,61	38,35	1,000	6,516	888,7	1052,6
NP40 0,1%	2,432	12,91	8,689	5,885	0,153	1,000	136,4	161,5
AI	0,018	0,095	0,064	0,043	0,001	0,007	1,000	1,184
DMSO + AI	0,015	0,080	0,054	0,036	0,001	0,006	0,844	1,000
	TRIS	DMSO 10%	DMSO 1%	EtOH 10	SDS 0,2%	NP40 0,1%	AI	DMSO + AI

## mTau

Tabelle C.2: Vergleich der Aggregation phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der Kreuzkorrelation.

<b>pTau</b>							
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	
<b>pTau</b>	TRIS	1,000	146,4	1818,1	565,7	1784,5	
	DMSO 1%	0,002	0,363	4,505	1,402	4,421	
	Fe 10 $\mu$ M	0,007	1,000	12,42	3,863	12,19	
	Al 10 $\mu$ M	0,001	0,222	1,000	0,311	0,982	
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,002	0,714	0,259	3,214	1,000	3,155
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,226	0,082	1,019	0,317	1,000
<b>mTau</b>	TRIS	0,668	97,78	1214,2	377,8	1191,7	
	DMSO 1%	0,002	0,834	0,303	3,758	1,169	3,689
	Fe 10 $\mu$ M	0,026	10,64	3,860	47,94	14,92	47,05
	Al 10 $\mu$ M	0,001	0,384	0,139	1,728	0,538	1,696
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,002	0,945	0,343	4,256	1,324	4,177
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,268	0,097	1,207	0,375	1,184
<b>mTau</b>	TRIS	1,000	25,33	702,5	285,3	1006,2	
	DMSO 1%	0,003	1,000	0,078	2,174	0,883	3,114
	Fe 10 $\mu$ M	0,039	12,76	1,000	27,74	11,26	39,73
	Al 10 $\mu$ M	0,001	0,460	0,036	1,000	0,406	1,432
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,004	1,133	0,089	2,463	1,000	3,527
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,321	0,025	0,698	0,284	1,000
<b>mTau</b>							
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	

Tabelle C.3: Vergleich der Koaggregation phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins mit  $\alpha$ -Synuklein in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der SIFT-Analyse.

<b>pTau</b>							
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	
<b>pTau</b>	TRIS	1,000	30,54	1158,2	225,3	1821,7	
	DMSO 1%	0,028	0,845	32,04	6,233	50,39	
	Fe 10 $\mu$ M	0,033	1,000	37,92	7,378	59,65	
	Al 10 $\mu$ M	0,001	0,026	1,000	0,195	1,573	
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,004	0,136	5,140	1,000	8,085	
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,017	0,636	0,124	1,000	
<b>mTau</b>	TRIS	0,717	21,89	830,0	161,5	1305,4	
	DMSO 1%	0,025	0,775	29,41	5,721	46,25	
	Fe 10 $\mu$ M	0,208	6,343	240,5	46,80	378,3	
	Al 10 $\mu$ M	0,003	0,117	3,748	0,729	5,895	
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,005	0,165	6,266	1,219	9,855	
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,025	0,934	0,182	1,469	
<b>mTau</b>	TRIS	1,000	3,451	221,5	132,5	888,4	
	DMSO 1%	0,035	0,122	7,846	4,693	31,48	
	Fe 10 $\mu$ M	0,290	1,000	64,18	38,39	257,5	
	Al 10 $\mu$ M	0,005	0,016	1,000	0,598	4,012	
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,008	0,026	1,672	1,000	6,707	
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,001	0,004	0,249	0,149	1,000	
<b>mTau</b>							
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	

Tabelle C.4: Vergleich der Koaggregation phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins mit  $\alpha$ -Synuklein in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der Kreuzkorrelation.

pTau						
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO
<b>pTau</b>	TRIS	1,0000	338,4	2152,1	745,9	2777,5
	DMSO 1%	0,0270	9,137	58,13	20,15	75,02
	Fe 10 $\mu$ M	0,0030	1,0000	6,360	2,204	8,209
	Al 10 $\mu$ M	0,0005	0,1572	1,0000	0,3466	1,291
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0013	0,4536	2,885	1,0000	3,724
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0004	0,1218	0,7748	0,2685	1,0000
<b>mTau</b>	TRIS	0,5103	172,7	1098,2	380,6	1417,3
	DMSO 1%	0,0027	0,0998	5,800	2,010	7,486
	Fe 10 $\mu$ M	0,0118	3,997	25,42	8,812	32,81
	Al 10 $\mu$ M	0,0097	3,299	20,98	7,272	27,08
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0015	0,5136	3,267	1,132	4,216
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0006	0,0240	1,393	0,4827	1,797
<b>mTau</b>	TRIS	1,0000	43,19	52,34	336,1	788,6
	DMSO 1%	0,0053	1,0000	0,2764	1,775	4,165
	Fe 10 $\mu$ M	0,0232	4,383	1,212	7,782	18,26
	Al 10 $\mu$ M	0,0191	3,618	1,0000	6,423	15,07
	Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0030	0,5632	0,1557	1,0000	2,346
	Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0013	0,2401	0,0664	0,4263	1,0000
mTau						
	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO

Tabelle C.5: Vergleich der Koaggregation von  $\alpha$ -Synuklein mit präformierten Oligomeren phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der SIFT-Analyse.

<b>pTau</b>							
<b>pTau</b>	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	
TRIS	1,0000	7,208	93,22	1702,1	454,7	2813,8	
DMSO 1%	0,1387	1,0000	12,93	236,2	63,09	390,4	
Fe 10 $\mu$ M	0,0107	0,0773	1,0000	18,26	4,88	30,19	
Al 10 $\mu$ M	0,0006	0,0042	0,0548	1,0000	0,2672	1,653	
Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0022	0,0159	0,2050	3,743	1,0000	6,188	
Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0004	0,0026	0,0331	0,6049	0,1616	1,0000	
<b>mTau</b>	TRIS	0,6850	63,86	1166,0	311,5	1927,6	
DMSO 1%	0,0273	0,1964	2,541	46,39	12,39	76,69	
Fe 10 $\mu$ M	0,0934	0,6735	8,710	159,1	42,49	262,9	
Al 10 $\mu$ M	0,0044	0,0319	0,4125	7,532	2,012	12,45	
Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0026	0,0184	0,2381	4,347	1,161	7,186	
Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0007	0,0050	0,0647	1,182	0,3158	1,954	
<b>mTau</b>	TRIS	1,0000	7,331	154,8	268,2	986,6	
DMSO 1%	0,0398	1,0000	0,2917	6,159	10,67	39,25	
Fe 10 $\mu$ M	0,1364	3,429	1,0000	21,12	36,59	134,6	
Al 10 $\mu$ M	0,0065	0,1624	0,0474	1,0000	1,733	6,373	
Fe 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0037	0,0937	0,0273	0,5771	1,0000	3,678	
Al 10 $\mu$ M + DMSO 1%	0,0010	0,0255	0,0074	0,1569	0,2719	1,0000	
<b>mTau</b>							
<b>mTau</b>	TRIS	DMSO 1%	Fe	Al	Fe+DMSO	Al+DMSO	

Tabelle C.6: Vergleich der Koaggregation von  $\alpha$ -Synuklein mit präformierten Oligomeren phosphorylierten und scheinphosphorylierten Tau-Proteins in Gegenwart verschiedener Substanzen. Dargestellt sind die Ratios (Säule/Spalte) der Kreuzkorrelation.

# Literaturverzeichnis

- [1] Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A. & Mandelkow, E. Structural studies of tau protein and alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem* **269**, 24290–7 (1994).
- [2] Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. & Lansbury, P. T., Jr. Nacp, a protein implicated in alzheimer’s disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709–15 (1996).
- [3] Wischik, C. M. *et al.* Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4506–10 (1988).
- [4] Ma, Q.-L., Chan, P., Yoshii, M. & Uéda, K. Alpha-synuclein aggregation and neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* **5**, 139–48 (2003).
- [5] Grundke-Iqbal, I. *et al.* Microtubule-associated protein tau. a component of alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**, 6084–9 (1986).
- [6] Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in lewy bodies. *Nature* **388**, 839–40 (1997).
- [7] Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* **116**, 227–47 (1977).
- [8] Fujiwara, H. *et al.* alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* **4**, 160–4 (2002).
- [9] Horiguchi, T. *et al.* Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* **163**, 1021–31 (2003).
- [10] Giasson, B. I. *et al.* Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* **290**, 985–9 (2000).
- [11] Morishima-Kawashima, M. *et al.* Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* **10**, 1151–60 (1993).

- [12] Sharma, N., McLean, P. J., Kawamata, H., Irizarry, M. C. & Hyman, B. T. Alpha-synuclein has an altered conformation and shows a tight intermolecular interaction with ubiquitin in lewy bodies. *Acta Neuropathol* **102**, 329–34 (2001).
- [13] García-Sierra, F., Wischik, C. M., Harrington, C. R., Luna-Muñoz, J. & Mena, R. Accumulation of c-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* **22**, 65–77 (2001).
- [14] Baba, M. *et al.* Aggregation of alpha-synuclein in lewy bodies of sporadic parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol* **152**, 879–84 (1998).
- [15] Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of alzheimer's disease. *Neuron* **3**, 519–26 (1989).
- [16] Mandelkow, E. M. *et al.* Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 96–106 (1996).
- [17] Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. Why are natively unfolded proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415–27 (2000).
- [18] Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**, 321–31 (1999).
- [19] Hirokawa, N., Shiomura, Y. & Okabe, S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* **107**, 1449–59 (1988).
- [20] Preuss, U., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in cho cells. *J Cell Sci* **110** ( Pt 6), 789–800 (1997).
- [21] Santarella, R. A. *et al.* Surface-decoration of microtubules by human tau. *J Mol Biol* **339**, 539–53 (2004).
- [22] Harada, A. *et al.* Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488–91 (1994).
- [23] Brandt, R., Léger, J. & Lee, G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* **131**, 1327–40 (1995).
- [24] Sontag, E. *et al.* Molecular interactions among protein phosphatase 2a, tau, and microtubules. implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* **274**, 25490–8 (1999).

- [25] Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Tau in alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* **8**, 425–7 (1998).
- [26] Feany, M. B. & Dickson, D. W. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* **40**, 139–48 (1996).
- [27] Feany, M. B., Mattiace, L. A. & Dickson, D. W. Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, pick's disease and corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 53–67 (1996).
- [28] Pollanen, M. S., Markiewicz, P., Bergeron, C. & Goh, M. C. Twisted ribbon structure of paired helical filaments revealed by atomic force microscopy. *Am J Pathol* **144**, 869–73 (1994).
- [29] Crowther, R. A., Olesen, O. F., Smith, M. J., Jakes, R. & Goedert, M. Assembly of alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett* **337**, 135–8 (1994).
- [30] Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* **118**, 573–84 (1992).
- [31] Novak, M., Kabat, J. & Wischik, C. M. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* **12**, 365–70 (1993).
- [32] Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J. & Crowther, R. A. Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **8**, 159–68 (1992).
- [33] Barghorn, S. & Mandelkow, E. Toward a unified scheme for the aggregation of tau into alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**, 14885–96 (2002).
- [34] Barghorn, S. *et al.* Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* **39**, 11714–21 (2000).
- [35] von Bergen, M. *et al.* Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem* **276**, 48165–74 (2001).
- [36] von Bergen, M. *et al.* Assembly of tau protein into alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)vtqvyyk(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5129–34 (2000).
- [37] Eckermann, K. *et al.* The beta-propensity of tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J Biol Chem* **282**, 31755–65 (2007).

- [38] Khlistunova, I. *et al.* Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* **281**, 1205–14 (2006).
- [39] Goux, W. J. *et al.* The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. *J Biol Chem* **279**, 26868–75 (2004).
- [40] Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Davies, P. & Mandelkow, E. A nucleated assembly mechanism of alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15712–7 (1998).
- [41] Sahara, N. *et al.* Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci* **25**, 3020–9 (2007).
- [42] Chirita, C. N., Necula, M. & Kuret, J. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J Biol Chem* **278**, 25644–50 (2003).
- [43] King, M. E., Gamblin, T. C., Kuret, J. & Binder, L. I. Differential assembly of human tau isoforms in the presence of arachidonic acid. *J Neurochem* **74**, 1749–57 (2000).
- [44] Maeda, S. *et al.* Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* **46**, 3856–61 (2007).
- [45] Wittmann, C. W. *et al.* Tauopathy in drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293**, 711–4 (2001).
- [46] Yoshiyama, Y. *et al.* Synapse loss and microglial activation precede tangles in a p301s tauopathy mouse model. *Neuron* **53**, 337–51 (2007).
- [47] Santacruz, K. *et al.* Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476–81 (2005).
- [48] Chen, X. *et al.* The human nacp/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and taqi rflp analysis. *Genomics* **26**, 425–7 (1995).
- [49] Shibasaki, Y., Baillie, D. A., St Clair, D. & Brookes, A. J. High-resolution mapping of snca encoding alpha-synuclein, the non-a beta component of alzheimer's disease amyloid precursor, to human chromosome 4q21.3–q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **71**, 54–5 (1995).
- [50] Giasson, B. I. *et al.* Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* **300**, 636–40 (2003).
- [51] Conway, K. A., Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset parkinson disease. *Nat Med* **4**, 1318–20 (1998).

- [52] Hashimoto, M. *et al.* Human recombinant nacp/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for lewy body disease. *Brain Res* **799**, 301–6 (1998).
- [53] Wood, S. J. *et al.* alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. implications for the pathogenesis of parkinson's disease. *J Biol Chem* **274**, 19509–12 (1999).
- [54] Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* **345**, 27–32 (1994).
- [55] Abeliovich, A. *et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239–52 (2000).
- [56] George, J. M., Jin, H., Woods, W. S. & Clayton, D. F. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* **15**, 361–72 (1995).
- [57] Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 3214–20 (2000).
- [58] Ostroverova, N. *et al.* alpha-synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* **19**, 5782–91 (1999).
- [59] Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I. & Nukina, N. alpha-synuclein affects the mapk pathway and accelerates cell death. *J Biol Chem* **276**, 45320–9 (2001).
- [60] Ibáñez, P. *et al.* Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1169–71 (2004).
- [61] Singleton, A. B. *et al.* alpha-synuclein locus triplication causes parkinson's disease. *Science* **302**, 841 (2003).
- [62] Ross, O. A. *et al.* Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol* **63**, 743–50 (2008).
- [63] Paik, S. R., Lee, J. H., Kim, D. H., Chang, C. S. & Kim, Y. S. Self-oligomerization of nacp, the precursor protein of the non-amyloid beta/a4 protein (a beta) component of alzheimer's disease amyloid, observed in the presence of a c-terminal a beta fragment (residues 25-35). *FEBS Lett* **421**, 73–6 (1998).
- [64] Alim, M. A. *et al.* Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* **277**, 2112–7 (2002).
- [65] Antony, T. *et al.* Cellular polyamines promote the aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* **278**, 3235–40 (2003).

- [66] Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F. & George, J. M. Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *J Biol Chem* **276**, 41958–62 (2001).
- [67] Lee, H.-J., Choi, C. & Lee, S.-J. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* **277**, 671–8 (2002).
- [68] Castellani, R. J., Siedlak, S. L., Perry, G. & Smith, M. A. Sequestration of iron by lewy bodies in parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **100**, 111–4 (2000).
- [69] Giese, A. *et al.* Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 1202–10 (2005).
- [70] Uversky, V. N., Li, J. & Fink, A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. a possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* **276**, 44284–96 (2001).
- [71] Hasegawa, T. *et al.* Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of sh-sy5y neuroblastoma cells. *Brain Res* **1013**, 51–9 (2004).
- [72] Matsuzaki, M. *et al.* Histochemical features of stress-induced aggregates in alpha-synuclein overexpressing cells. *Brain Res* **1004**, 83–90 (2004).
- [73] Ellis, R. J., Caligiuri, M., Galasko, D. & Thal, L. J. Extrapyramidal motor signs in clinically diagnosed alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **10**, 103–14 (1996).
- [74] Mölsä, P. K., Marttila, R. J. & Rinne, U. K. Extrapyramidal signs in alzheimer's disease. *Neurology* **34**, 1114–6 (1984).
- [75] Morris, J. C., Drazner, M., Fulling, K., Grant, E. A. & Goldring, J. Clinical and pathological aspects of parkinsonism in alzheimer's disease. a role for extranigral factors? *Arch Neurol* **46**, 651–7 (1989).
- [76] Louis, E. D., Tang, M. X. & Mayeux, R. Parkinsonian signs in older people in a community-based study: risk of incident dementia. *Arch Neurol* **61**, 1273–6 (2004).
- [77] Wilson, R. S., Schneider, J. A., Bienias, J. L., Evans, D. A. & Bennett, D. A. Parkinsonianlike signs and risk of incident alzheimer disease in older persons. *Arch Neurol* **60**, 539–44 (2003).
- [78] Galpern, W. R. & Lang, A. E. Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol* **59**, 449–58 (2006).
- [79] Mayeux, R. *et al.* A population-based investigation of parkinson's disease with and without dementia. relationship to age and gender. *Arch Neurol* **49**, 492–7 (1992).

- [80] Hely, M. A., Morris, J. G. L., Reid, W. G. J. & Trafficante, R. Sydney multicenter study of parkinson's disease: non-l-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* **20**, 190–9 (2005).
- [81] Aarsland, D. *et al.* Risk of dementia in parkinson's disease: a community-based, prospective study. *Neurology* **56**, 730–6 (2001).
- [82] Kosik, K. S., Joachim, C. L. & Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4044–8 (1986).
- [83] Uéda, K. *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11282–6 (1993).
- [84] Hamilton, R. L. Lewy bodies in alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol* **10**, 378–84 (2000).
- [85] Knopman, D. S. *et al.* Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 1087–95 (2003).
- [86] Mori, H. *et al.* Lewy bodies in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* **104**, 273–8 (2002).
- [87] Yamazaki, M. *et al.* Alpha-synuclein inclusions in amygdala in the brains of patients with the parkinsonism-dementia complex of guam. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 585–91 (2000).
- [88] Lippa, C. F., Schmidt, M. L., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Antibodies to alpha-synuclein detect lewy bodies in many down's syndrome brains with alzheimer's disease. *Ann Neurol* **45**, 353–7 (1999).
- [89] Wilhelmsen, K. C. *et al.* 17q-linked frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis without tau mutations with tau and alpha-synuclein inclusions. *Arch Neurol* **61**, 398–406 (2004).
- [90] Jellinger, K. A., Seppi, K., Wenning, G. K. & Poewe, W. Impact of coexistent alzheimer pathology on the natural history of parkinson's disease. *J Neural Transm* **109**, 329–39 (2002).
- [91] Mattila, P. M., Røyttä, M., Torikka, H., Dickson, D. W. & Rinne, J. O. Cortical lewy bodies and alzheimer-type changes in patients with parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **95**, 576–82 (1998).
- [92] McKeith, I. G. *et al.* Prospective validation of consensus criteria for the diagnosis of dementia with lewy bodies. *Neurology* **54**, 1050–8 (2000).

- [93] Schmidt, M. L., Martin, J. A., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Convergence of lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of alzheimer's disease and lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **91**, 475–81 (1996).
- [94] Arai, Y. *et al.* Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic alzheimer's disease: morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res* **888**, 287–296 (2001).
- [95] Lippa, C. F. *et al.* Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am J Pathol* **153**, 1365–70 (1998).
- [96] Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D. & Dickson, D. W. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 389–97 (2003).
- [97] Arima, K. *et al.* Nacp/alpha-synuclein and tau constitute two distinctive subsets of filaments in the same neuronal inclusions in brains from a family of parkinsonism and dementia with lewy bodies: double-immunolabeling fluorescence and electron microscopic studies. *Acta Neuropathol* **100**, 115–21 (2000).
- [98] Yancopoulou, D., Xuereb, J. H., Crowther, R. A., Hodges, J. R. & Spillantini, M. G. Tau and alpha-synuclein inclusions in a case of familial frontotemporal dementia and progressive aphasia. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 245–53 (2005).
- [99] Takeda, A. *et al.* C-terminal alpha-synuclein immunoreactivity in structures other than lewy bodies in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* **99**, 296–304 (2000).
- [100] Frausto da Silva J.J.R., W. R. *The biological chemistry of the elements* (Oxford University Press, Oxford, 2001).
- [101] Krewski, D. *et al.* Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **10 Suppl 1**, 1–269 (2007).
- [102] Martin, R. B. The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin Chem* **32**, 1797–806 (1986).
- [103] Saiyed, S. M. & Yokel, R. A. Aluminium content of some foods and food products in the usa, with aluminium food additives. *Food Addit Contam* **22**, 234–44 (2005).
- [104] Moore, P. B. *et al.* Absorption of aluminium-26 in alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dement Geriatr Cogn Disord* **11**, 66–9 (2000).

- [105] Yokel, R. A. & Florence, R. L. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicology* **227**, 86–93 (2006).
- [106] Birchall, J. D. & Chappell, J. S. Aluminum, chemical physiology, and alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1008–10 (1988).
- [107] Roskams, A. J. & Connor, J. R. Aluminum access to the brain: a role for transferrin and its receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9024–7 (1990).
- [108] Ackley, D. C. & Yokel, R. A. Aluminum transport out of brain extracellular fluid is proton dependent and inhibited by mersalyl acid, suggesting mediation by the monocarboxylate transporter (mct1). *Toxicology* **127**, 59–67 (1998).
- [109] Namekata, K. *et al.* Association of transferrin c2 allele with late-onset alzheimer's disease. *Hum Genet* **101**, 126–9 (1997).
- [110] Perl, D. P. & Good, P. F. Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *Lancet* **329**, 1028 (1987).
- [111] Doellken, U. Ueber die wirkung des aluminiums mit besonderer beruecksichtigung der durch das aluminium verursachten laesionen im centralnervensystem. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **40**, 98–120 (1897).
- [112] Klatzo, I., Wisniewski, H. & Streicher, E. Experimental production of neurofibrillary degeneration. i. light microscopic observations. *J Neuropathol Exp Neurol* **24**, 187–99 (1965).
- [113] Terry, R. D. & Pena, C. Experimental production of neurofibrillary degeneration 2. electron microscopy, phosphatase histochemistry and electron probe analysis. *J Neuropathol Exp Neurol* **24**, 200–10 (1965).
- [114] Kawahara, M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* **8**, 171–82; discussion 209–15 (2005).
- [115] G.A., T. Studies of aluminum interaction with enzymes and proteins - the inhibition of hexokinase. *Neurotoxicology* **1**, 89–100 (1980).
- [116] Yamamoto, H., Saitoh, Y., Yasugawa, S. & Miyamoto, E. Dephosphorylation of tau factor by protein phosphatase 2a in synaptosomal cytosol fractions, and inhibition by aluminum. *J Neurochem* **55**, 683–90 (1990).
- [117] Abdel-Ghany, M., el Sebae, A. K. & Shalloway, D. Aluminum-induced nonenzymatic phospho-incorporation into human tau and other proteins. *J Biol Chem* **268**, 11976–81 (1993).

- [118] Hollósi, M. *et al.* Metal ion-induced conformational changes of phosphorylated fragments of human neurofilament (nf-m) protein. *J Mol Biol* **223**, 673–82 (1992).
- [119] Scott, C. W., Fieles, A., Sygowski, L. A. & Caputo, C. B. Aggregation of tau protein by aluminum. *Brain Res* **628**, 77–84 (1993).
- [120] Haase, C., Stieler, J. T., Arendt, T. & Holzer, M. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem* **88**, 1509–20 (2004).
- [121] Shin, R. W., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Aluminum modifies the properties of alzheimer's disease phf tau proteins in vivo and in vitro. *J Neurosci* **14**, 7221–33 (1994).
- [122] Yamamoto, A. *et al.* Iron (iii) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (ii) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of alzheimer's disease. *J Neurochem* **82**, 1137–47 (2002).
- [123] Li, W., Ma, K. K., Sun, W. & Paudel, H. K. Phosphorylation sensitizes microtubule-associated protein tau to al(3+)-induced aggregation. *Neurochem Res* **23**, 1467–76 (1998).
- [124] Mizoroki, T. *et al.* Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J Alzheimers Dis* **11**, 419–27 (2007).
- [125] Kawahara, M., Kato, M. & Kuroda, Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Res Bull* **55**, 211–7 (2001).
- [126] Kawahara, M., Muramoto, K., Kobayashi, K. & Kuroda, Y. Functional and morphological changes in cultured neurons of rat cerebral cortex induced by long-term application of aluminum. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 1317–22 (1992).
- [127] Guy, S. P., Jones, D., Mann, D. M. & Itzhaki, R. F. Human neuroblastoma cells treated with aluminium express an epitope associated with alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* **121**, 166–8 (1991).
- [128] McDermott, J. R., Smith, A. I., Iqbal, K. & Wisniewski, H. M. Brain aluminum in aging and alzheimer disease. *Neurology* **29**, 809–14 (1979).
- [129] Bjertness, E. *et al.* Content of brain aluminum is not elevated in alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **10**, 171–4 (1996).
- [130] Lovell, M. A., Ehmman, W. D. & Markesbery, W. R. Laser microprobe analysis of brain aluminum in alzheimer's disease. *Ann Neurol* **33**, 36–42 (1993).
- [131] Crapper, D. R., Krishnan, S. S. & Dalton, A. J. Brain aluminum distribution in alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* **180**, 511–3 (1973).

- [132] Xu, N., Majidi, V., Markesbery, W. R. & Ehmann, W. D. Brain aluminum in alzheimer's disease using an improved gfaas method. *Neurotoxicology* **13**, 735–43 (1992).
- [133] Markesbery, W. R., Ehmann, W. D., Alauddin, M. & Hossain, T. I. Brain trace element concentrations in aging. *Neurobiol Aging* **5**, 19–28 (1984).
- [134] Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M. & Schmeidler, J. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of alzheimer's disease: a laser microprobe (lamma) study. *Ann Neurol* **31**, 286–92 (1992).
- [135] Perl, D. P. & Brody, A. R. Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science* **208**, 297–9 (1980).
- [136] Walton, J. R. Aluminum in hippocampal neurons from humans with alzheimer's disease. *Neurotoxicology* **27**, 385–94 (2006).
- [137] Murayama, H. *et al.* Interaction of aluminum with phftau in alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. *Am J Pathol* **155**, 877–85 (1999).
- [138] Munoz-Garcia, D., Pendlebury, W. W., Kessler, J. B. & Perl, D. P. An immunocytochemical comparison of cytoskeletal proteins in aluminum-induced and alzheimer-type neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* **70**, 243–8 (1986).
- [139] Huang, Y. *et al.* Neurofibrillary lesions in experimental aluminum-induced encephalopathy and alzheimer's disease share immunoreactivity for amyloid precursor protein, a beta, alpha 1-antichymotrypsin and ubiquitin-protein conjugates. *Brain Res* **771**, 213–20 (1997).
- [140] Savory, J., Huang, Y., Herman, M. M., Reyes, M. R. & Wills, M. R. Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res* **669**, 325–9 (1995).
- [141] Savory, J., Huang, Y., Herman, M. M. & Wills, M. R. Quantitative image analysis of temporal changes in tau and neurofilament proteins during the course of acute experimental neurofibrillary degeneration; non-phosphorylated epitopes precede phosphorylation. *Brain Res* **707**, 272–81 (1996).
- [142] Kowall, N. W., Pendlebury, W. W., Kessler, J. B., Perl, D. P. & Beal, M. F. Aluminum-induced neurofibrillary degeneration affects a subset of neurons in rabbit cerebral cortex, basal forebrain and upper brainstem. *Neuroscience* **29**, 329–37 (1989).
- [143] Savory, J., Rao, J. K., Huang, Y., Letada, P. R. & Herman, M. M. Age-related hippocampal changes in bcl-2:bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis

- associated with aluminum-induced neurodegeneration: increased susceptibility with aging. *Neurotoxicology* **20**, 805–17 (1999).
- [144] Kaneko, N., Yasui, H., Takada, J., Suzuki, K. & Sakurai, H. Orally administered aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J Inorg Biochem* **98**, 2022–31 (2004).
- [145] Kihira, T., Yoshida, S., Yase, Y., Ono, S. & Kondo, T. Chronic low-ca/mg high-al diet induces neuronal loss. *Neuropathology* **22**, 171–9 (2002).
- [146] Wills, M. R., Hewitt, C. D., Savory, J. & Herman, M. M. Long-term oral aluminum administration in rabbits. ii. brain and other organs. *Ann Clin Lab Sci* **23**, 17–23 (1993).
- [147] Shcherbatykh, I. & Carpenter, D. O. The role of metals in the etiology of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**, 191–205 (2007).
- [148] Martyn, C. N. *et al.* Geographical relation between alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Lancet* **333**, 61–62 (1989).
- [149] W.F. Forbes, S. L. & Gentleman, J. Geochemical risk factors for mental functioning, based on the ontario longitudinal study of aging (lsa) v. comparisons of the results, relevant to aluminum water concentrations, obtained from the lsa and from death certificates mentioning dementia. *Canadian Journal on Aging* **14**, 642–656 (1995).
- [150] W.F. Forbes, L. H., C.A. McAiney & Agwani, N. Geochemical risk factors for mental functioning, based on the ontario longitudinal study of aging (lsa) ii. the role of ph. *Canadian Journal on Aging* **13**, 249–267 (1994).
- [151] Solfrizzi, V. *et al.* Macronutrients, aluminium from drinking water and foods, and other metals in cognitive decline and dementia. *J Alzheimers Dis* **10**, 303–30 (2006).
- [152] Wettstein, A., Aeppli, J., Gautschi, K. & Peters, M. Failure to find a relationship between mnemonic skills of octogenarians and aluminum in drinking water. *Int Arch Occup Environ Health* **63**, 97–103 (1991).
- [153] WHO/IPCS. Aluminum. WHO, Geneva (1997).
- [154] Polizzi, S. *et al.* Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and alzheimer's disease. *Neurotoxicology* **23**, 761–74 (2002).
- [155] Hosovski, E., Mastelica, Z., Sunderić, D. & Radulović, D. Mental abilities of workers exposed to aluminium. *Med Lav* **81**, 119–23 (1990).
- [156] Hänninen, H., Matikainen, E., Kovala, T., Valkonen, S. & Riihimäki, V. Internal load of aluminum and the central nervous system function of aluminum welders. *Scand J Work Environ Health* **20**, 279–85 (1994).

- [157] Sim, M. *et al.* Are aluminium potroom workers at increased risk of neurological disorders? *Occup Environ Med* **54**, 229–35 (1997).
- [158] Letzel, S. *et al.* Longitudinal study of neurotoxicity with occupational exposure to aluminum dust. *Neurology* **54**, 997–1000 (2000).
- [159] Salib, E. & Hillier, V. A case-control study of alzheimer's disease and aluminium occupation. *Br J Psychiatry* **168**, 244–9 (1996).
- [160] Gillette-Guyonnet, S. *et al.* Cognitive impairment and composition of drinking water in women: findings of the epidos study. *Am J Clin Nutr* **81**, 897–902 (2005).
- [161] Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Letenneur, L. & Dartigues, J. F. Silica and aluminum in drinking water and cognitive impairment in the elderly. *Epidemiology* **7**, 281–5 (1996).
- [162] Bellia, J. P., Birchall, J. D. & Roberts, N. B. The role of silicic acid in the renal excretion of aluminium. *Ann Clin Lab Sci* **26**, 227–33 (1996).
- [163] Crapper McLachlan, D. R. *et al.* Intramuscular desferrioxamine in patients with alzheimer's disease. *Lancet* **337**, 1304–8 (1991).
- [164] Domingo, J. L. Aluminum and other metals in alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis* **10**, 331–41 (2006).
- [165] Savory, J., Herman, M. M., Erasmus, R. T., Boyd, J. C. & Wills, M. R. Partial reversal of aluminium-induced neurofibrillary degeneration by desferrioxamine in adult male rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol* **20**, 31–7 (1994).
- [166] Webb, J., Multani, J. S., Saltman, P., Beach, N. A. & Gray, H. B. Spectroscopic and magnetic studies of iron (3) phosphates. *Biochemistry* **12**, 1797–802 (1973).
- [167] Deibel, M. A., Ehmann, W. D. & Markesbery, W. R. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci* **143**, 137–42 (1996).
- [168] Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L. & Markesbery, W. R. Copper, iron and zinc in alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* **158**, 47–52 (1998).
- [169] Bartzokis, G. *et al.* In vivo evaluation of brain iron in alzheimer disease using magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 47–53 (2000).
- [170] Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M. & Perry, G. Iron accumulation in alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9866–8 (1997).

- [171] Morris, C. M., Kerwin, J. M. & Edwardson, J. A. Non-haem iron histochemistry of the normal and alzheimer's disease hippocampus. *Neurodegeneration* **3**, 267–75 (1994).
- [172] Smith, M. A. *et al.* Abnormal localization of iron regulatory protein in alzheimer's disease. *Brain Res* **788**, 232–6 (1998).
- [173] Honda, K., Casadesus, G., Petersen, R. B., Perry, G. & Smith, M. A. Oxidative stress and redox-active iron in alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 179–82 (2004).
- [174] Bishop, G. M. *et al.* Iron: a pathological mediator of alzheimer disease? *Dev Neurosci* **24**, 184–7 (2002).
- [175] Gutteridge, J. M., Quinlan, G. J., Clark, I. & Halliwell, B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochim Biophys Acta* **835**, 441–7 (1985).
- [176] Yang, E. Y., Guo-Ross, S. X. & Bondy, S. C. The stabilization of ferrous iron by a toxic beta-amyloid fragment and by an aluminum salt. *Brain Res* **839**, 221–6 (1999).
- [177] Kostka, M. *et al.* Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J Biol Chem* **283**, 10992–1003 (2008).
- [178] Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913–7 (1986).
- [179] Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* **59**, 750–3 (1992).
- [180] Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K. & Yen, S. H. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* **597**, 209–19 (1992).
- [181] Köpke, E. *et al.* Microtubule-associated protein tau. abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in alzheimer disease. *J Biol Chem* **268**, 24374–84 (1993).
- [182] Kenessey, A. & Yen, S. H. The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of phf-tau from alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* **629**, 40–6 (1993).
- [183] Braak, H. & Braak, E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* **16**, 271–8; discussion 278–84 (1995).

- [184] Buerger, K. *et al.* Csf phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in alzheimer's disease. *Brain* **129**, 3035–41 (2006).
- [185] Hampel, H. *et al.* Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* **61**, 95–102 (2004).
- [186] Goedert, M., Jakes, R. & Vanmechelen, E. Monoclonal antibody at8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* **189**, 167–9 (1995).
- [187] Zheng-Fischhöfer, Q. *et al.* Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase a at thr212 and ser214 generates the alzheimer-specific epitope of antibody at100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* **252**, 542–52 (1998).
- [188] Buée-Scherrer, V. *et al.* Ad2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **39**, 79–88 (1996).
- [189] Ferrer, I., Barrachina, M. & Puig, B. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in alzheimer's disease, pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol* **104**, 583–91 (2002).
- [190] Alonso, A. d. C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* **279**, 34873–81 (2004).
- [191] Gendron, T. F. & Petrucelli, L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **4**, 13 (2009).
- [192] Drewes, G. *et al.* Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). a novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* **270**, 7679–88 (1995).
- [193] Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Mark, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**, 297–308 (1997).
- [194] Voss, K. & Gamblin, T. C. Gsk-3beta phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects. *Mol Neurodegener* **4**, 18 (2009).
- [195] Ishiguro, K. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase i generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* **325**, 167–72 (1993).

- [196] Kobayashi, S. *et al.* A cdc2-related kinase pssalre/cdk5 is homologous with the 30 kda subunit of tau protein kinase ii, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett* **335**, 171–5 (1993).
- [197] Li, B., Chohan, M. O., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Disruption of microtubule network by alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol* **113**, 501–11 (2007).
- [198] Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S. & Iqbal, K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 298–303 (1997).
- [199] Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* **2**, 783–7 (1996).
- [200] Alonso, A. d. C., Li, B., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8864–9 (2006).
- [201] Paula-Barbosa, M., Tavares, M. A. & Cadete-Leite, A. A quantitative study of frontal cortex dendritic microtubules in patients with alzheimer's disease. *Brain Res* **417**, 139–42 (1987).
- [202] Stokin, G. B. *et al.* Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Science* **307**, 1282–8 (2005).
- [203] Praprotnik, D., Smith, M. A., Richey, P. L., Vinters, H. V. & Perry, G. Filament heterogeneity within the dystrophic neurites of senile plaques suggests blockage of fast axonal transport in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **91**, 226–35 (1996).
- [204] Biernat, J. *et al.* Protein kinase mark/par-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* **13**, 4013–28 (2002).
- [205] Biernat, J. & Mandelkow, E. M. The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* **10**, 727–40 (1999).
- [206] Mills, J. *et al.* Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth. *J Neurosci* **23**, 1638–48 (2003).
- [207] Sayas, C. L., Avila, J. & Wandosell, F. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of gsk-3. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 144–53 (2002).

- [208] Sayas, C. L., Avila, J. & Wandosell, F. Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by galpha12 and galpha13 by rho-independent and rho-dependent mechanisms. *J Neurosci* **22**, 6863–75 (2002).
- [209] Litersky, J. M. & Johnson, G. V. Phosphorylation by camp-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* **267**, 1563–8 (1992).
- [210] Litersky, J. M. & Johnson, G. V. Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J Neurochem* **65**, 903–11 (1995).
- [211] Baum, L., Hansen, L., Masliah, E. & Saitoh, T. Glycogen synthase kinase 3 alteration in alzheimer disease is related to neurofibrillary tangle formation. *Mol Chem Neuropathol* **29**, 253–61 (1996).
- [212] Lovestone, S. *et al.* Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* **4**, 1077–86 (1994).
- [213] Mandelkow, E. M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 and the alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* **314**, 315–21 (1992).
- [214] Mulot, S. F., Hughes, K., Woodgett, J. R., Anderton, B. H. & Hanger, D. P. Phf-tau from alzheimer's brain comprises four species on sds-page which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. *FEBS Lett* **349**, 359–64 (1994).
- [215] Roder, H. M., Eden, P. A. & Ingram, V. M. Brain protein kinase pk40erk converts tau into a phf-like form as found in alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 639–47 (1993).
- [216] Hyman, B. T., Elvhage, T. E. & Reiter, J. Extracellular signal regulated kinases. localization of protein and mrna in the human hippocampal formation in alzheimer's disease. *Am J Pathol* **144**, 565–72 (1994).
- [217] Reynolds, C. H., Utton, M. A., Gibb, G. M., Yates, A. & Anderton, B. H. Stress-activated protein kinase/c-jun n-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* **68**, 1736–44 (1997).
- [218] Ledesma, M. D., Correas, I., Avila, J. & Díaz-Nido, J. Implication of brain cdc2 and map2 kinases in the phosphorylation of tau protein in alzheimer's disease. *FEBS Lett* **308**, 218–24 (1992).
- [219] Robertson, J. *et al.* Phosphorylation of tau by cyclic-amp-dependent protein kinase. *Dementia* **4**, 256–63 (1993).

- [220] Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal alzheimer-like state. *J Neurochem* **64**, 1420–3 (1995).
- [221] Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Differential phosphorylation of human tau isoforms containing three repeats by several protein kinases. *Arch Biochem Biophys* **328**, 43–50 (1996).
- [222] Embi, N., Rylatt, D. B. & Cohen, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. separation from cyclic-amp-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107**, 519–27 (1980).
- [223] Woodgett, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor a. *EMBO J* **9**, 2431–8 (1990).
- [224] Neal, J. W. & Clipstone, N. A. Glycogen synthase kinase-3 inhibits the dna binding activity of nfatc. *J Biol Chem* **276**, 3666–73 (2001).
- [225] Buss, H. *et al.* Phosphorylation of serine 468 by gsk-3beta negatively regulates basal p65 nf-kappab activity. *J Biol Chem* **279**, 49571–4 (2004).
- [226] Welsh, G. I., Miller, C. M., Loughlin, A. J., Price, N. T. & Proud, C. G. Regulation of eukaryotic initiation factor eif2b: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett* **421**, 125–30 (1998).
- [227] Grimes, C. A. & Jope, R. S. Creb dna binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* **78**, 1219–32 (2001).
- [228] Xavier, I. J. *et al.* Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both dna-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* **275**, 29147–52 (2000).
- [229] Turenne, G. A. & Price, B. D. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol* **2**, 12 (2001).
- [230] Sutherland, C., Leighton, I. A. & Cohen, P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signaling. *Biochem J* **296** ( Pt 1), 15–9 (1993).
- [231] Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. & Woodgett, J. R. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* **12**, 803–8 (1993).
- [232] Shaw, M., Cohen, P. & Alessi, D. R. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by igf-1 is mediated by pdk1/pkb-induced phosphorylation of ser-9 and not by dephosphorylation of tyr-216. *FEBS Lett* **416**, 307–11 (1997).

- [233] Aghdam, S. Y. & Barger, S. W. Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr Alzheimer Res* **4**, 21–31 (2007).
- [234] Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase b. *Nature* **378**, 785–9 (1995).
- [235] Plattner, F., Angelo, M. & Giese, K. P. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 25457–65 (2006).
- [236] Hallows, J. L., Chen, K., DePinho, R. A. & Vincent, I. Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. *J Neurosci* **23**, 10633–44 (2003).
- [237] Morfini, G. *et al.* A novel cdk5-dependent pathway for regulating gsk3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* **23**, 2235–45 (2004).
- [238] Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H. Y., Kar, S. & Paudel, H. K. Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry* **45**, 3134–45 (2006).
- [239] Fang, X. *et al.* Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11960–5 (2000).
- [240] Stambolic, V. & Woodgett, J. R. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* **303** ( Pt 3), 701–4 (1994).
- [241] Lesort, M., Jope, R. S. & Johnson, G. V. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* **72**, 576–84 (1999).
- [242] Williamson, R. *et al.* Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of src family protein kinases. *J Neurosci* **22**, 10–20 (2002).
- [243] Sperber, B. R., Leight, S., Goedert, M. & Lee, V. M. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett* **197**, 149–53 (1995).
- [244] Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P. & Anderton, B. H. Glycogen synthase kinase-3 induces alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**, 58–62 (1992).

- [245] Spittaels, K. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* **275**, 41340–9 (2000).
- [246] Brownlees, J. *et al.* Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes. *Neuroreport* **8**, 3251–5 (1997).
- [247] Li, X. *et al.* Activation of glycogen synthase kinase-3 induces alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm* **113**, 93–102 (2006).
- [248] Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. & Anderton, B. H. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases erk2, c-jun n-terminal kinase and p38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* **74**, 1587–95 (2000).
- [249] Matsuo, E. S. *et al.* Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* **13**, 989–1002 (1994).
- [250] Ishizawa, T. *et al.* Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* **163**, 1057–67 (2003).
- [251] Yamaguchi, H. *et al.* Preferential labeling of alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (tpk) i/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of tpk ii. *Acta Neuropathol* **92**, 232–41 (1996).
- [252] Pei, J. J. *et al.* Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 70–8 (1997).
- [253] Leroy, K., Yilmaz, Z. & Brion, J.-P. Increased level of active gsk-3beta in alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**, 43–55 (2007).
- [254] Pei, J. J. *et al.* Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (gsk-3beta) in brains staged for alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 1010–9 (1999).
- [255] Rankin, C. A., Sun, Q. & Gamblin, T. C. Tau phosphorylation by gsk-3beta promotes tangle-like filament morphology. *Mol Neurodegener* **2**, 12 (2007).
- [256] Liu, F. *et al.* Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci* **26**, 3429–36 (2007).

- [257] Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* **25**, 59–68 (2007).
- [258] Rankin, C. A., Sun, Q. & Gamblin, T. C. Pre-assembled tau filaments phosphorylated by gsk-3b form large tangle-like structures. *Neurobiol Dis* **31**, 368–77 (2008).
- [259] Abraha, A. *et al.* C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in alzheimer's disease. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3737–45 (2000).
- [260] Vandebroek, T. *et al.* Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry* **44**, 11466–75 (2005).
- [261] Jackson, G. R. *et al.* Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in drosophila. *Neuron* **34**, 509–19 (2002).
- [262] Lucas, J. J. *et al.* Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in gsk-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* **20**, 27–39 (2001).
- [263] Engel, T., Goñi-Oliver, P., Lucas, J. J., Avila, J. & Hernández, F. Chronic lithium administration to ftdp-17 tau and gsk-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* **99**, 1445–55 (2006).
- [264] Jensen, P. H. *et al.* alpha-synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase a-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* **274**, 25481–9 (1999).
- [265] Duka, T., Duka, V., Joyce, J. N. & Sidhu, A. Alpha-synuclein contributes to gsk-3beta-catalyzed tau phosphorylation in parkinson's disease models. *FASEB J* **23**, 2820–30 (2009).
- [266] Kim, H.-S. *et al.* C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *FASEB J* **17**, 1951–3 (2003).
- [267] Mateo, I. *et al.* Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **21**, 228–32 (2006).
- [268] Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. & Gong, C.-X. Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and gsk-3beta. *FEBS Lett* **530**, 209–14 (2002).

- [269] Liu, F. *et al.* Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in alzheimer's disease. *FEBS Lett* **512**, 101–6 (2002).
- [270] Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. & Gong, C.-X. Contributions of protein phosphatases pp1, pp2a, pp2b and pp5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* **22**, 1942–50 (2005).
- [271] Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Pp2a mRNA expression is quantitatively decreased in alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* **168**, 402–12 (2001).
- [272] Gong, C. X. *et al.* Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in alzheimer disease brain. *J Neurochem* **65**, 732–8 (1995).
- [273] Lian, Q., Ladner, C. J., Magnuson, D. & Lee, J. M. Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2b) activity in alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp Neurol* **167**, 158–65 (2001).
- [274] Sontag, E. *et al.* Altered expression levels of the protein phosphatase 2a abalphac enzyme are associated with alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 287–301 (2004).
- [275] Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. & Gong, C.-X. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase a and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2a and 5. *Neuroscience* **115**, 829–37 (2002).
- [276] Klein, P. S. & Melton, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8455–9 (1996).
- [277] Stambolic, V., Ruel, L. & Woodgett, J. R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* **6**, 1664–8 (1996).
- [278] Zhang, F., Phiel, C. J., Spece, L., Gurvich, N. & Klein, P. S. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (gsk-3) in response to lithium. evidence for autoregulation of gsk-3. *J Biol Chem* **278**, 33067–77 (2003).
- [279] Mendes, C. T. *et al.* Lithium reduces gsk3b mRNA levels: implications for alzheimer disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **259**, 16–22 (2009).
- [280] Lovell, M. A., Xiong, S., Xie, C., Davies, P. & Markesbery, W. R. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J Alzheimers Dis* **6**, 659–71; discussion 673–81 (2004).
- [281] Muñoz-Montaña, J. R., Moreno, F. J., Avila, J. & Diaz-Nido, J. Lithium inhibits alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* **411**, 183–8 (1997).

- [282] Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S. & Lee, V. M. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **272**, 25326–32 (1997).
- [283] Noble, W. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6990–5 (2005).
- [284] Le Corre, S. *et al.* An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9673–8 (2006).
- [285] Hampel, H. *et al.* Lithium trial in alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study. *J Clin Psychiatry* **70**, 922–31 (2009).
- [286] Terao, T. *et al.* Lithium and dementia: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**, 1125–8 (2006).
- [287] Nagase, H. & Woessner, J. F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491–4 (1999).
- [288] Murphy, G. *et al.* Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**, S39–49 (2002).
- [289] Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5578–82 (1990).
- [290] Becker, J. W. *et al.* Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the c-truncated proenzyme. *Protein Sci* **4**, 1966–76 (1995).
- [291] Fini M.E., M. R. B. C. P. M. e., Cook J.R. Matrix metalloproteinases. *Academic Press, San Diego* 299–356 (1998).
- [292] Nagase, H. Zinck metalloproteases in health and disease. *Taylor and Francis, London* 153–204 (1996).
- [293] Loftus, I. M. *et al.* Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. a potential role in acute plaque disruption. *Stroke* **31**, 40–7 (2000).
- [294] Li, Y. *et al.* Overexpression of mmp-2 and mmp-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* **22**, 664–7 (2009).
- [295] Kelly, E. A. & Jarjour, N. N. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med* **9**, 28–33 (2003).
- [296] Iannone, F. & Lapadula, G. Human immunodeficiency virus-1 and rheumatoid arthritis: a puzzling association. *J Rheumatol* **30**, 2294; author reply 2294–5 (2003).

- [297] Pyke, C., Ralfkiaer, E., Tryggvason, K. & Danø, K. Messenger rna for two type iv collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* **142**, 359–65 (1993).
- [298] Naylor, M. S., Stamp, G. W., Davies, B. D. & Balkwill, F. R. Expression and activity of mmeps and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* **58**, 50–6 (1994).
- [299] Levin, J. *et al.* Increased alpha-synuclein aggregation following limited cleavage by certain matrix metalloproteinases. *Exp Neurol* **215**, 201–8 (2009).
- [300] Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J. & Tökés, Z. A. Matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16**, 7910–9 (1996).
- [301] Limb, G. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin a/c degradation during apoptosis. *Am J Pathol* **166**, 1555–63 (2005).
- [302] Sans-Fons, M. G., Sole, S., Sanfeliu, C. & Planas, A. M. Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages. *Am J Pathol* **177**, 2870–85 (2010).
- [303] Choi, D. H. *et al.* A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J Neurochem* **106**, 405–15 (2008).
- [304] Si-Tayeb, K. *et al.* Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* **169**, 1390–401 (2006).
- [305] Kwan, J. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (adp-ribose) polymerase (parp) in vitro. *FASEB J* **18**, 690–2 (2004).
- [306] Luo, D., Mari, B., Stoll, I. & Anglard, P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* **277**, 25527–36 (2002).
- [307] Golubkov, V. S. *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase (mt1-mmp) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability. *J Biol Chem* **280**, 25079–86 (2005).
- [308] Canu, N. *et al.* Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* **18**, 7061–74 (1998).
- [309] Johnson, G. V., Jope, R. S. & Binder, L. I. Proteolysis of tau by calpain. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 1505–11 (1989).

- [310] Chung, C. W. *et al.* Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis* **8**, 162–72 (2001).
- [311] Gamblin, T. C. *et al.* Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10032–7 (2003).
- [312] Rissman, R. A. *et al.* Caspase-cleavage of tau is an early event in alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* **114**, 121–30 (2004).
- [313] Rohn, T. T. *et al.* Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* **11**, 341–54 (2002).
- [314] Basurto-Islas, G. *et al.* Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 470–83 (2008).
- [315] Ugolini, G., Cattaneo, A. & Novak, M. Co-localization of truncated tau and dna fragmentation in alzheimer's disease neurones. *Neuroreport* **8**, 3709–12 (1997).
- [316] García-Sierra, F., Mondragón-Rodríguez, S. & Basurto-Islas, G. Truncation of tau protein and its pathological significance in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **14**, 401–9 (2008).
- [317] Olson, M. W. *et al.* Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* **275**, 2661–8 (2000).
- [318] Newman, J. *et al.* Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol* **110**, 135–44 (2005).
- [319] Guillozet-Bongaarts, A. L. *et al.* Phosphorylation and cleavage of tau in non-ad tauopathies. *Acta Neuropathol* **113**, 513–20 (2007).
- [320] Mondragón-Rodríguez, S. *et al.* Conformational changes and cleavage of tau in pick bodies parallel the early processing of tau found in alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* **34**, 62–75 (2008).
- [321] Guillozet-Bongaarts, A. L. *et al.* Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J Neurochem* **97**, 1005–14 (2006).
- [322] Luna-Muñoz, J., Chávez-Macías, L., García-Sierra, F. & Mena, R. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **12**, 365–75 (2007).

- [323] Guillozet-Bongaarts, A. L. *et al.* Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **26**, 1015–22 (2005).
- [324] Binder, L. I., Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F. & Berry, R. W. Tau, tangles, and alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 216–23 (2005).
- [325] Frost, B., Jacks, R. L. & Diamond, M. I. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* **284**, 12845–52 (2009).
- [326] Frost, B., Ollesch, J., Wille, H. & Diamond, M. I. Conformational diversity of wild-type tau fibrils specified by templated conformation change. *J Biol Chem* **284**, 3546–51 (2009).
- [327] Asahina, M., Yoshiyama, Y. & Hattori, T. Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol* **20**, 60–3 (2001).
- [328] Gottschall, P. E. & Deb, S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* **3**, 69–75 (1996).
- [329] Lorenzl, S. *et al.* Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with alzheimer's disease. *Neurochem Int* **43**, 191–6 (2003).
- [330] Leake, A., Morris, C. M. & Whateley, J. Brain matrix metalloproteinase 1 levels are elevated in alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **291**, 201–3 (2000).
- [331] Nagele, R. G. *et al.* Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 663–74 (2004).
- [332] Deb, S., Wenjun Zhang, J. & Gottschall, P. E. Beta-amyloid induces the production of active, matrix-degrading proteases in cultured rat astrocytes. *Brain Res* **970**, 205–13 (2003).
- [333] Yao, J. S., Zhai, W., Young, W. L. & Yang, G.-Y. Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for kdr and mmp-9. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 1396–404 (2006).
- [334] Shan, B. *et al.* Cyclin-dependent kinase 9 is required for tumor necrosis factor-alpha-stimulated matrix metalloproteinase-9 expression in human lung adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* **280**, 1103–11 (2005).
- [335] Estève, P. O. *et al.* Protein kinase c-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by il-1 and tnf-alpha in glioma cells via nf-kappa b. *J Biol Chem* **277**, 35150–5 (2002).
- [336] Gottschall, P. E., Tatsuno, I. & Arimura, A. Regulation of interleukin-6 (il-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (il-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (pacap). *Brain Res* **637**, 197–203 (1994).

- [337] Bauer, J. *et al.* Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* **285**, 111–4 (1991).
- [338] Strauss, S. *et al.* Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of alzheimer's disease patients. *Lab Invest* **66**, 223–30 (1992).
- [339] Fillit, H. *et al.* Elevated circulating tumor necrosis factor levels in alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **129**, 318–20 (1991).
- [340] Perry, R. T., Collins, J. S., Wiener, H., Acton, R. & Go, R. C. The role of tnf and its receptors in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**, 873–83 (2001).
- [341] Licastro, F. *et al.* Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol* **103**, 97–102 (2000).
- [342] Singh, V. K. & Guthikonda, P. Circulating cytokines in alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* **31**, 657–60 (1997).
- [343] Bermejo, P. *et al.* Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Immunol Lett* **117**, 198–202 (2008).
- [344] Rogers, J. & Lue, L. F. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**, 333–40 (2001).
- [345] El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Loike, J. D. & Silverstein, S. C. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**, S81–4 (1998).
- [346] McGeer, P. L. & McGeer, E. G. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **21**, 195–218 (1995).
- [347] Yan, P. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* **281**, 24566–74 (2006).
- [348] Yoshiyama, Y., Asahina, M. & Hattori, T. Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (mmp-3) in alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* **99**, 91–5 (2000).
- [349] Deb, S. & Gottschall, P. E. Increased production of matrix metalloproteinases in enriched astrocyte and mixed hippocampal cultures treated with beta-amyloid peptides. *J Neurochem* **66**, 1641–7 (1996).

- [350] Park, C.-H. *et al.* Heat shock-induced matrix metalloproteinase (mmp)-1 and mmp-3 are mediated through erk and jnk activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *J Invest Dermatol* **123**, 1012–9 (2004).
- [351] Hosseini, M. *et al.* Il-1 and tnf induction of matrix metalloproteinase-3 by c-jun n-terminal kinase in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 1469–76 (2006).
- [352] Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases and timp. *New York: Oxford University Press* (2000).
- [353] Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K. & Wahl, L. M. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and timp-1 production by tnf-alpha, granulocyte-macrophage csf, and il-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* **161**, 3071–6 (1998).
- [354] Rigler, R. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. applications in biotechnology. *J Biotechnol* **41**, 177–86 (1995).
- [355] Schwille, P., Bieschke, J. & Oehlenschläger, F. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys Chem* **66**, 211–28 (1997).
- [356] Bieschke, J. *et al.* Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5468–73 (2000).
- [357] Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M. & Kretzschmar, H. A. Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch Virol Suppl* 161–71 (2000).
- [358] Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85 (1985).
- [359] Ebeling, W. *et al.* Proteinase k from tritirachium album limber. *Eur J Biochem* **47**, 91–7 (1974).
- [360] Magde D., W. W., Elson E. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters* **29**, 705–708 (1972).
- [361] Magde, D., Elson, E. L. & Webb, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers* **13**, 29–61 (1974).
- [362] Ehrenberg M., R. R. Rotational brownian-motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem. Phys.* **4**, 390–401 (1974).

- [363] Eigen, M. & Rigler, R. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5740–7 (1994).
- [364] Rigler R., W. J. K. P., Mets U. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal* **22**, 69–175 (1993).
- [365] P., S. *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*. Master's thesis, TU Braunschweig (1996).
- [366] Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. & Rigler, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* **72**, 1878–86 (1997).
- [367] Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114 Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg. *FCS +Plus Theory and Handling Version 3.2* (2003).
- [368] Bader, B. Einzelmolekülbasierte aggregationsanalyse von alpha-synuclein und tau-protein auf molekularer ebene. doctoral thesis (2006).
- [369] Kaye, R. *et al.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486–9 (2003).
- [370] Vossel, K. A. *et al.* Tau reduction prevents abeta-induced defects in axonal transport. *Science* **330**, 198 (2010).
- [371] Roberson, E. D. *et al.* Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750–4 (2007).
- [372] Sun, Q. & Gamblin, T. C. Pseudohyperphosphorylation causing ad-like changes in tau has significant effects on its polymerization. *Biochemistry* **48**, 6002–11 (2009).
- [373] Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (ser262, ser214) also protects it against aggregation into alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **38**, 3549–58 (1999).
- [374] Gray, E. G., Paula-Barbosa, M. & Roher, A. Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobiol* **13**, 91–110 (1987).
- [375] Munishkina, L. A., Phelan, C., Uversky, V. N. & Fink, A. L. Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. *Biochemistry* **42**, 2720–30 (2003).
- [376] Pérez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejó de Garcini, E. & Avila, J. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* **67**, 1183–90 (1996).

- [377] Yang, L. S. & Ksiezak-Reding, H. Ca<sup>2+</sup> and mg<sup>2+</sup> selectively induce aggregates of phf-tau but not normal human tau. *J Neurosci Res* **55**, 36–43 (1999).
- [378] Andrási, E., Páli, N., Molnár, Z. & Kösel, S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and alzheimer-diseased patients. *J Alzheimers Dis* **7**, 273–84 (2005).
- [379] Andrási, E., Farkas, E., Scheibler, H., Réffy, A. & Bezúr, L. Al, zn, cu, mn and fe levels in brain in alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* **21**, 89–97 (1995).
- [380] Hiraoka, S. *et al.* Conformational transition state is responsible for assembly of microtubule-binding domain of tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 659–63 (2004).
- [381] Madhav, T. R., Vatsala, S., Ramakrishna, T., Ramesh, J. & Easwaran, K. R. Preservation of native conformation during aluminium-induced aggregation of tau protein. *Neuroreport* **7**, 1072–6 (1996).
- [382] Uversky, V. N., M Cooper, E., Bower, K. S., Li, J. & Fink, A. L. Accelerated alpha-synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Lett* **515**, 99–103 (2002).
- [383] Shtilerman, M. D., Ding, T. T. & Lansbury, P. T., Jr. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce parkinson's disease? *Biochemistry* **41**, 3855–60 (2002).
- [384] Zhou, Z. *et al.* Crowded cell-like environment accelerates the nucleation step of amyloidogenic protein misfolding. *J Biol Chem* **284**, 30148–58 (2009).
- [385] Maas, T., Eidenmüller, J. & Brandt, R. Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* **275**, 15733–40 (2000).
- [386] Bader, B. *et al.* Single particle analysis of tau oligomer formation induced by metal ions and organic solvents. *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 190–6 (2011).
- [387] Paik, S. R., Shin, H. J., Lee, J. H., Chang, C. S. & Kim, J. Copper(ii)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem J* **340** ( Pt 3), 821–8 (1999).
- [388] Hillmer, A. S. *et al.* Converse modulation of toxic alpha-synuclein oligomers in living cells by n'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 461–6 (2010).
- [389] Dexter, D. T. *et al.* Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **114** ( Pt 4), 1953–75 (1991).

- [390] Ponka, P., Beaumont, C. & Richardson, D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* **35**, 35–54 (1998).
- [391] Cauwe, B., Martens, E., Proost, P. & Opdenakker, G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase b/mmp-9 substrates. *Integr Biol (Camb)* **1**, 404–26 (2009).
- [392] Butler, G. S. & Overall, C. M. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new intracellular substrates revealed by degradomics. *Biochemistry* **48**, 10830–45 (2009).
- [393] Rodríguez, D., Morrison, C. J. & Overall, C. M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? new substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* (2009).
- [394] White, A. R. *et al.* Degradation of the alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity. *J Biol Chem* **281**, 17670–80 (2006).
- [395] Wang, Y. P., Biernat, J., Pickhardt, M., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.-M. Step-wise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10252–7 (2007).
- [396] Tomlinson, B. E., Blessed, G. & Roth, M. Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* **11**, 205–42 (1970).
- [397] Alafuzoff, I., Iqbal, K., Friden, H., Adolfsson, R. & Winblad, B. Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathol* **74**, 209–25 (1987).
- [398] Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631–9 (1992).
- [399] Pickhardt, M. *et al.* Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *J Biol Chem* **280**, 3628–35 (2005).
- [400] Pickhardt, M. *et al.* Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells. *Biochemistry* **46**, 10016–23 (2007).
- [401] Taniguchi, S. *et al.* Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* **280**, 7614–23 (2005).

- [402] Crowe, A., Ballatore, C., Hyde, E., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 1–6 (2007).
- [403] Chee, F. *et al.* Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in drosophila neuromuscular junctions. *Biochem Soc Trans* **34**, 88–90 (2006).
- [404] Bertsch, U. *et al.* Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol* **79**, 7785–91 (2005).
- [405] Hansson, O. *et al.* Association between csf biomarkers and incipient alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **5**, 228–34 (2006).
- [406] Herukka, S.-K., Hallikainen, M., Soininen, H. & Pirttilä, T. Csf abeta42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1294–7 (2005).
- [407] Zetterberg, H., Wahlund, L.-O. & Blennow, K. Cerebrospinal fluid markers for prediction of alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **352**, 67–9 (2003).
- [408] Hampel, H. *et al.* Value of csf beta-amyloid1-42 and tau as predictors of alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry* **9**, 705–10 (2004).
- [409] Haense, C. *et al.* Csf total and phosphorylated tau protein, regional glucose metabolism and dementia severity in alzheimer's disease. *Eur J Neurol* **15**, 1155–62 (2008).
- [410] Neumann, M. *et al.* Alpha-synuclein accumulation in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 (nbia-1, formerly hallervorden-spatz syndrome) with widespread cortical and brainstem-type lewy bodies. *Acta Neuropathol* **100**, 568–74 (2000).

# Danksagung

An vorderster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Armin Giese. Nicht allein für die Möglichkeit, dieses Projekt in seinem Labor durchführen zu dürfen, sondern auch für die kontinuierliche Betreuung, den großen Freiraum in der wissenschaftlichen Arbeit, und die stets gründliche und scharfsinnige Evaluation aller Arbeitsschritte und Ergebnisse.

In gleicher Weise bedanke ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Benedikt Bader für die gute Betreuung, die ausführliche Einarbeitung in alle Methoden, und ganz besonders für die ständige Verfügbarkeit für kleine und große Hilfestellungen bei sämtlichen Projekten auch über die hier vorliegende Arbeit hinaus. Auch danke ich Dr. Johannes Levin herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei sämtlichen Projekten, sein hohes Interesse, seinen Optimismus, sowie besonders für seine Fähigkeit, auch kleine Lücken in meiner Arbeitsauslastung zu erkennen und mit sinnvollen Tätigkeiten zu füllen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Kretzschmar danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Dem gesamten Labor von Prof. Giese danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die stetige Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen. Insbesondere für die zahllosen Hilfestellungen und endlose Geduld in allen Fragen außerhalb der FCS danke ich Dr. Kathrin Dittmar. In gleicher Weise danke ich Janina Mielke für ihre Unterstützung. Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. Tobias Högen für seine Hilfe in allen Fragen rund um die FCS, Felix Schmidt für die kontinuierliche gute Zusammenarbeit, Michael Schmidt für die Einführung in die Elektronen-Mikroskopie, und Elzbieta Staniszewski für Unterstützung bei der Gen-Sequenzierung.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Lorenzl, Peer Schmitz, Dr. Lars Israel, Prof. Dr. Manuela Neumann, Salah Soliman, Ben Vanmassenhove, sowie allen, die in dieser Danksagung noch nicht namentlich erwähnt wurden, aber durch ihre Unterstützung und ihr Wissen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die durch ihre Geduld und ihre Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht haben. Insbesondere danke ich meiner Freundin, Jenna Hildebrandt, für die moralische Unterstützung, die Hilfe insbesondere in Fragen der graphischen Darstellung, sowie die schier endlose Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Raphael Winkelmann für den geduldigsten technischen Support, den man sich wünschen kann. Herzlichen Dank Euch allen.