

**Rolle der Phosphorylierung des humanen Tau-Proteins:
Einfluss auf die pathologische Aggregation
und Wechselwirkung mit Mikrotubuli**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Antje Hascher
aus Riesa

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. E. MANDELKOW
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. H. QUADER
Tag der Disputation: 17. Juni 2005

Hamburg, den 01. Juni 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Gliederung

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	ix
I Einleitung	1
1 Die Alzheimersche Krankheit	1
1.1 Die pathologische Aggregation von Tau	2
1.2 Die familiäre Alzheimer Krankheit (fAD)	7
1.3 Tauopathien	8
2 Mikrotubuli	9
2.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine	10
2.1.1 Strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Proteine	11
3 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau	11
3.1 Die Struktur von Tau	12
3.2 Die Funktion von Tau	15
3.3 Die Regulation der Funktion von Tau durch Phosphorylierung	16
4 Ziel der Arbeit	21
II Material und Methoden	23
2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1 Präparation elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	23
2.1.2 Anlegen von Glycerolstocks	23
2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	23
2.1.4 Ethanolpräzipitation	24
2.1.5 Mutagenese der Tau-Konstrukte	24
2.1.6 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	27
2.1.7 Gelelektrophorese von DNA	27
2.1.8 Elution von DNA aus Agarosegelen	28

2.1.9 Ligation von DNA	28
2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	
mittels Hitzeschockmethode	28
mittels Elektroporationsmethode	29
2.1.11 Plasmidpräparation im „Mini“- und „Midi“-Maßstab	29
2.1.12 Sequenzierung von DNA	30
2.2 Proteinchemische Methoden	31
2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.2.2 SDS-Gelelektrophorese	31
2.2.3 Coomassie Färbung von Proteingelen	32
2.2.4 Silber-Färbung von Proteingelen	33
2.2.5 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	33
2.2.6 Aufreinigung von rekombinanten Tau-Proteinen	34
2.2.7 Kationenaustauschchromatografie	35
2.2.8 Gelpermeations-Chromatografie	36
2.2.9 Westernblot	37
2.3 Spezielle Methoden zur Analyse der Aggregation von Tau-Protein zu	
PHFs	37
2.3.1 <i>In vitro</i> PHF-Bildung	37
2.3.2 Fluoreszenzmessungen von <i>in vitro</i> PHFs	39
2.3.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie	39
2.4 Spektroskopische Methoden	40
2.4.1 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie	40
2.4.2 Circular dichroismus	41
2.5 Spezielle Methoden zur Untersuchung der Bindung von Tau-Protein	
an Mikrotubuli	42
2.5.1 Messung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion.....	42
III Ergebnisse	44
3.1 Allgemein	44
3.2 Klonierung der E-Mutanten	44
3.3 Expression und Proteinreinigung der E-Mutanten	46

3.4	Einfluss der E-Mutanten in den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i> des Proteins Tau	48
3.4.1	Einfluss der E-Mutation innerhalb des KXGS-Motivs auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion	49
3.4.1.1	Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i>	49
3.4.2	Polymerisation von E-Mutanten im KXGS-Motiv zu PHFs	51
3.4.2.1	Kinetik der Aggregation von E-Mutanten auf Basis Isoformen ht23 und ht40 im KXGS-Motiv innerhalb der <i>Repeats</i> in Anwesenheit des Polyanions Heparin	52
3.4.2.2	Kinetik der Aggregation von E-Mutanten auf der Basis Isoformen ht23 und ht40 im KXGS-Motiv innerhalb der <i>Repeats</i> in Anwesenheit der Fettsäure Arachidonsäure	53
3.4.3	Elektronenmikroskopie der Tau-Filamente von KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40	55
3.4.4	Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K19 und K19 in Gegenwart verschiedener Polyanionen	57
3.4.5	Strukturuntersuchung der löslichen KXGE-Konstrukte	57
3.4.6.1	Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K18 und K19 in Gegenwart von Heparin	59
3.4.6.2	Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K18 und K19 in Gegenwart von Arachidonsäure	60
3.4.6.3	Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutante von K19 in Gegenwart von Poly-Glutamat	62
3.4.7	Elektronenmikroskopie der PHF-Bildung der KXGE-Mutanten mit verschiedenen Aggregationsinduktoren	63
3.4.8	Inhibition der PHF-Bildung von K19_wt durch Zugabe von K19_3RE	65
3.4.9	PHF-Bildung von K19_wt in Anwesenheit von K19_3RE bei variabler Heparinkonzentration	66
3.5	Einfluss von E-Mutanten des Tau-Proteins in den flankierenden Regionen der <i>Repeats</i>	68
3.5.1	Einfluß der Phosphorylierungsimitationen in der P2 Region	68
3.5.1.1	CD-Spektroskopie	69

3.5.1.2 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in der P2-Region	70
3.5.1.3 Kinetik der PHF-Bildung von ht23-E-Mutanten in der P2-Region	72
3.5.1.4 Morphologie der Tau-Filamente aus E-Mutanten an den SP/TP-Stellen in der P2-Region	74
3.5.2 Einfluss der E-Mutanten in der C-terminalen Region	76
3.5.2.1 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in der C-terminalen Region	76
3.5.2.2 Kinetik der PHF-Bildung der ht23-E-Mutanten in C-terminalen Region	79
3.5.2.3 Morphologie der Tau-Filamente aus E-Mutanten in der C-terminalen Region	80
3.5.3 Kombination der E-Mutationen in den flankierenden Regionen der <i>Repeats</i> und der KXGS-Motive innerhalb der <i>Repeats</i>	81
3.5.3.1 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach- E-Mutanten des Proteins Tau	82
3.5.3.2 Kinetik der PHF-Bildung von Mehrfach-E-Mutanten auf ht23-Basis	86
3.5.3.2.1 Kombination der E-Mutationen in der P2- und der C-terminalen Region	86
3.5.3.3 Morphologie der Filamente aus kombinierten E-Mutanten der SP/TP-Stellen	88
3.5.3.4 Kombination der E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i>	89
3.5.3.4.1 Morphologie der kombinierten E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i>	91
3.5.3.5 Kombination der E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i> und der C-terminalen Region	91
3.5.3.5.1 Morphologie der kombinierten E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i>	93
3.5.3.6 PHF-Bildung von Mehrfach-E-Mutanten in den KXGS-Motiven und den angrenzenden Regionen	95
3.5.3.6.1 Morphologie der Mehrfach-E-Mutationen	97

IV Diskussion	98
4.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in der Repeat-Region	100
4.1.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den Repeats auf die Tau Tubulin Interaktion	101
4.1.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den Repeats auf die Aggregation von Tau	103
4.2 Einfluss von Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen	107
4.2.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der Repeats auf die Tau-Tubulin-Interaktion	107
4.2.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der Repeats auf die PHF-Bildung	109
4.3.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen und der Repeats auf die Tau-Tubulin-Interaktion.....	111
4.3.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen und der Repeats auf die PHF-Bildung	112
V Zusammenfassung	114
VI Literaturverzeichnis	115
VII Anhang	132
7.1 Primer-Sequenzen zur ortsgerechten Mutagenese von Tau	132
7.2 Abkürzungsverzeichnis	134
7.3 Danksagung	136
7.4 Lebenslauf.....	137
7.5 Erklärung.....	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur von Tau	3
Abbildung 2: Darstellung der Tau-Sequenz	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tau-Gens und des Tau-Proteins .	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phosphorylierungsstellen des Proteins Tau	16
Abbildung 5: Darstellung des pNG2-Tau-Vektors	45
Abbildung 6: E-Mutanten nach Aufreinigung durch Gelpermeations- Chromatografie und elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE	47
Abbildung 7: Für die Polymerisation zu PHFs verwendete Isoformen und Konstrukte von Tau	48
Abbildung 8: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von KXGE-Mutanten innerhalb der <i>Repeats</i> auf Basis der Isoformen ht23 und ht40	50
Abbildung 9: Aggregation der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der <i>Repeat</i> -Domäne auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 in Anwesenheit von Heparin	52
Abbildung 10: ThS-Signal der E-Mutanten in den KXGE-Motiven in der <i>Repeat</i> -Domäne auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 in Anwesenheit von Arachidonsäure	54
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastier- ten Filamenten von ht23_wt, ht23_3RE, ht40_wt und ht40_4RE in Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren	56
Abbildung 12: Darstellung der Tau-Konstrukte zur Untersuchung der PHF- Bildung in Gegenwart verschiedener Aggregationsinduktoren	57
Abbildung 13: FTIR-Spektren der löslichen Proteine der KXGE-Konstrukte K18_4RE und K19_3RE	58

Abbildung 14: Aggregation der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der <i>Repeat</i> -Domäne auf Basis der Konstrukte K18 und K19 in Anwesenheit von Heparin.....	59
Abbildung 15: ThS-Signal der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der <i>Repeat</i> -Domäne auf Basis der Konstrukte K18 und K19 in Anwesenheit von Arachidonsäure.....	61
Abbildung 16: PHF-Bildung der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der <i>Repeat</i> -Domäne auf Basis des Konstruktes K19 in Anwesenheit von Poly-Glutamat	63
Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von K19_wt und K19_3RE in Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren	64
Abbildung 18: Hemmung der PHF-Bildung von K19_wt durch verschiedene Konzentrationen von K19_3RE	65
Abbildung 19: PHF-Bildung von K19_wt in Anwesenheit von K19_3RE bei verschiedenen Heparinkonzentrationen	67
Abbildung 20: Für die Polymerisation zu PHFs verwendete E-Mutanten der Isoform ht23	69
Abbildung 21: Exemplarisch dargestellte CD-Kurven der Proteine ht23_wt, ht23_S235E und ht23_3RE	69
Abbildung 22: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von E-Mutanten in der P2-Region auf Basis der Isoform ht23	71
Abbildung 23: PHF-Polymerisation der E-Mutanten in der P2-Region auf der Basis der Isoform ht23	73
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der P2-Region	75
Abbildung 25: Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von E-Mutanten in der C-terminalen Region auf Basis der Isoformen ht23	78
Abbildung 26: PHF-Bildung der E-Mutanten in der C-terminalen Region auf ht23-Basis	79
Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der C-terminalen Region	81

Abbildung 28: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach-E-Mutanten von ht23	82
Abbildung 29: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach-E-Mutanten in der P2-Region in Kombination mit der C-terminalen Region auf Basis der Isoform ht23	84
Abbildung 30: PHF-Bildung der Doppel-SP/TP-E-Mutanten in der P2- und C-terminalen Region auf ht23 Basis	87
Abbildung 31: PHF-Bildung der kombinierten E-Mutanten an den SP/TP-Stellen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i> auf ht23 Basis	90
Abbildung 32: PHF-Bildung der kombinierten E-Mutanten von den SP/TP-Stellen im C-terminalen Bereich und mit den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i> auf ht23 Basis	92
Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der C-terminal flankierenden Region der <i>Repeats</i>	94
Abbildung 34: PHF-Polymerisation der Kombinationsmutanten von SP/TP-Stellen in der P2-Region sowie der C-terminalen Region und den KXGS-Motiven innerhalb der <i>Repeats</i> auf ht23 Basis	96
Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und Mehrfach-E-Mutanten	97
Abbildung 36: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation für KXGE-Mutanten	102
Abbildung 37: Modell der Tau-Mikrotubuli-Interaktion	103
Abbildung 38: Modell zur PHF-Aggregation	104
Abbildung 39: Ausmaß der Aggregation der KXGE-Mutanten in Anwesenheit von Heparin	105
Abbildung 40: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten der SP/TP-Motive auf ht23-Basis	108
Abbildung 41: Ausmaß der PHF-Bildung der E-Mutanten auf ht23-Basis in Anwesenheit des Polyanions Heparin	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese	25
Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte .	26
Tabelle 3: PCR-Programm für die zyklische Sequenzierung von DNA	30
Tabelle 4: Zusammensetzung der Elektrophoresegele für die SDS-PAGE	31
Tabelle 5: Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE	32
Tabelle 6: Klonierung der E-Mutanten und modifizierte Aminosäuren	46
Tabelle 7: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation von KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40	50
Tabelle 8: Parameter der Aggregation von KXGE-Mutanten mit Heparin	53
Tabelle 9: Ausmaß der Aggregation der KXGE-Konstrukte in Anwesenheit verschiedener Induktoren	62
Tabelle 10: Hemmung der PHF-Bildung von K19_wt durch K19_3RE	66
Tabelle 11: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten in der P2-Region	71
Tabelle 12: Parameter der PHF-Bildung von E-Mutanten in der P2-Region	72
Tabelle 13: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten in der C-terminalen Region	77
Tabelle 14: Parameter der PHF-Bildung von E-Mutanten in der C-terminalen Region	80
Tabelle 15: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der Mehrfach-E-Mutanten im C-terminalen Bereich	83
Tabelle 16: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der Mehrfach-E-Mutanten in den flankierenden Bereichen	85
Tabelle 17: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten in den flankierenden Bereichen	86
Tabelle 18: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten in der P2-Region und den <i>Repeats</i>	89

Tabelle 19: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten der flankierenden Bereiche	93
Tabelle 20: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten der flankierenden Bereiche und der <i>Repeats</i>	96

I Einleitung

1 Die Alzheimersche Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des Gehirns. Sie wurde erstmals im Jahr 1907 von dem Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Die Wahrscheinlichkeit zu erkranken, erhöht sich mit zunehmendem Alter. Bei sporadischen Fällen liegt das Risiko im 65. Lebensjahr zu erkranken bei 1.5% und erhöht sich alle fünf Jahre um 1.0-1.5%. Im Durchschnitt führt die Erkrankung nach etwa 10 Jahren zum Tode. Der Krankheitsverlauf beginnt allerdings schon 10 – 20 Jahre früher, wobei das erste Drittel klinisch stumm verläuft (Kurz, 1997). Als erste Symptome treten der Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, erste Probleme bei der Wortfindung oder eine leichte Hilflosigkeit auf (Kurz *et al.*, 1991; Haupt *et al.*, 1992). Mit dem Fortschreiten der Krankheit kommt es zum Verlust des abstrakten Denkens, Sprachstörungen (Wortfindungsstörungen, verminderte Sprachproduktion) sowie Probleme bei gewohnten Abläufen. In der Endphase treten Verhaltensstörungen verbunden mit zeitlicher und räumlicher Desorientierung (Gilleard *et al.*, 1993) auf. Es kommt zu Angstzuständen, Depressionen, Halluzinationen und motorischen Fehlfunktionen. Derzeit kann die Alzheimer-Krankheit nicht therapiert werden. Es sind viele kognitive Tests entwickelt worden. Mit den Gutachten der kognitiven Tests lässt sich das Frühstadium der Alzheimer-Krankheit nur unzureichend von Alterssenilität abgrenzen.

Die eindeutige Diagnose kann erst durch post mortem Analyse gestellt werden, wobei eine Abnahme der Gehirnmasse und eine Vergrößerung der Hirnfurchen zu beobachten ist. Die Ursache für die Symptome ist im Absterben der Nervenzellen zu sehen. Mit fortschreitender Krankheit sind immer mehr Hirnareale betroffen. Histopathologisch treten zwei Formen von Aggregaten auf: Amyloid-Plaques (extrazellulär) und neurofibrilläre Bündel (NTFs, *neurofibrillary tangles*) (intrazellulär). Die Amyloid-Plaques bestehen aus 39-42 Aminosäuren langen Fragmenten des β -Amyloid-Vorläufer-Protein (APP, *β -amyloid-precursor-protein*), die durch das Zusammenspiel von β - und γ - Sekretase entstehen. In den Amyloid-Plaques werden

Peptide mit unterschiedlicher Länge (40 ($A\beta_{40}$) oder 42 Aminosäuren ($A\beta_{42}$)) gefunden. Überwiegend entsteht das Peptid $A\beta_{40}$. Das Peptid $A\beta_{42}$ neigt verstärkt zu Aggregaten und bildet dabei oligomere Strukturen, die als die eigentlich toxische Spezies angesehen werden (Elser und Wolfe, 2001).

Die intrazellulären Ablagerungen werden als neurofibrilläre Bündel (NFTs) bezeichnet und bestehen im Wesentlichen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau. Die neurofibrillären Bündel entstehen im Zellsoma und werden durch das Absterben der Neuronen auch extrazellulär gefunden und als *ghost tangles* bezeichnet (Anderton *et al.*, 1993). NFTs bestehen aus filamentösen Strukturen, die in zwei Erscheinungsformen auftreten. Im Elektronenmikroskop sind sie durch Negativ-Kontrastierung als paarige helikale Filamente (PHFs) mit einer Breite von 10 - 20 nm und einer axialen Periodizität von ca. 80 nm darstellbar (Kidd: 1963). In weitaus geringerem Ausmaß können auch gerade Filamente (*straight filaments*) mit einer konstanten Breite von 15 nm für neurofibrilläre Bündel aus Alzheimer Gehirnen beobachtet werden (Crowther, 1991).

Beide Formen der Proteinablagerungen können durch Silber- Färbung (Gallyas) oder immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht werden (Braak und Braak, 1997a, b). Die neurofibrillären Bündel breiten sich ausgehend von der enthorinalen und transenthorinalen Region entlang des Hippocampus und Neocortex aus. Aufgrund der gerichteten Ausbreitung der NFTs ist eine Einteilung in sechs Stadien möglich: Stadium I und II (transenthorinal), Stadium III und IV (limbisch) und Stadium V und VI (isokortikal) (Braak und Braak, 1991; Braak *et al.*, 1994). Die Ausbreitung der neurofibrillären Bündel korreliert gut mit der Schwere der Krankheit und dem Krankheitsverlauf.

1.1 Die pathologische Aggregation von Tau

Tau konnte durch N-terminale Sequenzierung von Peptiden, die durch Protease-Behandlung aus PHFs entstehen (Wischik *et al.*, 1988b; Kondo *et al.*, 1988; Goedert *et al.*, 1988; Novak *et al.*, 1993), als wichtige Komponente der paarigen helikalen Filamente identifiziert werden. Des Weiteren wurde diese Tatsache durch

immunologische Studien bestärkt (Brion *et al.*, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a). Der Kern der PHFs besteht aus der Mikrotubuli-bindenden *Repeat*-Region des Tau-Proteins. Der Kernbereich ist resistent gegen den Verdau mit Pronase, lediglich die im Elektronenmikroskop diffus erscheinenden Ränder der PHFs (*fuzzy coat*) lassen sich durch Pronase abbauen.

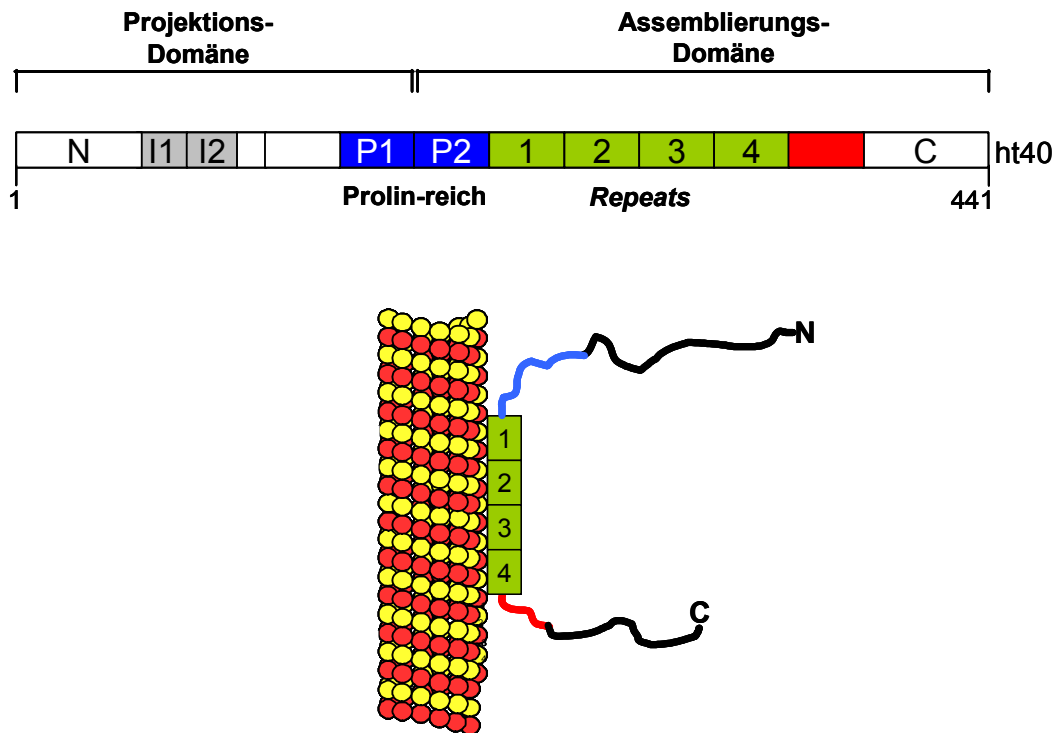


Abbildung 1: Domänenstruktur von Tau. Dargestellt sind die Projektions-Domäne (N-terminal) und die Assemblierungsdomäne (C-terminal) in einem Balkendiagramm (oben). Die Tau-Mikrotubuli-Bindung wird über die Assemblierungs-Domäne von Tau vermittelt (unten) Die Darstellung ist nicht maßstabsgerecht.

Das Protein Tau kann posttranslational durch Degradation, Glykosylierung, Racemisierung und Phosphorylierung modifiziert werden. Tau-Protein, das aus Hirngewebe von Alzheimer Patienten isoliert wird, weist einen heterogenen Phosphorylierungsgrad auf (Lindwall und Cole, 1984; Butler und Shelanski, 1986; Hagedstedt *et al.*, 1989). Für Tau-Protein aus gesundem Gehirngewebe wird ein Phosphorylierungsgrad von 2 – 3 Mol Phosphat pro Mol Tau gefunden, wogegen aus PHFs isoliertes Tau-Protein einen wesentlich höheren Phosphorylierungsgrad von 6 – 8 Mol Phosphat pro Mol Tau aufweist (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Kopke *et al.*, 1993). Die natürliche Funktion – die Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli – ist bei hyperphosphoryliertem Tau gestört (Biernat *et al.*, 1992; Yoshida und Ihara,

1993). Das kann Auswirkungen auf den axonalen Transport haben und in der Konsequenz zum Absterben der Neuronen führen.

Aus Alzheimer Gehirnen isolierte PHFs können teilweise wieder aufgelöst werden. Sie zeigen nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE drei charakteristische Banden bei 55, 64 und 69 kDa (Greenberg und Davies, 1990; Lee *et al.*, 1991) auf. Es kann auch eine schwächere Bande bei 74 kDa detektiert werden (Goedert *et al.*, 1992a; Sergeant *et al.*, 1997). Die PHFs aus Alzheimer Gehirnen bestehen aus allen sechs Isoformen und sind hyperphosphoryliert (Goedert *et al.*, 1992a). Durch die Behandlung mit Phosphatasen kann dieser Effekt der posttranslationalen Phosphorylierung aufgehoben werden (Drewes *et al.*, 1993; Iqbal *et al.*, 1998).

Tau aus Alzheimer-Gehirn ist an 10 - 15 Stellen phosphoryliert (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Dabei sind sowohl Ser-Pro/Thr-Pro-Motive als auch andere Phosphorylierungsstellen betroffen. Dagegen können in gesunden Gehirnen nur 3 - 6 Stellen im phosphorylierten Zustand nachgewiesen werden. Die Hyperphosphorylierung kann durch das Zusammenspiel mehrerer Kinasen erreicht werden. Die SP/TP-Stellen im Tau werden von verschiedenen Prolin-gerichteten Kinasen phosphoryliert (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992). Für die Ursache der Alzheimer Krankheit wird die Fehlregulation der Kinasen und Phosphatasen diskutiert, als dessen Ergebnis die Hyperphosphorylierung von Tau zu den toxischen Aggregaten (neurofibrillären Bündeln) führt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die gleichen Phosphorylierungsstellen, die Tau von den Mikrotubuli ablösen, Tau vor der Aggregation schützen (Schneider *et al.*, 1999). Weiterhin ist bekannt, dass auch Tau-Protein, das nicht phosphoryliert ist, *in vitro* zu PHFs aggregieren kann (Wille *et al.*, 1992a; Schweers *et al.*, 1995).

Um in *in vitro*-Experimenten die PHF-Bildung von rekombinantem Tau zu untersuchen, hat sich die Zugabe von Polyanionen als förderlich erwiesen, weil dadurch die Reaktion beschleunigt wird. Diese polyanionischen Moleküle kommen aus allen bekannten Stoffgruppen. Es können Polysaccharide wie Heparin (Perry *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1996; Goedert *et al.* 1996), Peptide wie Polyglutamat (Friedhoff *et al.*, 1998), Nukleinsäuren wie RNA (Kampers *et al.*, 1996) oder auch

Mizellen von Fettsäuren wie Arachidonsäure (Wilson *et al.*, 1997) sein. All diese Induktoren sind durch ihre negative Ladung gekennzeichnet. Sie beeinflussen die Aggregation von Tau in Abhängigkeit der Konzentration von Polyanion und Protein. Dabei spielt das Verhältnis Protein zu Polyanion eine entscheidende Rolle.

Tau-Konstrukte, die nur aus Fragmenten der *Repeat*-Region bestehen, aggregieren schneller als Tau mit der vollständigen Sequenz (Wille *et al.*, 1992a; Schweers *et al.*, 1995; Friedhoff *et al.*, 1998b). Als minimale Sequenz, die notwendig für die Aggregation von Tau ist, ließ sich ein Fragment von 43 Aminosäureresten durch den Verdau mit verschiedenen Proteasen identifizieren, dass innerhalb der *Repeat*-Region liegt und als PHF43 bezeichnet wird (von Bergen *et al.*, 2000). Das PHF43-Motiv enthält ein Hexapeptid ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ (PHF 6) das wahrscheinlich für die Zunahme an β -Struktur verantwortlich ist (siehe Abb. 2). Durch die Aggregation in PHFs steigt in einem überwiegend ungefalteten Protein der Anteil an β -Faltblattstruktur (von Bergen *et al.*, 2000).

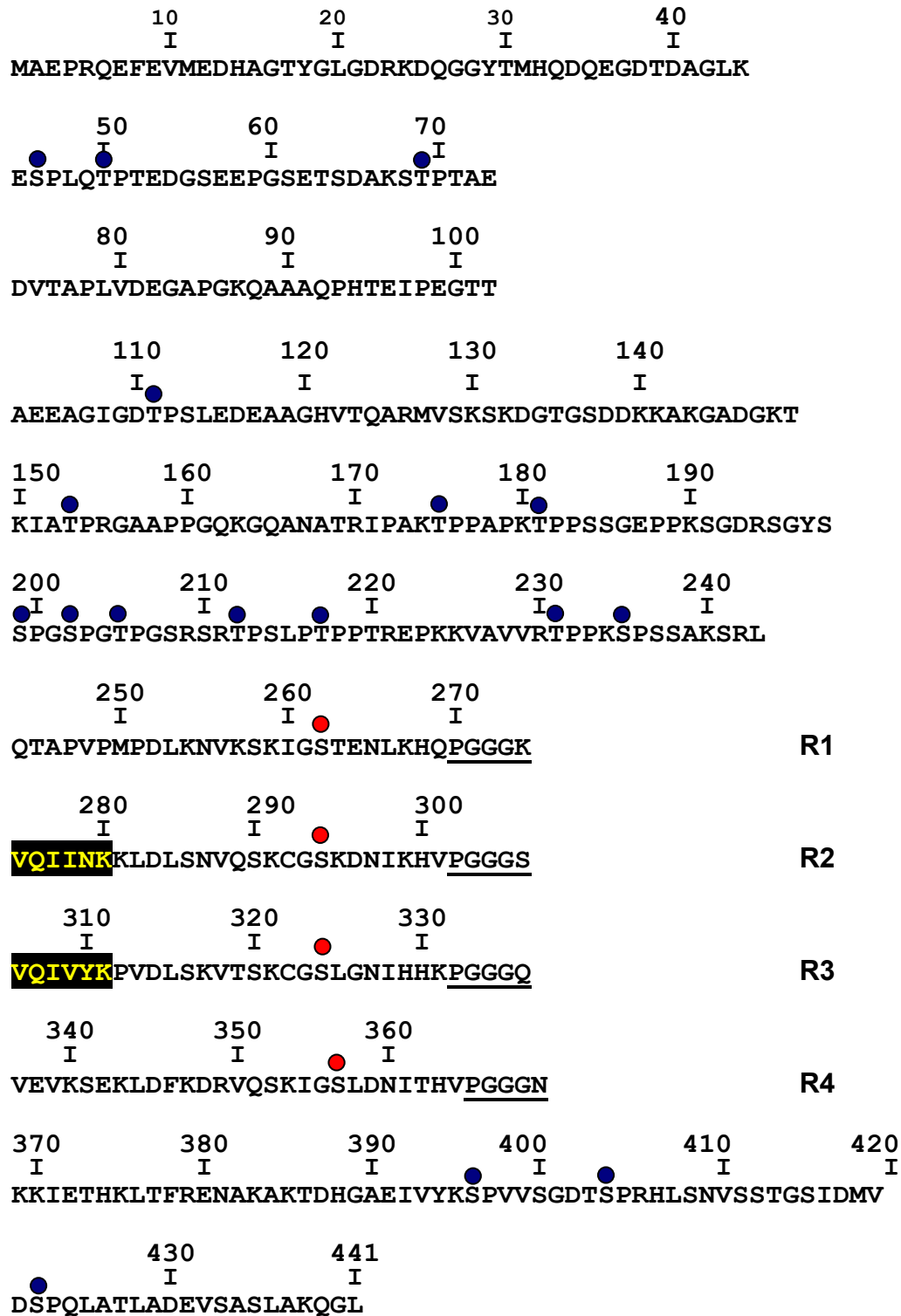


Abbildung 2: Darstellung der Tau-Sequenz. Die blauen Punkte zeigen die SP/TP-Motive an. Die Phosphorylierungsstellen der KXGS-Motive sind mit roten Punkten markiert. Die beiden Hexapeptid-Motive sind dunkel unterlegt.

1.2 Die familiäre Alzheimer Krankheit (fAD)

Der Hauptanteil der Alzheimer Fälle (etwa 95%) sind sporadischen Ursprungs. Nur ein sehr geringer Prozentsatz (etwa 5%) ist genetisch bedingt. In diesen Fällen spricht man von familiärer Alzheimer-Krankheit. Als Auslöser wurden drei Gene gefunden, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Alle Gene stehen im Zusammenhang mit der Produktion des toxischen β -Amyloid-Peptides.

Das Gen für das Amyloid-Vorläufer-Protein ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Es sind verschiedene Mutationen in diesem Gen bekannt, die ca. 5% der familiären Alzheimer Fälle auslösen. Sie führen zu verstärkter Bildung des toxischen β -Amyloid-Peptides und in der Folge zu dessen Ablagerung, die als Amyloid-Plaques beschrieben werden (Citron *et al.*, 1992; Scheuner *et al.*, 1996; Hardy *et al.*, 1997a). Ein Sonderfall sind Fälle von Trisomie-21. Diese Patienten weisen meist schon sehr früh Symptome der Demenz auf. Im Alter von 50 Jahren sind alle Patienten dement. Die Ursache dafür liegt in der erhöhten Gen-Dosis (dreifaches Vorhandensein des Chromosoms 21) des APP auf Chromosom 21 (Wisniewski *et al.*, 1994).

Des Weiteren wurden Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und Presenilin 2 als Ursachen für die familiäre Alzheimer Krankheit identifiziert. Beides sind Transmembran-Proteine, die als γ -Sekretasen die Funktion der Spaltung des APP übernehmen (zur Übersicht Esler und Wolfe, 2001). Dabei haben Mutationen im Presenilin 1-Gen eine größere Bedeutung, da etwa 50% der familiären Alzheimer Fälle auf Mutationen in diesem Gen zurückzuführen sind (Sherrington *et al.*, 1995). Das Gen für Presenilin 1 ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Fälle der familiären Alzheimer-Krankheit, die durch Mutationen im Gen für Presenilin 2 hervorgerufen werden sind selten (Rogaev *et al.*, 1995). Das Gen für Presenilin 2 ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Die Ursache für die erhöhte Produktion des toxischen β -Amyloid-Peptides liegt in den Gen-Mutationen von Presenilin 1 und 2.

Als Risikofaktor wird das Transportlipoprotein Apo E beschrieben. Es ist auf Chromosom 19 lokalisiert und wirkt als Transporter für Cholesterin. Es wird in drei Isoformen exprimiert. Für Träger der Allel-Kombination ϵ 4/4 besteht ein erhöhtes Risiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken (Strittmatter *et al.*, 1993a, b). Die

ApoE-Allele $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$ hingegen haben eine schützende Funktion (Corder *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den Mutationen im Presenilin-Gen, die zu einem frühen Ausbruch der Krankheit führen, ist das $\epsilon 4$ -Allel von Apo E ein Risikofaktor für den späten Ausbruch der Krankheit. Das ist allerdings umstritten, da auch viele $\epsilon 4$ -Homozygote ein hohes Alter erreichen, ohne zu erkranken. Das Vorkommen des $\epsilon 4$ -Allels führt ebenso wie die oben genannten Mutationen zu einer erhöhten Produktion des toxischen β -Amyloid-Peptides (Wolfe und Haass, 2001).

1.3 Tauopathien

Während für die eindeutige Diagnose der Alzheimer-Krankheit das Auftreten von zwei verschiedenen Aggregationsformen (der Proteine Tau und A β) notwendig ist, treten bei anderen neurodegenerativen Krankheiten nur Aggregate des Proteins Tau auf.

Dazu zählen die Pick-Krankheit (PiD, *Pick's disease*), die progressive supranukleare Lähmung (PSP, *progressive supranuclear palsy*), die corticobasale Degeneration (CBD, *corticobasal degeneration*), die argyophile Körner Krankheit (AgD, *argyophilic grain disease*), die Prionen-Krankheit (Creuzfeld-Jakob), Parkinsonismus und die frontotemporalen Demenzen (FTDP-17, *frontotemporal dementia linked to chromosome 17*). In Gehirnen der Patienten, die an der Pick-Krankheit, an progressiver supranuklearer Lähmung oder an der corticobasalen Degeneration erkrankt sind, wurde das Protein Tau in Form von neurofibrillären Bündeln gefunden. Diese Krankheiten werden als Tauopathien bezeichnet (Spillantini und Goedert, 1998). Die Zusammenhänge zwischen der Aggregation von Tau und den einzelnen Krankheiten sind noch unklar. Die betroffenen Gehirnregionen, die Zelltypen und die Zusammensetzung der neurofibrillären Bündel aus den verschiedenen Tau-Isoformen sowie deren Morphologie weisen eine große Vielfalt auf (Tolnay und Probst, 1999; Buee und Delacourte, 1999).

Im Jahr 1994 konnte erstmals eine Verknüpfung von einer neurodegenerativen Erkrankung mit Tauopathie mit dem Chromosom 17 nachgewiesen werden (Wilhelmsen *et al.*, 1994). Es wurden weitere Erkrankungen entdeckt, in denen das

Auftreten einer Tauopathie mit dem Genort auf dem Chromosom 17 korreliert. Diese Krankheiten wurden unter der Bezeichnung „frontotemporale Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17“ (FTDP-17, *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosom 17*) zusammengefasst (Foster *et al.*, 1997). Für die Patienten wurden mehrere Mutationen im Tau-Gen (lokalisiert auf Chromosom 17) identifiziert. Einige dieser Mutationen führen zu einem veränderten Spleißverhalten, bei anderen ist die Funktion noch unklar. Diese Mutationen können einerseits zum Austausch von Aminosäuren führen, andererseits sind auch zwei Deletionsmutationen bekannt sowie drei stille Mutationen, dabei bleibt die Aminosäuresequenz von Tau unverändert (Spillantini *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998). Die meisten Mutationen liegen in den Exons, die für die Wiederholungssequenzen in der Mikrotubuli-Bindungsregion codieren. Der pathogene Mechanismus ist noch unbekannt. Da diese Region aber zum einen für die Tau-Mikrotubuli-Bindung verantwortlich ist (Gustke *et al.*, 1994; Trinczek *et al.*, 1995) und zum anderen als Bestandteil der paarigen helikalen Filamente identifiziert wurde (Wischik *et al.*, 1988b; Novak *et al.*, 1993), wird eine Störung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion und eine erhöhte Tendenz zur Aggregation in die unlöslichen Filamente vermutet. Als weitere Ursache ist eine Veränderung im Spleißverhalten von Exon 10 (geringere Effektivität) zu vermuten, was ein verändertes Verhältnis der Isoformen bewirkt (erhöhte Menge an 4-Repeat-Isoformen) (Spillantini *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998). Diese Tatsachen geben einen Hinweis, dass auch die Aggregation des Proteins Tau in die neurofibrillären Bündel alleine ausreichend ist, um eine neurodegenerative Erkrankung und Demenz zu verursachen.

2 Mikrotubuli

Die Zellform, die interne räumliche Organisation, die Motilität und unter Umständen auch die Fähigkeit der Kommunikation der Zelle werden durch das Zytoskelett vermittelt. Das Zytoskelett stellt das interne Gerüstsystem der Zelle dar und besteht im Wesentlichen aus drei Filamentsystemen.

Dazu gehören kontraktile Mikrofilamente, die hauptsächlich aus Aktin und Myosin aufgebaut sind, Intermediärfilamente und die Mikrotubuli, die den Hauptanteil tragen.

Ein Mikrotubulus besteht aus 13 Protofilamenten, die einen Hohlzylinder bilden. Die Protofilamente werden aus Heterodimeruntereinheiten aus α - und β -Tubulin gebildet, die longitudinal angeordnet sind (Downing und Nogales, 1999). Durch diese Anordnung der Heterodimereinheiten erhält der Mikrotubulus seine strukturelle und funktionelle Polarität. Dabei sind schnell wachsende Plusenden und langsam wachsende Minusenden zu unterscheiden.

Diese Eigenschaft ist eine notwendige Voraussetzung für die Funktion der Mikrotubuli, welche an der Gestaltung der Zellform, der Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose, der Zellbewegung und an dem Transport von Vesikeln und Organellen in Neuronen beteiligt sind.

Durch die Polymerisation der Untereinheiten α - und β -Tubulin entsteht ein Heterodimer, das als solches sowohl als Polymer als auch in Lösung vorliegt. Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 25 nm. Die Isoformen α - und β -Tubulin bestehen aus ca. 450 Aminosäuren und weisen ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa auf. Eine dritte Isoform - das γ -Tubulin ist mit den Mikrotubuliorganisierenden Zentren assoziiert und an der Nukleation der Mikrotubuli in Zellen beteiligt.

2.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Die Mikrotubuli dienen in den Nervenzellen als ein Element des Zytoskeletts, an das eine Vielzahl von Proteinen assoziiert sind – die sogenannten MAPs (Mikrotubulus-assoziierte Proteine) (zur Übersicht siehe Cassimeris und Spittle, 2001).

Diese können nach ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören die strukturellen MAPs, zu denen auch das Protein Tau gehört. Diese sind an der Regulation der Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli beteiligt. Als zweite Gruppe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen seien die Motorproteine wie Kinesin und Dynein genannt, die den Vesikeltransport entlang der Mikrotubuli in den Neuronen gewährleisten (zur Übersicht siehe Hirokawa und Takemura, 2005). In der dritten Gruppe sind heterogene Proteine zusammengefasst, die den Mikrotubulus als

zytoskelettären Anker nutzen (zur Übersicht siehe Mandelkow und Mandelkow, 1995).

2.1.1 Strukturelle Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Die strukturellen MAPs fördern die Tubulin-Polymerisation und tragen so zur Stabilisierung der Mikrotubuli bei (Murphy und Borisy, 1975). Die ursprüngliche Einteilung der MAPs erfolgte in zwei Gruppen. Nach ihrem Molekulargewicht wurden sie in MAPs mit niedrigem Molekulargewicht (von 50 bis 70 kDa) und MAPs mit hohem Molekulargewicht (über 200 kDa) eingeteilt. In die Gruppe der hochmolekularen MAPs gehören MAP1, MAP2 und MAP4 mit Molekulargewichten von 330 kDa, 280 kDa, und 190-210 kDa, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt wurden.

Die MAP2-Proteine haben eine Funktion in der neuronalen Morphogenese und werden überwiegend in den Dendriten exprimiert (Binder *et al.*, 1985; Riederer und Matus, 1985). MAP4-Proteine kommen in unterschiedlichen Organismen und Zelltypen vor und werden daher auch als ubiquitär vorhandenes, nicht neuronales Mikrotubuli-assoziiertes Protein geführt (Bulinski und Borisy, 1979; zur Übersicht siehe Tucker 1990; Schoenfeld und Obar, 1994).

MAP2 und MAP4 haben ähnliche biochemische Eigenschaften wie Tau (Weingarten *et al.*, 1975; Sloboda *et al.*, 1975), das zu den niedermolekularen MAPs gehört. Diese MAPs weisen Sequenzhomologien in ihren Mikrotubulusbindungsdomänen auf (Goedert *et al.*, 1991).

3 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

Das Tau-Protein wird hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert und ist überwiegend in den Axonen (Binder *et al.*, 1985; Kosik und Finch, 1987; Garner *et al.*, 1988) lokalisiert. Die Interaktion des Tau-Proteins mit den Mikrotubuli erfolgt über die C-terminale Hälfte - die Mikrotubulus-Bindungsdomäne des Tau-Proteins (siehe

Abb. 1). Diese besteht aus drei bzw. vier unvollständigen Sequenzwiederholungen von 31-32 Aminosäuren, die im Folgenden als *Repeats* bezeichnet werden, und die N-terminal (P2-Region) und C-terminal flankierenden Bereiche dieser Region (siehe Abb. 3). Der Überschuss an basischen Aminosäuren in der Mikrotubulus-Bindungsdomäne trägt zur Interaktion mit dem sauren C-Terminus der Mikrotubuli bei (Goode und Feinstein, 1994; Littauer *et al.*, 1986; Rivas *et al.*, 1988). Auch die *Repeat*-Region flankierenden Bereiche sind maßgeblich an der Funktion der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt (Butner und Kirschner, 1991; Lee und Rook, 1992; Gustke *et al.*, 1994; Trinczek *et al.*, 1995). Die C-terminale Hälfte von Tau wird daher auch als Assemblierungsdomäne bezeichnet. Die N-terminale Domäne wird als Projektionsdomäne bezeichnet und dient wahrscheinlich als Abstandshalter zwischen den einzelnen Mikrotubuli (Chen *et al.*, 1992; Zingsheim *et al.*, 1979) (siehe dazu Abb. 3).

3.1 Die Struktur von Tau

Das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau wurde 1975 erstmals beschrieben (Weingarten *et al.*, 1975). Es zeichnet sich durch seine Hitzestabilität aus und wurde als Protein-Faktor beschrieben, der die spontane Polymerisation von α - und β -Tubulin zu Mikrotubuli fördert (Garcia und Cleveland, 2001).

Das Tau-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert (Neve *et al.*, 1986) und besteht aus 16 Exons (siehe dazu Abb. 3) (Andreadis *et al.*, 1992, Andreadis *et al.*, 1995), wobei Exon -1 Teil des Promotors ist (zur Übersicht siehe Buee *et al.*, 2000). Die sechs Isoformen von Tau im humanen ZNS entstehen durch alternatives Spleißen der Tau mRNA. Sie werden entwicklungsabhängig reguliert und im zentralen Nervensystem exprimiert (Goedert *et al.*, 1989; Himmler, 1989). Im adulten Stadium sind alle sechs Isoformen vorhanden, wogegen im fötalen zentralen Nervensystem nur die kürzeste Isoform (ht23) exprimiert wird (Kosik *et al.*, 1989; Goedert und Jakes, 1990). Die sechs Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein von einem oder zwei N-terminalen Einschüben aus 29 Aminosäuren und durch die Existenz von drei bzw. vier C-terminalen unvollständigen Sequenzwiederholungen aus 31-32 Aminosäuren, die als *Repeats* bezeichnet werden. Die *Repeats* befinden sich innerhalb der

Mikrotubulus-Bindungsdomäne. Aufgrund der Anzahl der *Repeats* lassen sich 3 *Repeat*- und 4 *Repeat*-Tau-Isoformen unterscheiden (siehe Abb. 3).

Eine weitere Isoform von Tau, die nur im peripheren Nervensystem vorkommt, wird als „großes“ Tau (*big Tau*) bezeichnet. Es besitzt einen zusätzlichen Einschub von 254 Aminosäuren, der von Exon 4a codiert wird (Couchie *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992b).

Im Elektronenmikroskop hat sich bestätigt, dass Tau ein größtenteils ungefaltetes Protein ist. Das filamentöse Protein Tau konnte mit einer Länge von ca. 35 nm als flexibles Molekül dargestellt werden (Wille *et al.*, 1992b). An Mikrotubulus gebundenes Tau hat eine Länge von ca. 20 nm und weist mit der Projektions-Domäne vom Mikrotubulus weg (Hirokawa *et al.*, 1988).

Bei der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese weist das Tau-Protein ein apparentes Molekulargewicht von 50 - 70 kDa auf, wobei das tatsächliche Molekulargewicht von Tau zwischen 36 - 46 kDa liegt.

Bei physiologischem pH-Wert liegen 25% der Aminosäuren des Tau-Proteins geladen vor. Das erklärt den hydrophilen Charakter des Tau-Proteins. Durch Untersuchungen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wurde nur ein sehr geringer Anteil an α -Helix oder β -Faltblatt gemessen (Cleveland *et al.*, 1977; Schweers *et al.*, 1994). Die Hitzestabilität des Proteins kann für die Reinigung aus einem Homogenisat ausgenutzt werden (Weingarten *et al.*, 1975). Außerdem ist das Tau-Protein nach Behandlung mit 2.5% Perchlorsäure noch löslich (Lindwall und Cole, 1984b; Fellous *et al.*, 1977).

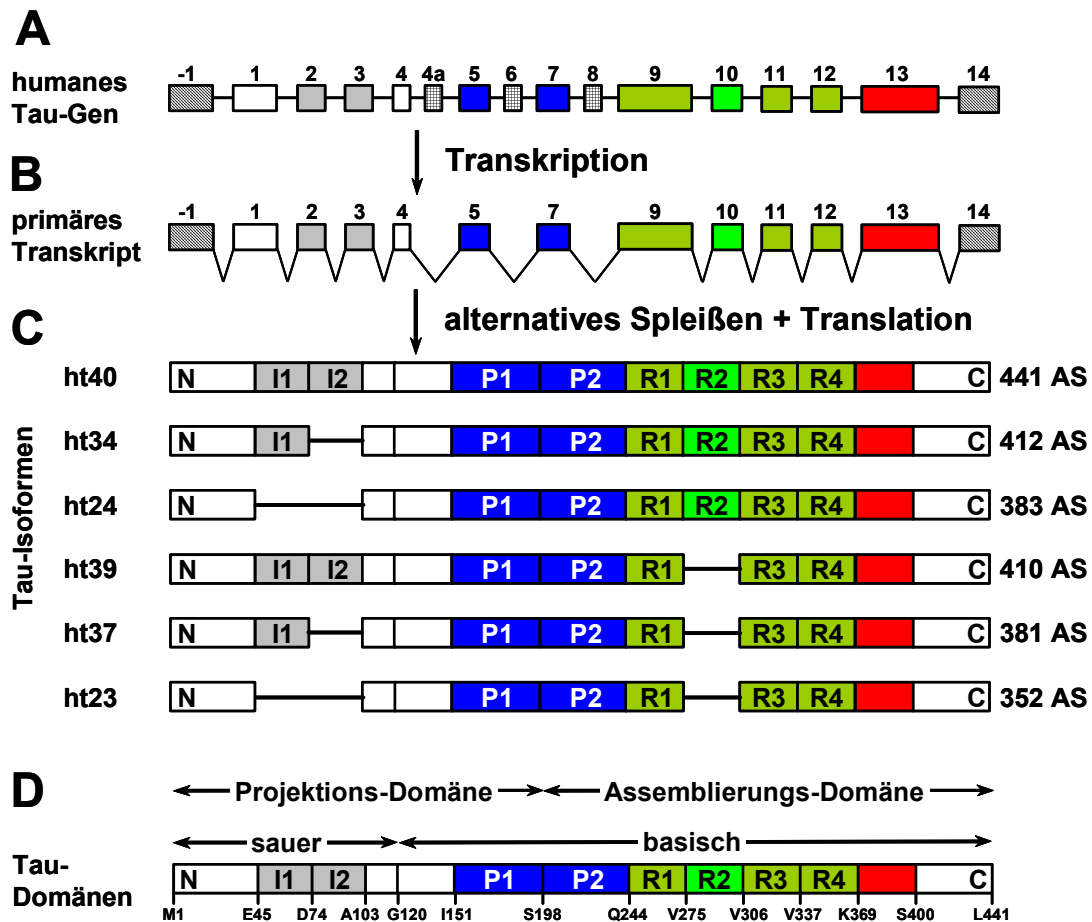


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tau-Gens und des Tau-Proteins.

(A): Das humane Tau-Gen ist auf über 100 kb auf Chromosom 17 an der Position 17q21 lokalisiert. Es besteht aus 16 Exons, wobei Exon -1 ein Teil des Promotors ist. Die Exone 6 und 8 werden im Menschen nicht transkribiert. Das Exon 4a wird nur im peripheren Nervensystem transkribiert. Es codiert für einen 254 Aminosäuren großen Einschub (kariert dargestellt) (nicht maßstabsgerecht).

(B): Das primäre Transkript enthält 13 Exons. Die Exons -1 und 14 (dunkelgrau dargestellt, nicht maßstabsgerecht) werden zwar transkribiert, aber nicht translatiert.

Die Exone 1, 4 (weiß dargestellt), 5, 7 (blau dargestellt), 9, 11, 12 (hellgrün dargestellt) und 13 (rot dargestellt) sind konstitutiv. Die Exone 2, 3 und 10 werden alternativ gespleißt. Exone 2 und 3 (grau dargestellt) codieren die N-terminalen Einschübe I1 und I2. Exon 10 (dunkelgrün dargestellt) codiert für den 2. Repeat (R2 = grün). Die sechs verschiedenen Tau mRNAs entstehen durch alternatives Spleißen auf der Basis des primären Transkripts. Diese werden im zentralen Nervensystem translatiert.

(C): Die sechs verschiedenen Tau-Isoformen im humanen zentralen Nervensystem entstehen durch die Kombination von An- und Abwesenheit von ein oder zwei N-terminalen Einschüben aus 29 Aminosäuren (I1 bzw. I2 = grau), die durch die Exone 2 bzw. 3 codiert werden, und drei (R1, R3, R4 = hellgrün) oder vier (R1, R2, R3, R4) Repeats im C-terminalen Bereich. Der 2. Repeat (R2 = dunkelgrün) kommt nur in 4-Repeat Tau-Isoformen vor und wird durch Exon 10 codiert (AS = Aminosäuren).

(D): Die Einteilung in funktionale Domänen des Tau-Proteins erfolgt in die N-terminale Projektions- und die C-terminale Assemblierungsdomäne. Die N-terminale Projektions-Domäne enthält die beiden Einschübe (I1 und I2 = grau) und weist eine saure Region (AS 1-120) und eine basische Region auf, die sich bis zum Ende des C-Terminus fortsetzt (AS 121-441). Die C-terminale Assemblierungs-Domäne besteht aus vier unvollständigen Repeats mit 31-32 Aminosäuren (R1-R4). Eine fünfte Sequenzwiederholungsregion wird als R' (rot dargestellt) bezeichnet. Diese weist eine geringere Sequenzhomologie zu den Repeats R1-R4 auf. Prolin-reiche Regionen (P1 und P2 = blau) flankieren die Repeat-Region N-terminal. Abbildung modifiziert nach (Gustke *et al.*, 1994).

3.2 Die Funktion von Tau

Das Protein Tau fördert die Tubulin-Polymerisation und Stabilität der Mikrotubuli (Cleveland *et al.*, 1977a, b; Herzog und Weber, 1978; Drubin und Kirschner, 1986). Die Bindung erfolgt durch die basischen Aminosäuren in der *Repeat*-Region und den flankierenden Prolin-reichen Regionen (Butner und Kirschner, 1991; Gustke *et al.*, 1994) von Tau an den sauren C-Terminus der Mikrotubuli. Im Vergleich zu 4-*Repeat*-Isoformen binden 3-*Repeat*-Isoformen schwächer an die Mikrotubuli (Butner und Kirschner, 1991; Gustke *et al.*, 1994; Ackmann *et al.*, 2000). Die Dissoziationskonstanten für die Mikrotubuli-Bindung in Abhängigkeit von der Isoform liegen im Bereich von 0.1 – 0.5 μM (Ackmann *et al.*, 2000). Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli erfolgt biphasisch. Die initiale Bindung von Tau an die Oberfläche der Mikrotubuli ist mit einer Konformationsänderung von Tau verbunden. Die weitere Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli erfolgt in einer zweiten Bindungsphase, die zu einer Beladung der Mikrotubulioberfläche mit Tau führt.

Die Funktion von Tau wird durch Phosphorylierung reguliert. Tau kann durch verschiedene Kinasen an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden (siehe dazu Abb. 4). Die Fähigkeit des Tau-Proteins Mikrotubuli zu binden und damit die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli zu fördern, beruht auf der Proteinstruktur in den drei (ht23) bzw. vier (ht40) Wiederholungssequenzen, die als *Repeats* bezeichnet werden. Diese zeichnen sich durch ihre hohe Homologie aus. Die *Repeats* weisen je ein KXGS-Motiv auf. Speziell die Kinase MARK kann diese Serinreste phosphorylieren, wodurch die Affinität von Tau zu den Mikrotubuli stark reduziert wird (Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1997) (siehe auch 3.3 Die Regulation der Funktion von Tau durch Phosphorylierung).

Die Mikroinjektion von „antisense“-mRNA des Tau-Proteins in Primärzellkulturen inhibiert die Axonausbildung (Esmaeli-Azad *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999). Durch die Expression von Tau in Sf9-Insektzellen kann eine Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Zellfortsätzen dargestellt werden (Knops *et al.*, 1991; Baas *et al.*, 1991; Biernat und Mandelkow, 1999). Da eine Voraussetzung für die Ausbildung von Zellfortsätzen ein Zusammenspiel von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten ist, wird

ebenso eine Interaktion von Tau mit Aktin-Filamenten vermutet (Harada *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1997; Biernat *et al.*, 2002).

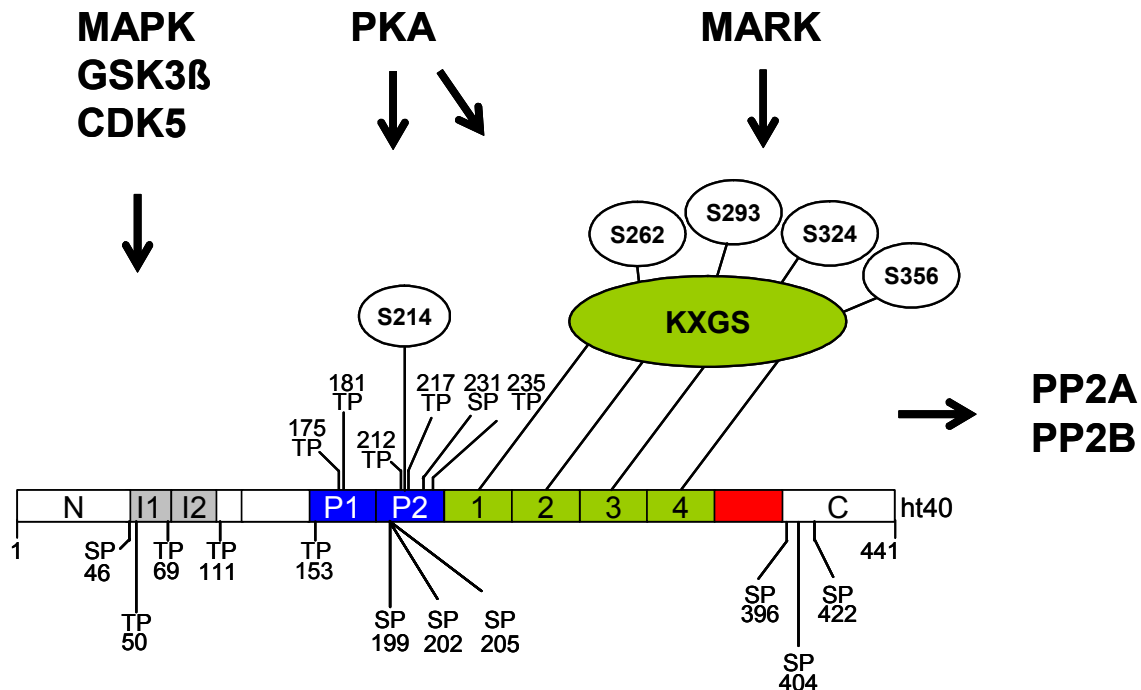


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phosphorylierungsstellen des Proteins Tau. Die KXGS-Motive in den *Repeats* (dunkelgrün) sind Substrat der MARK. Die SP/TP-Motive in den flankierenden Bereichen der *Repeats* können durch die Kinasen MAPK, GSK3β, CDK2 oder CDK5 phosphoryliert werden.

3.3 Die Regulation der Funktion von Tau durch Phosphorylierung

Die physiologische Bindung von Tau an Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung reguliert (Lindwall und Cole, 1984a; Gustke *et al.*, 1992; Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995; Trinczek *et al.*, 1995). Der Grad der Phosphorylierung wird in Abhängigkeit von der Entwicklung reguliert (Pope *et al.*, 1993; Mawal-Dewan *et al.*, 1994; Saito *et al.* 1995). In fötalem Gewebe ist der Grad der Phosphorylierung hoch. Mit zunehmendem Alter nimmt der Grad der Phosphorylierung durch die steigende Aktivität der Phosphatasen ab (Mawal-Dewan *et al.*, 1994).

Aus Hirngewebe von Alzheimer Patienten isoliertes Tau-Protein weist einen heterogenen Phosphorylierungszustand auf (Lindwall und Cole, 1984; Butler und

Shelanski, 1986; Hagestedt *et al.*, 1989) und ist hyperphosphoryliert (Alonso *et al.*, 2001, Morishima-Kawashima und Ihara, 2002). Das Protein Tau ist Substrat vieler Kinasen und Phosphatasen. Die in der Alzheimer-Krankheit beobachtete Hyperphosphorylierung geht wahrscheinlich auf eine Fehlregulation zurück, die mit einer erhöhten Aktivität von Kinasen und einer verminderten Aktivität von Phosphatasen erklärt werden kann (Tojanowski und Lee, 1995; Gong *et al.*, 1995; Ladner *et al.*, 1996; zur Übersicht siehe Lovestone und Reynolds, 1997).

Hyperphosphoryliertes Tau-Protein weist eine verlangsamte elektrophoretische Mobilität auf. Die Dephosphorylierung kann durch Phosphatasen (Protein-Phosphatase-2A, Protein-Phosphatase-2B, teilweise auch durch Protein-Phosphatase-1) erreicht werden (Drewes *et al.*, 1993; Iqbal *et al.*, 1998).

Innerhalb des Tau-Proteins gibt es 30 verschiedene Stellen, die durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden können. Dabei dient das Protein Tau als Substrat von Kinasen mit verschiedenen Aminosäureerkennungssequenzen. *In vitro* kann das Protein Tau von den im Folgenden genannten Kinasen phosphoryliert werden. Als Beispiele sind die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) (Pierre und Nunez, 1983; Steiner *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1993; Brandt *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 1995; Litersky *et al.*, 1996), die Ca²⁺/Phospholipid-abhängige Proteinkinase (PKC) (Correas *et al.*, 1992), die Casein-Kinase 1 (CK1) (Pierre und Nunez, 1983), die Casein-Kinase 2 (CK2) (Singh *et al.*, 1996), die CA²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase (CAM-Kinase) (Baudier und Cole, 1987; Steiner *et al.*, 1990), die Mitogen-aktivierende Kinase (MAP-Kinase) (Drewes *et al.*, 1992), die MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) (Drewes *et al.*, 1995), die Zellzyklus-abhängige Kinase (CDC/Cyclin A) (Vulliet *et al.*, 1992), die Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 5 (CDK 2 und CDK 5) (Paudel *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995), die Glykogensynthase-Kinase β (GSK-3 β) (Mandelkow *et al.*, 1992; Hanger *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994; Song und Yang, 1995; Moreno *et al.*, 1996) und die Tyrosin-Kinase *fyn* (Lee *et al.*, 1998) zu nennen. Diese Kinasen können in Prolin-gerichtete Kinasen und nicht Prolin-gerichtete Kinasen unterschieden werden. Prolin-gerichtete Kinasen können Serin- und Threoninreste phosphorylieren auf die C-terminal ein Prolin folgt.

Die Phosphorylierung von Tau beeinflusst die Bindung an die Mikrotubuli. Durch die physiologische Phosphorylierung der Serinreste in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* wird das Tau-Protein von den Mikrotubuli abgelöst und damit die Dynamik der Mikrotubuli gewährleistet (Biernat *et al.*, 1999). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Tau durch die MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) am Serin 262 im KXGS-Motiv des 1. *Repeats* Tau von den Mikrotubuli ablöst (Biernat *et al.*, 1993). Dadurch zerfallen die Mikrotubuli in die Untereinheiten und verlieren ihre Stabilität. Aber auch andere nicht Prolin-gerichtete Kinasen können ebenso wie die MARK (Drewes *et al.*, 1997; 1998), die Serine (262, 293, 324 und 356) in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* phosphorylieren und so die Tau-Mikrotubuli-Bindung negativ beeinflussen (Illenberger *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des Serins 214 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) hat ebenso einen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion (Pierre und Nunez, 1983; Scott *et al.*, 1993; Brandt *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 1995; Zheng-Fischhöfer *et al.*, 1998). Dagegen hat die Phosphorylierung durch Prolin-gerichtete Kinasen nur eine moderate Wirkung auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion (Trinczek *et al.*, 1995).

Das Tau-Protein ist aber auch Substrat von Prolin-gerichteten Kinasen, welche zusätzliche Phosphorylierungen in der P2-Region und der C-terminal flankierenden Region der *Repeat*-Domäne verursachen (siehe Abb. 4). Die Prolin-gerichteten Kinasen phosphorylieren die Serin- bzw. Threoninreste, auf die C-terminal unmittelbar in der Aminosäurekette ein Prolin folgt (SP/TP-Motive) (Lichtenberg-Kraag *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995).

Die Kinase GSK3 β phosphoryliert das Protein Tau an den Aminosäuren Serin 235 und Serin 404. Erst wenn diese Stellen phosphoryliert sind, kommt es zur Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 231 und Serin 396 (Diplomarbeit Goodemann, 1999). Die Aminosäure Serin 404 kann außerdem von der Kinase Cdk5 und MAPK phosphoryliert werden. In den Gehirnen von Alzheimer Patienten wurden beide Stellen von phosphorylierungsabhängigen Antikörpern erkannt (Brion *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2001). Für strukturelle Untersuchungen wurde mehrfach versucht, die tatsächlichen Phosphorylierungsverhältnisse im Gehirn nachzustellen. Experimentell ergaben sich

in vitro nur bis zu 40%, in Einzelfällen wie Serin 235 (Phosphorylierung mit MAPK) bis zu 80% Phosphorylierung (Illenberger *et al.*, 1998, Schneider *et al.*, 1999).

Der Einfluss der Phosphorylierung an den SP/TP-Motiven auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion und die Aggregation ist Gegenstand vieler Untersuchungen und Diskussionen. Diese Phosphorylierungen tragen entscheidend dazu bei, Tau in der Weise zu modifizieren, dass es als hyperphosphoryliertes Protein im Gehirn vorliegt. Die umstrittene These, die Hyperphosphorylierung sei die Ursache für die Aggregation von Tau, konnte durch frühere Untersuchungen aus unserem Labor nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung an den KXGS-Motiven in den *Repeats* das Tau vor der Aggregation schützt, während Phosphorylierungen an den SP/TP-Motiven nur einen leicht verzögernden Einfluss auf die Aggregation hat (Schneider *et al.*, 1999).

Durch Kinasen ist es normalerweise schwierig, eine vollständige Phosphorylierung zu erreichen. Strukturelle und funktionelle Auswirkungen einzelner Phosphorylierungsstellen oder deren Kombination können dagegen mit Hilfe von Pseudo-Phosphorylierungen (Glutamat-Mutanten) untersucht werden, da der Austausch der Serin- bzw. Threoninreste in Glutamat die negative Ladung des Phosphats simuliert und zu 100% erfolgt. Manche dieser Mutanten zeigen ebenso wie hyperphosphoryliertes Tau aus Alzheimer Patienten eine reduzierte Mobilität bei elektrophoretischer Auftrennung (Eidenmüller *et al.*, 2000; Haase *et al.*, 2004). In Anwesenheit von Harnstoff wird diese Veränderung wieder aufgehoben (Eidenmüller *et al.*, 2000). Die Daten anderer Gruppen zeigen, dass die Pseudo-Phospho-Mutanten die Tau-Mikrotubuli-Interaktion in ähnlicher Weise beeinträchtigen wie physiologische Phosphorylierungen (Eidenmüller *et al.*, 2000; Haase *et al.*, 2004). Dabei haben Pseudo-Phosphorylierungen in den *Repeats* den größten Effekt.

Um die Hyperphosphorylierung zu imitieren, wurden auch Mehrfach-E-Mutanten hergestellt. Diese können den Effekt von Polyanionen nicht ersetzen. Ohne Zugabe von Polyanionen kommt es nicht zur Aggregation. In Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren wurde eine reduzierte PHF-Bildung für Mehrfach-E-Mutanten

(S198E_S199E_S202E_T231E_S235E_S396E_S404E_S409E_S413E_S422E) beschrieben (Eidenmüller *et al.*, 2000).

Für C-terminal eingeführte Pseudo-Phosphorylierungen wurde mit verschiedenen Induktoren eine erhöhte Aggregation beschrieben (Haase *et al.*, 2004). Quantitative elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die erhöhte Masse an PHFs mit einer verlängerten lag-Phase einhergeht und die Filamentbildung stabilisiert wird, sobald die Energiebarrieren der Nukleation überwunden wurden (Necula und Kuret, 2004).

Es bleibt zu klären, welche Phosphorylierungsstellen Tau in die Aggregation treiben. Die Simulierung einzelner Phosphorylierungsstellen und deren Kombination tragen zur Klärung bei. Aus diesem Grund wurden Tau-Mikrotubuli-Bindungs-Assays und die PHF-Bildung mittels E-Mutanten auf ihren Einfluss auf die Funktion von Tau untersucht.

4 Ziel der Arbeit

Innerhalb des Tau-Proteins gibt es 30 mögliche Phosphorylierungsstellen, die in unterschiedlichem Ausmaß von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden können. Diese Phosphorylierungsstellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen; die Phosphorylierungsstellen innerhalb der *Repeats*, welche sich in der Mikrotubuli-Bindungsdomäne befinden und in solche, die in den N- und C-terminal daran angrenzenden Regionen der *Repeats* liegen.

Durch die Vielzahl von Kinasen und dem Wechselspiel der Kinasen und Phosphatasen in der Zelle ist es schwer, den Einfluß einzelner Phosphorylierungsstellen *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen, zumal es unmöglich ist, einzelne Phosphorylierungsstellen *in vivo* oder *in vitro* zu 100% in den phosphorylierten Zustand zu überführen. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Serin- bzw. Threoninreste als Einzel-, Doppel- und Mehrfachmutanten mittels ortsgerichteter Mutagenese in Glutamat (E-Mutanten) umzuwandeln, um so eine vollständige Imitierung der Phosphorylierung an den jeweiligen Stellen durch die negative Ladung des Glutamatrestes zu simulieren. Damit sollte die Analyse des Effektes der Phosphorylierung in Bezug auf die Sekundärstruktur, die Bindung an Mikrotubuli und die PHF-Bildung *in vitro* ermöglicht werden.

Um die entsprechenden Proteine rekombinant in *E.coli* exprimieren zu können, sollten die verschiedenen E-Mutanten von Tau und verkürzte Konstrukte in einen bestehenden Expressionsvektor kloniert werden. Der Einfluss der „Pseudo-Phosphorylierung“ auf die unterschiedlichen Parameter der Tau-Mikrotubuli-Interaktion sollte mittels Mikrotubuli-Polymerisations- und Bindungs-Assays untersucht werden.

Zusätzlich zur Imitation der Phosphorylierung in der *Repeat*-Domäne sollte auch der Einfluß von Kombinationen mit Pseudophosphorylierungen in den flankierenden Bereichen untersucht werden.

Zur Quantifizierung der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Aggregation der Tau-E-Mutanten in Anwesenheit von verschiedenen, die PHF-Bildung fördernden, Polyanionen sollte ein Fluoreszenz-basiertes Messverfahren (Thioflavin S-Fluoreszenz-Assay) eingesetzt werden. Die qualitative Untersuchung der Aggregationseigenschaften der Tau-E-Mutanten, sowie die Morphologie gebildeter Filamente, erfolgte durch Kontrolle im Elektronenmikroskop.

Insgesamt sollte nachgewiesen werden, ob die Methode der Pseudophosphorylierung geeignet ist, die Aggregations- und Mikrotubuli-Bindungseigenschaften von Tau in verschiedenen Phosphorylierungszuständen zu untersuchen und so zwei widerstreitende Hypothesen zu überprüfen: ob Phosphorylierung das Tau-Protein in die Aggregation treibt oder ob die Phosphorylierung das Tau-Protein vor der Aggregation schützt. Die Antwort auf diese Frage ist wichtig für mögliche therapeutische Ansätze in der Zukunft.

II Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Mit dieser Methode wurden *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht. 1 L LB-Medium wurden mit 20 mL einer Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) angeimpft und bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0.5-0.6$) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman J2-21M/E, JA10, 4000 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 500 mL eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend einmal mit 10%igem Glycerol gewaschen. Das Pellet wurde in 2 mL 10%igem Glycerol aufgenommen und in Aliquots von 25 µL in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2 Anlegen von Glycerolstocks

Von den Bakterien, die zur Proteinpräparation verwendet wurden, sind Dauerkulturen angelegt worden. Hierzu wurden 800 µL der entsprechenden Bakterienkultur ($OD_{600} = 0.6$) mit 200 µL 80%igem Glycerol gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung dieser Kulturen erfolgte bei -80°C.

2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung in Quarzküvetten bei 260 nm in einem Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) bestimmt.

Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde folgende Gleichung verwendet:

$$1.0 E_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/mL Doppelstrang-DNA}$$

Da das Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm liegt, kann aus dem Quotienten $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ der Reinheitsgrad von DNA bestimmt werden. Die DNA gilt als sauber, wenn die Absorptionsverhältnisse zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

2.1.4 Ethanolpräzipitation

Zur Konzentrierung von DNA wurde diese mit 0.1 Volumina 3 M KOAc-Lösung und 2 Volumina 100%igem Ethanol (-20°C) versetzt und für 30-60 min bei 20°C inkubiert. Das Pellet der ersten Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, 10 000 x g, 30 min, 4°C) wurde mit 2 Volumina 70%igem Ethanol gewaschen und ein zweites Mal zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, 10 000 x g, 30 min, 4°C). Nach Lufttrocknung des DNA-Pellets wurde dieses in dem gewünschten Volumen an Puffer bzw. destilliertem Wasser aufgenommen.

2.1.5 Mutagenese der Tau-Konstrukte

Verwendete Mutanten wurden durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Deutschland) hergestellt. Die Produkte wurden mittels Topo-Cloning-Kit (Invitrogen, Deutschland) in den Expressionsvektor pNG2 (Biernat *et al.*, 1992) eingefügt. Dieser beruht auf dem Vektor pET3 (Studier *et al.*, 1990).

Für E-Mutanten enthielt der PCR-Ansatz folgende Komponenten: je 0.5 µL 0.5 pMol/µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer (für die Sequenzen der Primer siehe Anhang), 0.5 µL 10 mM dNTPs (jedes Nukleotid je 2.5 mM), 2.0 µL 10 x Pfu-Puffer, 50-200 ng Vektor-DNA sowie 0.5 µL Native Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Deutschland, 2.5 U/µL). Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Es wurden jeweils Negativkontrollen

mitgeführt, welche nur den Vorwärtsprimer enthielten. Nach einer einmaligen Denaturierungsphase von 30 sec bei 95°C wurden die folgenden Reaktionszyklen durchgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95°C	30 sec	16
Hybridisierung	58°C	1 min	16
Polymerisation	68°C	15 min	16

Um die Matrizen-DNA, die nicht die gewünschte Mutation enthält, zu entfernen, wurde 1 µL des Restriktionsenzym Dpn I (New England Biolabs, Deutschland) pro PCR-Ansatz hinzugeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym Dpn I schneidet spezifisch methylierte DNA wie die Matrizen-DNA, welche aus *E. coli* isoliert wurde. Die PCR-Produkte enthalten keine Methylierung und bleiben erhalten. Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese (2.1.7 Gelelektrophorese von DNA) durchgeführt und die PCR-Produkte mit der erwarteten Größe in XL2 - Blue Zellen (Stratagene, Deutschland) transformiert (2.1.10 Transformation von DNA in *E. coli* Zellen).

Um eine schnelle Analyse der erfolgreichen Mutagenese mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchführen zu können, wurden die *Primer* so gewählt, dass Restriktionsschnittstellen entweder deletiert oder neu in das Plasmid eingefügt wurden. Durch Sequenzierung beider DNA-Stränge des Tau-Konstrukts auf dem Vektor wurde die eingeführte Mutation nachgewiesen (2.1.12 Sequenzierung von DNA).

Für E-Mutanten, welche mittels Topo-Cloning-Kit (Invitrogen, Deutschland) hergestellt wurden, enthielt der PCR-Ansatz folgende Komponenten: 300–500 ng Matrizen-DNA, je 4.0 µL 5 pMol/µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 25 µL PWO-Master (Roche, Deutschland). Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µL aufgefüllt. Nach einer einmaligen Denaturierungsphase von 2 min bei 94°C wurden die folgenden Reaktionszyklen durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: PCR-Programm für die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	94°C	45 sec	25
Hybridisierung	68°C	45 sec	25
Polymerisation	72°C	45 sec	25

Auf den letzten Wiederholungsschritt folgte eine Inkubation bei 72°C für 10 min. Das PCR-Produkt wurde mittels Topo-Cloning-Kit (Invitrogen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in den Topo-Vektor kloniert und anschließend in Top 10 „One Shot“ Zellen (2.1.10 Transformation von DNA in *E. coli* Zellen) transformiert.

Nach der Bestätigung der gewünschten Sequenz durch Sequenzierung (2.1.12 Sequenzierung von DNA) der Tau-Konstrukte im Topo-Vektor wurden diese mit den Restriktionsenzymen *Bam* H I und *Nde* I geschnitten. Dies war möglich, da die verwendeten *Primer* am Startcodon eine *Nde* I-Schnittstelle und in 3'-Position zum Stopcodon eine *Bam* H I-Schnittstelle enthielten. Der Ansatz wurde elektrophoretisch aufgetrennt, die Fragmente der gewünschten Größe aus dem Gel isoliert (2.1.8 Elution von DNA aus Agarosegelen) und anschließend mit dem pNG2-Vektor ligiert (2.1.9 Ligation von DNA).

2.1.6 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA zur Ligation (2.1.9 Ligation von DNA) oder Charakterisierung erfolgte enzymatisch mittels Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Deutschland). Dafür wurden 100 ng DNA mit je 1 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Deutschland) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Analyse wurden diese Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.1.7 Gelelektrophorese von DNA). Um die Fragmente der entsprechenden Größe zu ligieren, wurden diese aus dem Agarosegel reisoliert (2.1.8 Elution von DNA aus Agarosegelen).

2.1.7 Gelelektrophorese von DNA

Zur Trennung von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Je nach erwarteter Größe der DNA wurden 0.6 – 1.0 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer unter Wärmezufuhr vollständig gelöst. Nach dem Erkalten auf ca. 50°C wurde die Gellösung in eine horizontale Gelkammer eingefüllt und ein Kamm für die Probenfächer eingesetzt. Das erstarrte Gel wurde in einer Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 2 mM EDTA) bedeckt. Die zu trennenden Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer (0.2% Bromphenolblau, 0.2% Xylen Cyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA) gemischt und in die Taschen pipettiert. Um die Größen der DNA-Fragmente analysieren zu können, wurde als Standard der Smart Ladder (Eurogentec, Deutschland) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch Anlegen einer Spannung von 80 V nach ihrer Größe getrennt und anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (80 µL einer 1%igen Stammlösung (w/v) in 200 mL Wasser) gefärbt. Zur Detektion wurde UV-Licht verwendet. Die Banden der entsprechenden Größe wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die darin enthaltene DNA wurde aus dem Agarosegel isoliert (2.1.8 Elution von DNA).

2.1.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden mittels „Ultra Clean 15 DNA Purification Kit“ (MoBio, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.1.9 Ligation von DNA

Um die gewünschten DNA-Fragmente zu einem rekombinanten Plasmid zu verknüpfen, wurden 50 - 100 ng Vektor mit 2-3fachem Überschuß an Insert-DNA in 2 x Ligase-Puffer und 1 µL Quick T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Deutschland) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation (2.1.10 Transformation von DNA in *E. coli*-Zellen) eingesetzt.

2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

mittels Hitzeschockmethode

1.0 bis 5.0 µL PCR- bzw. Ligationsansatz wurden mit 25 µL ultrakompetenten XL2-Blue Zellen (Stratagene, Deutschland) für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 sec bei 42°C erwärmt (Hitzeschock) und nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL SOC-Medium wurden die Zellen für ca. 1 h bei 37°C und 200 rpm (Innova 4300, New Brunswick Scientific, Deutschland) inkubiert und auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/mL Carbenicillin mittels Drigalskispatels ausgestrichen und für 16–20 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Testtransformation mit 0.5 ng des Plasmids pUC 18 durchgeführt.

mittels Elektroporationsmethode

Um Tau-Mutanten und -Konstrukte in größerem Maßstab zu produzieren, wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli*-Stämme transformiert, die sich zur Proteinexpression eignen. Bei dieser Methode werden die Membranen von *E. coli*-Zellen durch Anlegen einer Spannung permeabel gemacht, so dass die Zellen Plasmid-DNA aufnehmen können.

Ein 25 µL-Aliquot elektrokompenter BL21 (DE3)-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 0.5 ng DNA hinzugegeben und in eine Küvette (BTX) pipettiert. Die so befüllten Küvetten wurden in der Elektroporationskammer für 2 – 3 msec mit 2500 Volt behandelt. Die Küvette wurde mit 2 x 100 µL SOC-Medium gespült und die Zellen für ca. 1 h bei 37°C und 200 rpm (Innova 4300, New Brunswick Scientific, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden 10 - 25 µL der Zellen auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/mL Carbenicillin mittels Drigalskispatels ausgestrichen und für 16 - 20 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Testtransformation mit 0.5 ng des Plasmids pUC 18 durchgeführt.

2.1.11 Plasmidpräparation im „Mini“- und „Midi“-Maßstab

Diese Methode diente der Präparation von Plasmid-DNA aus 5 mL Übernachtskulturen, die für Kontrollschnitte verwendet wurde. Die Durchführung erfolgte mit dem „Invisorb Spin Plasmid MiniKit“ (Invitex, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers. Für Sequenzierungen und präparative Restriktionsschnitte wurde die DNA aus 100 mL Übernachtskulturen mit dem „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

2.1.12 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der neu konstruierten Tau-Mutanten und -Konstrukte wurden die DNA-Abschnitte nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert und mit dem hTau-Gen verglichen.

Der Reaktionsansatz enthielt 1.0 - 1.5 µg Plasmid-DNA als Matrize, 2.0 µL "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Mix" (Applied Biosystems, Deutschland), 6.0 µL Reaktionspuffer "Half Term" (Applied Biosystems, Deutschland), 10 pmol Sequenzierungs-Oligonukleotide. Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL aufgefüllt. In Tabelle 3 ist das verwendete PCR-Programm für die zyklische Sequenzierung beschrieben. Die Parameter wurden in 25 Zyklen (Tabelle 3) wiederholt:

Tabelle 3: PCR-Programm für die zyklische Sequenzierung von DNA

PCR-Zyklus	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95°C	30 sec	25
Hybridisierung	40°C	30 sec	25
Polymerisation	60°C	4 min	25

Um die nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (Terminatoren) von den Sequenzierungsprodukten abzutrennen, wurden die Reaktionsansätze mit 40 µL Ethanol, 2 µL Pellet Paint NF Co-Precipitant (Novagen, Deutschland), 2 µL 3 M NaAc (pH 5.2) für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5415D, 10 000 x g, 5 min). Das Pellet wurde mit jeweils 100 µL 70%igem und 100%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 25 µL destilliertem Wasser aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte mittels BCA-Reagenz („BCA Protein Kit“) der Firma Sigma (Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Parallel wurde zu jeder Messung eine Eichreihe mit BSA erstellt und daraus die Proteinkonzentration in mg/mL berechnet.

2.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Ladung getrennt werden. Um die Trennung allein auf Basis des Molekulargewichts durchzuführen, wurde die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die 0.5 mm dicken Gele bestanden aus einem 4%igem Sammelgel und einem 10%, 15% oder 17%igem Trenngel (siehe Tabelle 4 (Matsudaira und Brugess, 1978) modifiziert nach Mandelkow *et al.*, 1985).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Elektrophoresegele für die SDS-PAGE

	Sammelgel (4%)	10%	15%	17%
40%iges Acrylamid/ Bis-Acrylamid (38/1)	5.4 mL	15.0 mL	22.6 mL	25.6 mL
1 M Tris-HCl pH 8.8	-	22.0 mL	22.0 mL	22.0 mL
0.25 M Tris-HCl pH 6.8	27.0 mL	-	-	-
H₂O	20.9 mL	22.0 mL	14.4 mL	11.4 mL
10%iges SDS	0.54 mL	0.60 mL	0.60 mL	0.60 mL
TEMED	0.108 mL	0.12 mL	0.12 mL	0.12 mL
APS	0.3 mL	0.13 mL	0.13 mL	0.13 mL

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 in 2 x Probenpuffer (160 mM Tris pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerol, 2% (w/v) β -Mercaptoethanol, 0.01% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Zur Identifikation der Proteingrößen wurde

jeweils ein Molekulargewichtsstandard (Fermentas, Deutschland) (siehe Tabelle 5) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS) bei Raumtemperatur für 30 min bei 120 V, um die Proben vor dem Eintritt ins Trenngel zu fokussieren. Dem schloß sich die Auftrennung für 45 min bei konstanter Spannung von 240 V an.

Tabelle 5: Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE

	kDa
β-Galaktosidase	116.0
BSA	66.2
Ovalbumin	45.0
Lactat-Dehydrogenase	35.0
Restriktionsendonuklease Bsp98I	25.0
β-Lactoglobulin	18.4
Lysozym	14.4

2.2.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um Proteine in SDS-Gelen sichtbar zu machen, wurden diese für 20 min in einer Coomassie-Färbelösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45% Methanol (v/v) und 9% Essigsäure (v/v)) inkubiert und anschließend für 20 min in Intensiventfärber (50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) und für mindestens 1 h in Normalentfärber (5% Methanol (v/v), 7.5% Essigsäure (v/v)) entfärbt. Die angefärbten Gele wurden zwischen zwei Zellophanfolien, die zuvor in Glycerin getränkt worden waren, unter Vakuum in einem beheizbaren Geltrockner (Modell 583, Bio-Rad, Deutschland) getrocknet.

2.2.4 Silber-Färbung von Proteingelen

Um geringe Proteinmengen in Polyacrylamidgelen nachzuweisen, wurden diese mit Silbernitrat gefärbt (modifiziert nach Heukeshoven und Dernick, 1988). Die Proteine wurden für 20 min im Gel fixiert (30% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) und anschließend für mindestens 30 min vernetzt (30% Ethanol (v/v), 0.5 M Natriumacetat, 0.5% Glutaraldehyd (v/v), 0.2% Natriumthiosulfat).

Nach dreimaligem intensiven Waschen (je 10 min) wurde mit Silbernitrat (0.1% Silbernitrat, 0.02% Formaldehyd (v/v)) gefärbt. Das Gel wurde nach erneutem Waschen bis zum Erreichen der gewünschten Intensität der Proteinbanden entwickelt (2.5% Natriumcarbonat, 0.01% Formaldehyd (v/v)). Durch Inkubation mit 0.05 M EDTA-Lösung wurde die Farbreaktion gestoppt.

2.2.5 Proteinexpression in *E. coli*

Die Proteinexpression erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) (Studier et al., 1990). Es wurden jeweils mehrere Klone einer Mutante auf Expression getestet. Dazu wurden 15 mL LB-Medium (mit 50 µg/mL Carbenicillin) mit 500 µL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0.6 - 0.8 bei 600 nm (OD_{600}) inkubiert. Zur Kontrolle der Expression vor der Induktion wurde 1 mL Zellsuspension bei 16 000 x g pelletiert und in 70 µL Probenpuffer aufgenommen (- IPTG-Probe). Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0.4 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 2.5 h Inkubation wurde ebenfalls 1 mL Zellsuspension wie oben pelletiert und in Probenpuffer aufgenommen (+ IPTG-Probe). Die restlichen 12 mL der Zellsuspension wurden ebenfalls pelletiert. Das Pellet wurde in 1.5 mL Resuspensionspuffer (20 mM MES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 2 mM Benzamidin, 10 µg/mL Pepstatin A) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.5 M NaCl (Endkonzentration) und 5 mM DTT (Endkonzentration) wurden die Proben im Wasserbad für 20 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und für 2 min bei 16 000 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde dann in 1.5 mL Puffer aufgenommen und 5 µL als

Gelprobe mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Vom Überstand wurden ebenfalls 5 µL mit 2 x Proteinprobenpuffer gemischt. Alle Gelproben wurden vor dem Auftrag für 5 min bei 95°C erhitzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Expression kontrolliert.

Die Proteinexpression im präparativen Maßstab erfolgte in einem 10 L Fermenter (Biostat B, B. Braun Biotech International). Dazu wurden 10 L LB-Medium (mit 50 µg/mL Carbenicillin) mit 300 mL einer Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 - 1.0 inkubiert und mit 0.4 mM IPTG (Endkonzentration) für 2.5 h induziert. Durch den Fermenter wurden folgende Parameter konstant gehalten: 37°C, pH 7.0, Rühren mit 600 Upm und O₂-Versorgung (gefilterte Umgebungsluft, 0.2 µm Porendurchmesser). In einer Durchflusszentrifuge (Contifuge 17RS, Rotor HCT 22 300, Heraeus) wurden die Zellen bei 12 x g und 4°C geerntet und das Pellet in 70 mL Resuspensionspuffer (20 mM MES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 2 mM Benzamidin, 10 µg/mL Pepstatin A) auf Eis resuspendiert.

2.2.6 Aufreinigung von rekombinanten Tau-Proteinen

Die aus der Fermentation gewonnene Zellsuspension wurde mittels French Press (SLM Aminco, SLM Instruments Inc., Deutschland) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0.5 M NaCl (Endkonzentration) und 5 mM DTT (Endkonzentration) wurde die Zellsuspension im Wasserbad für 20 min bei 100°C erhitzt. Die Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckman Ultrazentrifuge Optima LE-80K, Ti45, 40 min, 127 000 x g, 4°C) abgetrennt.

Nahezu alle *E. coli*-Proteine werden bei dieser Behandlung denaturiert und können pelletiert werden. Tau-Protein bleibt bei dieser Behandlung hingegen in Lösung und behält seine natürliche Funktion (Weingarten *et al.*, 1975; Herzog und Weber, 1978; Gustke *et al.*, 1994).

Der Überstand der Zentrifugation wurde zweimal gegen 1 L SP-Sepharose A-Puffer (20 mM MES pH 6.8, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT,

0.1 mM PMSF) über Nacht (erster Pufferwechsel nach 3 h) bei 4°C unter Rühren dialysiert. Der dafür verwendete Dialyseschlauch (Reichert Chemietechnik, Deutschland) hatte eine Ausschlussgrenze von 3.5 kDa.

2.2.7 Kationenaustauschchromatografie

Für die weitere Aufreinigung wurde die Methode der Kationenaustauschchromatografie eingesetzt. Das verwendete Kationenaustauschermaterial bestand aus Sepharosekügelchen an die Sulfopropyl-Gruppen gekoppelt sind. Diese binden kationische Proteine aufgrund deren Nettoladung in Lösung. Proteine, die beim verwendeten pH-Wert als Anionen vorliegen, werden vom Säulenmaterial nicht gebunden. Die Elution der gebundenen Proteine von der Säule erfolgte durch einen linear ansteigenden NaCl-Gradienten von 0 - 0.6 M NaCl.

Das Dialysat wurde durch Zentrifugation (40 min, 127 000 x g, 4°C) geklärt und mittels einer 150 mL Auftragsschleife (Superloop, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) auf eine selbst hergestellte Kationenaustauscher-Säule (SP-Sepharose fast flow Säulenmaterial, XK16-Säule, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) mit einem Fluß von 3.5 mL/min mit SP-Sepharose A-Puffer an einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurde mit 100 mL SP-Sepharose A-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten durch steigende Konzentration von SP-Sepharose B-Puffer (20 mM MES pH 6.8, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF).

Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, geeignete Elutionsfraktionen vereint und anschließend durch Zentrifugation in geeigneten Konzentratoren (5 kDa Ausschußgröße (Tau-Konstrukte) oder 10 kDa Ausschußgröße (ht23), Ultrafree, Millipore) für weitere Reinigungsschritte auf ein Volumen von ca. 500 µL aufkonzentriert.

2.2.8 Gelpermeations-Chromatografie

Um Multimere und Abbauprodukte des Tau-Proteins vom Protein der Gesamtlänge zu trennen, wurde eine Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt. Da schon in früheren Arbeiten (Friedhoff *et al.*, 1998b; von Bergen *et al.*, 2000) gezeigt wurde, dass Dimere und kürzere Fragmente des Tau-Proteins eine schnellere PHF-Aggregation *in vitro* zeigen als Tau-Protein der Gesamtlänge, war dieser Reinigungsschritt besonders wichtig für kinetische Untersuchungen zur PHF-Aggregation.

Das aufkonzentrierte Protein wurde mittels Auftragsschleife auf eine mit PBS-Puffer, pH 7.4, 1 mM DTT äquilibrierte Gelfiltrations-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 für ht23 oder Superdex 75 prep grade für Tau-Konstrukte) aufgetragen und mit einem Fluß von 0.5-1.0 mL/min mit Puffer (PBS, pH 7.4; 1 mM DTT) eluiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Page analysiert, geeignete Monomerfraktionen vereint, gegebenenfalls aufkonzentriert, umgepuffert und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.9 Westernblot

Die Auftrennung der Proben erfolgte durch SDS-Page wie in 2.2.2 SDS-Gelelektrophorese beschrieben. Nach Äquilibration des ungefärbten Gels für 30 min in Blotting-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 5% Methanol, 0.0375% (w/v) SDS, pH_{RT} 8.2) wurden die Proteine aus dem Gel im Semi-Dry-Verfahren (0.8 A/cm²/h) auf die zuvor mit Methanol aktivierte und ebenso in Blotting-Puffer äquilibrierte PVDF-Membran („Immobilon“, Millipore) transferiert. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für 30 min in entfetteter Milch 5% (w/v) in TBS-Tween (10 mM Tris/HCl pH_{RT} 7.2, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 1 h bei 37°C mit dem Primärantikörper (K9JA-AK: 1:5 000 in 1 x TBS-Tween, Tau-spezifisch) inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBS-Tween wurde die Membran für 45 min bei 37°C mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-AK: 1:2 000 in 1 x TBS-Tween) behandelt. Der Sekundärantikörper (Sigma, Deutschland) ist mit Rettich-Peroxidase gekoppelt. Nach 3 x 5 min Waschen der Membran mit TBS-Tween wurden die Proteine mit dem „Super-SignalTM-Kit“ (Pierce, Großbritannien) nach Vorschrift des Herstellers auf ECL-Filmen („Hyperfilm“, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) detektiert.

2.3 Spezielle Methoden zur Analyse der Aggregation von Tau-Protein zu PHFs

2.3.1 *In vitro* PHF-Bildung

Um die Kinetik der PHF-Bildung zu untersuchen, wurden ausschließlich Tau-Proteine und -Konstrukte verwendet, die durch zwei Reinigungsschritte von Tau-Multimeren bzw. -Abbauprodukten und anderen Proteinen gereinigt worden waren.

Die Polymerisationsansätze wurden in Volumina von 20 - 200 µl durchgeführt. Diese enthielten Tau-Konstrukte im Konzentrationsbereich von 5 - 50 µM. Die Polymerisation wurde durch das Polyanion Heparin (MW ~ 6 000 Da, Sigma) induziert, welches im molaren Verhältnis von 4:1 (Protein:Heparin) eingesetzt wurde. Die Ansätze wurden bis zu 21 Tage bei 37°C in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 inkubiert. Um den proteolytischen Abbau zu verhindern, wurden Protease-Inhibitoren (Endkonzentration: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 µg/mL Pepstatin A, 1 µg/mL Leupeptin, 1 µg/mL Aprotinin) zugesetzt.

Vor der Inkubation und Zugabe des Heparins wurden die Ansätze mit 2 mM DTT für 5 min bei 50°C erhitzt. Diese Vorbehandlung sollte eine völlige Reduktion von multimeren Tau-Proteinen zu Monomeren bewirken und einen gemeinsamen Startpunkt für alle Ansätze gewährleisten.

Die Induktion der PHF-Bildung mit Arachidonsäure (Sigma, Deutschland) erfolgte mit einer 100 mg/mL in 100% Ethanol gelösten Stammlösung, welche bei -80°C gelagert wurde. Vor dem direkten Gebrauch wurde auf Eis eine 10 mM Arbeitslösung hergestellt (3.05 µL 100 mg/mL Arachidonsäure und 96.05 µL 100% Ethanol), die im Verhältnis 1:18.75 (Arachidonsäure:Tau) eingesetzt wurde. Dieses Verhältnis entspricht dem in der Literatur (King *et al.*, 2000) angegebenen. Als Negativkontrolle wurde parallel immer ein Ansatz ohne Protein mitgeführt. Somit konnte gezeigt werden, dass Arachidonsäure keinen Einfluß auf die gemessene ThS-Fluoreszenz hatte.

Zu den gewählten Zeitpunkten wurden aus den Ansätzen Aliquots entnommen und gebildete PHFs mit dem ThS-Assay (Friedhoff *et al.*, 1998a) quantifiziert. Aus denselben Reaktionsansätzen wurden am Endpunkt der Kinetik Proben entnommen, um die PHF-Bildung elektronenmikroskopisch zu überprüfen.

2.3.2 Fluoreszenzmessungen von *in vitro* PHFs

Die Quantifizierung der *in vitro* erzeugten PHFs erfolgte mit der Thioflavin S-Methode (Friedhoff *et al.*, 1998a). Die Fluoreszenz der Interaktion von PHFs mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin S (Sigma, Deutschland) wurde mit dem Fluoroskan Ascent Spektrofluorometer (Labsystems, Deutschland) mit einem Excitationsfilter bei 440 nm und einem Emissionsfilter bei 510 nm gemessen. Die Integrationszeit betrug 60 Millisekunden. Die Messungen erfolgten in schwarzen 384 Loch Mikrotiterplatten (Cliniplate 384, Labsystems, Deutschland), worin die Proben vor der Messung bei 420 Upm für 5 sec (geräteinterne Einstellung) gemischt wurden. Die Messung erfolgte im Auflichtmodus bei Raumtemperatur. Die Proben wurden in 100 mM Tris/HCl pH 6.8 mit 25 μ M ThS für 30 min (im 60 sec Takt/jede Minute) gemessen. Die vor Zugabe der Probe gemessene Hintergrund-Fluoreszenz wurde vom Endpunkt der Messung abgezogen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Sigma Plot. Die Kurven wurden sigmoidal mit drei Parametern gefittet.

2.3.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur Bestätigung der gebildeten PHFs und zur Überprüfung der Morphologie der PHFs wurden diese mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) untersucht. Als Probenträger wurden Kupfernetze (600 *mesh*) verwendet, die mit einem Kohlefilm belegt worden waren. Der Kohlefilm wurde zunächst auf eine frisch gespaltene Glimmerschicht in einem Hochvakuum-Pumpenstand (BAE 080T, Balzer) bei einem Druck von $2 - 4 \times 10^{-6}$ hPascal aufgedampft und anschließend auf die Kupfernetze übertragen.

Um die Adsorption der Proben zu erhöhen, wurden die Netze in einem Beglimmungsapparat (CTA 010, Balzer) im Vakuum zweimal für 30 sec bei einem Stromfluss von 30 – 45 mA beglimmt. Das beglimmte Netz wurde mit der Seite des Kohlefilms auf 10 μ L der Proben gelegt, die zuvor mit H₂O auf eine Proteinkonzentration von 0.1 - 0.5 mg/mL eingestellt worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 45 sec wurde die Flüssigkeit mit Hilfe eines Filterpapiers

abgezogen und das Netz zweimal für 10 sec mit je 15 μL H_2O auf die gleiche Weise gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation des Netzes für 45 sec mit 20 μL einer 2% igen Uranylacetat-Lösung (w/v) (pH 4.5). Alle Lösungen wurden direkt vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0.2 μm).

Die Bildung der PHFs und deren Erscheinungsbild wurde standardmäßig mit einer Wolframelektrode bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV und einer Vergrößerung von 45 000 mit einem TEM CM12 (Philips) überprüft. Zur Dokumentation der PHFs wurde Kodak electron image film SO-163 Estar thick base 8.3 x 10.2 cm als Negativmaterial verwendet. Anschließend wurden davon Positiv-Abzüge hergestellt.

2.4 Spektroskopische Methoden

2.4.1 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur von Proteinen lässt sich mit Hilfe von Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) untersuchen. Die Absorption der Amid-I-Bande beruht im Messbereich ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) zu circa 80% auf der Streckschwingung der Carbonylgruppe der Peptidbindung. Abhängig von der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe variieren Frequenz und Intensität dieser Schwingung. In den verschiedenen Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt und β -Schleifen sind die Wasserstoffbrücken unterschiedlich ausgebildet (zur Übersicht siehe Susi und Byler, 1986; Byler und Susi, 1986). Die Messung wird in D_2O durchgeführt, da H_2O im selben spektralen Bereich absorbiert wie die Amid-I-Bande.

Zur Messung löslicher Tau-Monomere wurden diese in 80% Aceton über Nacht bei -20°C gefällt und anschließend für 10 min bei 16 000 x g (4°C) pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 90% Ethanol in H_2O wurden die Pellets im Vakuum getrocknet und in D_2O (Sigma) aufgenommen.

Die Spektren wurden mit einem Spektrometer vom Typ Jasco FT-IR410 Instruments (Jasco, Deutschland) aufgenommen. Um atmosphärischen Wasserdampf aus der Probenkammer zu entfernen, wurde diese intensiv mit Stickstoff gespült. Im Messbereich ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) wurde mit einer spektralen Auflösung von 1 cm^{-1} gemessen. Für jedes Spektrum wurden 128 Einzelspektren gemittelt. Die Probe wurde zur Messung zwischen zwei CaF_2 -Fenster pipettiert, die durch einen Abstandshalter von $25 \mu\text{m}$ Dicke getrennt waren.

Bevor die Proben-Spektren aufgenommen wurden, wurde das Hintergrundspektrum des Geräts und der verwendeten D_2O -Charge aufgenommen. Sowohl von den Proben-Spektren als auch von dem D_2O -Spektrum wurde jeweils der Wasserdampf-Hintergrund abgezogen. Zum besseren Vergleich der Spektren wurden sie in Bezug auf ihr Maximum normalisiert.

2.4.2 Circular dichroismus

Die Circular-Dichroismus-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung der Konformation von Proteinen in Lösung (Greenfield und Fasman, 1969). Dabei wird der Unterschied der Absorption von links- und rechtsgedrehtem circular polarisiertem Licht im Bereich von $180 - 260 \text{ nm}$ durch die chiralen Zentren in der Polypeptidkette ausgenutzt. Damit lassen sich die Unterschiede in der Sekundärstruktur von Proteinen sichtbar machen. Im Vergleich mit den Spektren für reine α -Helix, β -Faltblatt und *random coil*-Strukturen kann auf die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins geschlossen werden.

Alle Messungen wurden in einem Jasco J-70 CD-Dichrograph (Jasco, Japan) in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0.05 cm durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Einzelspektren aufgenommen, summiert und auf ihre Proteinkonzentration normalisiert.

2.5 Spezielle Methoden zur Untersuchung der Bindung von Tau-Protein an Mikrotubuli

2.5.1 Messung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Die Bindung von Tau an Mikrotubuli stabilisiert diese und führt zu einer Reduktion der Zerfallsrate (Drewes et al., 1997; Drewes et al., 1998). Die Bildung der Mikrotubuli wurde mittels Lichtstreuung analysiert. Diesen Experimenten liegt der Faraday-Tyndall-Effekt zugrunde, welcher besagt, dass das einfallende Licht durch die Teilchen einer kolloiden Lösung gestreut wird. Hierdurch kommt es zu einer Abnahme der Lichtintensität, die ein indirektes Maß für die Bildung von Polymeren wie z. B. Mikrotubuli darstellt (Gaskin *et al.*, 1974; Berne, 1974). Die Streuung bei 350 nm verhält sich proportional zur Mikrotubulimasse, welche das Produkt aus Mikrotubuli-Konzentration und Länge der Mikrotubuli darstellt.

Durch Messung der Lichtstreuung bei 350 nm wurde die Bindungsfähigkeit von verschiedenen Tau-Proteinen an Mikrotubuli untersucht. Dafür wurde Tau in einer Endkonzentration von 5 μM mit 30 μM Tubulin (unterhalb der kritischen Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in Anwesenheit von 1 mM GTP auf Eis in Polymerisationspuffer (100 mM Na-PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT) in einem Endvolumen von 40 μL gemischt. Als letzte Komponente wurde Tau hinzugefügt. Nach schnellem Mischen wurde der Reaktionsansatz in eine auf 37°C vorgewärmte transparente Greiner 384 Loch-Platte (Lichtweg 4 mm) pipettiert und so die Reaktion durch den raschen Temperatursprung (innerhalb von 3 sec) von 4°C auf 37°C gestartet.

Der Aufbau von Mikrotubuli aus Tubulin wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min in einem Spektrophotometer Modell Safire (Tecan, Crailsheim, Deutschland) verfolgt.

III Ergebnisse

3.1 Allgemein

Das Protein Tau gliedert sich in zwei Domänen. Die N-terminal gelegene Projektions-Domäne und die C-terminale Assemblierungs-Domäne (Abb. 1). Die Projektions-Domäne dient als Abstandshalter zwischen den Mikrotubuli und ragt ins Zytoplasma. Die Assemblierungs-Domäne besteht aus den *Repeats*, die sich durch unvollständige Sequenzwiederholungen aus 31 – 32 Aminosäuren zusammensetzen. Diese Domäne bindet an die Mikrotubuli. Die Regulation der Tau-Mikrotubuli-Interaktion wird durch Phosphorylierung reguliert (Abb. 4). Die Phosphorylierungsstellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Einerseits gibt es Phosphorylierungsstellen, die innerhalb der *Repeats* liegen (KXGS-Motive) und Tau von den Mikrotubuli ablösen. Andere Phosphorylierungsstellen befinden sich in den flankierenden Bereichen der *Repeats* (SP/TP-Motive), die ebenso einen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Bindung haben (Abb. 4).

3.2 Klonierung der E-Mutanten

Die Umwandlung der SP/TP-Phosphorylierungsstellen und der KXGS-Motive in EP/EP- und KXGE-Mutanten erfolgte durch gezielte Mutageneseschritte (siehe Tabelle 6). Es wird immer wieder diskutiert, dass die Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der *Repeats* das Protein Tau in die Aggregation treiben. Die Phosphorylierungen an den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* lösen das Protein Tau von den Mikrotubuli ab. Dadurch wird die Dynamik der Mikrotubuli gewährleistet. Um den Einfluss der Phosphorylierung an einzelnen Stellen und in Kombinationen untersuchen zu können, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (2.1.5 Mutagenese der Tau-Konstrukte) Punktmutationen in das Tau-Gen eingeführt (Expressions-Vektor pNG2, Biernat *et al.*, 1992).

Der Expression-Vektor pNG2 ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Konstrukte K18_4RE und K19_3RE wurden durch Amplifizierung der entsprechenden Isoform-DNA mit Hilfe von *Primern* hergestellt, die sowohl die *Bam* HI- bzw. die

Nde I-Schnittstelle als auch das jeweilige Start- bzw. Stopcodon enthielten. Die Vektor-DNA wurde mit denselben Restriktionsendonukleasen verdaut, und nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel reisoliert (siehe 2.1.8 Elution aus Agarosegelen). Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Quick-T4-DNA-Ligase (siehe 2.1.9 Ligation von DNA). Die Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese erfolgte für alle E-Mutanten und Konstrukte durch Sequenzierung nach Sanger *et al.*, 1977 (2.1.12 Sequenzierung von DNA).

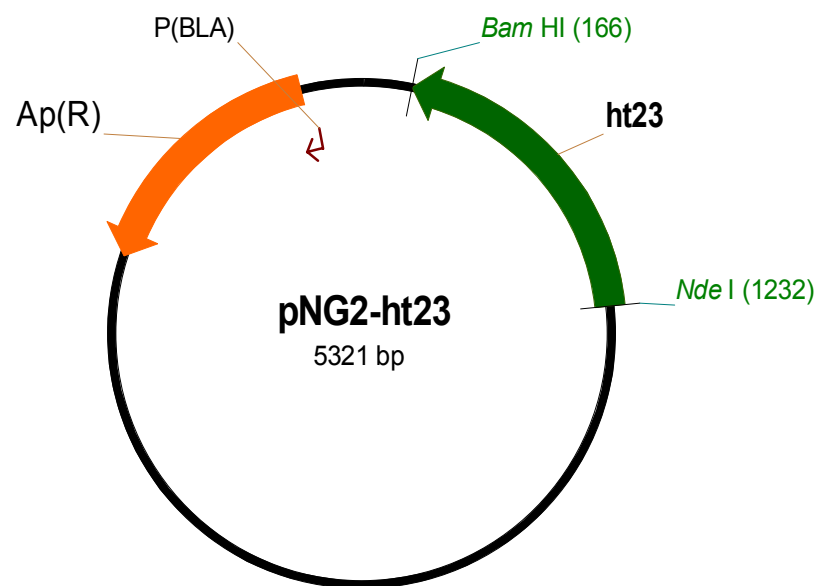


Abbildung 5: Darstellung des pNG2-Tau-Vektors. Der grüne Blockpfeil stellt das ht23-Gen dar. Durch Schneiden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI und *Nde* I wurden compatible Schnittstellen hergestellt. Dadurch konnten die Fragmente des Vektors und des Tau-Insert miteinander ligiert werden.

Tabelle 6: Klonierung der E-Mutanten und modifizierte Aminosäuren

E-Mutanten	veränderte Aminosäure	Klonierung
ht23_T231E	T231E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_S235E	S235E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_T231E_S235E	T231E, S235E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_S396E	S396E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_S404E	S404E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_S422E	S422E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_S396E_S404E	S396E, S404E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_3RE	S262E, S324E, S356E	ortsgerichtete Mutagenese
ht23_3RE_S396E_S404E	S262E, S324E, S356E, S396E, S404E	Ligation nach Restriktion
ht23_T231E_S235E_S396E_S404E	T231E, S235E, S396E, S404E	Ligation nach Restriktion
ht23_T231E_3RE	T231E, S262E, S324E, S356E	Ligation nach Restriktion
ht23_3RE_S396E	S262E, S324E, S356E, S396E	Ligation nach Restriktion
ht23_T231E_S235E_3RE_S396E_S404E	T231E, S235E, S262E, S324E, S356E, S396E, S404E	Ligation nach Restriktion
ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E	T231E, S235E, S262A, S324A, S356A, S396E, S404E	Ligation nach Restriktion
Ht40_4RE	S262E, S293E, S324E, S356E	ortsgerichtete Mutagenese
K18_4RE	S262E, S293E, S324E, S356E	Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte
K19_3RE	S262E, S324E, S356E	Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte

3.3 Expression und Proteinreinigung der E-Mutanten

Die Expression und Reinigung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.2.5 – 2.2.8 beschrieben nach dem modifizierten Protokoll nach Gustke *et al.*, 1994. Die Plasmid-DNA wurde in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Mehrere Klone wurden im kleinen Maßstab auf ihre Expression nach Zugabe von IPTG kontrolliert. Die Herstellung der Proteine im präparativen Maßstab wurde in einem 10 L Fermenter durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press und anschließender Hitzebehandlung. Durch anschließende Zentrifugation

konnte ein Großteil, der durch die Hitzebehandlung denaturierten, zellulären *E. coli*-Proteine abgetrennt werden. Während die denaturierten Proteine pelletiert wurden, befand sich das hitzestabile Tau-Protein im Überstand. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Kationenaustauschchromatografie durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Analyse geeigneter Proteinfractionen wurden diese aufkonzentriert und für eine weitere Reinigung auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. So gereinigte Proteine wurden für die folgenden Experimente eingesetzt. Exemplarisch sind in Abbildung 6 wie oben beschrieben gereinigte E-Mutanten nach elektrophoretischer Auftrennung abgebildet, die zur Untersuchung der Mikrotubuli-Bindung und PHF-Aggregation verwendet wurden.

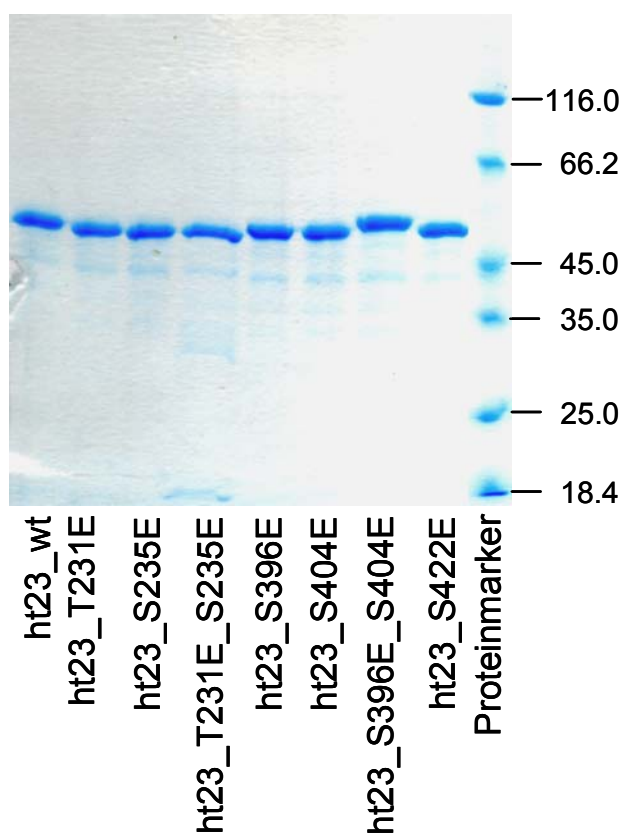


Abbildung 6: E-Mutanten nach Aufreinigung durch Gelpermeations-Chromatografie und elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE. Es wurde jeweils eine definierte Proteinmenge aufgetragen.

3. 4 Einfluss der E-Mutanten in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* des Proteins Tau

Die in dieser Arbeit verwendeten Isoformen und Konstrukte sowie deren KXGE-Mutanten sind in Abbildung 7 zusammengefasst. Um den Einfluss der E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* zu untersuchen, wurden Experimente sowohl mit der längsten und kürzesten Isoform (ht40 und ht23) als auch mit den Konstrukten der *Repeat*-Domäne K18 und K19 durchgeführt. Der Einfluss der Mutationen auf die Sekundärstruktur wurde mit Hilfe von Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) und Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) untersucht. Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion, das Polymerisationsverhalten in Anwesenheit von verschiedenen Induktoren und die Morphologie der Filamente wurde für alle in Abbildung 7 dargestellten Tau-Mutanten untersucht.

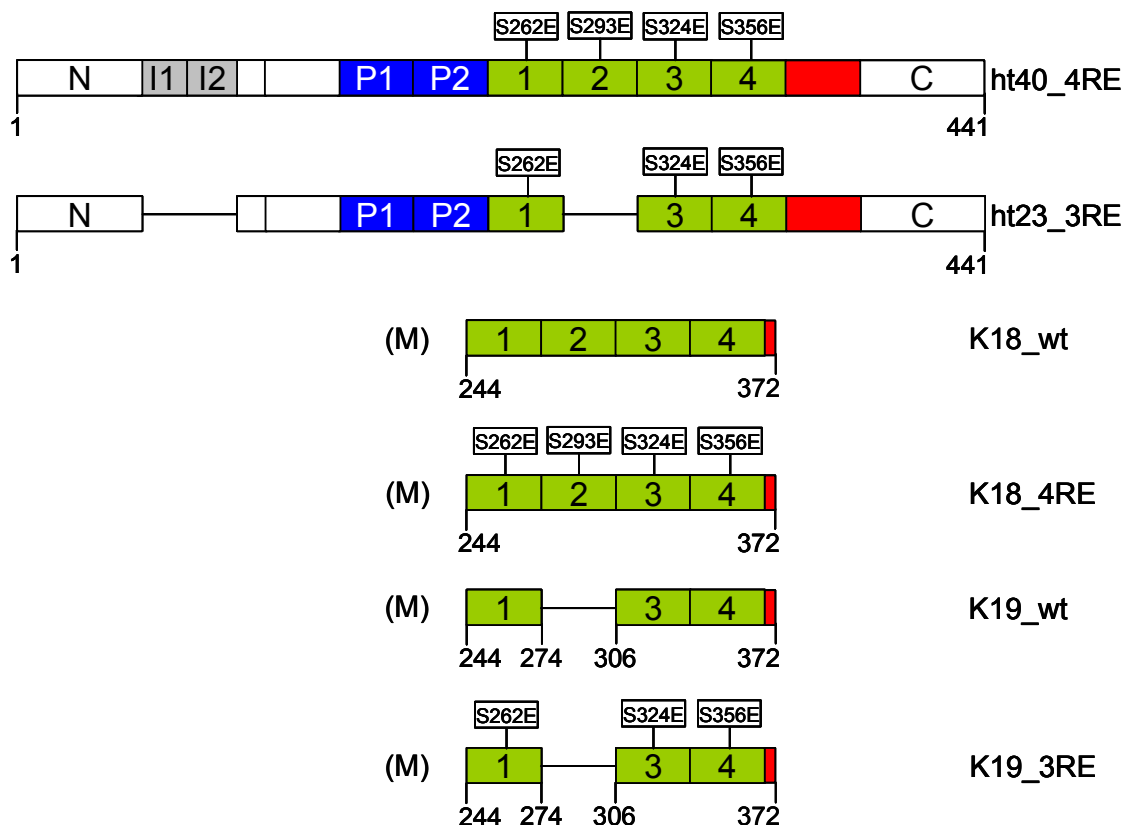


Abbildung 7: Für die Polymerisation zu PHFs verwendete Isoformen und Konstrukte von Tau. Die längste humane Isoform ht40 enthält zwei N-terminale Einschübe (I1 und I2 = grau) sowie vier *Repeats* (1, 2, 3 und 4 = grün). Die kürzeste humane Isoform ht23 enthält keine N-terminalen Einschübe. Weiterhin fehlt der 2. *Repeat*. Das 4-*Repeat*-Konstrukt besteht aus den vier *Repeats* der Mikrotubuli-Bindings-Domäne. Das Konstrukt K19 besteht aus drei *Repeats*, der 2. *Repeat* fehlt. Die Serinreste der KXGS-Motive innerhalb der *Repeats* sind als Kästen (weiß) dargestellt.

3.4.1 Einfluss der E-Mutation innerhalb des KXGS-Motivs auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Die Fähigkeit des Tau-Proteins, Mikrotubuli zu binden und damit die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli zu fördern, beruht auf der Proteinstruktur in den drei (ht23) bzw. vier (ht40) Mikrotubuli-Bindungsbereichen, die als *Repeats* bezeichnet werden. Die *Repeats* weisen je ein KXGS-Motiv auf. Durch die physiologische Phosphorylierung der Serinreste in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* durch die MARK, wird das Tau-Protein von den Mikrotubuli abgelöst und damit die Dynamik der Mikrotubuli gewährleistet (Yoshida und Ihara, 1993; Biernat *et al.*, 1999). Um den Einfluss der vollständigen Phosphorylierung zu imitieren und deren Wirkung auf die Mikrotubulus-Bindung und Polymerisation zu PHFs untersuchen zu können, wurden die Serine innerhalb dieser Motive durch punktuelle Mutagenese in Glutaminsäurereste umgewandelt. Die Simulation der Phosphorylierung durch Glutaminsäure ermöglicht die Analyse des Einflusses von einzelnen Phosphorylierungsstellen.

3.4.1.1 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats*

Der Einfluss der Phosphorylierung in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* wurde zunächst auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 untersucht (Abb. 7). Dabei wurde der Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in zwei natürlich vorkommenden Isoformen untersucht.

Der Wildtyp der längsten Isoform ht40 polymerisiert in einem sehr hohen Ausmaß (Abb. 8). Das erklärt sich dadurch, dass ht40_wt mit vier *Repeats* stark an Mikrotubuli binden kann, wogegen ht23_wt (kürzeste Isoform) nur drei *Repeats* besitzt, schwächer an Mikrotubuli bindet und eine geringere Stabilisierung der Mikrotubuli bewirkt (Gustke *et al.*, 1994; Ackmann *et al.*, 2000).

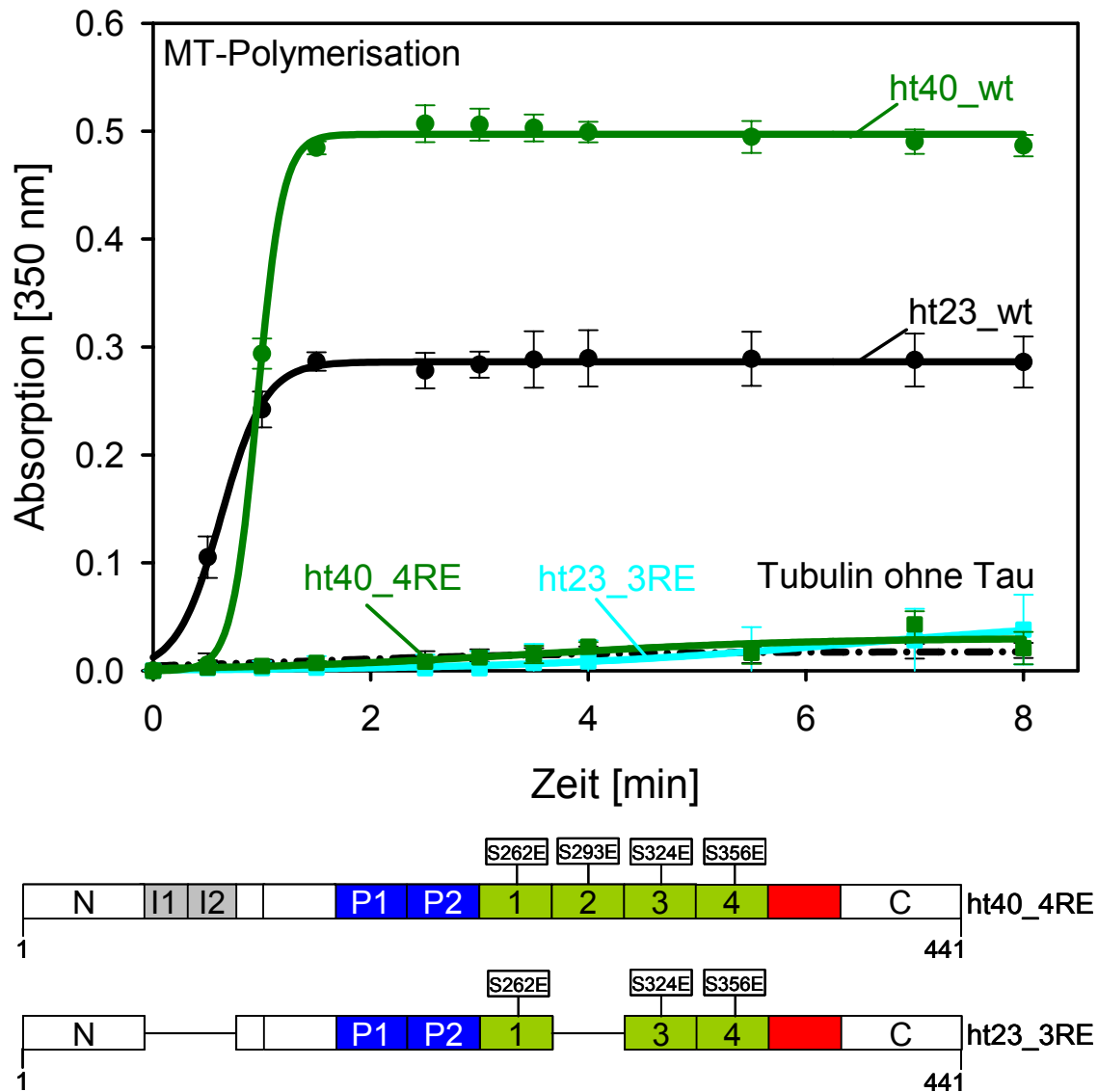


Abbildung 8: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von KXGE-Mutanten innerhalb der *Repeats* auf Basis der Isoformen ht23 und ht40. Die Polymerisationskurven für 30 μM Tubulin in Anwesenheit von 5 μM Tau in 100 mM Na-Pipes pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP wurden mit einem Photometer bei konstanter Wellenlänge (350 nm) über die Zeitdauer von 8 min aufgenommen. Die Reaktion wurde durch einen raschen Temperatursprung von 4°C auf 37°C gestartet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Tabelle 7: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation von KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40

Tau-Mutante	Ausmaß der MT-Polymerisation	$t_{1/2}$ [sec]	$t_{1/2}$ [x-fach]
Ht40_wt	100%	57	1.0
Ht40_4RE	4%	203	4.0
ht23_wt	100%	37	1.0
ht23_3RE	13%	337	10.0

Es zeigte sich, dass die KXGE-Mutanten sowohl auf der Basis der kürzesten Isoform (ht23) als auch auf der Basis der längsten Isoform (ht40) Mikrotubuli deutlich schlechter stabilisieren als die Wildtyp-Proteine (Tabelle 7). Die Umwandlung der KXGS-Motive in KXGE-Motive und die damit erreichte Imitation der vollständigen Phosphorylierung in den *Repeats* bewirkte eine nahezu vollständige Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation. In früheren Arbeiten wurden die Dissoziationskonstanten der Isoformen für die Bindung an Mikrotubuli auf 0.1 – 0.5 μM in Abhängigkeit der Isoform bestimmt. Es zeigte sich, dass die Bindungskapazität für 4-*Repeat*-Isoformen größer war, als die der 3-*Repeat*-Isoformen (Gustke *et al.*, 1994; Ackmann *et al.*, 2000).

3.4.2 Polymerisation von E-Mutanten im KXGS-Motiv zu PHFs

Die Bildung von PHFs aus monomerem Tau kann durch Polyanionen beschleunigt werden. Das können Polysaccharide wie Heparin (Goedert *et al.*, 1996), Peptide wie Polyglutamat (Friedhoff *et al.*, 1998), Nukleinsäuren wie RNA (Kampers *et al.*, 1996) oder auch Fettsäuren wie Arachidonsäure (Wilson *et al.*, 1997) sein. All diese Induktoren sind durch ihre negative Ladung gekennzeichnet. Sie alle beeinflussen die Aggregation von Tau in Abhängigkeit der Konzentration von Polyanion und Protein. Dabei spielt auch das Verhältnis Protein zu Polyanion eine entscheidende Rolle. Für Heparin erwies sich ein Verhältnis von Protein zu Heparin von 4:1 am effektivsten (Friedhoff *et al.*, 1998a).

Die Kinetik der PHF-Bildung wurde in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S (ThS) photometrisch untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz von Thioflavin S beruht auf der Interaktion des Farbstoffes an die gebildeten PHFs. Die Emission steigt proportional zum Ausmaß (Masse) der PHF-Aggregation (Friedhoff *et al.*, 1998a) und wird nach Anregung bei 440 nm bei einer Emission von 510 nm gemessen.

3.4.2.1 Kinetik der Aggregation von E-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 im KXGS-Motiv innerhalb der *Repeats* in Anwesenheit des Polyanions Heparin

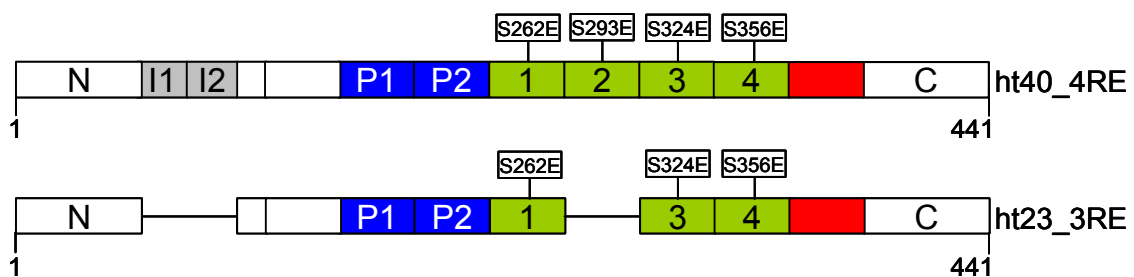
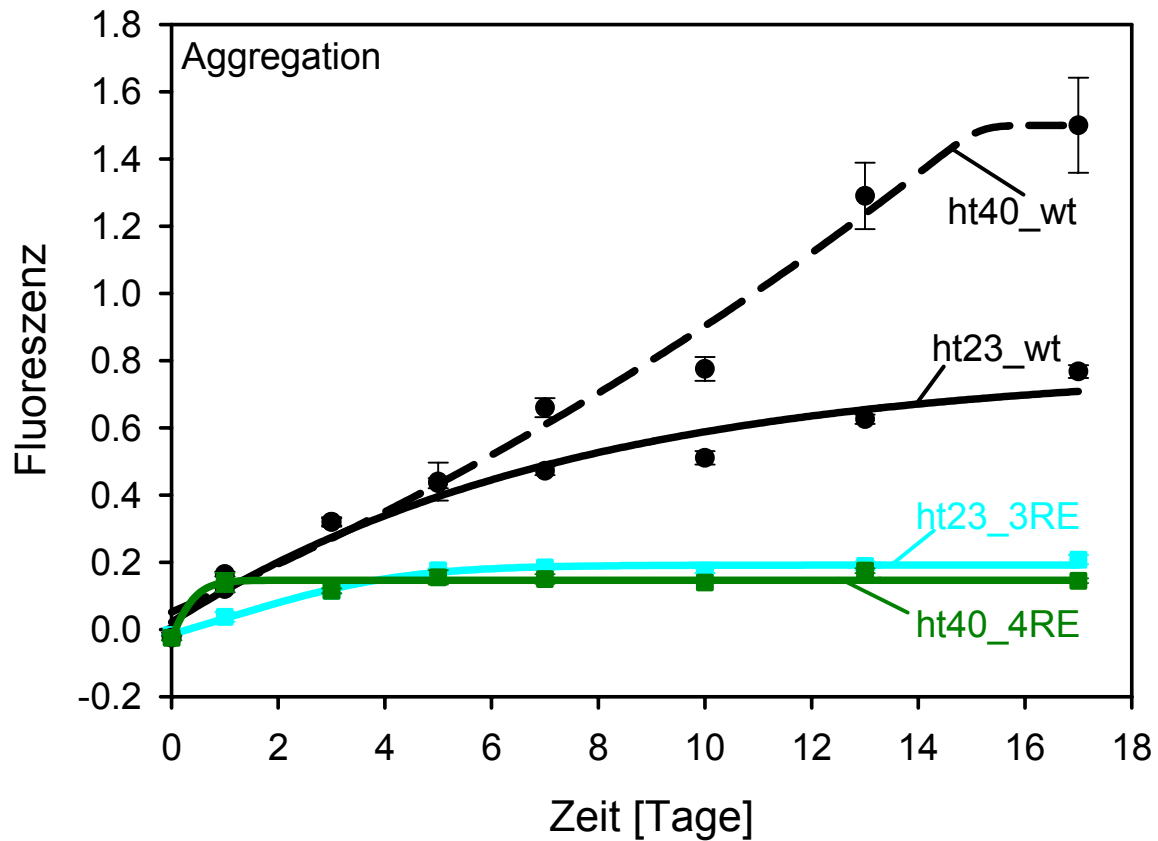


Abbildung 9: Aggregation der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der *Repeat*-Domäne auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μ M Protein und 12.5 μ M Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Der Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeat*-Domäne wurde auch in Hinblick auf Veränderungen im Aggregationsverhalten mit Hilfe des Thioflavin S-Assays (Friedhoff *et al.*, 1998a) untersucht. Die Aggregation wurde durch Zugabe von Heparin induziert. Dafür wurden die jeweiligen Proteine (50 μM) im Verhältnis 4:1 (Protein : Heparin) mit 12.5 μM Heparin gemischt und für eine Zeitdauer von 17 Tagen bei 37°C inkubiert.

Die Fluoreszenzwerte zeigen einen deutlich unterschiedlichen Verlauf für die KXGE-Mutanten und den jeweiligen Wildtyp. Beide KXGE-Mutanten (ht23_3RE und ht40_4RE) bilden zu einem geringen Ausmaß Aggregate. Die KXGE-Mutationen führen zu einer deutlichen Reduktion der Aggregation. Für ht23_3RE wurde eine Reduktion des Endsignals um 73% und für ht40_4RE eine Reduktion des Endsignals um 90% gemessen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Parameter der Aggregation von KXGE-Mutanten mit Heparin

Tau-Mutante	Ausmaß des ThS-Signals	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_3RE	27%	3	0.6
Ht40_wt	100%	8	1.0
Ht40_4RE	10%	0.3	0.1

3.4.2.2 Kinetik der Aggregation von E-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 im KXGS-Motiv innerhalb der *Repeats* in Anwesenheit der Fettsäure Arachidonsäure

Es wurde untersucht, ob andere Polyanionen wie Mizellen der Fettsäure Arachidonsäure den gleichen Einfluss auf die Aggregation der KXGE-Mutanten haben (King *et al.*, 2000; Barghorn und Mandelkow, 2002). Dafür wurden 4 μM Protein mit 75 μM Arachidonsäure für 3 Tage bei 37°C inkubiert und zu gewählten Zeitpunkten Aliquots für die Messung im ThS-Assay nach Friedhoff *et al.*, (1998a) entnommen.

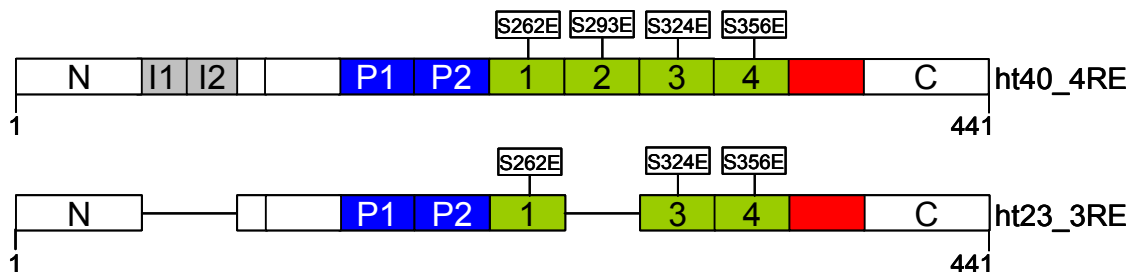
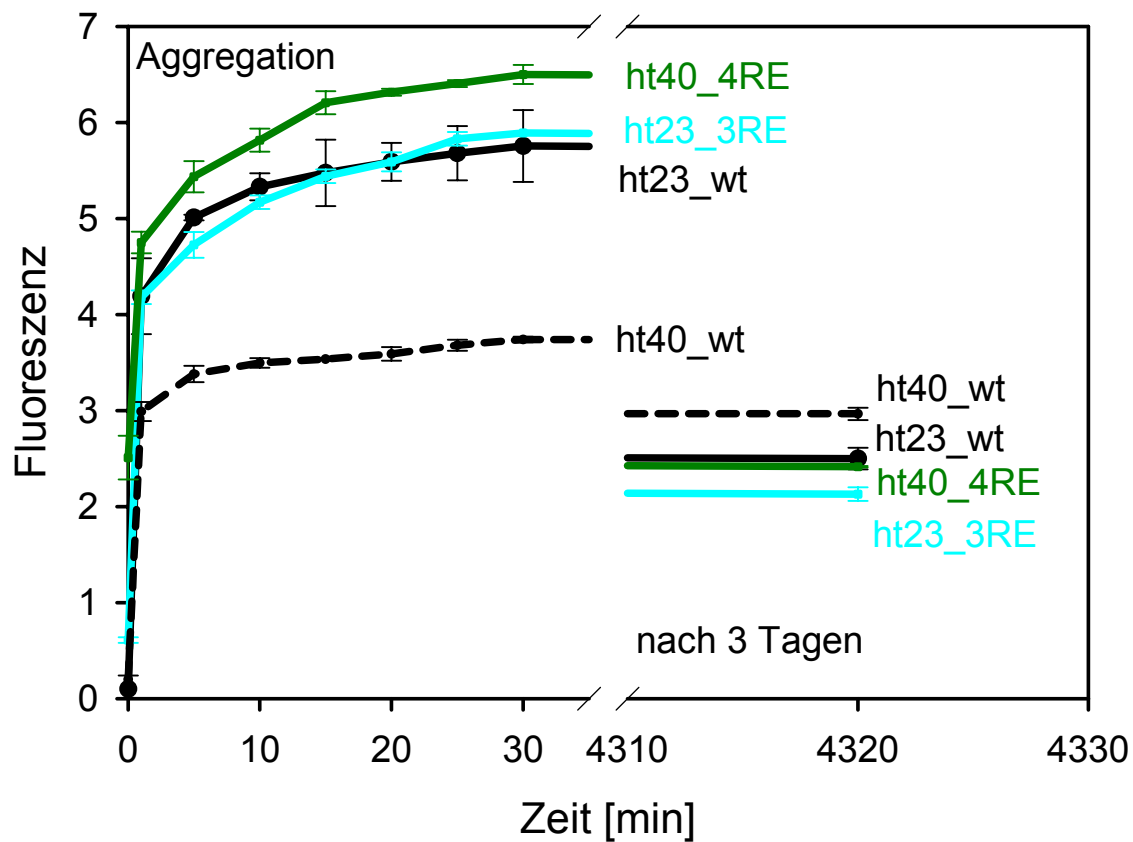


Abbildung 10: ThS-Signal der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der *Repeat*-Domäne auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 4 μ M Protein und 75 μ M Arachidonsäure eingesetzt. Die Aggregation wurde über eine Zeitdauer von 3 Tagen verfolgt. Diese Mutanten sind im EM als amorphe Aggregate sichtbar. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Für alle Proteine war das Ausmaß der maximalen Fluoreszenz in Gegenwart von Arachidonsäure als polymerisationsfördernder Substanz schon nach 30 min erreicht. Somit scheinen alle Proteine im Vergleich zum Ansatz mit Heparin (Abb. 9) mit Arachidonsäure eine beschleunigte Aggregation zu zeigen. Das Signal ist aber nicht auf die Bildung von PHFs zurückzuführen, sondern vermutlich auf eine

Wechselwirkung zwischen Tau und der Mizellen-Oberfläche im frühen Stadium (Barghorn und Mandelkow, 2002; Necula *et al.*, 2004). Nach 24 h sank das ThS-Signal wieder ab. Elektronenmikroskopisch konnten nach 24 h weder für den Wildtyp noch für die KXGE-Mutanten Filamente nachgewiesen werden. Erst nach 3 Tagen konnten die Wildtypen ht23_wt und ht40_wt als Filamente dargestellt werden (siehe Abb. 11). Dabei ist zu bemerken, dass für ht23_wt nur sehr wenige Filamente gefunden wurden. Das stimmt mit den Daten früherer Arbeiten überein (King *et al.*, 2000; Barghorn und Mandelkow, 2002). Aus den Ansätzen der KXGE-Mutanten konnten nur amorphe Aggregate dokumentiert werden (siehe Abb. 11).

3.4.3 Elektronenmikroskopie der Tau-Filamente von KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40

Den PHF-Ansätzen wurden jeweils am Endpunkt Aliquots entnommen und diese elektronenmikroskopisch untersucht, um die Morphologie der Filamente zu überprüfen. Für die PHF-Ansätze mit dem Polyanion Heparin konnten für beide KXGE-Mutanten nur amorphe Aggregate dokumentiert werden. Der Wildtyp ht23 zeigte die typische Morphologie der paarigen helikalen Filamente, wogegen ht40_wt neben paarigen helikalen Filamenten auch gerade Filamente (*straight filaments*) bildete (Abb. 11).

Auch die Ansätze der PHF-Bildung mit der polymerisationsfördernden Substanz Arachidonsäure wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Wildtyp-Proteine ht40_wt und ht23_wt zeigen ausschließlich gerade Filamente (*straight filaments*), die zu Verklumpungen neigen (Abb. 11). Keine der KXGE-Mutanten zeigte paarige helikale Strukturen. Wie schon mit Heparin als PHF-Induktor wurden hier nur amorphe Aggregate für beide KXGE-Mutanten gebildet (Abb. 11). Exemplarisch sind ht40_wt und ht40_4RE dargestellt.

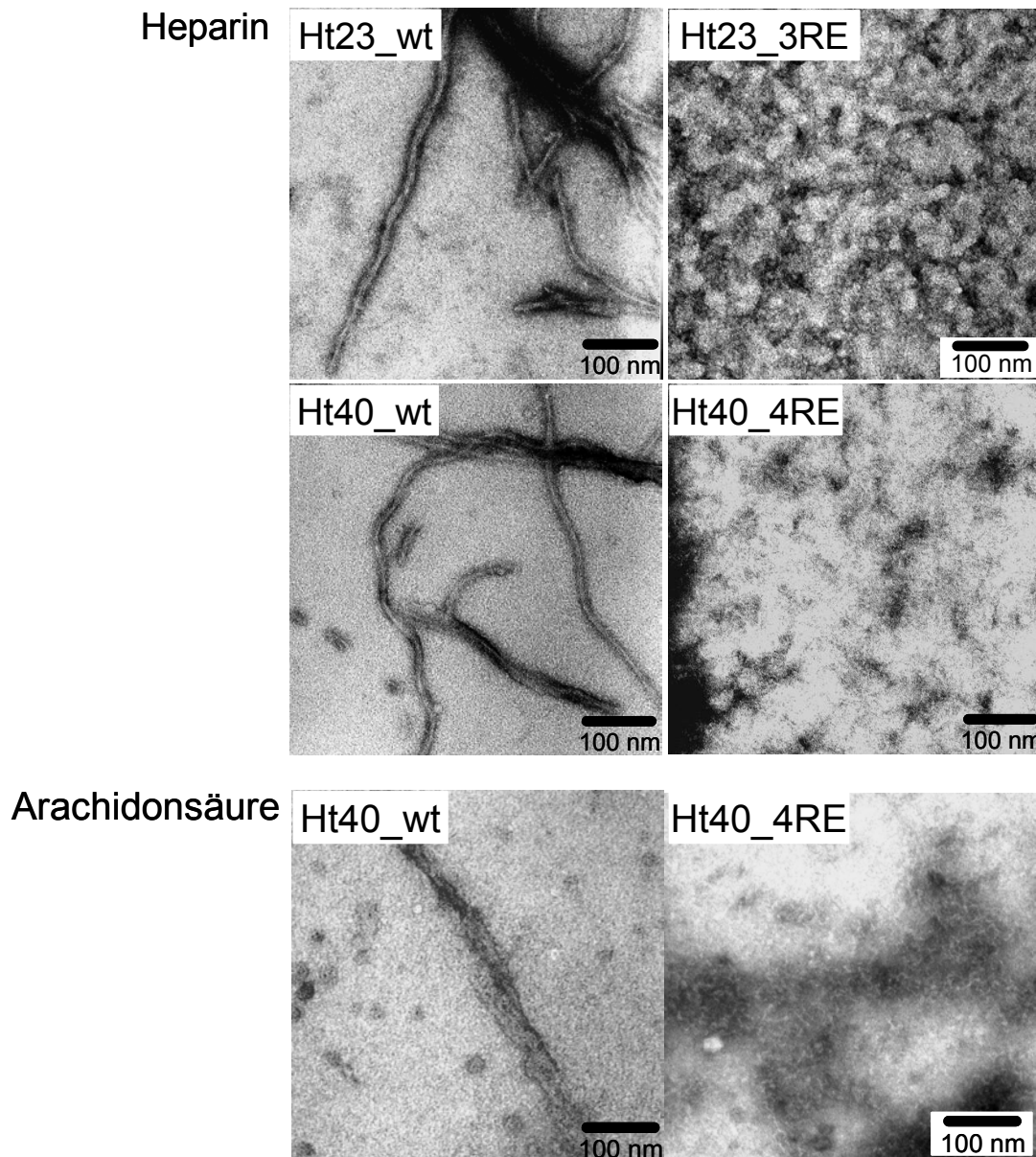


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt, ht23_3RE, ht40_wt und ht40_4RE in Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren. Der Balken entspricht 100 nm.

3.4.4 Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K18 und K19 in Gegenwart verschiedener Polyanionen

Die KXGE-Mutationen sind ausschließlich in der *Repeat*-Domäne lokalisiert. Um den Einfluss der KXGE-Mutanten zu untersuchen, wurde die PHF-Bildung der in Abbildung 12 dargestellten Konstrukte in Gegenwart von verschiedenen Aggregationsinduktoren untersucht.

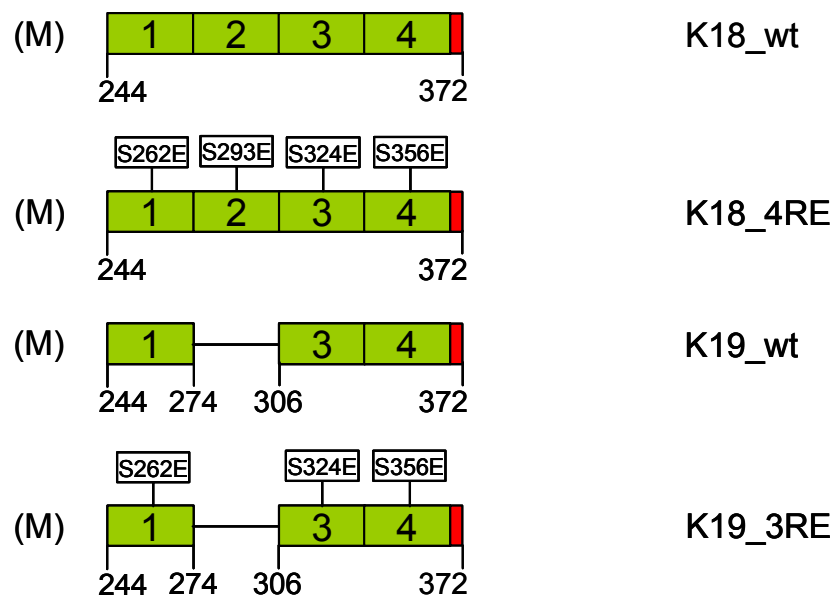


Abbildung 12: Darstellung der Tau-Konstrukte zur Untersuchung der PHF-Bildung in Gegenwart verschiedener Aggregationsinduktoren. Die Tau-Konstrukte bestehen aus den drei (K19) bzw. vier (K18) unvollständigen Sequenzwiederholungsabschnitten, die als *Repeats* bezeichnet werden und für die Mikrotubuli-Bindung bedeutsam sind. Jedes *Repeat* enthält ein KXGS-Motiv. Die Phosphorylierungsstellen in den KXGS-Motiven sind als Kästen (weiß) dargestellt.

3.4.5 Strukturuntersuchung der löslichen KXGE-Konstrukte

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass lösliches monomeres Tau-Protein als Zufallsknäuel (*random coil*) vorliegt (Cleveland *et al.*, 1977; Schweers *et al.*, 1994). Dafür wurden Techniken der Röntgen-Kleinwinkel-Streuung, CD-Spektroskopie und FTIR-Spektroskopie verwendet. Die löslichen Proteine der KXGE-Konstrukte wurden mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Ein Maximum bei 1645 cm^{-1} lässt auf eine ungeordnete Sekundärstruktur schließen (Surewicz *et al.*, 1993). Eine eindeutig Unterscheidung aufgrund von FTIR-Spektren ist auf Basis der Amid-I-Bande nur für

β -Faltblatt-Strukturen möglich. Die für β -Faltblatt-Strukturen typischen Charakteristika (Absorption bei $1615 - 1635 \text{ cm}^{-1}$) lassen sich von den Absorptionsmaxima anderer Sekundärstrukturelemente wie α -Helix und *random coil* ($1640 - 1660 \text{ cm}^{-1}$) unterscheiden (Surewicz *et al.*, 1993). Monomere Tau-Proteine sind durch ein Maximum bei 1645 cm^{-1} gekennzeichnet. Die Amid-I-Bande der beiden KXGE-Konstrukte (K18_4RE und K19_3RE) zeigt in beiden Fällen ein Maximum bei 1645 cm^{-1} .

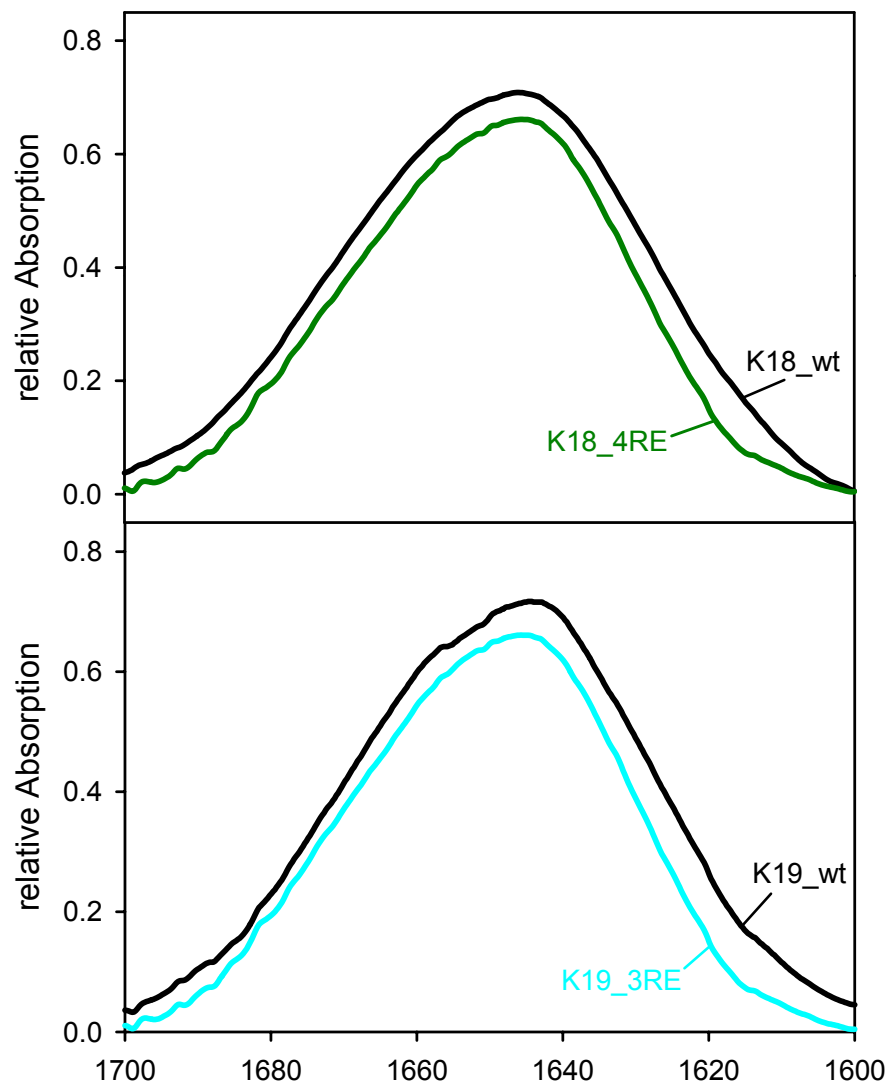


Abbildung 13: FTIR-Spektren der löslichen Proteine der KXGE-Konstrukte K18_4RE und K19_3RE. Für die Spektren wurde Aceton gefälltes Protein in D_2O resuspendiert. Sowohl die Wildtyp Proteine als auch die KXGE-Konstrukte weisen ein Absorptionsmaximum bei 1645 cm^{-1} , welches typisch für Zufallsknäuelstrukturen (*random coil*) ist.

3.4.6.1 Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K18 und K19 in Gegenwart von Heparin

Für die Untersuchung der Aggregation der KXGE-Mutanten auf Basis der Konstrukte K18 und K19 wurden jeweils 20 μM Protein mit 5 μM Heparin für 21 h bei 37°C inkubiert. Aus den Ansätzen wurden zu gewählten Zeitpunkten Aliquots entnommen und in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin S gemessen.

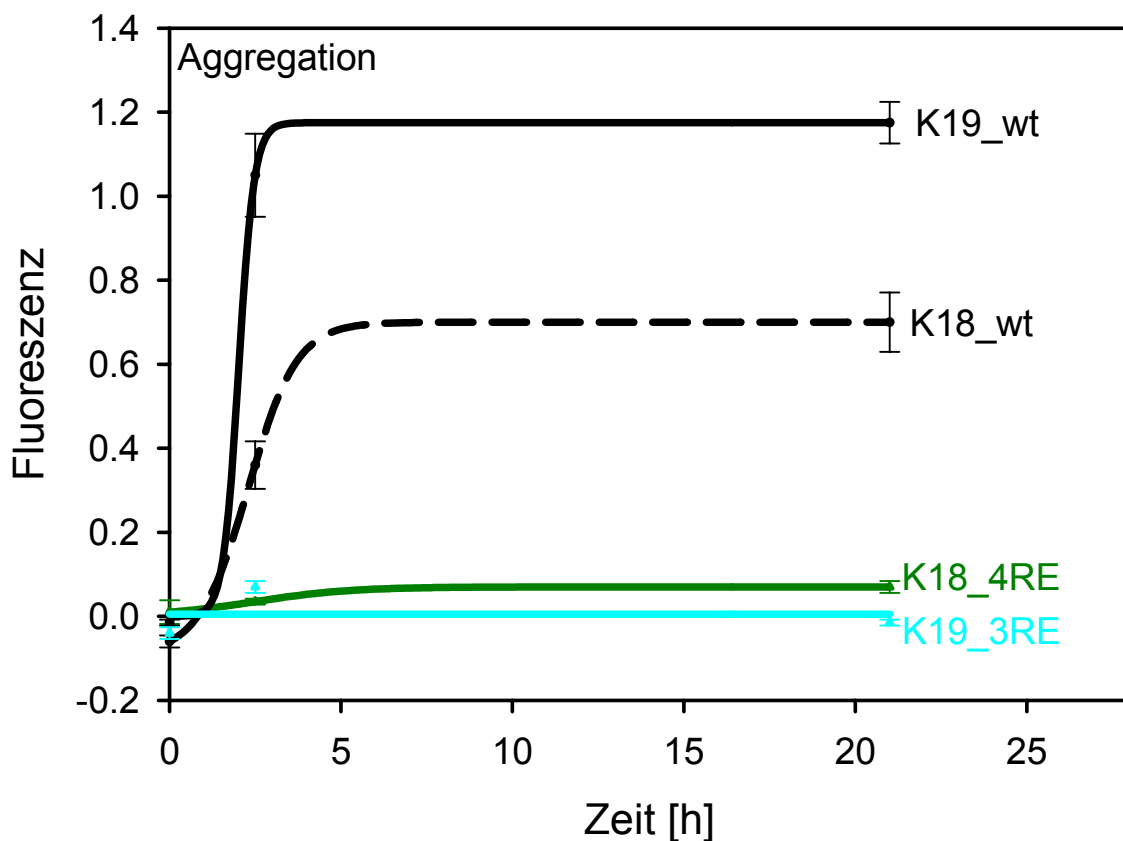


Abbildung 14: Aggregation der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der *Repeat*-Domäne auf Basis der Konstrukte K18 und K19 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 20 μM Protein und 5 μM Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

Für die E-Mutanten war über die gesamte Zeit nur eine sehr geringe Fluoreszenz messbar. Die Konstrukte K18_4RE und K19_3RE aggregieren im Vergleich zum Wildtyp-Protein nur zu einem geringen Ausmaß. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen (Abb. 9) in Bezug auf die Aggregation. Die elektronenmikroskopische Kontrolle bestätigte die gemessenen Fluoreszenzdaten. Die Wildtyp-Konstrukte K18_wt und K19_wt zeigen die typische Morphologie. Exemplarisch sind die paarigen helikalen Filamente von K19_wt dargestellt (Abb. 17). Für beide KXGE-Konstrukte (K18_4RE und K19_3RE) konnten nur amorphe Aggregate dokumentiert werden (Abb. 17). Dass K18_wt ein geringeres Ausmaß als K19_wt in der PHF-Bildung zeigt, ist damit zu begründen, dass die Experimente unter oxidierenden Bedingungen durchgeführt wurden. Es ist bekannt, dass *3-Repeat*-Isoformen und *3-Repeat*-Konstrukte unter oxidierenden Bedingungen schneller und zu einem größeren Ausmaß aggregieren (Barghorn und Mandelkow, 2002).

3.4.6.2 Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutanten von K18 und K19 in Gegenwart von Arachidonsäure

Die Untersuchung der KXGE-Mutanten in Gegenwart der polymerisationsfördernden Substanz Arachidonsäure wurde wie auch schon die Untersuchung der KXGE-Mutanten der Isoformen mit 4 μM Protein in Gegenwart von 75 μM Arachidonsäure in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 über eine Zeitdauer von 30 h bei 37°C verfolgt.

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Konstrukten (K18_wt und K19_wt) zeigen die KXGE-Konstrukte (K18_4RE und K19_3RE) nur eine geringe Fluoreszenz im ThS-Assay. Beide KXGE-Konstrukte (K18_4RE und K19_3RE) aggregieren nur zu einem sehr geringen Ausmaß, die K18_4RE-Mutante zeigt im Vergleich zu K19_3RE einen geringeren Effekt auf die Aggregation in Anwesenheit von Arachidonsäure. Die elektronenmikroskopische Kontrolle der Ansätze bestätigte die Fluoreszenz-Messdaten mit Arachidonsäure. Die KXGE-Konstrukte bildeten amorphe Aggregate (siehe Abb. 17).

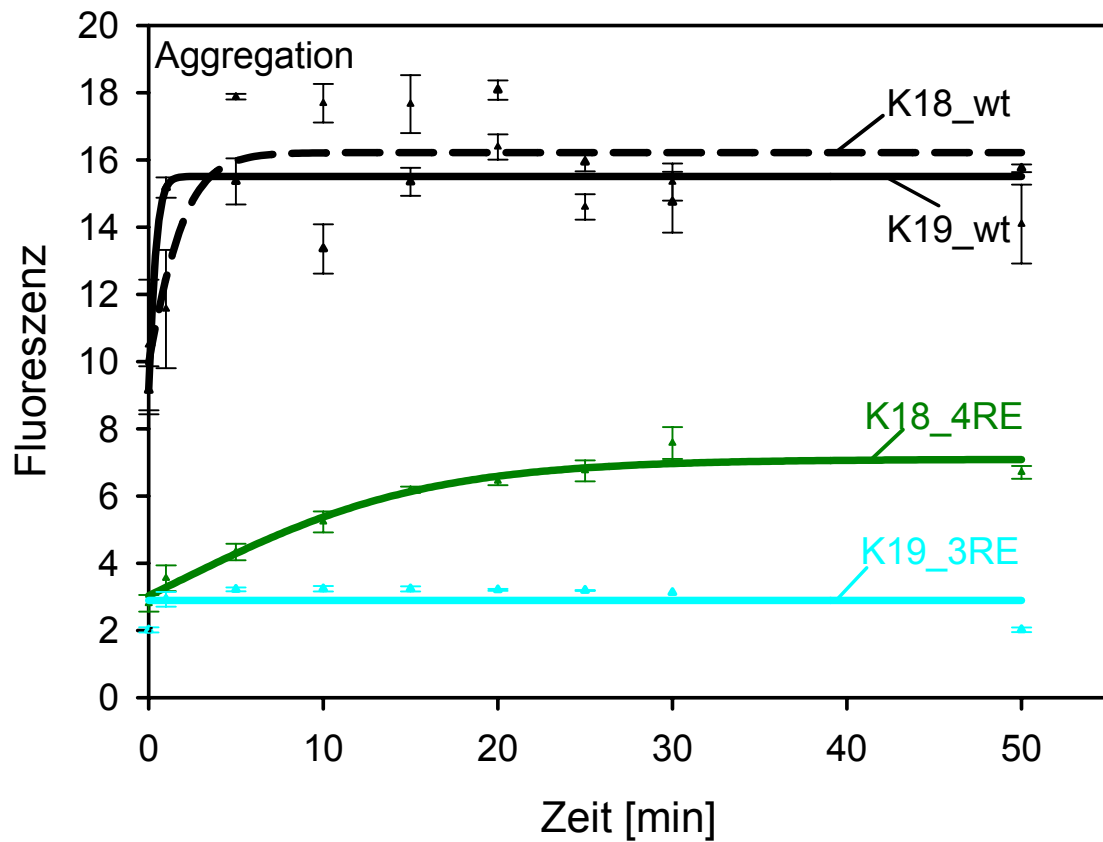


Abbildung 15: ThS-Signal der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der *Repeat*-Domäne auf Basis der Konstrukte K18 und K19 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 4 μ M Protein und 75 μ M Arachidonsäure eingesetzt. Die PHF-Bildung wurde über eine Zeitdauer von 30 h verfolgt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

Diese Daten stimmen mit den für die Isoform-KXGE-Mutanten ermittelten Messdaten überein. Nach 3 Tagen weisen auch die KXGE-Mutanten auf Basis der entsprechenden Isoform (ht23 und ht40) eine deutlich geringere Fluoreszenz auf und sind im Elektronenmikroskop als amorphe Aggregate anstelle von Filamenten abgebildet (Abb. 11).

3.4.6.3 Kinetik der Aggregation der KXGE-Mutante von K19 in Gegenwart von Poly-Glutamat

In früheren Arbeiten (Kampers *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass Poly-Glutamat als Aggregationsinduktor zur PHF-Bildung verwendet werden kann. Auf Basis des Konstruktes K19 sollte auch dieser Aggregationsinduktor auf seine Fähigkeit untersucht werden, die Aggregation zu induzieren. In Vorversuchen wurde das optimale Verhältnis Protein:Poly-Glutamat (MW 13 600) ermittelt. Es erwies sich ein Verhältnis von 1:1 (Protein:Poly-Glutamat) als effektiv. Die Ansätze wurden für eine Zeitdauer von 17 Tagen bei 37°C in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 inkubiert. Aus den Ansätzen wurden zu gewählten Zeitpunkten Aliquots entnommen und in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin S gemessen.

Das Fluoreszenzsignal für die KXGE-Mutante K19_3RE ist sehr gering. Es zeigt sich, dass das KXGE-Konstrukt K19_3RE nur zu einem sehr geringen Ausmaß im Vergleich zu K19_wt amorph aggregiert. Diese Daten bestätigen die Messdaten, die mit anderen Polyanionen wie Heparin (3.4.6.1) bzw. mit Arachidonsäure (3.4.6.2) gemessen wurden.

In der elektronenmikroskopischen Kontrolle konnten keine Filamente für das Konstrukt K19_3RE gefunden werden (siehe Abb. 17). Die PHF-Bildung von KXGE-Mutanten konnte weder mit den Aggregationsinduktor Heparin noch mit Arachidonsäure oder durch Poly-Glutamat induziert werden.

Tabelle 9: Ausmaß der Aggregation der KXGE-Konstrukte in Anwesenheit verschiedener Induktoren

Protein	Heparin	Arachidonsäure		Poly-Glutamat
K18_wt	100%	PHF	100%	n. u.
K18_4RE	10%	amorphe Aggregate	47%	n. u.
K19_wt	100%	PHF	100%	100%
K19_3RE	0%	amorphe Aggregate	35%	3%

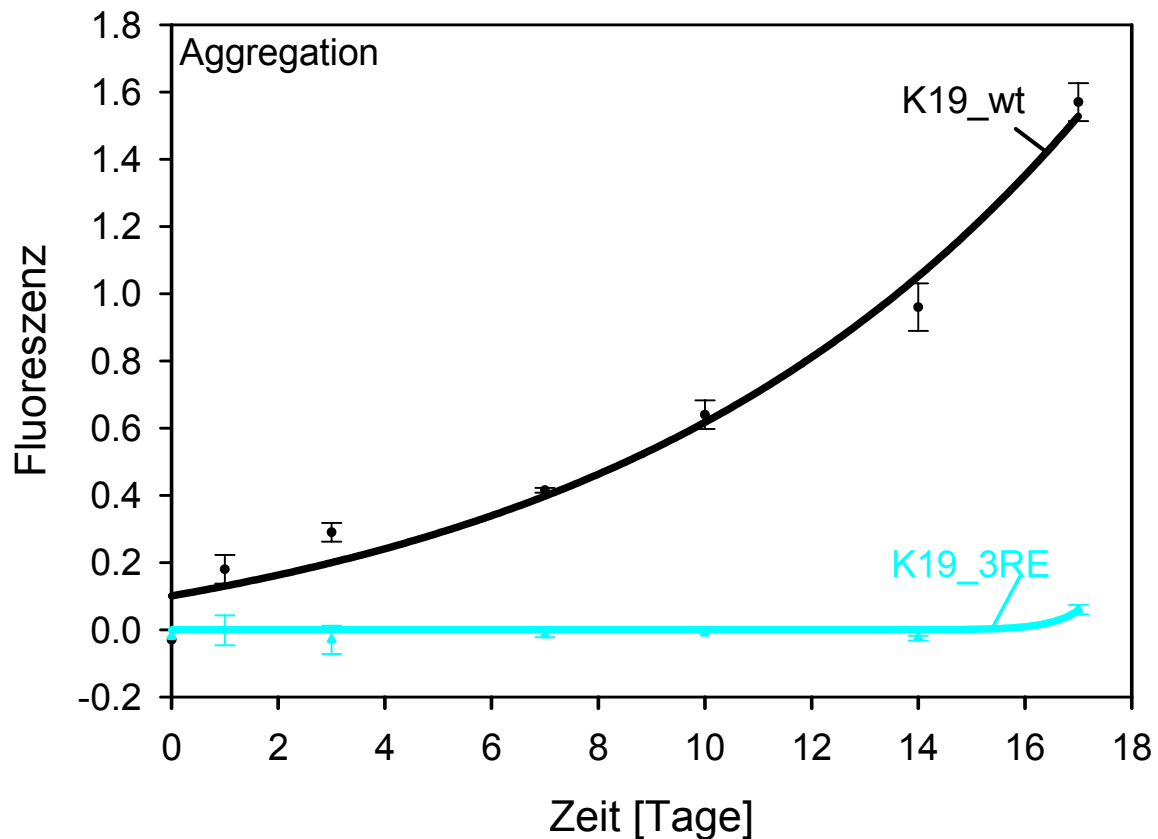


Abbildung 16: PHF-Bildung der E-Mutanten in den KXGS-Motiven in der *Repeat*-Domäne auf Basis des Konstruktes K19 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 30 μ M Protein und 30 μ M Poly-Glutamat eingesetzt. Die PHF-Bildung wurde über eine Zeitdauer von 17 Tagen gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

3.4.7 Elektronenmikroskopie der PHF-Bildung der KXGE-Mutanten mit verschiedenen Aggregationsinduktoren

Die Ansätze mit den verschiedenen Aggregationsinduktoren wurden elektronenmikroskopisch überprüft. Für die Aggregationsinduktoren Heparin, Arachidonsäure und Poly-Glutamat lassen sich für die KXGE-Konstrukte K18_4RE und K19-3RE nur amorphe Aggregate darstellen, die in Abbildung 17 dokumentiert sind. Die Wildtyp-Proteine aggregieren zu den typisch paarigen helikalen PHFs, mit einer Breite von 10 – 20 nm und einer axialen Periodizität von ca. 80 nm. Exemplarisch sind K19_wt und K19_3RE in Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren dargestellt.

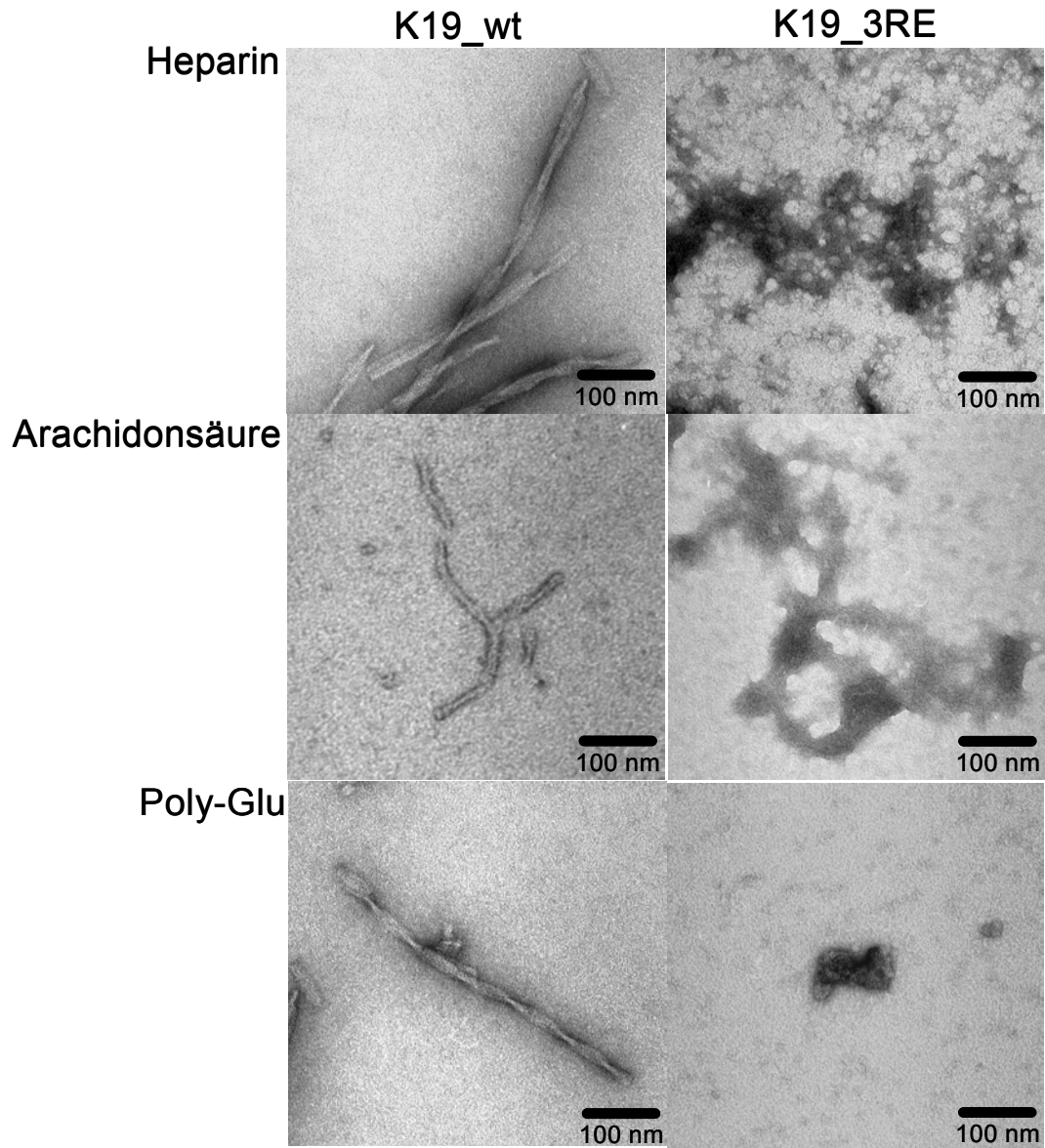


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von K19_wt und K19_3RE in Anwesenheit verschiedener Aggregationsinduktoren. Der Balken entspricht 100 nm.

3.4.8 Inhibition der PHF-Bildung von K19_wt durch Zugabe von K19_3RE

Aus den vorherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob K19_3RE die PHF-Bildung von K19_wt hemmen kann. Das Protein zu Heparin Verhältnis von 4:1 wurde konstant für alle Ansätze eingesetzt, weil es sich nach Vorversuchen als optimal erwies. Für die Ansätze wurden je 40 μM K19_wt Protein mit 10 μM Heparin und zusätzlich verschiedenen (4 μM , 40 μM , 100 μM) K19_3RE-Konzentrationen in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 gemischt und für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

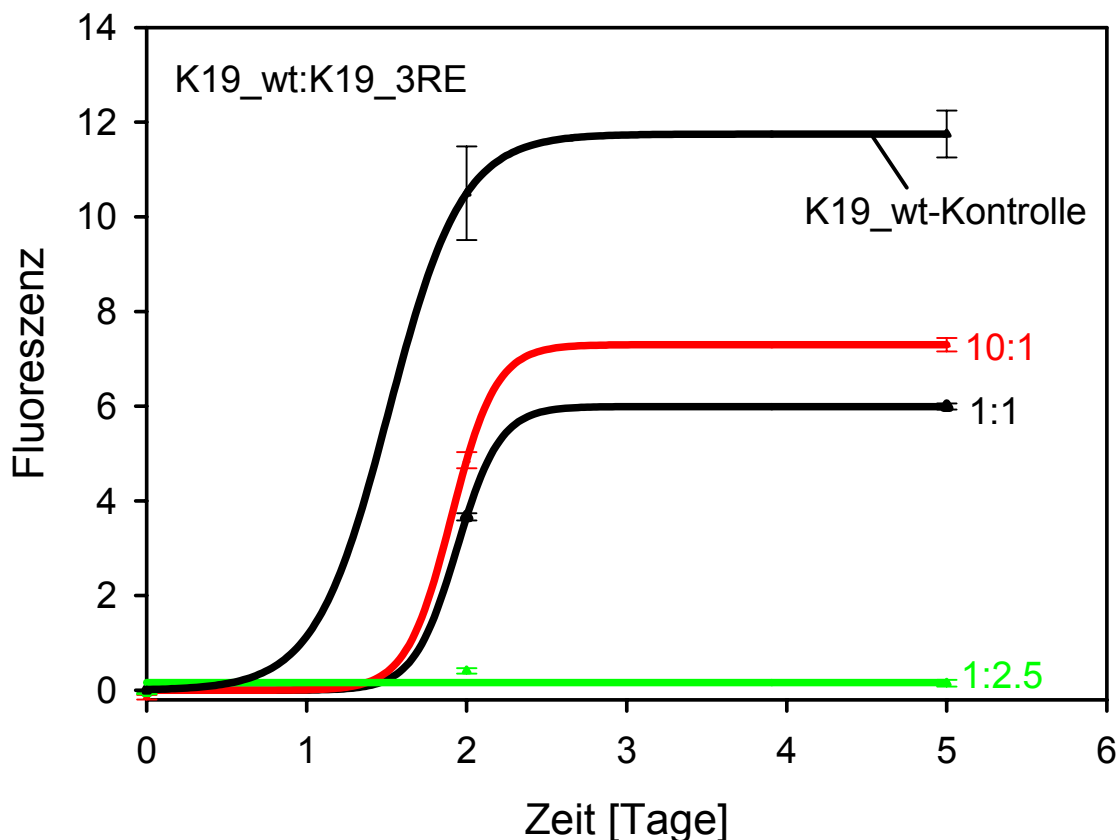


Abbildung 18: Hemmung der PHF-Bildung von K19_wt (40 μM) durch verschiedene Konzentrationen von K19_3RE (4 μM , 40 μM , 100 μM) bei konstanter Heparinkonzentration (10 μM). Die Ansätze wurden für 5 Tage in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

Es zeigt sich, dass schon die Zugabe von 4 μM K19_3RE (K19_wt:K19_3RE 10:1) (rote Kurve) das Ausmaß der PHF-Bildung von K19_wt um 40% reduziert. Werden beide Tau-Proteine in gleicher Konzentration eingesetzt (40 μM), ist das Ausmaß der Polymerisation ebenfalls geringer als ohne Zugabe von K19_3RE (schwarze Kurve).

Die PHF-Bildung wird durch die Zugabe von K19_3RE um ca. 50% reduziert. Am deutlichsten wird der Unterschied, wenn die Konzentration von K19_3RE (100 μM) höher als die Konzentration von K19_wt (40 μM) ist (grüne Kurve). Wenn K19_3RE im Überschuss zugesetzt wird, ist die PHF-Bildung zu nahezu 100% reduziert. In Tabelle 10 sind die Veränderungen auf das Ausmaß der PHF-Bildung von K19_wt in Abhängigkeit von der Konzentration von K19_3RE dargestellt.

Tabelle 10: Hemmung der PHF-Bildung von K19_wt durch K19_3RE

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	Verhältnis K19_wt:K19_3RE
K19_wt (40 μM)	100%	
K19_wt (40 μM)/ K19_3RE (4 μM)	62%	10:1
K19_wt (40 μM)/ K19_3RE (40 μM)	51%	1:1
K19_wt (40 μM)/ K19_3RE (100 μM)	1%	1:2.5

3.4.9 PHF-Bildung von K19_wt in Anwesenheit von K19_3RE bei variabler Heparinkonzentration

Aus den vorherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob die Bindung an Heparin durch die Einführung der E-Mutationen in den KXGS-Motiven beeinflusst wird. Das Verhältnis von K19_wt-Protein (40 μM) zu K19_3RE-Protein (100 μM) wurde konstant im Verhältnis 1:2.5 eingesetzt. Die Ansätze variierten in ihren Heparinkonzentrationen (10 μM , 22.5 μM und 35 μM) und wurden für 10 Tage bei 37 °C in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 inkubiert.

Mit 10 μM Heparin ist die PHF-Bildung sehr gering. Mit 22.5 μM steigt die PHF-Bildung an. Bei weiterer Erhöhung der Heparinkonzentration auf 35 μM ist eine weitere Zunahme des ThS-Signals zu verzeichnen (Abb. 19). Diese Ergebnisse und die Daten mit verschiedenen Konzentrationen an K19_3RE bei konstanter Heparinkonzentration (siehe 3.4.8) führen zu dem Schluss, dass durch die KXGE-Mutationen die Bildung von PHFs des Wildtyp-Konstruktes inhibiert wird (siehe Abb. 18). Die Daten, die durch Zugabe variabler Heparinkonzentrationen bei konstantem

Proteinverhältnis gemessen wurden, weisen darauf hin, dass die PHF-Bildung gehemmt wird und dass die E-Mutationen in den KXGS-Motiven keinen Einfluss auf die Bindung des Polyanions Heparin haben, da die PHF-Bildung des K19-Wildtyp-Proteins durch Erhöhung der Heparinkonzentration wieder zunimmt, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie K19_wt ohne Zugabe von K19_3RE. Die Hemmung der PHF-Bildung von K19_wt bei niedrigeren Konzentrationen an Heparin ist vermutlich damit zu erklären, dass durch K19_3RE das Polyanion Heparin gebunden wird, und damit nicht mehr als Induktor zur PHF-Bildung für K19_wt zur Verfügung steht.

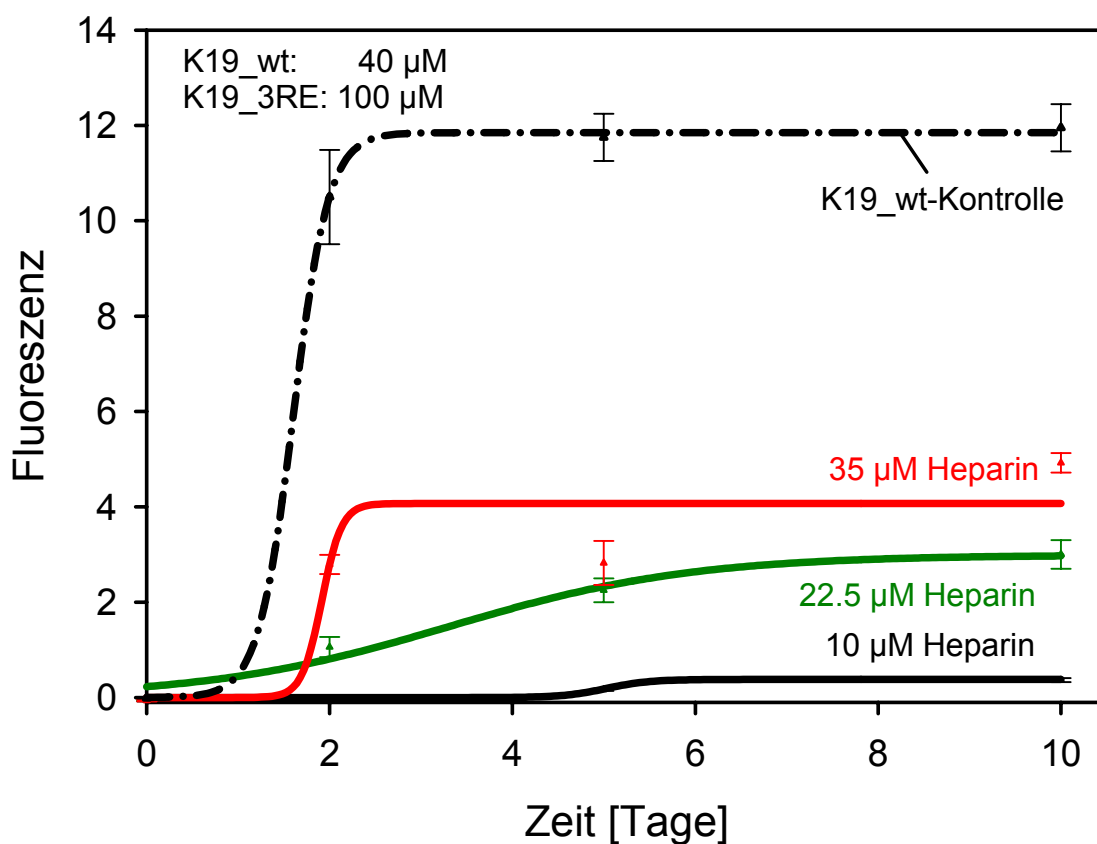


Abbildung 19: PHF-Bildung von K19_wt (40 µM) in Anwesenheit von K19_3RE (100 µM) bei verschiedenen Konzentrationen an Heparin (10 µM, 22.5 µM und 35 µM). Die Ansätze wurden für 10 Tage in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 6.8 bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

3.5 Einfluss von E-Mutanten des Tau-Proteins in den flankierenden Regionen der *Repeats*

Innerhalb des Tau-Proteins gibt es 30 verschiedene Stellen, die durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden können. Das Protein ist u. a. Substrat von Prolin-gerichteten Kinasen wie der MAPK, GSK3 β oder CDK5, welche zusätzliche Phosphorylierungen in der P2-Region und der C-terminal flankierenden Region der *Repeat*-Domäne verursachen (siehe Abb. 4). Um herauszufinden, welchen Einfluss diese Phosphorylierungsstellen auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion oder die Aggregation haben, wurden Pseudo-Phospho-Mutanten als Einzel-, Doppel- und Kombinationsmutanten der Phosphorylierungsstellen hergestellt, die durch die Alzheimer-typischen Antikörper erkannt werden.

In diesen Mutanten sind die jeweiligen Stellen zu 100% modifiziert, während sich durch Phosphorylierung von Tau mit Kinasen nur deutlich geringere Phosphorylierungsgrade (bis zu 40%) erreichen lassen.

3.5.1 Einfluss der Phosphorylierungsimitationen in der P2-Region

In Abbildung 20 sind die verwendeten E-Mutanten dargestellt. Für die Untersuchungen des Einflusses der E-Mutationen in den die *Repeats* flankierenden Bereichen wurden Experimente sowohl in Bezug auf den Einfluss der eingeführten Mutation auf die Sekundärstruktur (Circular-Dichroismus-Spektroskopie), die Fähigkeit Mikrotubuli zu stabilisieren, als auch auf das Polymerisationsverhalten zu PHFs in Anwesenheit des Aggregationsinduktors Heparin und die Morphologie im Elektronenmikroskop durchgeführt.

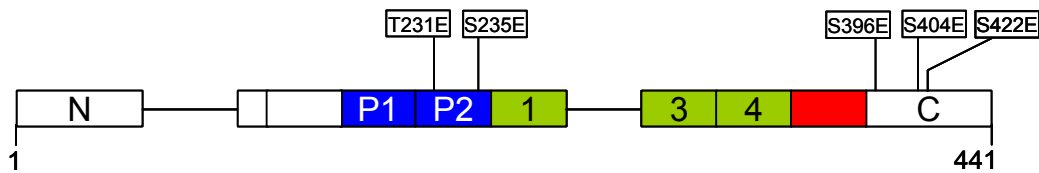


Abbildung 20: Für die Polymerisation zu PHFs verwendete Isoform ht23 und E-Mutanten von Tau. Die kürzeste Tau-Isoform ht23 enthält weder N-terminale Einschübe, noch den 2. *Repeat*. Die *Repeats* sind in grün dargestellt. Die Prolin-reichen Bereiche P1 und P2 sind in blau dargestellt. Die SP/TP-Stellen in der C-terminalen Region sind in weiß abgebildet.

3.5.1.1 CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanteile wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht. Für alle Tau-E-Mutanten wurden deshalb wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben Circular dichroismus Spektren aufgenommen und diese auf Anzeichen von Strukturmerkmalen untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 21 die CD-Spektren von ht23_wt, ht23_S235E und ht23_3RE dargestellt.

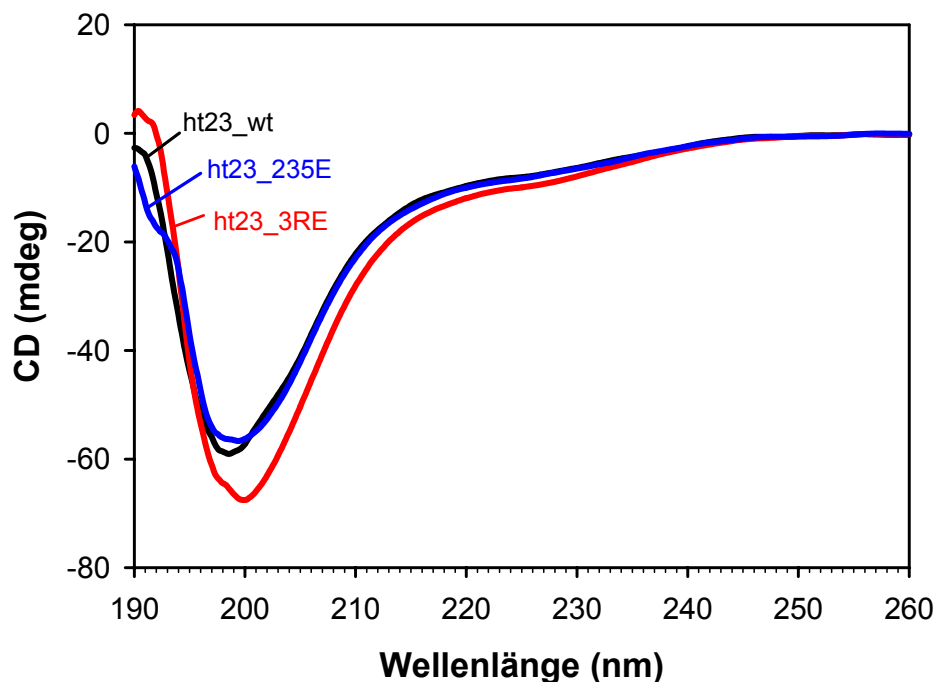


Abbildung 21: Exemplarisch dargestellte CD-Kurven der Proteine ht23_wt, ht23_S235E und ht23_3RE. Die eingeführten E-Mutationen bewirken keine Änderung der Sekundärstruktur.

Die Messungen ergeben, dass durch die eingeführten E-Mutationen keine Änderung der Konformation ausgelöst wird. Alle Kurven gleichen dem Wildtyp, der die typischen Charakteristika eines Zufallsknäuels (*random coil*, Minimum bei 195 nm; Maximum bei 212 nm) aufweist.

3.5.1.2 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in der P2-Region

Die Polymerisation von Mikrotubuli (30 μM) in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten (5 μM) wurde in 100 mM Na-Pipes-Puffer pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP gemessen. Die Reaktion wurde durch den Temperatursprung von 4°C auf 37°C gestartet. Die Absorption wurde bei 350 nm spektroskopisch verfolgt.

Die E-Mutationen in der P2-Region zeigen nur eine Abschwächung der Mikrotubuli-Polymerisation. Die ht23_T231E-Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine geringfügige Abnahme der Polymerisation von ca. 15%. Die ht23_T231E_S235E-Doppelmutante und die Einzelmutante ht23_S235E zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung im Ausmaß der Polymerisation von Mikrotubuli (siehe Tabelle 11).

Für die ht23_S235E-Einzel-Mutante ist die Zeit zum Erreichen der halbmaximalen Polymerisation $t_{1/2}$ verdoppelt. Der Wert $t_{1/2}$ für die ht23_T231E_S235E-Doppel-Mutante ist verdreifacht (siehe Tabelle 11). Die ht23_T231E-Einzelmutante hat in Bezug auf $t_{1/2}$ nur einen geringen Einfluss (1.5-fach) auf die Mikrotubuli-Polymerisation. Abschließend kann man sagen, dass die Pseudo-Phosphorylierungen an den SP/TP-Stellen T231 und S235 den Einfluss auf die Polymerisation der Mikrotubuli nicht wesentlich reduziert.

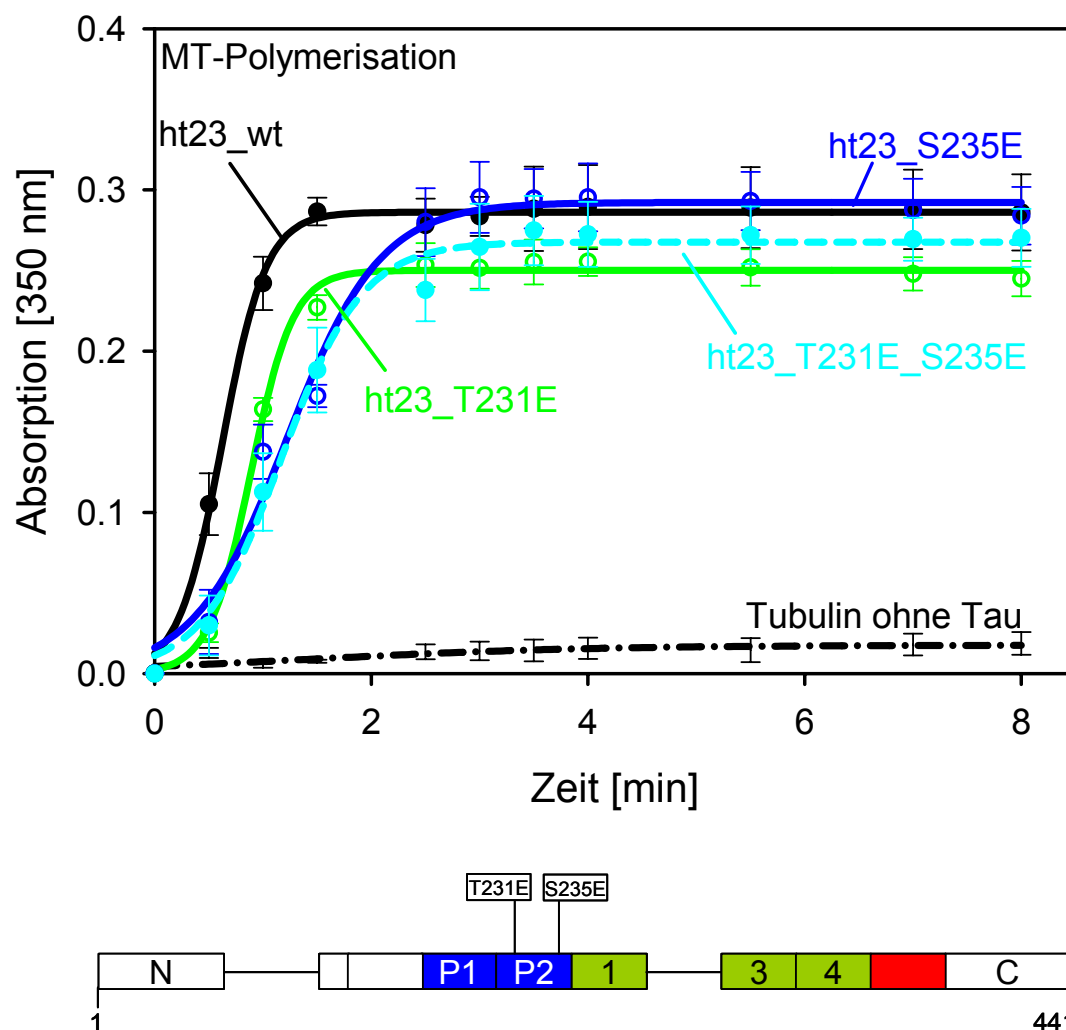


Abbildung 22: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von E-Mutanten in der P2-Region auf Basis der Isoform ht23. Die Polymerisationskurven für 30 μM Tubulin in Anwesenheit von 5 μM Tau in 100 mM Na-Pipes pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP wurden mit einem Photometer bei konstanter Wellenlänge (350 nm) über die Zeitdauer von 8 min aufgenommen. Die Reaktion wurde durch einen raschen Temperatursprung von 4°C auf 37°C gestartet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Tabelle 11: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten in der P2-Region

Tau-Mutante	Ausmaß der MT-Polymerisation	$t_{1/2}$ [sec]	$t_{1/2}$ [x-fach]
ht23_wt	100%	37.5	1.0
ht23_T231E	86%	54	1.5
ht23_S235E	100%	73	2.0
ht23_T231E_S235E	95%	106	3.0

3.5.1.3 Kinetik der PHF-Bildung von ht23-E-Mutanten in der P2-Region

Der Einfluss der imitierten Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen auf die Aggregation von Tau wurde in Anwesenheit des Aggregationsinduktors Heparin untersucht. Die Messung der E-Mutanten in der P2-Region auf Basis der Isoform ht23 wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 für eine Zeitdauer von 17 Tagen durchgeführt. Es wurden je 50 μ M Protein eingesetzt und Protein zu Heparin im Verhältnis 4:1 gegeben. Das Ausmaß der PHF-Aggregation wurde in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S gemessen.

Die Einzelmutanten ht23_T231E und ht23_S235E zeigen im Vergleich zu ht23_wt eine Reduktion des Endsignals (ht23_T231E um etwa 55%, ht23_S235E um etwa 42%). Die Doppelmutante ht23_T231E_S235E verhält sich in Bezug auf ihre Aggregationseigenschaft vergleichbar zu ht23_wt (Abb. 23). Die Wirkung der ht23_T231E-Mutante beschränkt sich auf eine Reduktion des Aggregationsausmaßes. Die Einzelmutante ht23_S235E erreicht zwar nur etwa 40% des Endsignals im Vergleich zum Wildtyp, aggregiert aber 5-mal schneller als der Wildtyp. Das weist auf eine schnellere Nukleation hin. Die Daten sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass der Effekt uneinheitlich und nicht additiv ist.

Tabelle 12: Parameter der PHF-Bildung von E-Mutanten in der P2-Region

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_T231E	45%	4	0.8
ht23_S235E	58%	1	0.2
ht23_T231E_S235E	88%	3	0.6

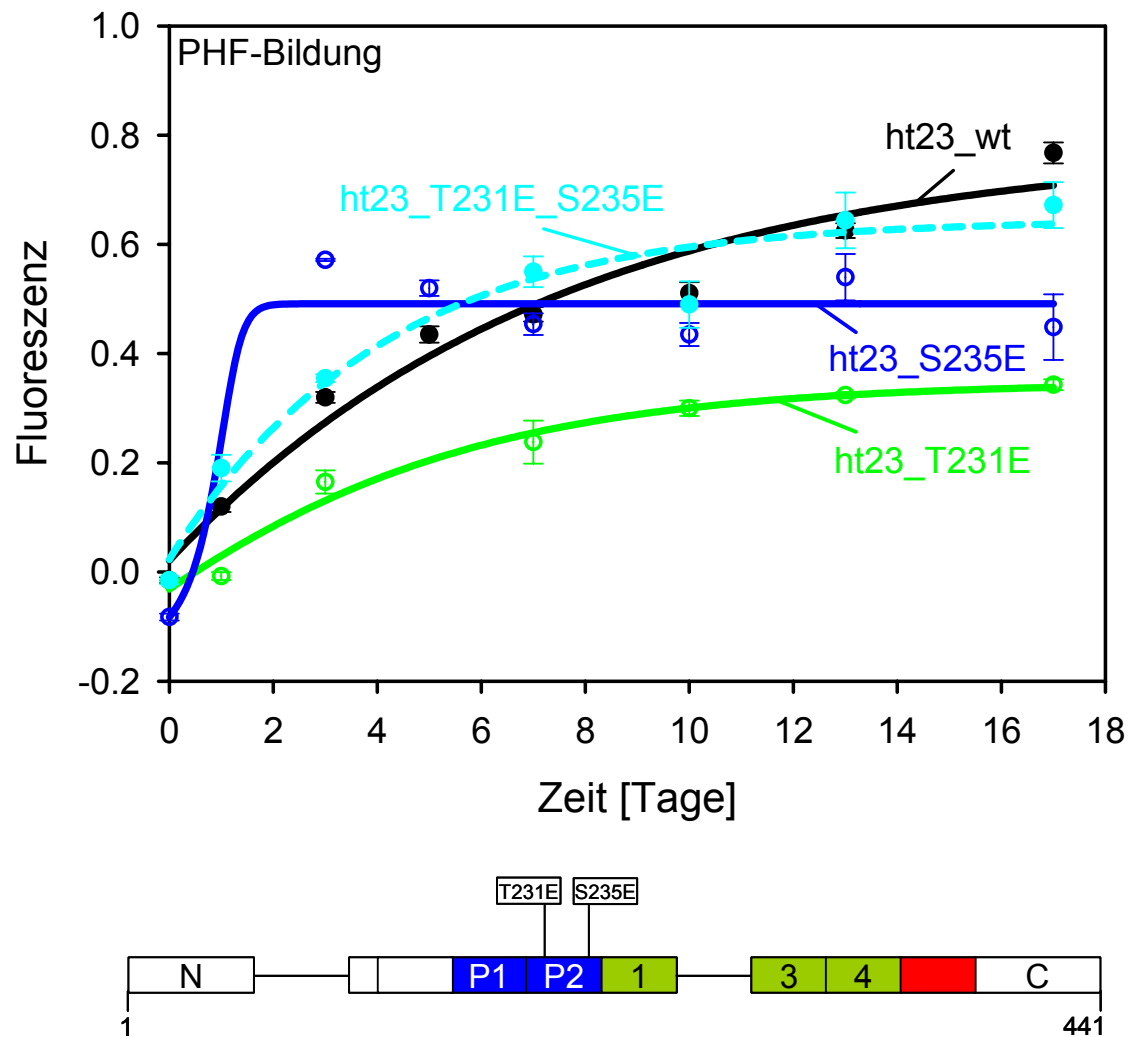


Abbildung 23: PHF-Polymerisation der E-Mutanten in der P2-Region auf Basis der Isoform ht23 in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μ M Protein und 12.5 μ M Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.5.1.4 Morphologie der Tau-Filamente aus E-Mutanten an den SP/TP-Stellen in der P2-Region

Die Ansätze der PHF-Kinetik von ht23_wt und den E-Mutanten in der P2-Region wurden anschließend auf ihre Morphologie elektronenmikroskopisch kontrolliert. Dazu wurden aus den Ansätzen der PHF-Kinetik am Endpunkt Aliquots entnommen und auf Kohlefilm-beschichteten Kupernetzen mit Uranylacetat negativ gefärbt. Dabei sollte untersucht werden, ob die Filamente auch in ihrer Morphologie dem Wildtyp entsprechen. Für ht23_wt und dessen E-Mutanten in der P2-Region gilt, dass sie die für paarige helikale Filamente typischen Merkmale (Breite: 10-20 nm, axiale Periodizität: ca. 80 nm) zeigen (Abb. 24). Dabei zeigt die ht23_S235E-Mutante kurze Filamente (zwischen 300-400 nm). Das weist auf eine schnelle Nukleation hin (Abb. 23), dadurch kommt es zur Ausbildung kürzerer Filamente. Die Filamente der Doppel-E-Mutante ht23_T231E_S235E sind sehr dünn (Breite: 10 nm), weisen aber auch die paarig helikale Struktur auf.

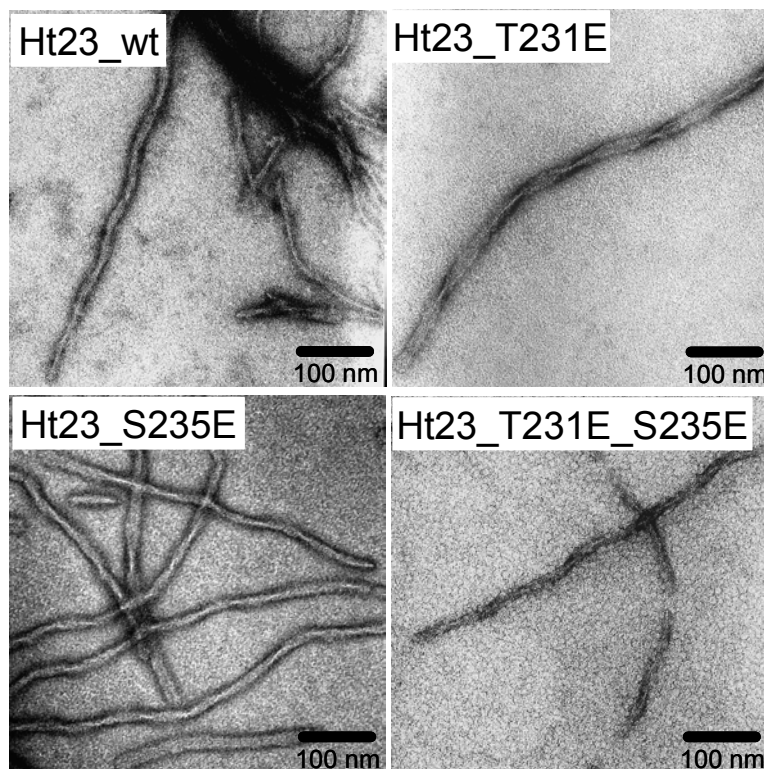


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der P2-Region. Der Balken entspricht 100 nm.

3.5.2 Einfluss der E-Mutanten in der C-terminalen Region

Für die PHF-Bildung mit dem Induktor Heparin werden bei den E-Mutanten im C-terminalen Bereich keine wesentlichen Veränderungen beobachtet (Abb. 26). Von besonderem Interesse ist die Rolle der C-terminalen Domäne, weil es in der Literatur Hinweise gibt, dass diese Domäne sich auf die *Repeat*-Domäne rückfalten kann und damit die Aggregation und Wechselwirkung mit Mikrotubuli beeinflusst (Abraha *et al.*, 2000; Binder *et al.*, 2005).

In den hier dargestellten Daten kann gezeigt werden, dass die Pseudo-Phosphorylierungen am C-Terminus einen abschwächenden Effekt auf die Polymerisation der Mikrotubuli haben. Die Aminosäure Serin 422 nimmt eine Sonderstellung ein. Im Einzelnen zeigen sich folgende Ergebnisse für die ht23_S422E-Mutante. Es wird eine Reduktion der Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit dieser Mutanten um 30% gemessen (Abb. 25). Die PHF-Bildung mit dem Induktor Heparin ist um 13% reduziert. Die elektronenmikroskopisch überprüften Filamente zeigen eine gekrümmte Morphologie (Abb. 27).

3.5.2.1 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten in der C-terminalen Region

Die Mikrotubuli-Polymerisation (30 μ M) wurde in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten (5 μ M) in 100 mM Na-Pipes-Puffer pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM GTP gemessen. Durch den Temperatursprung von 4°C auf 37°C wurde die Reaktion gestartet. Die Absorption wurde bei 350 nm photometrisch gemessen.

In Anwesenheit der ht23_S396E-Mutante ist die Mikrotubuli-Polymerisation um ca. 30% reduziert. Die ht23_S396E_S404E-Doppelmutante bewirkt eine Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation um 27%. Für die Mutationen an der Aminosäure Serin 422 ist eine Reduktion der Polymerisationsrate von Mikrotubuli von 41% zu verzeichnen. Während die Einzelmutanten ht23_S396E und ht23_S422E eine starke Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation bewirken, bildet die ht23_S404E-Einzelmutante eine Ausnahme der untersuchten Mutanten in der C-terminalen

Region. Die ht23_S404E-Mutante bewirkt eine geringe Verbesserung der Mikrotubuli-Polymerisation (12%), während die anderen E-Mutanten in der C-terminalen-Region eine Abschwächung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion bewirken.

Die Zeit für die halbmaximale Polymerisation von Mikrotubuli ist für die E-Mutanten ht23_S404E und ht23_S396E_S404E um etwa das Doppelte verlängert. Für die ht23_S422E-Mutante ist die Zeit sogar verdreifacht. Nur die ht23_S396E-Mutante zeigt einen dem Wildtyp vergleichbaren $t_{1/2}$ -Wert.

Das Ausmaß der Polymerisation wird durch die E-Mutation in der C-terminalen Region um mehr als 25% reduziert (Tabelle 13). Die Imitierung der Phosphorylierungen der SP/TP-Motive in der C-terminalen Region hat einen deutlich größeren reduzierenden Effekt im Vergleich zu den E-Mutationen in der P2-Region auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion (letztere zeigen nur eine Reduktion von ca. 15%).

Tabelle 13: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten in der C-terminalen Region

Tau-Mutante	Ausmaß der MT-Polymerisation	$t_{1/2}$ [sec]	$t_{1/2}$ [x-fach]
ht23_wt	100%	37.5	1.0
ht23_S396E	71%	53	1.4
ht23_S404E	112%	84	2.3
ht23_S422E	59%	114	3.0
ht23_S396E_S404E	73%	82	2.2

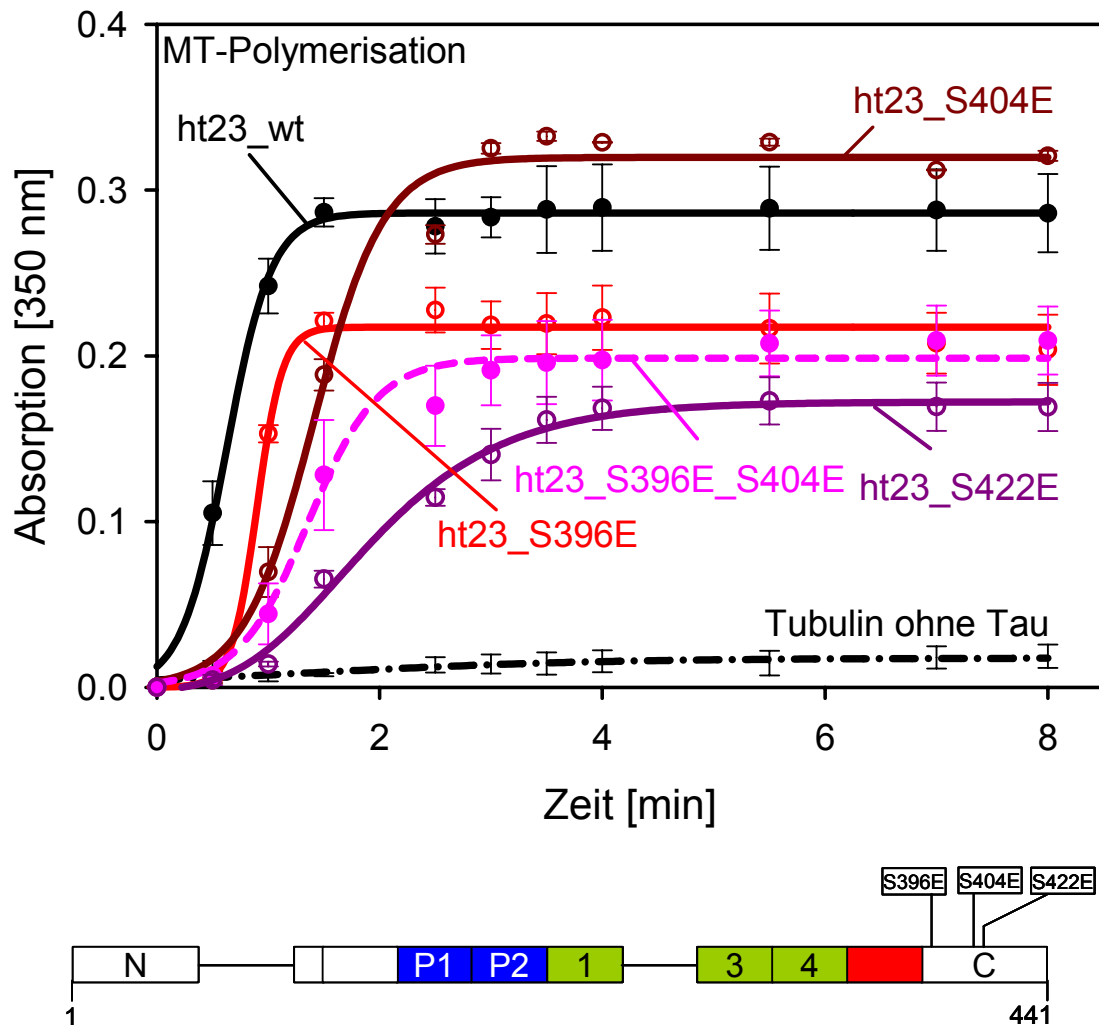


Abbildung 25: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von E-Mutanten in der C-terminalen Region auf Basis der Isoform ht23. Die Polymerisationskurven für 30 μM Tubulin in Anwesenheit von 5 μM Tau in 100 mM Na-Pipes pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP wurden mit einem Photometer bei konstanter Wellenlänge (350 nm) über die Zeitdauer von 8 min aufgenommen. Die Reaktion wurde durch einen raschen Temperatursprung von 4°C auf 37°C gestartet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.5.2.2 Kinetik der PHF-Bildung der ht23-E-Mutanten in der C-terminalen Region

Die E-Mutanten in der C-terminalen-Region von ht23 wurden auf ihre PHF-Bildungseigenschaft in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 für eine Zeitdauer von 17 Tagen untersucht. Das Verhältnis Protein zu Heparin betrug 4:1, wobei die eingesetzte Proteinkonzentration je 50 μM betrug. Das Ausmaß der PHF-Bildung wurde in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S gemessen.

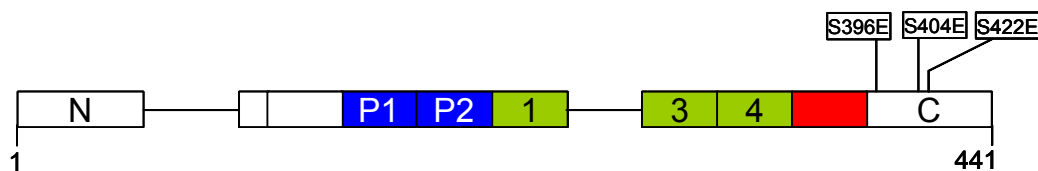
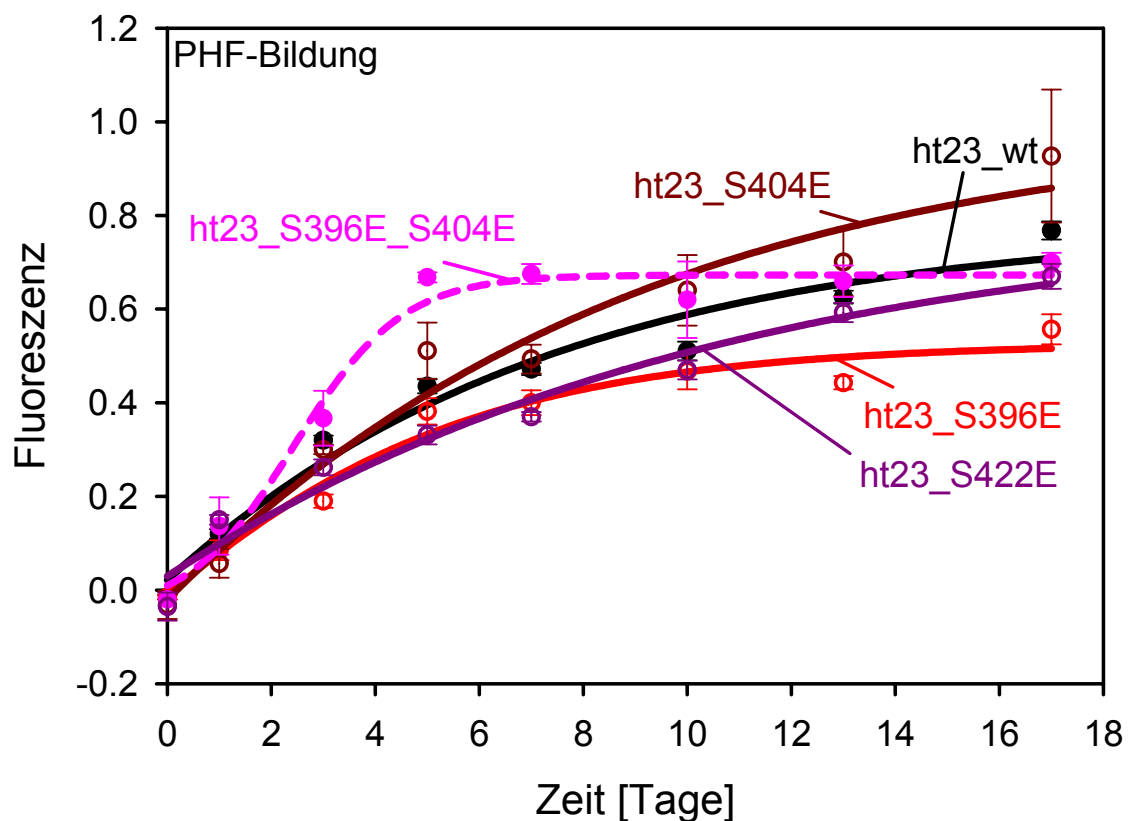


Abbildung 26: PHF-Bildung der E-Mutanten in der C-terminalen Region auf ht23-Basis in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μM Protein und 12.5 μM Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

Die Einzelmutante ht23_S396E zeigt eine verringerte PHF-Bildung. Diese Mutante bewirkt eine Reduktion des Thioflavin S-Endwertes um 30% im Vergleich zu ht23_wt. Dagegen bewirkt die Einzel-E-Mutante ht23_S404E eine Erhöhung des Thioflavin S-Signals um 20% verglichen mit ht23_wt. Das Ausmaß der PHF-Aggregation der Doppel-Mutante ht23_S396E_S404E entspricht dem des Wildtyps. Dabei aggregiert die ht23_S396E_S404E-Doppelmutante fast doppelt so schnell wie der Wildtyp. Der Einfluss der Aminosäure Serin 422 ist gering. Die Mutation des Serins 422 in Glutaminsäure bewirkt nur eine moderate Reduktion des Thioflavin S-Signals (13%).

Tabelle 14: Parameter der PHF-Bildung von E-Mutanten in der C-terminalen Region

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_S396E	72%	4	0.8
ht23_S404E	120%	6	1.2
ht23_S422E	87%	5	1.0
ht23_S396E_S404E	91%	3	0.6

3.5.2.3 Morphologie der Tau-Filamente aus E-Mutanten in der C-terminalen Region

Den Ansätzen der PHF-Kinetik wurden Aliquots entnommen, um die ThS-Messdaten zu überprüfen und die Morphologie der gebildeten Filamente elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Im Gegensatz zur P2-Region ergeben sich für die Morphologie der Filamente in der C-terminalen Region deutliche Unterschiede.

Die ht23_S396E-Mutante zeigt dem Wildtyp vergleichbare Filamente, die den typisch paarigen helikalen Filamenten gleichen (Abb. 27). Die Filamente der ht23_S404E-Mutante unterscheiden sich in Länge und Struktur. Diese Mutante bildet vorrangig gerade Filamente (Breite: 15 nm) die besonders lang sind und zur Verklumpung neigen. Auch die ht23_S396E_S404E-Doppelmutante tritt vorrangig in Form von geraden Filamenten auf, die auffällig lang und zu Bündeln formiert sind (Abb. 27). Die Filamente der ht23_S422E-Mutante weisen zwar die typische Struktur der paarigen

helikalen Filamente auf, sind aber dünn (ca. 10 nm) und neigen zu gekrümmter Form.

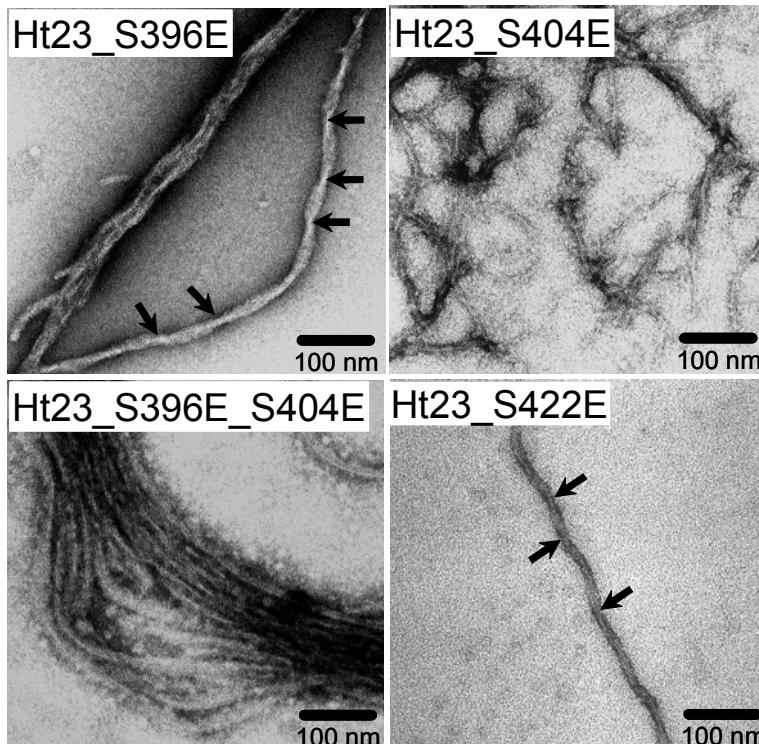


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der C-terminalen Region. Der Balken entspricht 100 nm.

3.5.3 Kombination der E-Mutationen in den flankierenden Regionen der *Repeats* und der KXGS-Motive innerhalb der *Repeats*

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Tau in den KXGS-Motiven das Protein von den Mikrotubuli ablöst (Biernat *et al.*, 1993). Deshalb sollten im Folgenden die Kombinationen von verschiedenen E-Mutanten untersucht werden.

3.5.3.1 Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach-E-Mutanten des Proteins Tau

Die Polymerisation von Mikrotubuli (30 μM) in Anwesenheit von Tau-E-Mutanten (5 μM) wurde in 100 mM Na-Pipes-Puffer pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP gemessen. Der Start der Reaktion erfolgte durch den Temperatursprung von 4°C auf 37°C. Photometrisch wurde die Absorption bei 350 nm gemessen.

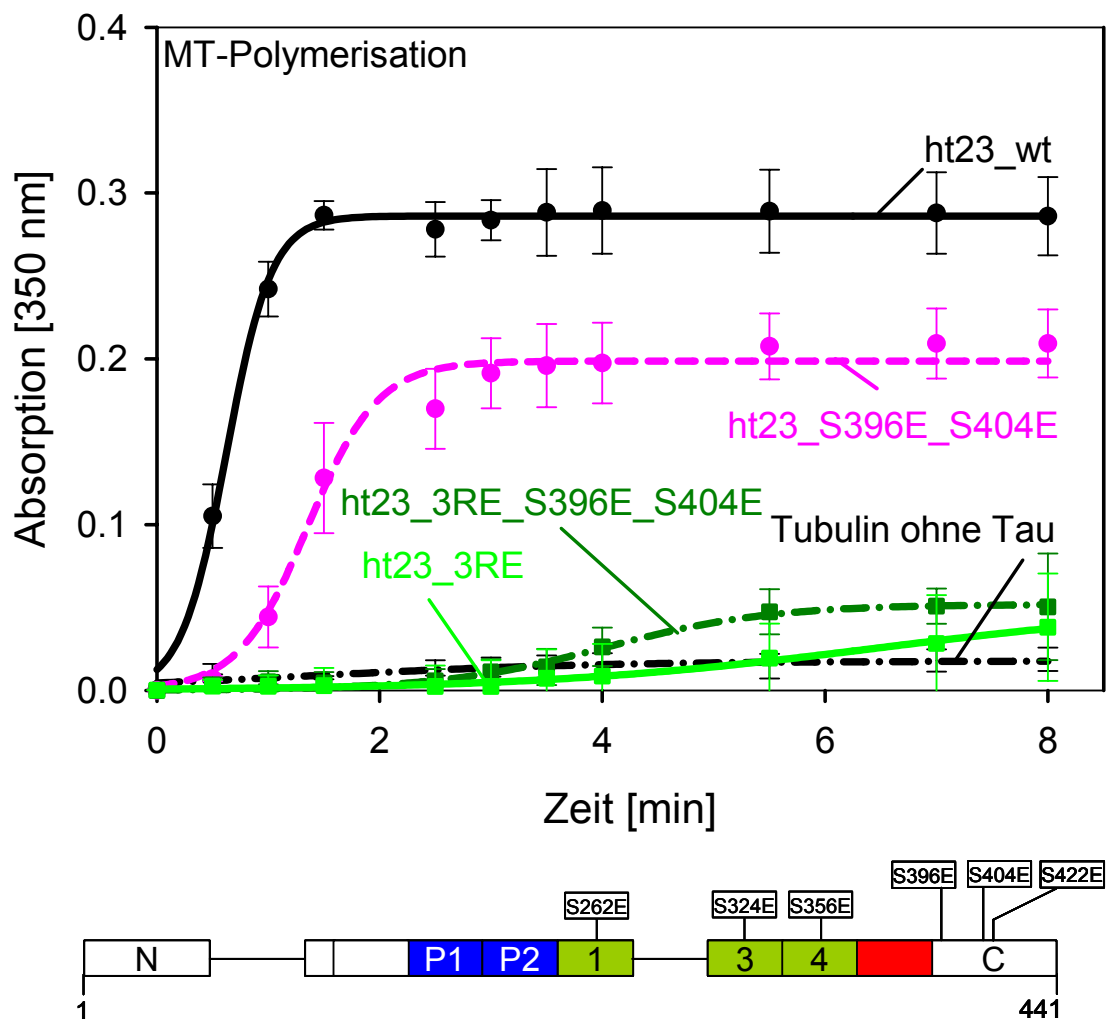


Abbildung 28: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach-E-Mutanten von ht23. Die MT-Polymerisation wurde für 30 μM Tubulin in Anwesenheit von 5 μM Tau in 100 mM Na-Pipes pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 1 mM GTP bei konstanter Wellenlänge (350 nm) über die Zeitdauer von 8 min gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Wie schon im Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben, bewirken die Mutationen der Serine 262, 324 und 356 innerhalb der KXGS-Motive in Glutaminsäurereste eine Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation um mehr als 85%. Die Mehrfach-Mutante ht23_3RE_S396E_S404E zeigt eine vergleichbare Stabilisierung von Mikrotubuli wie die ht23_3RE-Mutante (Reduktion um 87%). Im Vergleich zu ht23_wt ist die Mikrotubuli-Polymerisation um 83% reduziert. Die halbmaximale Mikrotubuli-Polymerisation wird erst nach der sechsfachen Zeit erreicht. Diese extreme Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation ist auf den Einfluss der E-Mutationen in den KXGS-Motiven in den *Repeats* zurückzuführen.

Die Kombination der E-Mutationen im Bereich der KXGS-Motive innerhalb der *Repeats*, bewirkt eine nahezu vollständige Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation. Das Ergebnis ist konsistent mit der Wirkung der entsprechenden Phosphorylierungsstellen (Biernat *et al.*, 1993; Illenberger *et al.*, 1996).

Tabelle 15: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der Mehrfach-E-Mutanten im C-terminalen Bereich

Tau-Mutante	Ausmaß der MT-Polymerisation	$t_{1/2}$ [sec]	$t_{1/2}$ [x-fach]
ht23_wt	100%	37.5	1.0
ht23_S396E_S404E	73%	82	2.2
ht23_3RE	13%	338	9.0
ht23_3RE_S396E_S404E	17%	241	6.4

Wie im Methodenteil beschrieben wurde die Tau-Mikrotubuli-Interaktion für die Doppel-E-Mutanten ht23_T231E_S235E und ht23_S396E_S404E sowie die Vierfach-E-Mutante ht23_T231E_S235E_S396E_S404E gemessen.

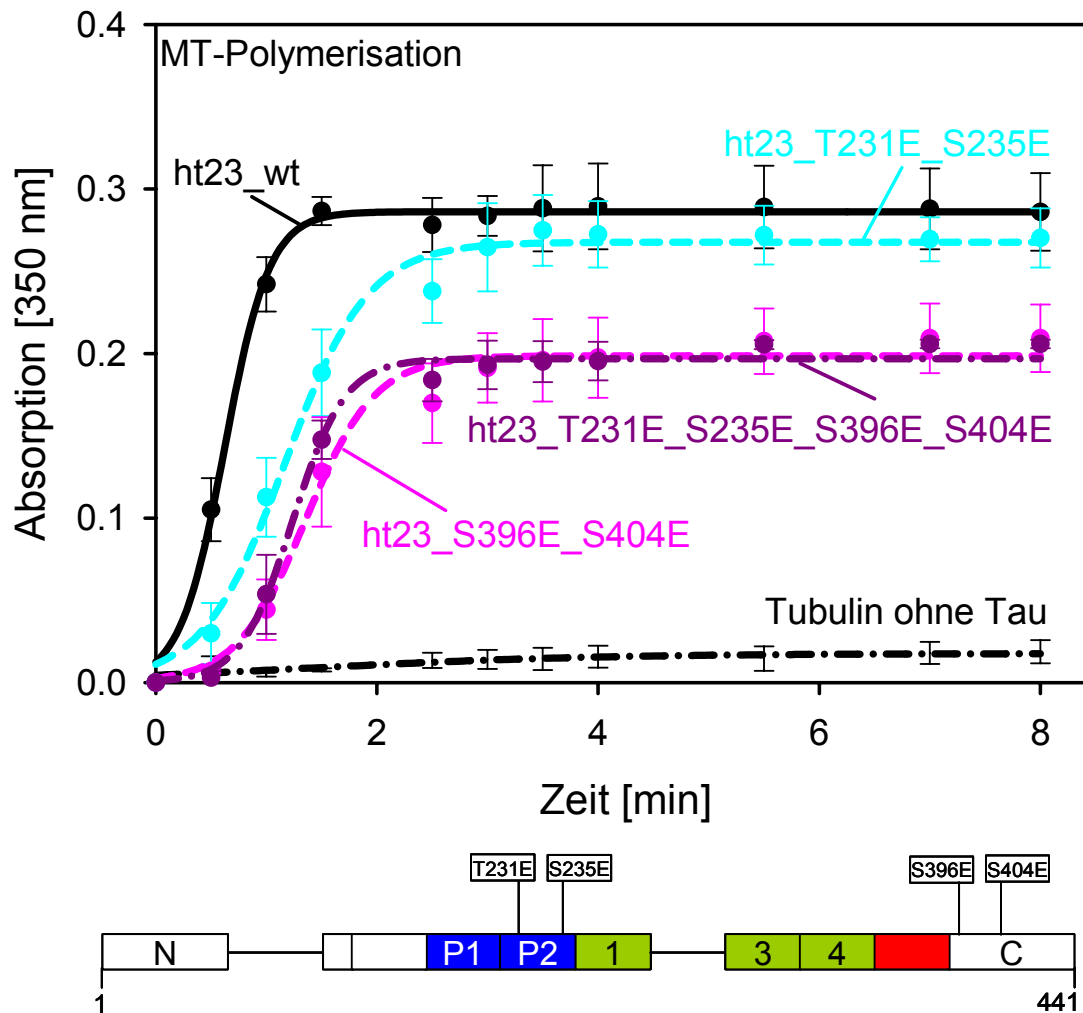


Abbildung 29: Polymerisationskurven von Mikrotubuli in Anwesenheit von Mehrfach-E-Mutanten in der P2-Region in Kombination mit der C-terminalen Region auf Basis der Isoform ht23. Die Polymerisationskurven für 30 μ M Tubulin in Anwesenheit von 5 μ M Tau in 100 mM Na-Pipes pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM DTT, 1 mM GTP wurden mit einem Photometer bei konstanter Wellenlänge (350 nm) über die Zeitdauer von 8 min aufgenommen. Die Reaktion wurde durch einen raschen Temperatursprung von 4°C auf 37°C gestartet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Mikrotubuli-Polymerisation der ht23_T231E_S235E-Doppelmutante ist mit dem Wildtyp vergleichbar. Dagegen bewirkt die ht23_S396E_S404E-Doppelmutante eine Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation um 27%, verglichen mit ht23_wt. Die Kombination der E-Mutationen in der P2- und C-terminalen Region bewirkt eine Reduktion der Mikrotubuli-Polymerisation für die ht23_T231E_S235E_S396E_S404E-Mutante um 28% im Vergleich zu ht23_wt. Die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Polymerisation ist für alle drei Mutanten (ht23_T231E_S235E, ht23_S396E_S404E, ht23_T231E_S235E_S396E_S404E) im Vergleich zum Wildtyp etwa verdoppelt.

Auch hier wird der größere Einfluss der E-Mutationen an den SP/TP-Stellen in der C-terminalen Region im Vergleich zu den SP/TP-Stellen in der P2-Region auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion deutlich.

Tabelle 16: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der Mehrfach-E-Mutanten in den flankierenden Bereichen

Tau-Mutante	Ausmaß der MT-Polymerisation	t _{1/2} [sec]	t _{1/2} [x-fach]
ht23_wt	100%	37.5	1.0
ht23_T231E_S235E	95%	106	3
ht23_S396E_S404E	73%	82	2.2
ht23_T231E_S235E_S396E_S404E	72%	74	2.0

3.5.3.2 Kinetik der PHF-Bildung von Mehrfach-E-Mutanten auf ht23-Basis

3.5.3.2.1 Kombination der E-Mutationen in der P2- und der C-terminalen Region

Die PHF-Polymerisation der Mehrfach-E-Mutanten in der P2- und der C-terminalen-Region auf Basis der Isoform ht23 wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 für eine Zeitdauer von 17 Tagen gemessen. Es wurden je 50 μ M Protein eingesetzt. Das Verhältnis Protein zu Heparin betrug 4:1. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin S wurde das Ausmaß der PHF-Bildung gemessen.

Das Ausmaß der ThioflavinS-Fluoreszenz am Ende der Messung für die Doppel-E-Mutanten ht23_T231E_S235E und ht23_S396E_S404E sind mit dem ThS-Signal von ht23_wt vergleichbar. Für diese Kombinationen der E-Mutationen ergeben sich nur moderate Veränderungen im ThS-Endsignal (10%). Auch für die Kombination der Doppel-Mutanten ht23_T231E_S235E_S396E_S404E ist das ThS-Signal mit dem von ht23_wt vergleichbar. Die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Aggregation ist für die Doppelmutanten ht23_T231E_S235E und ht23_S396E_404E um knapp die Hälfte verkürzt.

Tabelle 17: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten in den flankierenden Bereichen

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_T231E_S235E	88%	3	0.6
ht23_S396E_S404E	91%	3	0.6
ht23_T231E_S235E_S396E_S404E	99%	6	1.2

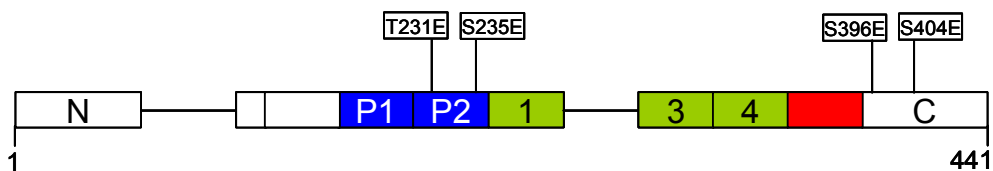
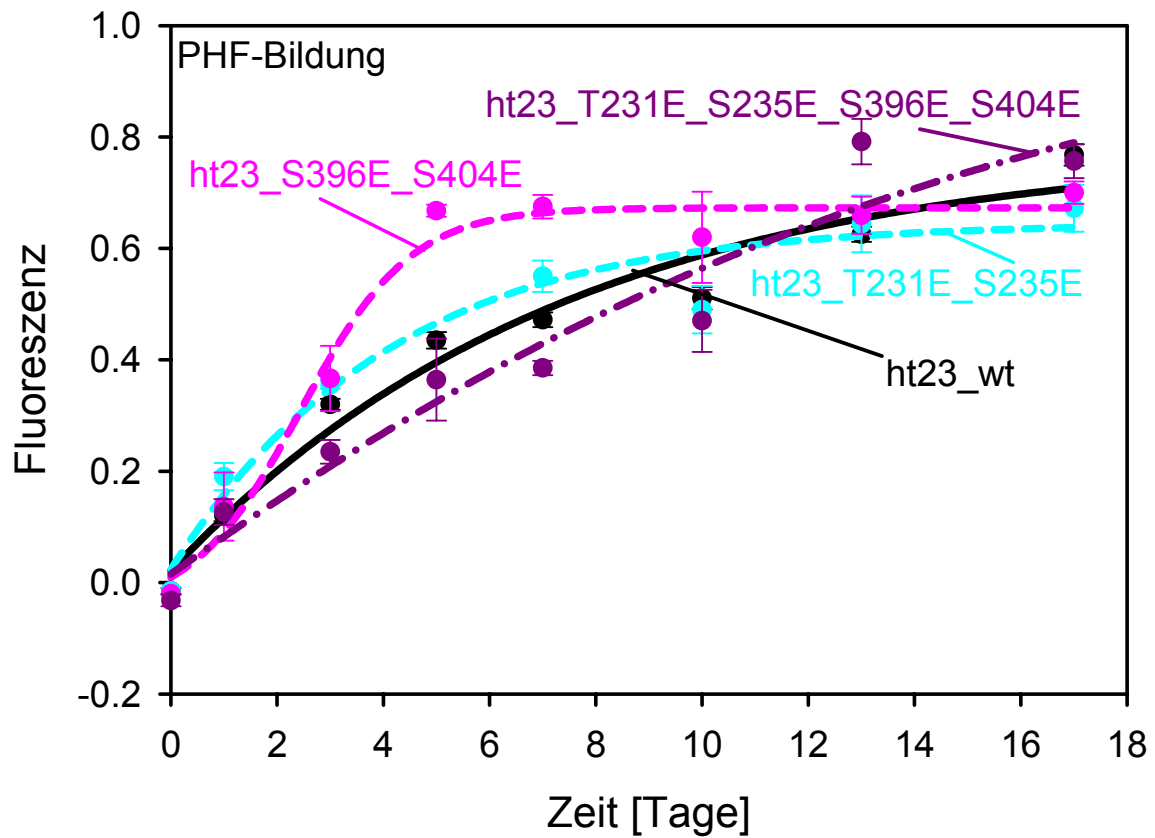


Abbildung 30: PHF-Bildung der Doppel-SP/TP-E-Mutanten in der P2- und C-terminalen Region auf ht23 Basis in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μ M Protein und 12.5 μ M Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

3.5.3.3 Morphologie der Filamente aus kombinierten E-Mutanten der SP/TP-Stellen

Während die ht23_S396E_S404E-Mutante (C-terminale Region) lange, gerade Filamente bildet, die sich zu Bündeln formieren (Abb. 27), weisen die dünnen Filamente (10 nm) der ht23_T231E_S235E-Mutante (P2-Region) die typische paarige helikale Struktur auf (Abb. 24). Die Gestalt der Filamente der ht23_T231E_S235E_S396E_S404E kombinierten E-Mutante, die E-Mutationen in den SP/TP-Stellen sowohl in der P2- als auch in der C-terminalen Region aufweist, gleicht morphologisch eher den Filamenten der ht23_T231E_S235E-Doppel-E-Mutante in der P2-Region. Die Filamente sind dünn (10 nm) und zeigen die paarige helikale Struktur. Die Filamente der ht23_T231E_S235E_S396E_S404E-Mutante neigen zu Verklumpungen (Abb. 35). Neben kurzen Filamenten werden auch lange dünne paarige helikal geformte Filamente gefunden. Die Morphologie der Filamente der Doppel-E-Mutanten unterscheidet sich somit deutlich voneinander.

3.5.3.4 Kombination der E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats*

Die PHF-Bildung der Mehrfach-E-Mutanten in der P2-Region in Kombination mit den E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auf Basis der Isoform ht23 wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 für eine Zeitdauer von 17 Tagen verfolgt. Dabei wurden je 50 μ M Protein und ein Verhältnis von 4:1 für Protein zu Heparin eingesetzt. Das Ausmaß der PHF-Bildung wurde durch die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S gemessen.

Wie schon für die ht23_T231E-Einzelmutante eine Reduktion des Thioflavin S - Endsignals um 55% im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten ist, zeigt auch die ht23_T231E_3RE-Mutante eine Reduktion des Endwertes um 65% im Vergleich zu ht23_wt.

Dabei hat die Einzelmutation am Threonin 231 in Glutaminsäure keine Auswirkungen auf das Erreichen der halbmaximalen Aggregationszeit von ht23_T231E (Tabelle 18). Die gleiche Mutation an Threonin 231 in Kombination mit E-Mutationen an den Serinen 262, 324 und 356 in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* bewirkt eine Erhöhung der halbmaximalen Aggregationszeit auf etwa das 2-fache für die ht23_T231E_3RE-Mutante, wobei eine Lag-Phase von 7 Tagen zu verzeichnen ist, was auf eine Inhibition der Nukleation hindeutet.

Tabelle 18: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten in der P2-Region und den *Repeats*

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_T231E	45%	4	0.8
ht23_T231E_3RE	35%	11	2.2
ht23_3RE	27%	3	0.6

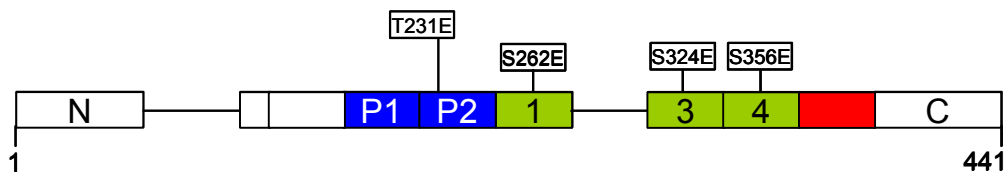
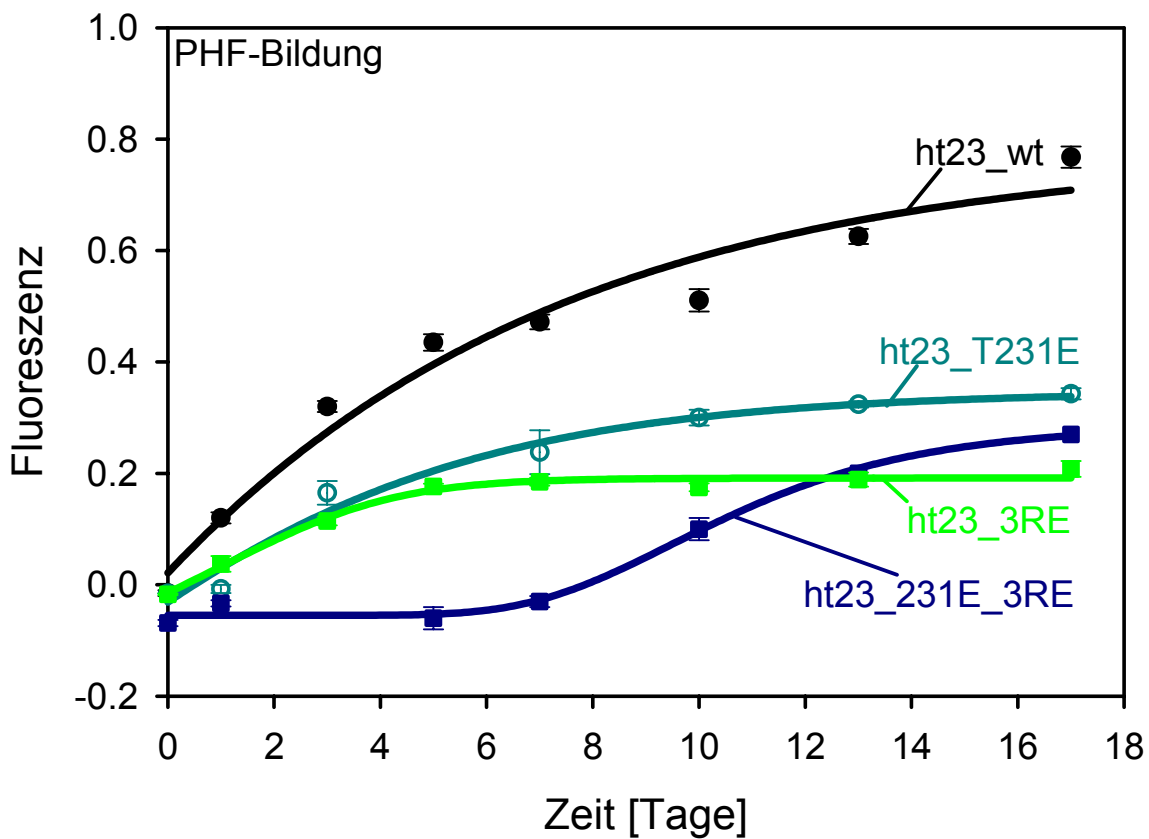


Abbildung 31: PHF-Bildung der kombinierten E-Mutanten an den SP/TP-Stellen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auf ht23 Basis in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μM Protein und 12.5 μM Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

3.5.3.4.1 Morphologie der kombinierten E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats*

Die Filamente aus den PHF-Ansätzen wurden elektronenmikroskopisch überprüft. Die Morphologie der ht23_T231E_3RE-Mutante weist die typische paarige helikale Struktur auf. Zusätzlich neigen die Filamente der ht23_T231E_3RE-Mutante dazu, Bündel zu formen, allerdings im Ausmaß nicht vergleichbar mit der ht23_S396E_S404E-Mutante (Abb. 27). Die Morphologie der Filamente der ht23_T231E_3RE-Mutante entspricht der von ht23_wt und der ht23_T231E_Einzelmutante (Abb. 24).

3.5.3.5 Kombination der E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* und der C-terminalen Region

Die PHF-Polymerisation der SP/TP-E-Mutanten in der C-terminalen-Region in Kombination mit E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auf Basis der Isoform ht23 wurde für eine Zeitdauer von 17 Tagen verfolgt. Die Ansätze enthielten je 50 µM Protein in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Das Verhältnis Protein zu Heparin betrug 4:1. Die Messung erfolgte in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S.

Die Kombinationsmutante ht23_3RE_S396E sowie die ht23_3RE_396E_S404E-Mutante weisen beide eine erhebliche Reduktion (ht23_3RE_S396E um 77%, ht23_3RE_396E_S404E um 83%) im Endsignal des ThS-Assays auf. Die kombinierte Pseudo-Phospho-Mutante in der P2-Region (ht23_T231E_3RE) zeigt ebenso eine signifikante Reduktion der PHF-Bildung (Reduktion um 65%).

Die Einzel- bzw. Doppelmutanten verhalten sich ähnlich dem Wildtyp. Sobald aber die Serinreste in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auch in Glutaminsäure umgewandelt wurden, reduziert sich das ThS-Signal erheblich für die Kombinations-E-Mutanten ht23_T231E_3RE und ht23_3RE_S396E.

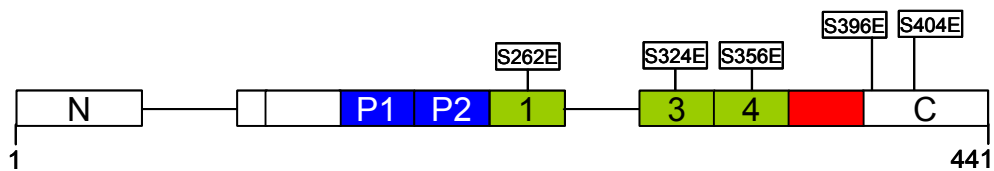
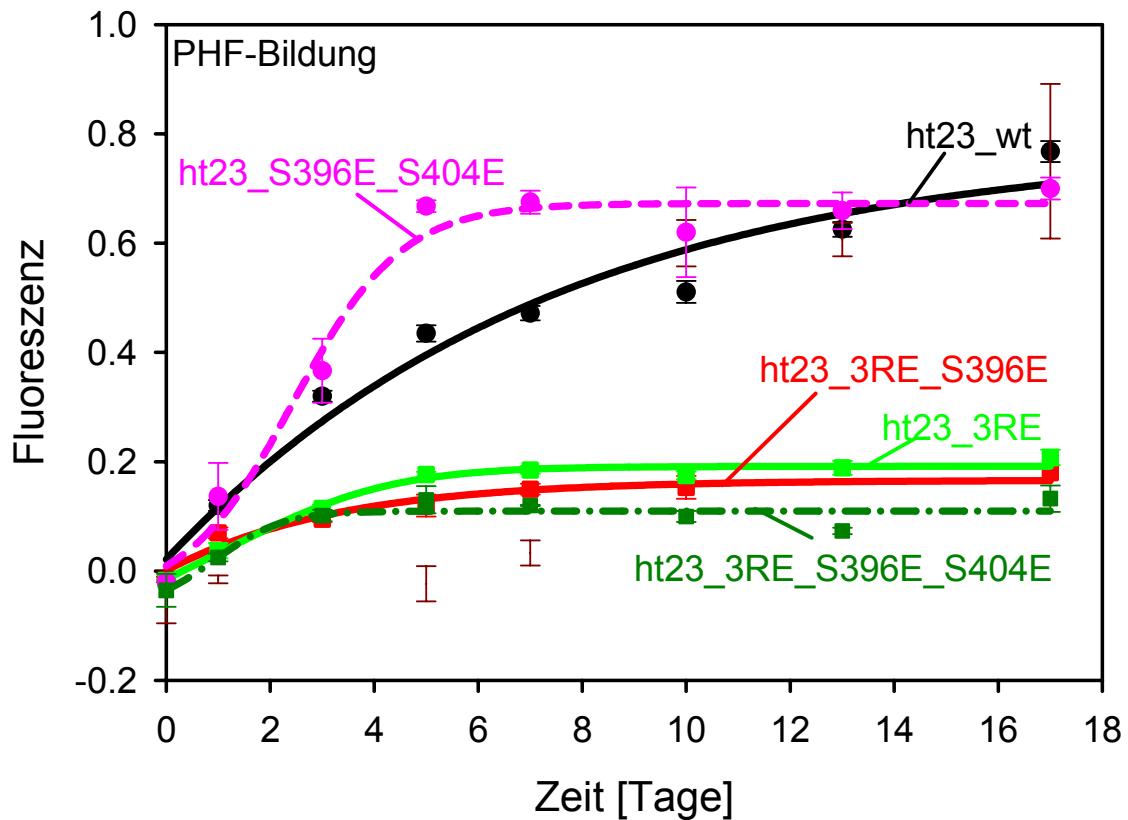


Abbildung 32: PHF-Bildung der kombinierten E-Mutanten von den SP/TP-Stellen im C-terminalen Bereich und mit den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auf ht23 Basis in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μM Protein und 12.5 μM Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

Tabelle 19: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten der flankierenden Bereiche

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23 wt	100%	5	1.0
ht23 T231E_3RE	35%	11	2.2
ht23 3RE_S396E	23%	3	0.6
ht23 3RE_S396E_S404E	17%	2	0.4

Die hier gezeigten Daten belegen, dass es für die Aggregation der E-Mutanten in PHFs unerheblich war, ob SP/TP-Stellen zusätzlich zu den KXGS-Motiven in den *Repeats* mutiert wurden.

3.5.3.5.1 Morphologie der kombinierten E-Mutationen in der P2-Region und den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats*

Die Daten der kinetischen Untersuchung zur PHF-Aggregation werden für die Mutanten ht23_3RE_S396E, ht23_3RE_S396E_S404E und ht23_T231E_3RE elektronenmikroskopisch bestätigt. Die Filamente der ht23_T231E_3RE-Mutante weisen die paarige helikale Struktur auf, bei der ht23_3RE_S396E-Mutante hingegen ist es schwierig, Filamente im EM zu finden.

Das Gleiche gilt für die ht23_3RE_S396E_S404E-Mutante. Auf den elektronenmikroskopischen Trägern können nur wenige PHFs gefunden werden, diese weisen aber die paarige helikale Struktur auf (siehe Abb. 33).

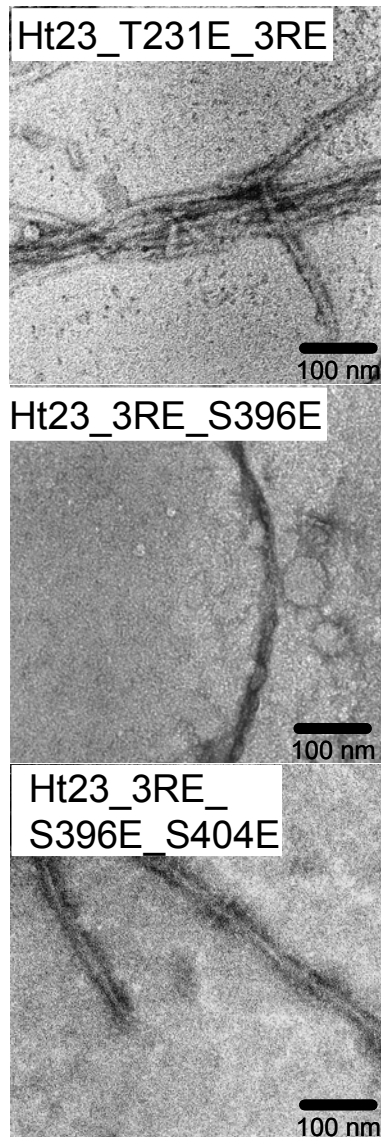


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und E-Mutanten in der C-terminal flankierenden Region der *Repeats*. Der Balken entspricht 100 nm.

3.5.3.6 PHF-Bildung von Mehrfach-E-Mutanten in den KXGS-Motiven und den angrenzenden Regionen

Die PHF-Polymerisation der kombinierten E-Mutanten in den KXGS-Motiven und den N- und C-terminal angrenzenden Regionen auf Basis der Isoform ht23 wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8 für eine Zeitdauer von 17 Tagen verfolgt. Das Verhältnis Protein zu Heparin betrug 4:1, wobei 50 μ M Protein eingesetzt wurde. Die PHF-Bildung wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin S gemessen.

Die Kombination der E-Mutationen in der P2-, der C-terminalen Region und den drei Serinresten in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* führt zu einer starken Reduktion des Thioflavin S-Signals um 81% für die ht23_T231E_S235E_3RE_S396E_S404E-Mutante. Dabei bewirkt die Kombination der E-Mutationen in der P2- und der C-terminalen Region nur eine minimale Reduktion im ThS-Signal für die ht23_T231E_S235E_S396E_S404E-Mutante (Tabelle 20). Die Kombination der E-Mutationen in der P2- und der C-terminalen Region mit Alaninmutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* bewirkt dagegen für die ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E-Mutante eine Erhöhung im Endsignal um 20% im ThS-Assay verglichen mit ht23_wt. Die E-Mutationen der SP/TP-Stellen in der P2- und der C-terminalen Region haben nur einen moderaten Effekt. Die Mutanten, die E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* enthalten, zeigen alle einen negativen Einfluss auf die PHF-Bildung. Wohingegen die Alaninmutation in den KXGS-Motiven (KXGA) die Eigenschaft der PHF-Bildung der E-Mutanten deutlich verändert. Die Mutante, die sieben E-Mutationen enthält, zeigt eine stark reduzierte Aggregation, und auch elektronenmikroskopisch können nur amorphe Aggregate nachgewiesen werden. Die Einführung von mehreren E-Mutationen wirkt auf die Aggregation inhibitorisch. Besonders zu erwähnen ist hier die Reduktion des $t_{1/2}$ -Wertes für die ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E-Mutante um das 5-fache, die zusätzlich ein um 20% erhöhtes Endsignal zeigt.

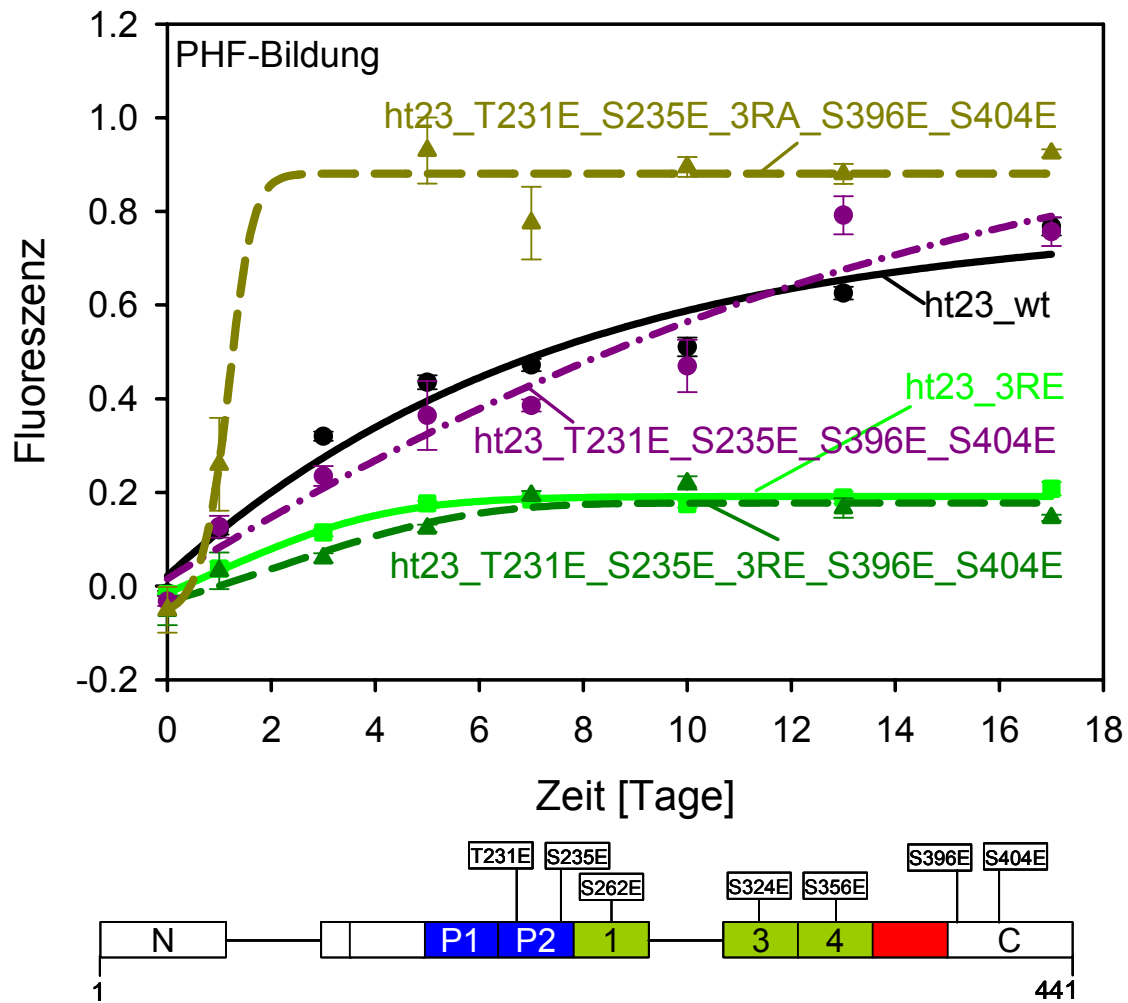


Abbildung 34: PHF-Polymerisation der Kombinationsmutanten von den SP/TP-Stellen in der P2-Region sowie der C-terminalen Region und den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* auf ht23 Basis in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 6.8. Es wurden je 50 μM Protein und 12.5 μM Heparin 6000 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung.

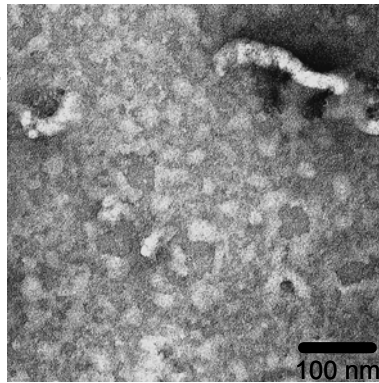
Tabelle 20: Parameter der PHF-Bildung von kombinierten E-Mutanten der flankierenden Bereiche und der *Repeats*

Tau-Mutante	Ausmaß der PHF-Bildung	$t_{1/2}$ [T]	$t_{1/2}$ x-fach
ht23_wt	100%	5	1.0
ht23_T231E_S235E_S396E_S404E	99%	6	1.2
ht23_T231E_S235E_3RE_S396E_S404E	amorph 19%	3	0.6
ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E	120%	1	0.2

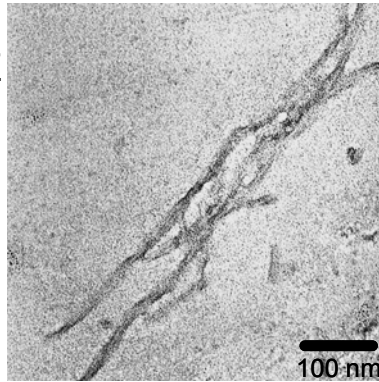
3.5.3.6.1 Morphologie der Mehrfach-E-Mutationen

Die Morphologie der Filamente von ht23_3RE_S396E_S404E zeigt elektronenmikroskopisch nur wenige, aber typische paarige helikale Filamente. Die Kombinationsmutanten ht23_T231E_S235E_3RE_S396E_S404E und ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E neigen beide zu Verklumpungen. Die ht23_T231E_S235E_3RE_S396E_S404E-Mutante bildet amorphe Aggregate. Für die ht23_T231E_S235E_3RA_S396E_S404E-Mutante sind dünne Filamente zu finden, die aber die paarige helikale Gestalt aufweisen.

Ht23_T231E_S235E
_3RE_S396E_S404E



Ht23_T231E_S235E
_3RA_S396E_S404E



Ht23_T231E_S235E
_S396E_S404E

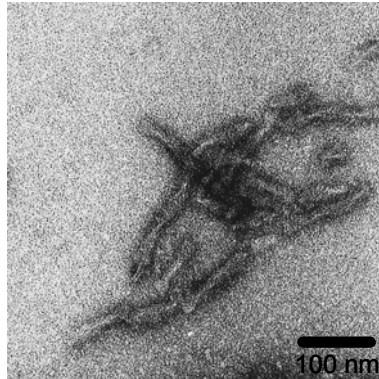


Abbildung 35:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Filamenten von ht23_wt und Mehrfach-E-Mutanten. Der Balken entspricht 100 nm.

IV Diskussion

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, bei der zwei Arten von Proteinen abnormal aggregieren. Die extrazellulären Ablagerungen werden als Amyloid-Plaques bezeichnet. Diese bestehen aus dem β -Amyloid-Peptid, welches durch Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP, *Amyloid-Precursor-Proteins*) durch das Zusammenspiel verschiedener Sekretasen entsteht. Die intrazellulären Aggregate werden als neurofibrilläre Bündel bezeichnet, die hauptsächlich aus dem Protein Tau bestehen. Neben der Alzheimer-Krankheit treten auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen des Gehirns abnorme Proteinablagerungen auf. Bei der Parkinson-Krankheit wurde das Protein α -Synuklein als Bestandteil der Aggregate identifiziert (zur Übersicht siehe Rajagopalan und Andersen, 2001; Wanker, 2000). Im Fall der Prion-Krankheiten bestehen die abgelagerten Aggregate aus dem Prion-Protein (zur Übersicht Jackson und Clarke, 2000). Die Gemeinsamkeit dieser Proteine ist die Ausbildung von intermolekularen β -Faltblattstrukturen (Tremblay *et al.*, 1998; Rochet und Lansbury, 2000), die zur pathologischen Aggregation führen.

Für das Protein Tau sind mehrere posttranslationale Modifizierungen bekannt. Eine besondere Bedeutung hat dabei die Phosphorylierung an Serin- bzw. Threoninresten. Im Fall der Alzheimer-Krankheit liegt das Tau-Protein in einem heterogenen Phosphorylierungszustand vor (Lindwall und Cole; 1984; Butner und Shelanski; 1986; Hagestedt *et al.*, 1989). Während gesundes Hirngewebe einen geringen Phosphorylierungsgrad aufweist (2-3 Mol Phosphat/Mol Tau; Ksiezak-Rieding *et al.*, 1992; Kopke *et al.*, 1993), ist für Tau-Protein, das aus PHFs isoliert wurde, ein hoher Grad an Phosphorylierung (6-8 Mol Phosphat/Mol Tau) festgestellt worden (Ksiezak-Rieding *et al.*, 1992; Kopke *et al.*, 1993). In diesem Fall spricht man von hyperphosphoryliertem Tau-Protein.

Die Phosphorylierung reguliert die physiologische Funktion von Tau, die in der Stabilisierung der Mikrotubuli besteht. Das Tau-Protein fördert die Nukleation der Tubulin-Untereinheiten zu Mikrotubuli und schützt die Mikrotubuli vor spontanem Zerfall (Gustke *et al.*, 1994). Dabei übernehmen die verschiedenen Domänen von Tau unterschiedliche Funktionen. Während die Assemblierungsdomäne von Tau, die in der C-terminalen Hälfte liegt, die Bindung an die Mikrotubuli und somit deren Stabilisierung bewirkt, dient die Projektions-Domäne als Abstandshalter auf der Mikrotubuli-Oberfläche (Steiner *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992). Die Projektions-Domäne liegt in der N-terminalen Domäne, die sich durch ihren sauren Charakter auszeichnet. Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion wird durch zwei verschiedenartige Phosphorylierungen reguliert. Die eine ist die Phosphorylierung an den Serinresten in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* (Drewes *et al.*, 1997; 1998). Diese Phosphorylierung der *Repeat*-Domäne hat einen stark negativen Effekt auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Sie löst Tau von den Mikrotubuli ab (Biernat *et al.*, 1993), dadurch zerfallen die Mikrotubuli in die Untereinheiten und verlieren ihre Stabilität. Dahingegen haben die Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen nur eine abschwächende Wirkung auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Es ist zu vermuten, dass die Feinregulation der Tau-Mikrotubuli-Interaktion durch die Phosphorylierung in den flankierenden Bereichen erfolgt. Diese Bereiche sind durch SP/TP-Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet, die durch Prolin-gerichtete Kinasen phosphoryliert werden können.

Es ist bislang umstritten, ob die heterogene Phosphorylierung des Tau-Proteins aus Alzheimergewebe, einen Einfluss auf die Aggregation des Tau-Proteins hat. Um den Effekt der Phosphorylierung auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion und die toxische Aggregation untersuchen zu können, wurde daher in dieser Arbeit die Phosphorylierung durch E-Mutanten imitiert. Dabei wurde sowohl der Einfluss der Phosphorylierung in den flankierenden Bereichen (SP/TP-Motive) als auch in der *Repeat*-Region (KXGS-Motive) einzeln und in Kombination analysiert.

4.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in der *Repeat*-Region

Das Protein Tau kann durch Phosphorylierungen an ungefähr 30 verschiedenen Stellen posttranslational modifiziert werden. Durch Untersuchungen des hyperphosphorylierten Tau Proteins aus Alzheimer-Gehirnen konnten viele der Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzierung identifiziert werden (Gustke *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1992; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Einige dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden in Glutaminsäurereste umgewandelt und so deren Einfluss auf die Struktur und Funktion von Tau biochemisch untersucht. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurden ebenfalls verschiedene E-Mutanten biochemisch charakterisiert. Diese Daten wiesen darauf hin, dass Pseudo-Phospho-Mutanten ebenso wie hyperphosphoryliertes Tau aus Alzheimer-Gehirnen eine reduzierte elektrophoretische Mobilität bewirken, die sich in Anwesenheit von Harnstoff wieder aufheben ließ (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001; Haase *et al.*, 2004).

E-Mutationen in der *Repeat*-Region haben einen negativen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Die Phosphorylierung von Tau in der *Repeat*-Domäne löst dieses von den Mikrotubuli ab und trägt so zur Dynamik der Mikrotubuli bei (Biernat *et al.*, 1993). Die *Repeat*-Region ist neben der Bindung an Mikrotubuli auch für die Aggregation in die PHFs von entscheidender Bedeutung, da sie den Kern der PHFs bilden. Als pathogener Mechanismus des Tau-Proteins kommen sowohl der Verlust der physiologischen Funktion (*loss of function*) durch Phosphorylierung als auch die Entstehung von eventuell toxischen Aggregaten (*gain of function*) in Frage. Es wird oft vermutet, dass in einer Kombination beider Reaktionswege Tau durch Phosphorylierung von den Mikrotubuli abgelöst wird und dann aggregiert. Andererseits wurde in früheren Untersuchungen unseres Labors gezeigt, dass die Phosphorylierungen an den Serinresten, die die Tau-Mikrotubuli-Interaktion beeinflussen, Tau vor der toxischen Aggregation schützt (Schneider *et al.*, 1999).

4.1.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den *Repeats* auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Ebenso wie die tatsächlichen Phosphorylierungen an den KXGS-Motiven in den *Repeats* führen auch die Pseudo-Phosphorylierungen zu signifikanten Veränderung der Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Für die Isoform-Mutanten ht23_3RE und ht40_4RE wurde eine Reduktion des Endsignals um ca. 80% gemessen (Abb. 36). Durch die Simulierung der Phosphorylierung geht die Fähigkeit von Tau, Mikrotubuli zu stabilisieren, fast vollständig verloren. Diese Daten stimmen mit früheren Arbeiten überein (Biernat *et al.*, 1993; Gustke *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 1998). Auch in den Studien anderer Gruppen konnte gezeigt werden, dass E-Mutationen einen negativen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion haben (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001; Haase *et al.*, 2004). Dabei wurden einerseits Zehnfach-E-Mutanten untersucht, die in den flankierenden Bereichen vor und nach der *Repeat*-Region gelegen sind (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001). Zum anderen wurden Kombinationsmutanten der flankierenden Bereiche, die bis zu fünf E-Mutationen enthielten, sowie der Einfluss der E-Mutationen in den KXGS-Motiven im 1. und 3. *Repeat* als Doppelmutation untersucht (Haase *et al.*, 2004). Während die Ergebnisse übereinstimmen, was den Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion betrifft, wird die Wirkung auf das Aggregationsverhalten der E-Mutanten unterschiedlich bewertet. Einerseits existieren Studien, die zeigen konnten, dass die Phosphorylierungen in der *Repeat*-Region Tau vor der Aggregation schützen (Schneider *et al.*, 1999). Mehrfach-E-Mutationen in den flankierenden Bereichen weisen einen ähnlichen Effekt auf (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001). Andererseits wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass Phosphorylierung Tau in die toxische Aggregation treibt (Alonso *et al.*, 2001; Iqbal und Grundke-Iqbal, 2004). Diese Ergebnisse sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da verschiedene Reinigungsmethoden für das Tau-Protein und verschiedene Analysemethoden verwendet wurden. Einerseits wurde aus Gehirngewebe isoliertes Tau-Protein untersucht (Alonso *et al.*, 2001; Iqbal und Grundke-Iqbal, 2004), andererseits wurde rekombinant hergestelltes Tau-Protein *in vitro* phosphoryliert (Schneider *et al.*, 1999) oder die Phosphorylierung durch E-Mutationen imitiert (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001; Haase *et al.*, 2004; Necula und Kuret, 2004).

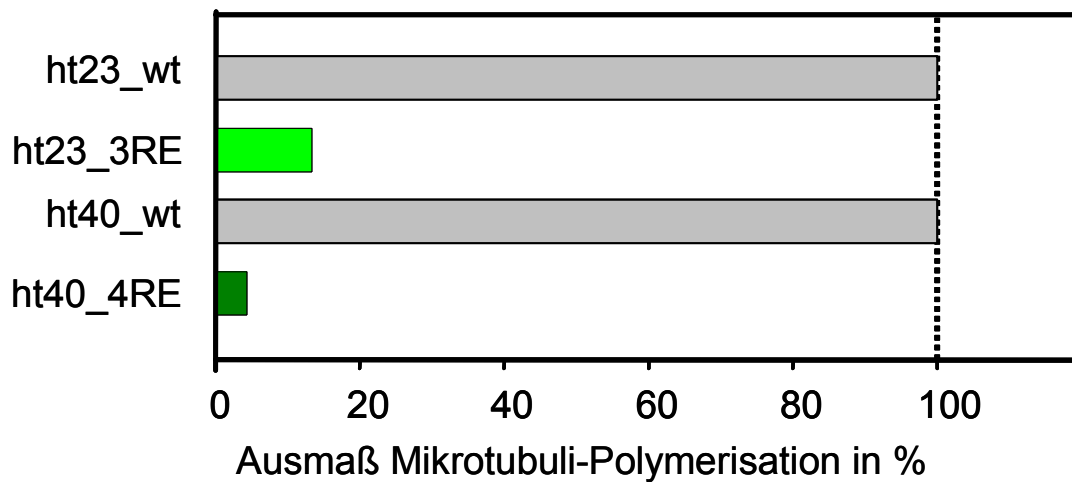


Abb. 36: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation für KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40.

Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion erfolgt wahrscheinlich durch die Wechselwirkungen der basischen Aminosäuren der Assemblierungsdomäne von Tau mit den sauren Aminosäuren des C-Terminus von β -Tubulin. Durch neuere Untersuchungen mittels NMR-Spektrometrie konnten die Interaktionsstellen im Tau-Protein weiter charakterisiert werden (Mukrasch *et al.*, 2005). Dabei wurden positiv geladene Dyaden oder Triaden am Ende der *Repeats* als besonders bedeutsam identifiziert. Die Serinreste der KXGS-Motive liegen vier oder fünf Aminosäuren von diesen entfernt. Kommt es zu einer Phosphorylierung der Serinreste innerhalb der KXGS-Motive oder zum Austausch der Aminosäuren in Glutamat, ist es möglich, dass es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Aminosäuren und der negativen Ladung der phosphorylierten Serinreste oder der KXGE-Motive kommt. Durch diese Wechselwirkung kann eine Turn-Struktur in diesem Sequenzbereich induziert werden, die die Interaktion der positiv geladenen Aminosäuren mit den Mikrotubuli verhindert (Abb. 37).

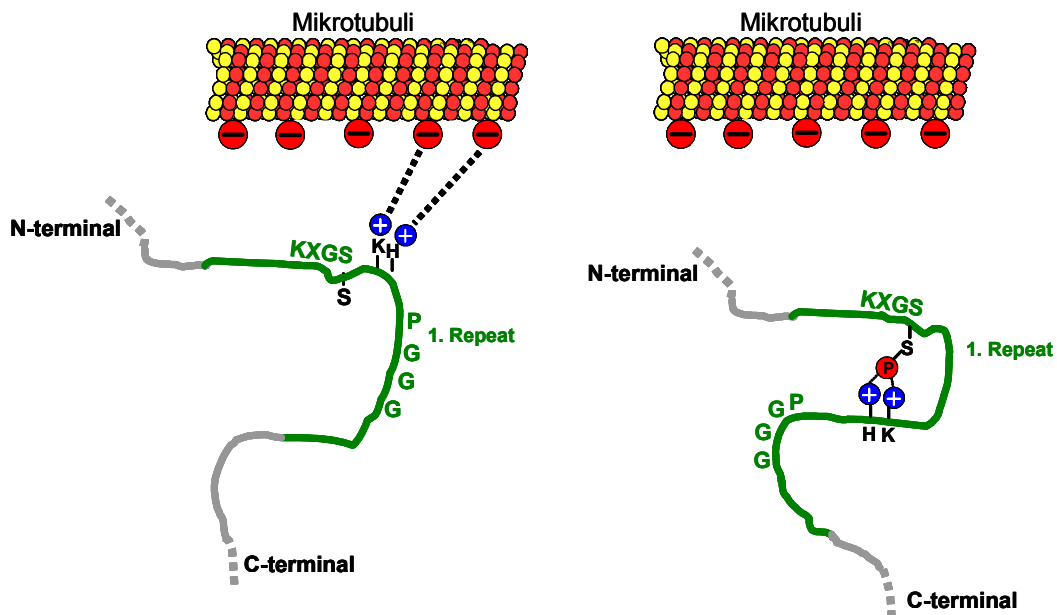


Abb. 37: Modell der Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Nach diesem Modell beruht die Interaktion von Tau (1. *Repeat*) mit den Mikrotubuli auf einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Aminosäuren Lysin 267 und Histidin 268, die vier Aminosäuren von der Phosphorylierungsstelle Serin 262 (1. *Repeat*) entfernt liegen, und den negativen Ladungen der Mikrotubuli. Durch die Phosphorylierung des Serins 262 interagieren die negativen Ladungen des Phosphatrestes mit den positiv geladenen Aminosäuren Lysin 267 und Histidin 268, die die Ausbildung einer Turn-Struktur stabilisieren, dadurch diese positiven Ladungen abschirmen und die Bindung von Tau an die Mikrotubuli sterisch verhindern.

4.1.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den *Repeats* auf die Aggregation von Tau

Die Aggregation von Tau kann *in vitro* durch Polyanionen beschleunigt werden (Perez *et al.*, 1996; Goedert *et al.*, 1996; Friedhoff *et al.*, 1998; Kampers *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997; King *et al.*, 1999; Chirita *et al.*, 2003). In Arbeiten anderer Gruppen wurden bis zu zehn Glutamatreste (S198E_S199E_S202E_T231E_S235E_S396E_S404E_S409E_S413E_S422E) in das Tau-Protein eingefügt. Diese E-Mutante konnte ohne Zugabe von Polyanionen nicht aggregieren (Eidenmüller *et al.*, 2000; Eidenmüller *et al.*, 2001).

Mittels NMR-Spektroskopie konnte der Mechanismus der Interaktion der *Repeats* von Tau mit Polyanionen (im Besonderen von Heparin und Poly-Glu) näher untersucht werden (Mukrasch *et al.*, 2005). Diese Studien zeigten, dass die Interaktion von Tau mit Polyanionen in zwei unterschiedlichen Motiven stattfinden. Dieselben positiv geladenen Motive, die an der Bindung an die Mikrotubuli beteiligt sind, binden auch an die Polyanionen Heparin und Poly-Glu (Abb. 38).

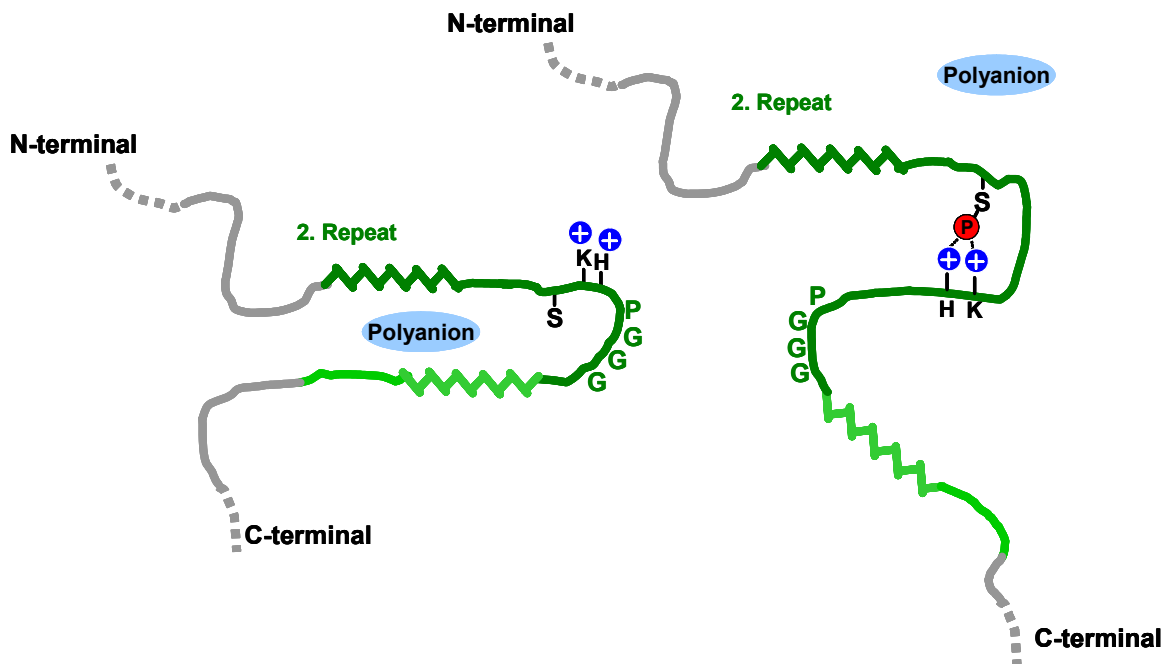


Abb. 38: Modell zur PHF-Aggregation. Durch die Phosphorylierung an den Serinresten der KXGS-Motive kommt es zur Ausbildung einer Turn-Struktur. Dadurch werden die geordneten Bereiche lokal distanziert. Die Bindung der Polyanionen ist behindert. Die Ausbildung der Turn-Struktur hat keinen Einfluss auf die geordneten Bereiche, dadurch kann es zur amorphen Aggregation kommen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Reduktion der PHF-Bildung in Anwesenheit des Polyanions Heparin für die KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 kommt (Abb. 9). Für die Induktion der PHF-Bildung mit Arachidonsäure ist die Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin S nicht geeignet, da es keine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenz und Aggregation gibt. Der Anstieg des ThS-Signals nach Induktion der PHF-Bildung mit Arachidonsäure nach einer Stunde geht nicht auf die Bildung von PHFs zurück (Barghorn und Mandelkow, 2002). Der Anstieg beruht vermutlich auf der Interaktion des Thioflavin S mit der Mizellen-Oberfläche. Die hier gezeigten Daten stimmen mit Erkenntnissen aus früheren Arbeiten überein (King *et al.*, 2000; Barghorn und

Mandelkow, 2002). Im Falle der Isoformen und deren KXGE-Mutanten ist das Signal erst nach drei Tagen auf Aggregatbildung zurückzuführen. Diese Aggregate können als amorphe Verklumpungen dokumentiert werden (siehe dazu Abb. 11 und 17). Es sind keine paarigen helikalen Filamente zu finden. Die Zunahme des ThS-Signals ist vermutlich mit der Kreuzreaktion des Fluoreszenzfarbstoffes zu erklären, der sich sowohl an β -Strukturen von Proteinen als auch an Mizellen von Fettsäuren anlagern kann. Daher kann im Fall der Induktion mit Arachidonsäure nicht auf die Art und das Ausmaß der Aggregation rückgeschlossen werden.

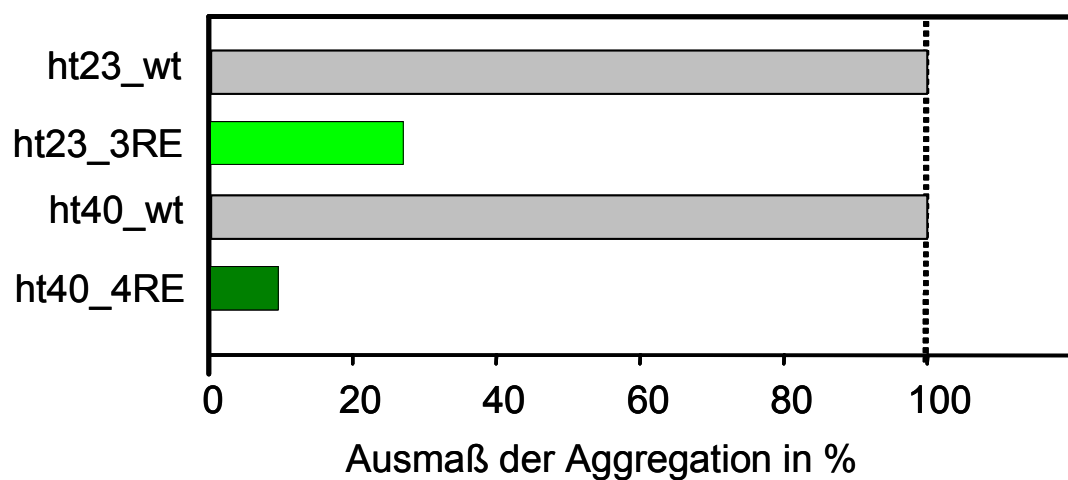


Abb. 39: Ausmaß der Aggregation der KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen ht23 und ht40 in Gegenwart des Polyanions Heparin.

Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich für die KXGE-Mutanten der Konstrukte K18 und K19, die nur aus den *Repeats* bestehen. Einerseits ist diese Region wesentlich an der Mikrotubuli-Bindung beteiligt (Butner und Kirschner, 1991; Gustke *et al.*, 1994; Goode und Feinstein, 1994), andererseits bildet diese Region den Kern der PHFs (Goedert *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988b; Jakes *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 1993). Konstrukte, die nur aus den *Repeats* der Mikrotubuli-Bindungsdomäne bestehen, polymerisieren schneller als Tau der Gesamtlänge (Wille *et al.*, 1992; Friedhoff *et al.*, 1998b; von Bergen *et al.*, 2000). Die Tau-Wildtyp-Konstrukte polymerisieren innerhalb von Stunden zu paarigen helikalen Filamenten, im Gegensatz von Tau-Isoformen, die einen längeren Zeitraum (mehrere Tage) dazu benötigen. Die KXGE-Konstrukte auf Basis der Tau-Isoformen zeigen generell ein vermindertes ThS-Signal nach Induktion der Polymerisation, wobei die Polyanionen

deutliche Unterschiede in der Effizienz der Polymerisationsrate aufweisen. Auch wenn Arachidonsäure als Polymerisationsförderer eingesetzt wurde und eine Erhöhung des ThS-Signals für K18_4RE messbar war, konnte dieses Signal allenfalls der Bildung amorpher Aggregate zugeschrieben werden und nicht, wie zunächst angenommen, der Bildung paariger helikaler Filamente. Alle Proben wurden elektronenmikroskopisch überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass weder die KXGE-Mutanten auf Basis der Isoformen noch die KXGE-Mutanten auf Basis der *Repeat*-Konstrukte paarige helikale Filamente bildeten.

Da K19_3RE eine starke Reduktion in der PHF-Bildung zeigt, sollte überprüft werden, ob diese Pseudo-Phosphorylierungen auch die PHF-Bildung von K19_wt beeinflussen. Schon bei einem Verhältnis von 10:1 (wt:KXGE-Mutante) wurde eine Reduktion der PHF-Bildung von ca. 40% gemessen. Wurde die Konzentration der KXGE-Mutante weiter erhöht, reduzierte sich die PHF-Bildung des Wildtyp-Proteins nahezu vollständig. Dies zeigt, dass die K19_3RE-Mutante die PHF-Bildung von Wildtyp-Tau „vergiften“ kann.

Weiterhin wurden Untersuchungen durchgeführt, welchen Einfluss die KXGE-Mutationen auf die Bindung von Heparin haben. Dabei wurden die Proteine in definierten Konzentrationen eingesetzt und die PHF-Bildung bei zunehmender Heparinkonzentration gemessen. Mit steigender Heparinkonzentration wurde eine Zunahme der PHF-Bildung gemessen (bis zu einer optimalen Konzentration vgl. Friedhoff *et al.*, 1998a). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Menge an Polyanionen, die zur Verfügung steht, von Bedeutung ist. Sie deuten darauf hin, dass E-Mutationen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* zwar die PHF-Bildung verhindern, aber keinen Einfluss auf die Heparin-Bindung haben. Diese Daten stützen die These, dass dieselbe Art der Phosphorylierung, die Tau von den Mikrotubuli ablöst, Tau gleichzeitig vor der Aggregation in die toxischen Filamente schützt (wie bereits früher im Labor gezeigt, Schneider *et al.*, 1999).

4.2 Einfluss von Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen

Die physiologische Bindung von Tau an Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung von Tau löst es vom Mikrotubulus ab, und macht diese labil und dynamisch. Tau-Protein aus Alzheimer Gehirnen ist hyperphosphoryliert. Um diesen Grad der Phosphorylierung zu erreichen, sind die Phosphorylierungen in den *Repeats* der Mikrotubuli-Bindungs-Region nicht ausreichend. Im Protein Tau gibt es bis zu 30 mögliche Phosphorylierungsstellen, die in unterschiedlichem Ausmaß von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden. Die Kinasen, die die flankierenden Bereiche der *Repeats* phosphorylieren sind größtenteils Prolin-gerichtete Kinasen wie MAPK, GSK3 β oder CDK2 und CDK5. Diese Kinasen können Serinreste, die C-terminal von einem Prolin gefolgt werden, phosphorylieren. Die flankierenden Bereiche der *Repeat*-Region sind reich an SP/TP-Motiven, so dass diese geeignete Substrate für Prolin-gerichtete Kinasen darstellen. Der Einfluss der Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion ist moderat (Biernat *et al.*, 1993) und dient eher der Feinregulation der Tau-Mikrotubuli-Interaktion. Anhand von Pseudo-Phosphorylierungen wurde der Effekt einzelner Phosphorylierungsstellen und deren Kombination auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion und die PHF-Bildung untersucht.

4.2.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der *Repeats* auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierungen der flankierenden Bereiche nur eine modulatorische Wirkung auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion haben (Biernat *et al.*, 1993). Die Ergebnisse aus den Experimenten mit den Pseudo-Phospho-Mutanten stimmen mit den Daten der physiologischen Phosphorylierungen überein. Die E-Mutation anstelle von Serin 235 hat keine Auswirkungen auf das Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation. Lediglich die $t_{1/2}$ -Zeit für die Bindung an die Mikrotubuli wird durch diese Mutation verdoppelt. Der Effekt der Pseudo-Phosphorylierung an Serin 231 zeigt nur einen moderaten Einfluss auf das endgültige Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation. Dass dieser Effekt nicht additiv ist, beweisen die

Ergebnisse der Doppelmutante ht23_S231E_S235E. Diese fördert die Mikrotubuli-Polymerisation in gleichem Ausmaß wie die jeweiligen Einzelmutanten.

E-Mutationen in der C-terminal flankierenden Region der *Repeats* haben einen geringfügig abschwächenden Effekt auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion als diejenigen in der P2-Region, trotzdem bleibt der Einfluss als moderat anzusehen (bis zu 30% Reduktion des Endsignals). Die Einzelmutante ht23_S396E bewirkt eine Reduktion (ca. 30%) im Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation. Die Pseudo-Phosphorylierung S404E führt zu einer Verdoppelung des $t_{1/2}$ -Wertes. Das Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der ht23_S404E-Mutante gleicht dem von ht23_wt (siehe dazu auch Abb. 40). Den deutlichsten Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion hat die Pseudo-Phosphorylierung des Serins 422. Diese Mutante hat einen negativen Einfluss sowohl auf das Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation (Reduktion des Endsignals um ca. 40%) als auch auf den $t_{1/2}$ -Wert von Tau (dreimal so hoch).

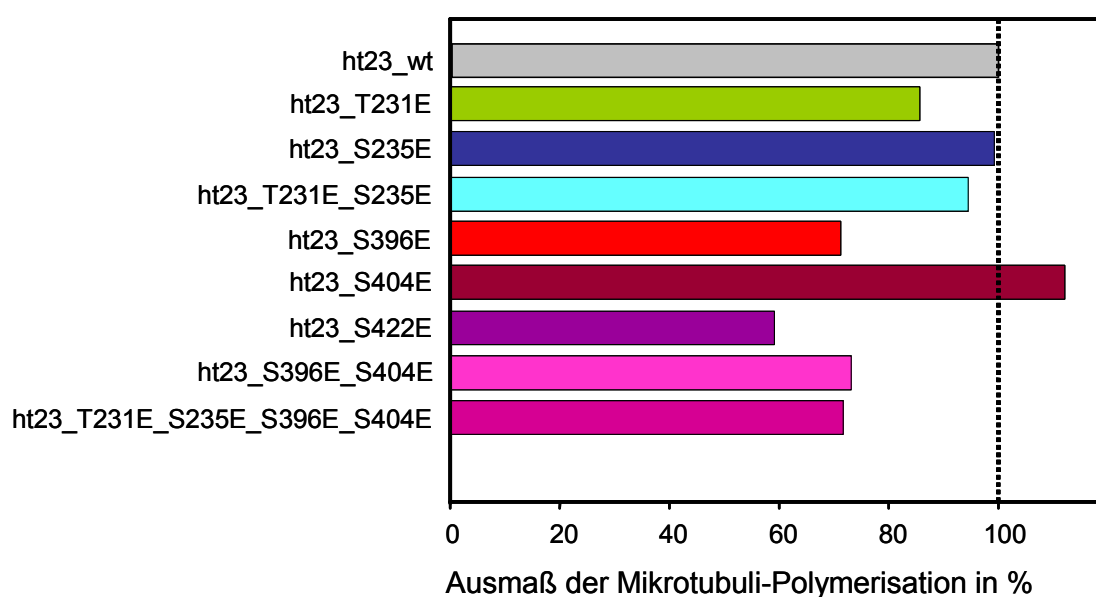


Abb. 40: Ausmaß der Mikrotubuli-Polymerisation der E-Mutanten der SP/TP-Motive auf ht23-Basis.

Dementsprechend ist auch der Einfluss der E-Mutanten gering, was darauf hindeutet, dass der Effekt der Phosphorylierung in den flankierenden Bereichen auf einer lokal begrenzten Interaktion beruht. Der Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der *Repeats* auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion ist moderat. Ein mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die Tau-Mikrotubuli-Interaktion biphasisch verläuft (Ackmann *et al.*, 2000). Die Serinreste in den *Repeats* dienen als Substrat der Kinasen, die sich als essentiell für die Mikrotubuli-Polymerisation herausgestellt haben. Die Phosphorylierungen der SP/TP-Motive in den flankierenden Bereichen der *Repeats* haben dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Mikrotubuli-Polymerisation (Schneider *et al.*, 1999).

4.2.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen der *Repeats* auf die PHF-Bildung

Der Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in der P2-Region auf die PHF-Bildung ist i. a. geringer als in den *Repeats* kann aber in Einzelfällen erheblich sein. Z. B. bewirkt die Einzelmutante ht23_T231E bewirkt eine Reduktion im Gesamtausmaß um ca. 55% (Abb. 41). Auch für die PHF-Bildung ist der Effekt der Pseudo-Phosphorylierungen T231E und S235E nicht additiv. Die Aminosäure Serin 235 ist einer der ersten Angriffspunkte der Prolin-gerichteten Kinase GSK3 β . Aus früheren *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass die Aminosäure Serin 235 durch Prolin-gerichtete Kinasen wie CDK5, GSK3 β oder MAP-Kinase zu einem frühen Zeitpunkt in der Phosphorylierungskaskade und bis zu 80% phosphoryliert wird (Schneider *et al.*, 1999). Ob diese Phosphorylierung die Aggregation stimuliert, ist noch unklar. Die Beschleunigung der PHF-Bildung weist auf jeden Fall auf eine verbesserte Nukleation hin, was auch übereinstimmt mit den kurzen Filamenten, die die ht23_S235E-Mutante bildet (siehe Abb. 24). Erst nach der Phosphorylierung von Serin 235 kommt es in der Kaskade *in vitro* zur geringfügigen Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 231, die sich negativ auf die PHF-Bildung auswirkt.

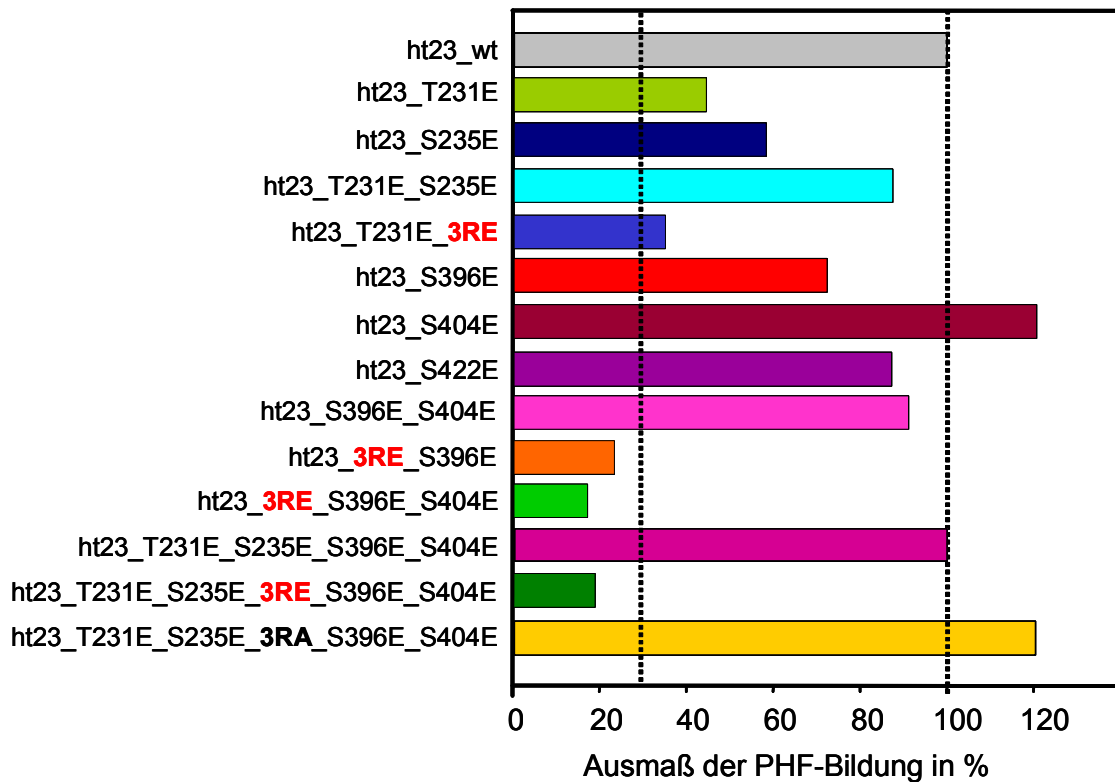


Abbildung 41: Ausmaß der PHF-Bildung der E-Mutanten auf ht23-Basis in Anwesenheit des Polyanions Heparin.

Der Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in der C-terminal flankierenden Region der *Repeats* hat nur einen geringen Einfluss auf die Beschleunigung der PHF-Bildung. Während die Einzel-Mutanten ht23_S396E und ht23_S422E eine Reduktion der PHF-Bildung (Reduktion um ca. 20-30%) im Gesamtausmaß verursachen, bewirkt die Pseudo-Phospho-Mutante ht23_S404E eine leichte Steigerung der PHF-Bildung von ca. 20%. Die Aminosäure Serin 404 ist ebenso wie die Aminosäure Serin 235 eine der ersten Angriffspunkte in der Phosphorylierungskaskade der Prolin-gerichteten Kinasen (CDK5, MAPK, GSK3 β). Es ist auffällig, dass beide Stellen, die zu einem frühen Zeitpunkt in der Kaskade phosphoryliert vorliegen (S235 und S404), die PHF-Nukleation beschleunigen (ht23_S235E) und im Fall von ht23_S404E das Ausmaß der PHF-Bildung positiv beeinflusst ist (siehe dazu Abb. 41).

Andere Daten lassen vermuten, dass die Aminosäure Serin 422 eine Sonderstellung einnimmt (da die Pseudo-Phosphorylierung an Serin 422 einen positiven Effekt auf die PHF-Bildung hat, Haase *et al.*, 2004). Aus unseren Untersuchungen wird jedoch deutlich, dass die Pseudo-Phosphorylierung an Serin 422 einen negativen Einfluss

sowohl auf die Tau-Mikrotubuli-Polymerisation als auch auf die PHF-Bildung hat. Das stimmt mit anderen Daten überein, die belegen, dass der Einfluss der Phosphorylierung an Serin 422 ohne eine weitere Modifizierung (wie zum Beispiel die Abspaltung des C-Terminus durch Caspase 3 an Aminosäure 421) eine geringfügig abschwächende Wirkung hat (Canu *et al.*, 1998; Fasulo *et al.*, 2000; Gambin *et al.*, 2003; Rissmann *et al.*, 2004). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass der abschwächende Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in der C-terminalen Region auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion und die PHF-Bildung abhängig von der Stelle der Mutation ist (Haase *et al.*, 2004). Das konnte durch elektronenmikroskopische Kontrolle der PHF-Ansätze dokumentiert werden (siehe dazu Abb. 27). Die Einzel-Mutante ht23_S404E bildet paarige helikale Filamente, die sich zu Bündeln miteinander verbinden. Das könnte die nur leichte Steigerung des ThS-Signals erklären, denn die zusammen gelagerten PHFs bieten so nur eine geringe Anlagerungsfläche für den Fluoreszenzfarbstoff. Ebenso könnte die Bündelung eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen ThS-Signal und elektronenmikroskopischer Untersuchung für die Doppelmutante ht23_S396E_S404E sein. Die Morphologie der ht23_S422E-Mutante ist dagegen völlig anders geartet. Diese Mutante bildet paarige helikale Filamente, die sich in gekrümmter Form darstellen. Die gleichzeitigen E-Mutationen in den SP/TP-Motiven vor und nach den *Repeats* haben keinen Einfluss auf die PHF-Bildung.

4.3.1 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen und der *Repeats* auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion

Werden zusätzlich zu den Pseudo-Phosphorylierungen weitere Mutationen in den flankierenden Bereichen eingeführt, dominiert der Effekt der Pseudo-Phosphorylierung in der *Repeat*-Region. Die Tau-Mikrotubuli-Bindung ist stark geschwächt. Der inhibitorische Effekt der KXGE-Pseudo-Phosphorylierung kann nicht durch die E-Mutation in den flankierenden Bereichen aufgehoben werden. Die Pseudo-Phospho-Mutante (ht23_3RE_S396E_S404E) ist unter den verwendeten Bedingungen nicht in der Lage, Mikrotubuli zu stabilisieren. Da aber bekannt ist, dass auch die flankierenden Bereiche die Tau-Mikrotubuli-Interaktion zwar schwach aber doch negativ beeinflussen, war dieses Ergebnis zu erwarten.

4.3.2 Einfluss der Pseudo-Phosphorylierungen in den flankierenden Bereichen und der *Repeats* auf die PHF-Bildung

Die PHF-Bildung der KXGE-Mutanten ist stark reduziert. Zusätzliche Pseudo-Phosphorylierungen sollten den hyperphosphorylierten Zustand von Tau imitieren, der als Ursache für die toxische Aggregation diskutiert wird. In den kinetischen Daten der Pseudo-Phospho-Mutanten ht23_T231E_3RE, ht23_3RE_S396E und ht23_3RE_S396E_S404E wurde gefunden, dass es zu einer erniedrigten PHF-Bildung kam. Bei der Kontrolle im Elektronenmikroskop zeigten diese Mutanten dennoch größtenteils die paarig helikale Morphologie im Gegensatz zu Pseudo-Phospho-Mutanten, die nur E-Mutationen in den KXGS-Motiven enthielten und amorphe Aggregate aufwiesen. Der inhibitorische Effekt der KXGE-Pseudo-Phosphorylierung kann durch die E-Mutation in dem flankierenden Bereich folglich nicht aufgehoben werden. Werden zusätzlich zu den *Repeat*-Pseudo-Phosphorylierungen vier der flankierenden SP/TP-Stellen (T231; S235; S396 und S404) durch E-Mutationen ersetzt, führen diese zu einer reduzierten PHF-Bildung. Diese Mutante bildet amorphe Aggregate, die denen der KXGE-Mutanten gleichen. Die Untersuchung weiterer E-Mutationen, die den hyperphosphorylierten Zustand von Tau imitieren, stützen die *in vitro* Daten, dass Tau-Protein durch die Phosphorylierung, die Tau von den Mikrotubuli ablöst, vor der Aggregation geschützt wird (Schneider *et al.*, 1999). Einen weiteren Hinweis darauf geben die Ergebnisse, die sich durch die Einführung von Alanin-Mutationen in den KXGS-Motiven und E-Mutationen in den flankierenden Bereichen ergeben. Diese Mutante bildet schneller und mit einem leicht erhöhten Ausmaß PHFs als das Wildtyp-Protein. Die Alanin-Mutationen in den KXGS-Motiven der *Repeats* verändern die Nettoladung nicht, da sowohl Alanin als auch Serin ungeladene Aminosäuren sind. Dieser Austausch führt aber zu einer geringfügigen Erhöhung der Hydrophobizität. Offensichtlich beschleunigt das die ersten Schritte der PHF-Bildung.

Die Ergebnisse der Pseudo-Phosphomutanten weisen darauf hin, dass der hyperphosphorylierte Zustand nicht als Ursache für die toxische Aggregation angesehen werden kann. Das stimmt mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, die ebenfalls mehrere E-Mutationen (zehn) in das Protein Tau eingeführt haben und eine reduzierte PHF-Bildung in Anwesenheit von

Polymerisationsinduktoren messen konnten (Eidenmüller *et al.*, 2001). Sie stützen die These, dass die Phosphorylierung die das Tau von den Mikrotubuli ablöst, es gleichzeitig vor der Aggregation in die paarigen helikalen Filamente schützt (Schneider *et al.*, 1999). Zu untersuchen bleibt, ob diese amorphen Aggregate *in vitro* wie auch *in vivo* toxisch sind und leichter abzubauen sind, als die sehr resistenten PHFs.

Durch die Untersuchung dieser grundlegenden Mechanismen bieten sich Möglichkeiten, die toxischen Aggregate einerseits in den ersten Schritten der pathologischen Aggregation zu unterbinden und andererseits Medikamente zu finden, die die entstandenen Aggregate wieder auflösen können.

Durch die hier vorgelegten Untersuchungen konnte die Frage nach dem Einfluss von Pseudophosphorylierungen auf die Bindung von Tau an Mikrotubuli und auf die PHF-Bildung aufgeklärt werden. Diese Ergebnisse ermöglichen einen Einblick in die Pathogenese des Tau-Proteins und tragen zum besseren Verständnis der molekularen Prozesse in der Alzheimer-Krankheit bei.

V Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion und auf die pathologische Aggregation mittels Pseudo-Phosphorylierungen untersucht (Mutationen Ser → Glu bzw. Thr → Glu). Der Effekt der Phosphorylierungsstellen in den KXGS-Motiven innerhalb der *Repeats* und in den SP/TP-Motiven der flankierenden Bereiche wurde mit Hilfe eines Tau-Mikrotubuli-Bindungsassays untersucht. Die Kinetik der Tau-Aggregation in paarige helikale Filamente wurde mit einem Fluoreszenz-Assay und mit Elektronenmikroskopie überprüft. Der Austausch der Aminosäuren als Einzel-, Doppel- oder Kombinationsmutationen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese. Die rekombinanten Proteine wurden aus *E. coli*-Zellen gereinigt.

Die Pseudo-Phosphorylierungen der KXGE-Motive innerhalb der *Repeat*-Domäne von Tau haben einen stark negativen Einfluss sowohl auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion als auch auf die Aggregation in die paarigen helikalen Filamente. KXGE-Mutanten auf der Basis der untersuchten Isoformen und Konstrukte zeigen eine geringe Tendenz zur Aggregation und bilden allenfalls amorphe Aggregate statt PHFs. Dabei haben zusätzliche E-Mutationen in den flankierenden Bereichen der *Repeat*-Domäne keinen Einfluss auf diesen Effekt.

Die Pseudo-Phosphorylierungen in den SP/TP-Motiven in den N- und C-terminal flankierenden Bereichen der *Repeats* haben sowohl auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktion als auch auf die Aggregation in die paarigen helikalen Filamente nur einen moderaten Einfluss. Die E-Mutanten in den SP/TP-Motiven zeigen im Elektronenmikroskop die typische Morphologie der paarigen helikalen Filamente.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die physiologische Tau-Mikrotubuli-Wechselwirkung und die pathologische Tau-Tau-Wechselwirkung in ähnlicher Weise durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Dies unterstützt die Annahme, dass die beiden Arten der Wechselwirkung von Tau auf ähnlichen Sequenzmotiven beruhen.

VI Literaturverzeichnis

Abraha, A., N. Ghoshal, T. C. Gamblin, V. Cryns, R. W. Berry, J. Kuret und L. I. Binder (2000). "C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease." *J. Cell Sci.* **113 Pt 21**: 3737-3745.

Ackmann, M., H. Wiech und E. Mandelkow (2000). "Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation." *J. Biol. Chem.* **275**(39): 30335-30343.

Alonso, A. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. und K. Iqbal (2001). „Hyperphosphorylation induces self-assembly of Tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." *PNAS* (98): 6923–6928.

Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg. Z. Psychiatrie* **64**: 146-148.

Anderton, B. H. (1993). Expression and processing of pathological proteins in Alzheimer's disease." *Hippocampus* **3**: 227-237.

Andreadis, A., W. M. Brown und K. S. Kosik (1992). "Structure and novel exons of the human tau gene." *Biochemistry* **31**: 10626-10633.

Andreadis, A., J. A. Broderick und K. S. Kosik (1995). "Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons." *Nucleic Acids Res.* **23**(17): 3585-3593.

Baas, P. W., T. P. Pienkowski und K. S. Kosik (1991). "Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization." *J. Cell Biol.* **115**(5): 1333-1344.

Barghorn, S. und Mandelkow, E. (2002). Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry* **41**, 14885-14896.

Baudier, J. und R. D. Cole (1987). "Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids." *J. Biol. Chem.* **262**(36): 17577-17583.

Baumann, K., E. M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms und E. Mandelkow (1993). "Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5." *FEBS Lett.* **336**(3): 417-424.

Berne, B. J. (1974). "Interpretation of the Light Scattering from Long Rods." *J. Mol. Biol.* **89**, 755-758.

Biernat, J., E. M. Mandelkow, C. Schröter, B. Lichtenberg-Kraag, B. Steiner, B. Berling, H. E. Meyer, M. Mercken, A. Vandermeeren, M. Goedert und E. Mandelkow (1992). "The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region." *EMBO J.* **11**: 1593-1597.

Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1993). "Phosphorylation of serine 262 strongly reduces the binding of tau protein to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding." *Neuron* **11**: 153-163.

Biernat, J. und E. M. Mandelkow (1999). "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**(3): 727-740.

Biernat, J., Wu, Y. Z., Timm, T., Zheng-Fischhofer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., Mandelkow, E.-M. (2002). „Protein kinase MARK/par-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity.“ *Mol. Biol. Cell* (**13**): 4013-4028.

Binder, L. I., A. Frankfurter und L. I. Rebhun (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." *J. Cell Biol.* **101**(4): 1371-1378.

Binder, L. I., A., Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F. und R. W. Berry (2005). „Tau, tangles, and Alzheimer's disease.“ *Biochim Biophys Acta* (**1739**): 216-223.,

Braak, H. und E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol.* **82**: 239-259.

Braak, E., H. Braak und E. M. Mandelkow (1994). "A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads." *Acta Neuropathol* **87**(6): 554-567.

Braak, H., Braak, E. (1997a). "Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* **18**: 85-88.

Braak, H., Braak, E. (1997b). "Staging of Alzheimer-related cortical destruction." *Int. Psychogeriatr.* **9**: 257-272.

Brandt, R., G. Lee, D. B. Teplow, D. Shalloway und M. Abdelghany (1994). "Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation." *J. Biol. Chem.* **269**: 11776-11782.

- Brion, J., Passareiro, H., Nunez, J., Flament-Durand, J. K. (1985). „Mise en evidence immologique de la proteine tau au niveau des lesions de degenescence neurofibrillaire de la maldie d'Alzheimer.“ Arch. Biol. **95**: 229-235.
- Buee, L. und A. Delacourte (1999). “Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease.” Brain Pathol **9**(4): 681-693.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte und P. R. Hof (2000). “Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.” Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.
- Bulinski, J. C. und G. G. Borisy (1979). “Self-assembly of microtubules in extracts of cultured HeLa cells and the identification of HeLa microtubule-associated proteins.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**(1): 293-297.
- Butner, K. A. und M. W. Kirschner (1991). “Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites.” J. Cell Biol. **115**(3): 717-730.
- Butner, M., Shelanski, M. L. (1986). “Microheterogeneity of microtubule-associated tau-proteins is due to differences in phosphorylation.” J. Neurochem. **47**: 1517-1522.
- Byler, D. M. und H. Susi (1986). “Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra.” Biopolymers **25**(3): 469-487.
- Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M. T., Brancolini, C., Rinaldi, A. M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A. und P. Calissano (1998). “Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis.” J Neurosci. **18** (18): 7061-7074.
- Cassimeris, L. und Spittle, C. (2001) Regulation of microtubule-associated proteins, Int Rev Cytol **210**, 163-226.
- Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan und N. Hirokawa (1992). “Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons.” Nature **360**(6405): 674-677.
- Chirita, C. N., Necula, M. und J. Kuret (2003). “Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro.” J Biol. Chem (**28**): 25644-25650.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg und D. J. Selkoe (1992). “Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production.” Nature **360**(6405): 672-674.

Cleveland, D. W., S. Y. Hwo und M. W. Kirschner (1977). "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly." *J. Mol. Biol.* **116**(2): 227-247.

Corder, E. H., A. M. Saunders, N. J. Risch, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, Jr., J. B. Rimmler, P. A. Locke, P. M. Conneally, K. E. Schmechel und et al. (1994). "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease." *Nat. Genet.* **7**(2): 180-184.

Correas, I., J. Diaz-Nido und J. Avila (1992). "Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain." *J. Biol. Chem.* **267**(22): 15721-15728.

Couchie, D., C. Mavilia, I. Georgieff, R. Liem, M. Shelanski und N. J. (1992). "Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 4378-4381.

Crowther, R. A. (1991). "Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 2288-2292.

Cunningham, C. C., N. Leclerc, L. A. Flanagan, M. Lu, P. A. Janmey und K. S. Kosik (1997). "Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line." *J. Cell Biol.* **136**(4): 845-857.

Downing, KH. und Nogales, E. (1999) "Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding." *Cell Struct Funct* **24**(5), 269-75.

Drewes, G., B. Lichtenberg-Kraag, F. Doring, E. M. Mandelkow, J. Biernat, J. Goris, M. Doree und E. Mandelkow (1992). "Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state." *Embo J* **11**(6): 2131-2138.

Drewes, G., Mandelkow, E.-M., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., Mandelkow, E. (1993). „Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A." *FEBS Letters* **336**: 425-432.

Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1995). "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**(13): 7679-7688.

- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. (1997). MARK - a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption, *Cell* **89**, 297-308.
- Drewes, G., Ebner, A., Mandelkow, E.-M. (1998) MAPs, MARKs, and microtubule dynamics, *Trends in Biochem. Sci.* **23**, 307-311.
- Drubin, D. G. und M. W. Kirschner (1986). "Tau Protein Function in Living Cells." *J. Cell Biol.* (**103**): 2739-2746.
- Eidenmüller, J., Fath, T., Hellwig, A., Reed, J., Sontag, E., Brandt, R., (2000) Structural and Functional Implications of Tau Hyperphosphorylation: Information from Phosphorylation- Mimicking Mutated Tau Proteins, *Biochemistry* **39**, 13166-13175.
- Eidenmüller, J., Fath, T., Maas, T., Pool, M., Sontag, E. und R. Brandt (2001). „Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein." *Biochem. J.* (357): 759-767.
- Esler, W. P. und M. S. Wolfe (2001). "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces." *Science* **293**(5534): 1449-1454.
- Esmali-Azad, B., J. H. McCarty und S. C. Feinstein (1994). "Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability." *J. Cell Sci.* **107**(Pt 4): 869-879.
- Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., Novak, M. und A. Cattaneo (2000). "The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis." *J Neurochem* **75** (2): 624-633.
- Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. und J. Nunez (1977). "Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors." *Europ. J. Biochem.* (**78**):167-174.
- Foster, N. L., K. Wilhelmsen, A. A. Sima, M. Z. Jones, C. J. D'Amato und S. Gilman (1997). "Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference." *Ann. Neurol.* **41**(6): 706-715.
- Friedhoff, P., A. Schneider, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1998a). "Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution." *Biochemistry* **37**(28): 10223-10230.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, E. M. Mandelkow, P. Davies und E. Mandelkow (1998b). "A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(26): 15712-15717.

Gamblin, T. C., Berry, R. W. und L. I. Binder (2003). „Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis.“ *Biochemistry* **42** (51):15009-15017.

Garcia, M. L. und D. W. Cleveland (2001). „Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease.“ *Curr. Opin Cell Biol.* (1):41-48.

Garner, C. C., Tucker, R. P. und A. Matus (1988). „Selective Localisation of Messenger RNA for Cytoskeletal Protein MAP2 in Dendrites.“ *Nature* (**336**): 674-677.

Gaskin, F., Cantor, C. R. and Shelanski, M. L. (1974). „Turbidimetric Studies of the in vitro Assembly and Disassembly of Porcine Neurotubules.“ *J. Mol. Biol.* **89**, 737-758.

Gilleard, C. J., J. M. Kellett, J. A. Coles, P. M. Millard, M. Honavar und P. L. Lantos (1993). „The St. George's dementia bed investigation study: cardiovascular, neurological and neuropsychological correlates.“ *Acta Psychiatr Scand* **87**(4): 273-278.

Godemann, R. (1999). „Funktionelle Untersuchungen des Tau-Proteins: Einfluss auf den Mikrotubuli-abhängigen Transport und in vitro Phosphorylierung.“ Diplomarbeit

Goedert, M., C. Wischik, R. Crowther, J. Walker und A. Klug (1988). „Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4051-4055.

Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford und R. A. Crowther (1989). „Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.“ *Neuron* **3**(4): 519-526.

Goedert, M. und R. Jakes (1990). „Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization.“ *Embo J* **9**(13): 4225-4230.

Goedert, M., R. A. Crowther und C. C. Garner (1991). „Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2.“ *Trends Neurosci.* **14**(5): 193-199.

Goedert, M., G. Spillantini, N. J. Cairns und R. A. Crowther (1992a). „Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms.“ *Neuron* **8**: 159-168.

- Goedert, M., M. G. Spillantini und R. A. Crowther (1992b). "Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous-system." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 1983-1987.
- Goedert, M., R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Hasegawa, M. J. Smith und R. A. Crowther (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans." Nature **383**(6600): 550-553.
- Goode, B. L. und S. C. Feinstein (1994). "Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau." J. Cell Biol. **124**(5): 769-782.
- Gong, C. X., S. Shaikh, J. Z. Wang, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal und K. Iqbal (1995). "Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain." J. Neurochem. **65**(2): 732-738.
- Greenberg, S. G. und P. Davies (1990). "A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**(15): 5827-5831.
- Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* **8**, 4108-4116.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi und H. M. Wisniewski (1986a). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." J. Biol. Chem. **261**(13): 6084-6089.
- Gustke, N., B. Steiner, E. M. Mandelkow, J. Biernat, H. E. Meyer, M. Goedert und E. Mandelkow (1992). "The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs." FEBS Lett. **307**(2): 199-205.
- Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1994). "Domains of Tau protein and interactions with microtubules." Biochemistry **33**: 9511-9522.
- Haase, C., Stieler, J. T., Arendt, T. und M. Holzer (2004). „Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation." Journal of Neurochemistry (88): 1509–1520.
- Hagestedt, T., Lichtenberg, B., Wille, H., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. (1989). „Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: Correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation." J. Cell Biol. **109**: 1643-1651.

- Hanger, D. P., K. Hughes, J. R. Woodgett, J. P. Brion und B. H. Anderton (1992). "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**(1): 58-62.
- Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda und N. Hirokawa (1994). "Altered microtubule organization in smallcalibre axons of mice lacking tau protein." *Nature* **369**(6480): 488-491.
- Hardy, J. (1997a). "The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**(6): 2095-2097.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M. Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. und Y. Ihara (1992). „Protein Sequence and Mass Spectrometric Analysis of Tau in the Alzheimer's Disease Brain." *J. Biol. Chem.* (**267**): 17047-17054.
- Haupt, M., A. Kurz, S. Pollmann und B. Romero (1992). "Psychopathologische Störungen bei beginnender Alzheimerscher Krankheit." *Fortschr Neurol Psychiatr* **60**(1): 3-7.
- Herzog, W. und K. Weber (1978). "Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro." *Eur. J. Biochem.* **92**(1): 1-8.
- Heukeshoven, J. und R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* **9**(1): 28-32.
- Himmler, A. (1989). "Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family." *Mol. Cell. Biol.* **9**(4): 1389-1396.
- Hirokawa, N., Y. Shiomura und S. Okabe (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." *J. Cell Biol.* **107**(4): 1449-1459.
- Hirokawa, N. und Takemura, R. (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons, *Nat Rev Neurosci* **6**(3), 201-14.
- Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. M. Kwon, P. Nowotny, P. Heutink und et al. (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." *Nature* **393**(6686): 702-705.

- Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek B., Biernat, J., Meyer, H.E., Olmsted, J.B., Mandelkow, E.-M. und E. Mandelkow (1996). „Phosphorylation of microtubule associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110/mark: phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics.” *J. Biol. Chem.* (271): 10834-10843.
- Illenberger, S., Q. Zheng-Fischhofer, U. Preuss, K. Stamer, K. Baumann, B. Trinczek, J. Biernat, R. Godemann, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1998). “The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease.” *Mol. Biol. Cell* **9**(6): 1495-1512.
- Iqbal, K., Alonso, A. C., Gong, C. X., Khatoon, S., Pei, J. J., Wang, J. Z. und I. Grundke-Iqbal (1998). „Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles.” *J. Neural. Transm. Suppl.* (**53**): 169-180.
- Iqbal K, und I. Grundke-Iqbal (2004).“ Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies.” *Curr Drug Targets* (**6**): 495-502.
- Jackson, G. S. und A. R. Clarke (2000). “Mammalian prion proteins.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**(1): 69-74.
- Jakes, R., M. Novak, M. Davison und C. M. Wischik (1991). “Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease.” *EMBO J.* **10**: 2725-2729.
- Kampers, T., P. Friedhoff, J. Biernat und E. M. Mandelkow (1996). “RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein-tau into Alzheimer-like paired helical filaments.” *FEBS Lett.* **399**(3): 344-349.
- Kampers, T., Pangalos, M., Geerts, H., Wiech, H. und E. Mandelkow (1999). „Assembly of paired helical filaments from mouse tau: Implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease.” *FEBS Letters* (**451**): 39-44.
- Kidd, M. (1963). “Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease.” *Nature* **197**: 192-193.
- King, M. E., V. Ahuja, L. I. Binder und J. Kuret (1999). “Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression.” *Biochemistry* **38**(45): 14851-14859.
- King, M. E., T. C. Gamblin, J. Kuret und L. I. Binder (2000). “Differential assembly of human tau isoforms in the presence of arachidonic acid.” *J. Neurochem.* **74**(4): 1749-1757.

- Knops, J., K. S. Kosik, G. Lee, J. D. Pardee, L. Cohen-Gould und L. McConlogue (1991). "Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes." *J. Cell Biol.* **114**(4): 725-733.
- Kondo, J., T. Honda, H. Mori, Y. Hamada, R. Miura, M. Ogawara und Y. Ihara (1988). "The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments." *Neuron* **1**: 827- 834.
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (1993). "Microtubule-associated protein tau Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease." *J Biol Chem.* **268**(32): 24374-24384.
- Kosik, K. S. und E. A. Finch (1987). "MAP2 and Tau Segregate into Dendritic and Axonal Domains after the Elaboration of Morphologically Distinct Neurites: an Immunchemical Study." *J. Neurosci.* (**7**): 3142-3153.
- Kosik, K. S., C. L. Joachim und D. J. Selkoe (1986). "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**(11): 4044-4048.
- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, S. Bakalis und R. L. Neve (1989). "Developmentally regulated expression of specific tau sequences." *Neuron* **2**(4): 1389-1397.
- Ksiezak-Reding, H., W. K. Liu und S. H. Yen (1992). "Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments." *Brain Res.* **597**(2): 209-219.
- Kurz, A., M. Haupt, E. M. Hofmeister, S. Pollmann, B. Romero, K. Ulm und R. Zimmer (1991). "Das Erscheinungsbild der Alzheimer-Krankheit im täglichen Leben." *Nervenarzt* **62**(5): 277-282.
- Kurz, A. (1997). "Neurobiologie, Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit." In: Wächtler C., Demenzen, Thieme.
- Ladner, C. J., J. Czech, J. Maurice, S. A. Lorens und J. M. Lee (1996). "Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes." *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**(8): 924-931.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-685.
- Lee, V. M., B. J. Balin, L. Otvos, Jr. und J. Q. Trojanowski (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau." *Science* **251**(4994): 675-678.

- Lee, G. und S. L. Rook (1992). "Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization." *J. Cell Sci.* **102**(Pt 2): 227-237.
- Lee, G., Newman, S. T., Gard, D.L., Band, H. und Panchamoorthy, G. (1998). "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine-kinases." *J. Cell Sci.* (111): 3167-3177.
- Lichtenberg-Kraag, B., E. M. Mandelkow, J. Biernat, B. Steiner, C. Schroter, N. Gustke, H. E. Meyer und E. Mandelkow (1992). "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**(12): 5384-5388.
- Lindwall, G. und R. D. Cole (1984a). "Phosphorylation affects the ability of Tau protein to promote microtubule assembly." *J. Biol. Chem.* **259**: 5301-5305.
- Lindwall, G. und R. D. Cole (1984b). "The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain." *J. Biol. Chem.* **259**(19): 12241-12245.
- Littauer, U. Z., Giveon, D., Thierauf, M. Ginzburg, I. und H. Ponstingl (1986). "Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins." *Proc. Acad. Sci.* (83):7162-7166.
- Litersky, J. M., Johnson, G. V., Jakes, R., Godert, M., Lee, M. und P. Seubert (1996). "Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356." *Biochem. J.* (**316**): 655-660.
- Liu, C. W., G. Lee und D. G. Jay (1999). "Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons." *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**(3): 232-242.
- Liu, W. K., R. T. Williams, F. L. Hall, D. W. Dickson und S. H. Yen (1995). "Detection of a Cdc2-related kinase associated with Alzheimer paired helical filaments." *Am. J. Pathol.* **146**(1): 228-238.
- Lovestone, S. und C. H. Reynolds (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." *Neuroscience* **78**(2): 309-324.
- Mandelkow, E. M., M. Herrmann und U. Ruhl (1985). "Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies." *J. Mol. Biol.* **185**(2): 311-327.
- Mandelkow, E. M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede und E. Mandelkow (1992). "Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau." *FEBS Lett.* **314**(3): 315-321.

- Mandelkow, E. und E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**(1): 72-81.
- Matsudaira, P. T. und D. R. Burgess (1978). "SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal. Biochem.* **87**(2): 386-396.
- Mawal-Dewan, M., J. Henley, A. Van de Voorde, J. Q. Trojanowski und V. M. Lee (1994). "The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases." *J. Biol. Chem.* **269**(49): 30981-30987.
- Moreno, F. J., Munoz-Montano, J. R. und J. Avila (1996). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylation in different residues in the presence of different factors: analysis on tau protein." *Mol. Cell Biochem.* (**165**): 47-54.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., Ihara, Y. (1995) Hyperphosphorylation of Tau in PHF, *Neurobiology of aging* **16**(3), 365-80.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani und Y. Ihara (1995). "Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau." *J. Biol. Chem.* **270**(2): 823-829.
- Morishima-Kawashima M. und Ihara Y. (2002) Alzheimer's Disease: β -Amyloid Protein and Tau, *Journal of Neuroscience Research* **70**, 392-401.
- Mukrasch MD, Biernat J, von Bergen M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. (2005) Sites of TAU important for aggregation populate beta -structure and bind to microtubules and polyanions *J Biol Chem.* 2005 Apr 26; in press
- Murphy, D. B. und Borisy, G. G. (1975). "Association of High Molecular Weight Proteins with Microtubules and their role in Microtubule Assembly in vitro." *Proc. Natl. Acad. Sci.* (**72**): 2696-2700.
- Necula, M. und J. Kuret (2004). "Pseudophosphorylation and Glycation of Tau Protein Enhance but Do Not Trigger Fibrillization in Vitro." *J. Biol. Chem* (279): 49694-49703.
- Neve, R. L., P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit und T. A. Donlon (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." *Brain Res.* **387**(3): 271-280.
- Novak, M., J. Kabat und C. M. Wischik (1993). "Molecular characterization of the minimal protease resistant tau-unit of the Alzheimer's-disease paired helical filament." *EMBO J.* **12**: 365-370.

- Paudel, H. K., J. Lew, Z. Ali und J. H. Wang (1993). "Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments." *J. Biol. Chem.* **268**(31): 23512-23518.
- Perez, M., J. M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejó de Garcini und J. Avila (1996). "Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction." *J. Neurochem.* **67**(3): 1183-1190.
- Perry G, Kawai M, Tabaton M, Onorato M, Mulvihill P, Richey P, Morandi A, Connolly JA und P. Gambetti. (1991). "Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton." *J Neurosci.* (**6**):1748-55.
- Pierre, M. und J. Nunez (1983). "Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**(1): 212-219.
- Pope, W., S. A. Enam, N. Bawa, B. E. Miller, H. A. Ghanbari und W. L. Klein (1993). "Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system." *Exp. Neurol.* **120**(1): 106-113.
- Rajagopalan, S. und J. K. Andersen (2001). „Alpha synuclein aggregation: is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease?" *Mech Ageing Dev.* (14): 1499-1510.
- Riederer, B. und A. Matus (1985). "Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**(17): 6006-6009.
- Rissman, R. A., Poon, W. W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M. P., LaFerla, F., Rohn, T. T. und C. W. Cotman (2004). "Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology." *J Clin. Inv.* **114** (1): 23-27.
- Rivas, C. I., Vara, J.C. und R. B. Maccioni (1988). "Anti-idiotypic antibodies that react with microtubule-associated proteins are present in the sera of rabbits immunized with synthetic peptides from tubulin's regulatory domain." *Proc. Natl. Acad. Sci.* (**85**):6092-6096.
- Rochet, J. C. und P. T. Lansbury, Jr. (2000). "Amyloid fibrillogenesis: themes and variations." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**(1): 60-68.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda und et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature* **376**(6543): 775-778.
- Saito, T., K. Ishiguro, T. Uchida, E. Miyamoto, T. Kishimoto und S. Hisanaga (1995). "In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons." *FEBS Lett.* **376**(3): 238-242.

- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**(12): 5463-5467.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe und S. Younkin (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." *Nat Med* **2**(8): 864-870.
- Schneider, A., J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow und E. M. Mandelkow (1999). "Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments." *Biochemistry* **38**(12): 3549-3558.
- Schoenfeld, T. A. und R. A. Obar (1994). "Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system." *Int Rev Cytol* **151**: 67-137.
- Schweers, O., E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx und E. Mandelkow (1994). "Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure." *J. Biol. Chem.* **269**(39): 24290-24297.
- Schweers, O., E. M. Mandelkow, J. Biernat und E. Mandelkow (1995). "Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**(18): 8463-8467.
- Scott, C. W., R. C. Spreen, J. L. Herman, F. P. Chow, M. D. Davison, J. Young und C. B. Caputo (1993). "Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly." *J. Biol. Chem.* **268**(2): 1166-1173.
- Sergeant, N., J. P. David, M. Goedert, R. Jakes, P. Vermersch, L. Buee, D. Lefranc, A. Wattez und A. Delacourte (1997). "Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications." *J. Neurochem.* **69**(2): 834-844.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman und et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-760.
- Singh, L. P., N. D. Denslow und A. J. Wahba (1996). "Modulation of rabbit reticulocyte guanine nucleotide exchange factor activity by casein kinases 1 and 2 and glycogen synthase kinase 3." *Biochemistry* **35**(10): 3206-3212.

- Sloboda, R. D., Rudolph, S. A., Rosenbaum, J. L. und P. Greengard (1975). "Cyclic-AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein." *Proc. Natl. Acad. Sci.* (**72**): 177-181.
- Song, J. S. und S. D. Yang (1995). „Tau-proteinkinases I/GSK3 α /Kinase F_A in heparin phosphorylates tau on ser 199, thr 231; ser 235, ser 262, ser 396 and ser 404 sites phosphorylated in Alzheimer-disease brain.“ *J. Prot Chem.* (14): 95-105.
- Spillantini, M. G. und M. Goedert (1998). "Tau protein pathology in neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci.* **21**(10): 428-433.
- Spillantini, M. G., J. R. Murrell, M. Goedert, M. R. Farlow, A. Klug und B. Ghetti (1998). "Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(13): 7737-7741.
- Steiner, B., E. M. Mandelkow, J. Biernat, N. Gustke, H. E. Meyer, B. Schmidt, G. Mieskes, H. D. Soling, D. Drechsel, M. W. Kirschner und et al. (1990). "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles." *Embo J* **9**(11): 3539-3544.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., und A. D. Roses (1993a). "Apolipoprotein-E: High avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease." *Proc. Natl. Acad. Sci.* (**90**): 1977-1981.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. und A. D. Roses (1993b). „Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease.“ *Proc Natl Acad Sci* **90** (**17**): 8098-8102.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch und D. Chapman (1993). "Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment." *Biochemistry* **32**(2): 389-394.
- Susi, H. und D. M. Byler (1986). "Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes." *Methods Enzymol* **130**: 290-311.
- Tolnay, M. und A. Probst (1999). "REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders." *Neuropathol Appl Neurobiol* **25**(3): 171-187.
- Tremblay, P., Z. Meiner, M. Galou, C. Heinrich, C. Petromilli, T. Lisse, J. Cayetano, M. Torchia, W. Mobley, H. Bujard, S. J. DeArmond und S. B. Prusiner (1998). "Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(21): 12580-12585.

- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1995). "Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules." *Mol. Biol. Cell* **6**(12): 1887-1902.
- Trojanowski, J. Q. und V. M. Lee (1995). "Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases." *FASEB J.* **9**(15): 1570-1576.
- Tucker, R. P. (1990). "The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review." *Brain Res Brain Res Rev* **15**(2): 101-120.
- von Bergen, M., P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (2000). "Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(10): 5129-5134.
- Vulliet, R., S. M. Halloran, R. K. Braun, A. J. Smith und G. Lee (1992). "Prolinedirected phosphorylation of human Tau protein." *J. Biol. Chem.* **267**(31): 22570-22574.
- Wanker, E. E. (2000). "Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations." *Biol. Chem.* **381**(9-10): 937-942.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo und M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**(5): 1858-1862.
- Wilhelmsen, K. C., T. Lynch, E. Pavlou, M. Higgins und T. G. Nygaard (1994). "Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22." *Am. J. Hum. Genet.* **55**(6): 1159-1165.
- Wille, H., G. Drewes, J. Biernat, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1992a). "Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro." *J. Cell Biol.* **118**: 573-584.
- Wille, H., E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1992b). "The juvenile microtubuleassociated protein MAP2c is a rod-like molecule that forms antiparallel dimers." *J. Biol. Chem.* **267**(15): 10737-10742.
- Wilson, D. M. und L. I. Binder (1997). "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease." *Am. J. Pathol.* **150**(6): 2181-2195.
- Wischik, C. M., M. Novak, H. C. Thogersen, P. C. Edwards, M. J. Runswick, R. Jakes, J. E. Walker, C. Milstein, M. Roth und A. Klug (1988b). "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**(12): 4506-4510.

Wisniewski, H. M., J. Wegiel und E. Popovitch (1994). "Age-associated development of diffuse and thioflavine-S-positive plaques in Down syndrome." *Dev. Brain Dysfunct* **7**: 330-339.

Wolfe, M. S. und C. Haass (2001). "The Role of presenilins in gamma-secretase activity." *J. Biol. Chem.* **276**(8): 5413-5416.

Wood, J. G., S. S. Mirra, N. J. Pollock und L. I. Binder (1986). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**(11): 4040-4043.

Yang, S.-D., Yu, J.-S., Shiah, S.-G. und J.-J. Huang (1994). "Protein Kinase F A/Glycogen Synthase Kinase-3 α after Heparin Potentiation Phosphorylates Tau on Sites Abnormally Phosphorylated in Alzheimer's Disease Brain." *J Neurochem.* (**61**): 1183-1186.

Yoshida, H. und Y. Ihara (1993). "Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: Assembly incompetence of paired helical filament tau." *Journal of Neurochem.* **61**: 1183-1186.

Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Illenberger, S., Godemann, R., Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of tau-protein by GSK-3 β 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**, 542-552.

Zingsheim, H. P., Herzog, W. und K. Weber (1979). "Differences in surface morphology of microtubules reconstituted from pure brain tubulin using two different microtubule-associated proteins: the high molecular weight MAP2 proteins and tau proteins." *Eur. J. Cell Biol.* (**19**):175-183.

VII Anhang

7.1 Primer-Sequenzen zur ortsgerichteten Mutagenese von Tau

T231E

5' CAAGAAGGTTGCAGTGGTCCGTGAACCACCCAAGTCG 3'
5' CGACTTGGGTGGTTCACGGACCACTGCAACCTTCTTG 3'

S235E

5' CAGTGGTACGTACTCCACCCAAGGAGCCGTCTTCCG 3'
5' CGGAAGACGGCTCCTTGGGTGGAGTACGTACCACTG 3'

T231E S235E

5' CAGTGGTCCGTGAGCCACCCAAGGAGCCGTCTTC 3'
5' GAAGACGGCTCCTTGGGTGGCTCACGGACCACTG 3'

S262E

5' AAGTCCAAGATCGGCGAGACTGAGAACCTTAAGCACCAGCCG 3'
5' CGGCTGGTGCTTAAGGTTCTCAGTCTCGCCGATCTTGGACTT 3'

S293E

5' CAGTCCAAGTGTGGCGAGAAGGATAATATCAAACACGTACCGGGA 3'
5' TCCCGGTACGTGTTTGATATTATCCTTCTCGCCACACTTGGACTG 3'

S324E

5' CTGAGCAAGGTGACGTCCAAGTGTGGCGAGTTAGGCAACATCCAT 3'
5' ATGGATGTTGCCTAACTCGCCACACTTGGACGTCACCTTGCTCAG 3'

S356E

5' CAGTCGAAGATTGGGGAGCTCGACAATATCACCCACG 3'
5' CGTGGGTGATATTGTCGAGCTCCCCAATCTTCGACTG 3'

S396 E

5' GGCGGAGATCGTTTACAAGGAGCCAGTGGTGTCTGGG 3'
5' CCCAGACACCACTGGCTCCTTGTAACGATCTCCGCC 3'

S404E

5' CCAGTGGTATCTGGGGACACGGAGCCACGGCATCT 3'
5' AGATGCCCGTGGCTCCGTGTCCCCAGATACCACTGG 3'

S396E S404E

5' CGGAGATCGTGTACAAGGAGCCAGTGGTGTCTGGGGAC 3'
5' GTCCCCAGACACCACTGGCTCCTTGTACACGATCTCCG 3'

S422 E

5' GGTAGACGAGCCCCAGCTCGCCACGCTCGCT 3'
5' AGCGAGCGTGGCGAGCTGGGGCTCGTCTACC 3'

K18-N-terminaler Primer

5' CCATATGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCA 3'

K18-C-terminaler Primer

5' GGGATCCTATTCAATCTTTTTATTTCTCCGCCAGGG 3'

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β -Peptid
AgD	Argyrophile Körner Krankheit (<i>argyrophilic grain disease</i>)
AK	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein E
APP	β -Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>β-amyloid precursor protein</i>)
AS	Aminosäure(n)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CBD	Cortikobasale Degeneration (<i>corticobasal degeneration</i>)
CD	Circular-Dichroismus
Cdk2/5	Cyclin-abhängige Kinase, Typ 2/5
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N,N,-tetraacetat
FPCL	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FTDP-17	Frontotemporale Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (<i>frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17</i>)
FTIR	Fourier Transform Infrarot
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3, β -Form
H	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
ht	Human Tau
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MAP	Mikrotubulus-assoziierte Proteine

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARK	MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NFT	Neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
n.u.	nicht untersucht
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHF	Paarige Helikale Filamente (<i>paired helical filaments</i>)
PiD	Pick-Krankheit (<i>Pick's disease</i>)
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-2a	Protein Phosphatase, Typ 2a
PSP	Progressive supranukleare Lähmung (<i>progressive supranuclear palsy</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
Sf9	Insektenovarienzelle
SE	Serin-Glutaminsäure
SP	Serin-Prolin
ThS	Thioflavin S
TE	Threonin-Glutaminsäure
TP	Threonin-Prolin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyethylenglykol-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheiten (<i>units</i>)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wild-Typ
ZNS	Zentralnervensystem

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Mandelkow und Frau Dr. Eva-Maria Mandelkow für die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Darüber hinaus bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen interessanten Anregungen.

Herrn Prof. Dr. H. Quader danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. J. Biernat, Dr. Martin von Bergen und Dr. Marcus Pickhardt für die Einarbeitung in das Thema, fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und Kooperationen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei allen hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima und darüber hinaus die netten Stunden in privater Runde.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Freunden Karin & Tino, Frank & Ilka, Anja und Familie Blume für ihre konstante Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche moralische Unterstützung.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Antje Hascher
geboren am 27.11.1976 in Riesa
ledig

Schulbildung:

09/83-08/91 Polytechnische Oberschule in Riesa
09/91-09/95 Max-Planck-Gymnasium in Riesa
Abschluss: Abitur

Studium:

10/95-03/00 Diplom-Biochemiker, Universität Leipzig
Diplomarbeit bei Prof. Ulrich Hahn, Fakultät für
Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie,
Universität Leipzig
Thema: Selektive Fluoreszenzmarkierung von
Proteinen mittels Proteasekatalyse
Abschluss: Diplom

Promotion:

04/00-06/05 Promotion bei Prof. Dr. E. Mandelkow, Max-Planck-
Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie in
Hamburg
Thema: Rolle der Phosphorylierung des humanen Tau-
Proteins: Einfluss auf die pathologische Aggregation und
Wechselwirkung mit Mikrotubuli

7.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, 6. Mai 2005