In vitro Analyse der biochemischen und strukturellen Auswirkungen von Mutationen im Tau-Protein bei frontotemporalen Demenzen
–
Implikationen für die Alzheimer-Krankheit

Dissertation

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

vorgelegt von

Stefan Barghorn
aus Oldenburg

Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. Mandelkow

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. H. Quader

Tag der Disputation: 21. Dezember 2001

Hamburg, den 06. Dezember 2001

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS i

ABBILDUNGSVERZEICHNIS iv

TABELLENVERZEICHNIS vi

I EINLEITUNG 1

1 DIE ALZHEIMER-KRANKHEIT 1

2 MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTE PROTEINE 2
2.1 STRUKTURELLE MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTE PROTEINE 3
2.2 DAS MIKROTUBULUS-ASSOZIIERTE PROTEIN TAU 4
2.2.1 Struktur des Proteins Tau 4
2.2.2 Funktionen des Proteins Tau 7
2.2.3 Regulation der Tau-Funktion durch Phosphorylierung 8
2.2.4 Pathologische Aggregation des Tau-Proteins 9

3 FAMILIÄRE NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN 11
3.1 FAMILIÄRE ALZHEIMER-KRANKHEIT 11
3.2 TAUOPATHIEN 13

4 FRONTOTEMPORALE DEMENZEN UND PARKINSONISMUS VERKNÜPFT MIT CHROMOSOM 17 14
4.1 SYMPTOME DER FTDP-17 ERKRANKUNGEN 15
4.2 MUTATIONEN IM TAU-PROTEIN BEI FTDP-17 16
4.2.1 Effekt der FTDP-17 Mutationen auf das alternative Spleißen der Tau mRNA 19
4.3 Pathogene Wirkung der FTDP-17 Mutationen 22

5 ZIEL DER ARBEIT 24

II MATERIAL UND METHODEN 26

1 PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN 26
1.1 BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN 26
1.2 SDS-GELELEKTROPHORESE 27
1.3 BLAU-NATIVE-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE 28
1.4 COOMASSIE FÄRBUNG VON PROTEINGELEN 29
1.5 SILBERFÄRBUNG VON PROTEINGELEN 29
1.6 PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI* 29
1.7 AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN TAU-PROTEINEN 30
1.8 BESTIMMUNG DER DTT-KONZENTRATION 32

2 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN 33
2.1 MUTAGENESE DER TAU-KONSTRUKTE 33
2.2 SEQUENZIERUNG VON DNA 34

3 SPEZIELLE METHODEN ZUR AGGREGATION VON TAU-PROTEIN ZU PHFS 35
3.1 *IN VITRO* PHF-POLYMERISATION 35
3.2 FLUORESZENZMESSUNGEN VON *IN VITRO* PHFS 36
3.3 TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE 37

4 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN 38
4.1 FOURIER TRANSFORM INFRAROT-SPEKTROSKOPIE 38

III ERGEBNISSE 40

1 FTDP-17 MUTANTEN DES TAU-PROTEINS 41
1.1 POLYMERISATION VON FTDP-17 TAU-PROTEIN ZU PHFS 42
1.1.1 Kinetik der PHF-Bildung von FTDP-17 Mutanten auf der Basis von hTau40 42
1.1.2 Kinetik der PHF-Bildung von FTDP-17 Mutanten auf Basis des Konstrukts K18 43
1.1.3 Elektronenmikroskopie der Tau-Filamente aus FTDP-17 Mutanten 45
1.2 DIE POLYMERISATION VON TAU UND FTDP-17 MUTANTEN ZU PHFS FÜHRT ZU β-FALTBLATTSTRUKTUR IN DER REPEAT-REGION 46
1.3 BESONDERE EIGENSCHAFTEN DER AUF DIE PHF-POLYMERISATION EXTREM FÖRDERLICH WIRKENDEN FTDP-17 MUTATION ΔK280 51
1.3.1 Die FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 bildet auch in Abwesenheit von Polyanionen PHFs 53
1.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Abwesenheit von Polyanionen gebildeten PHFs der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 54
1.3.3 Die Polymerisation der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 zu PHFs führt unabhängig von Polyanionen zu β-Faltblattstruktur in der Repeat-Region 55
1.3.4 Temperatur-Abhängigkeit der PHF-Polymerisation von K18-ΔK280 in Abwesenheit von Heparin 57
1.3.5 PHF-Bildung der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 mit N-terminalem HA-Tag 59
1.3.6 Die FTDP-17 Mutation ΔK280 im PHF-bildenden Motiv PHF6 und PHF6* 61

2 AGGREGATION VON WILD-TYP TAU UND CYSTEIN-MUTANTEN ZU PHFS UNTER REDUZIERENDEN UND OXIDIERENDEN BEDINGUNGEN 67
2.1 DIMERISIERUNGSGRAD DER VERWENDETEN CYSTEIN-MUTANTEN 70
2.2 BEDINGUNGEN DER PHF-POLYMERISATION VON CYSTEIN-MUTANTEN 72
2.2.1 Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Wild-Typ Tau-Konstrukten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart des Polyanions Heparin 72
2.3 POLYMERISATION DER K18 UND K19 CYSTEIN-MUTANTEN ZU PHFS IN GEGENWART DES POLYANIONS HEPARIN 75
2.3.1 Polymerisation der Cystein-Mutanten in Abhängigkeit vom Puffer 77
2.3.2 Polymerisation des 3-Repeat Tau-Konstrukts K19 zu PHFs in Gegenwart der polymerisationsfördernden Fettsäure Arachidonsäure 82
2.4 POLYMERISATION DER FTDP-17 MUTANTE K18-ΔK280 OHNE CYSTEINE IN ABWESENHEIT VON POLYANIONEN 84
2.5 DIMERISIERUNG DER TAU-KONSTRUKTE OHNE CYSTEINE 87

IV DISKUSSION 90

1 FTDP-17 MUTATIONEN IM TAU-PROTEIN 90
1.2 POLYMERISATION DER FTDP-17 TAU-MUTANTEN ZU PHFS 92
1.2.1 Das Erscheinungsbild der FTDP-17 Tau-Filamente 94
1.3 DIE POLYMERISATION VON TAU FÜHRT ZU β-FALTBLATTSTRUKTUR IN DEN PHFS 96
1.4 INTERAKTION UND FUNKTION DER PHF6 UND PHF6* MOTIVE INNERHALB DER REPEATS BEI DER PHF-POLYMERISATION 103
1.5 FTDP-17 MUTATIONEN: PATHOGENE WIRKUNG, STAND DER FORSCHUNG UND AUSSICHTEN 108

2 AGGREGATION VON TAU ZU PHFS UNTER REDUZIERENDEN UND OXIDIERENDEN BEDINGUNGEN 112
2.1 DIE ROLLE DER DIMERISIERUNG BEI DER PHF-AGGREGATION 113
2.2 POLYMERISATION VON TAU ZU PHFS IN GEGENWART DES POLYANIONS HEPARIN UNTER REDUZIERENDEN UND OXIDIERENDEN BEDINGUNGEN 114
2.2.1 Polymerisation von Wild-Typ 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs 114
2.2.2 Polymerisation von 4-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs 116
2.2.3 Polymerisation von 3-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs 117
2.2.4 Einfluß des Puffers auf die Polymerisation von 3-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs 118
2.2.5 Die Dimerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs 118
2.2.6 Nachweis von nicht-kovalent verbundenen Dimeren bei den Tau-Mutanten ohne Cysteine 119
2.3 POLYMERISATION VON TAU ZU PHFS IN ABWESENHEIT DES POLYANIONS HEPARIN UNTER REDUZIERENDEN BEDINGUNGEN 121
2.3.1 Polymerisation des Tau-Konstrukts K18-ΔK280 ohne Cysteine zu PHFs 121
2.4 DIE FUNKTION VON POLYANIONEN UND ANDEREN POLYMERISATIONSFÖRDERNDEN SUBSTANZEN BEI DER PHF-POLYMERISATION 122
2.4.1 PHF-Polmerisation in Gegenwart der polymerisationsfördernden Fettsäure Arachidonsäure 124
2.4.2 Vergleich der verschiedenen PHF-polymerisationsfördernden Substanzen und ihre mögliche Rolle bei der Alzheimer-Krankheit in vivo 125

V ZUSAMMENFASSUNG 130

VI LITERATURVERZEICHNIS 132

VII ANHANG 156

1 *PRIMER*-SEQUENZEN DER ORTSGERICHTETEN MUTAGENESE VON TAU 156

2 ABKÜRZUNGEN 157

3 LEBENSLAUF 159

4 ERKLÄRUNG 160

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TAU-GENS UND DES TAU-PROTEINS **6**

ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LOKALISATION DER FTDP-17 MUTATIONEN AUF DEM TAU-GEN UND IM TAU-PROTEIN **18**

ABBILDUNG 3: ALTERNATIVES SPLEIßEN VON MRNA UND DIE EFFEKTE DER FTDP-17 TAU-MUTATIONEN **21**

ABBILDUNG 4: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES 4-REPEAT TAU-KONSTRUKTS K18 **32**

ABBILDUNG 5: FÜR DIE POLYMERISATION ZU PHFS VERWENDETE ISOFORMEN UND KONSTRUKTE VON TAU **40**

ABBILDUNG 6: POLYMERISATION DER HTAU40 FTDP-17 MUTANTEN ZU PHFS **43**

ABBILDUNG 7: POLYMERISATION DER K18 FTDP-17MUTANTEN ZU PHFS **44**

ABBILDUNG 8: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON NEGATIV KONTRASTIERTEN FILAMENTEN DER FTDP-17 MUTANTEN **46**

ABBILDUNG 9: FTIR-SPEKTREN DER TAU ISOFORMEN HTAU40 UND HTAU23 **48**

ABBILDUNG 10: FTIR-SPEKTREN VON LÖSLICHEM UND ZU PHFS POLYMERISIERTEN FTDP-17 MUTANTEN DES TAU-KONSTRUKTS K18 **50**

ABBILDUNG 11: AUFTRENNUNG DER K18 MUTANTE ΔK280 BEI EINER GELPERMEATIONS-CHROMATOGRAPHIE **52**

ABBILDUNG 12: POLYMERISATION DER K18 FTDP-17 MUTANTEN ZU PHFS IN ABWESENHEIT VON POLYANIONEN **54**

ABBILDUNG 13: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER IN ABWESENHEIT UND GEGENWART VON POLYANIONEN GEBILDETEN PHFS DER K18 MUTANTE ΔK280 **55**

ABBILDUNG 14: FTIR-SPEKTREN VON PHFS DER FTDP-17 MUTANTE K18-ΔK280, DIE IN ABWESENHEIT UND GEGENWART VON POLYANIONEN POLYMERISIERTEN **56**

ABBILDUNG 15: TEMPERATUR-ABHÄNGIGKEIT DER PHF-POLYMERISATION DER FTDP-17 MUTANTE K18-ΔK280 IN ABWESENHEIT VON POLYANIONEN **58**

ABBILDUNG 16: PHF-BILDUNG DER HA-K18-ΔK280 MUTANTE **60**

ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PHF6 UND PHF6* MUTANTEN IN DEN TAU-KONSTRUKTEN K18 UND K19 **62**

ABBILDUNG 18: EINFLUß DER FTDP-17 MUTATION ΔK280 IN DEN PHF BILDENDEN MOTIVEN PHF6 UND PHF6* AUF DIE PHF-KINETIK **63**

ABBILDUNG 19: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER IN GEGENWART VON HEPARIN GEBILDETEN PHFS DER MUTANTEN K19-R3* UND K18-ΔK280-ΔR3 **65**

ABBILDUNG 20: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CYSTEIN-MUTANTEN IN DEN TAU-KONSTRUKTEN K18, K19 UND K12 **69**

ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER K18, K19 UND K12 CYSTEIN-MUTANTEN AUF EINEM SDS-PAGE-GEL **71**

ABBILDUNG 22: PHF-POLYMERISATION VON K18WT IN PBS PH 7.4 IN GEGENWART UND ABWESENHEIT VON 1 MM DTT **73**

ABBILDUNG 23: PHF-POLYMERISATION VON K19WT IN PBS PH 7.4 IN GEGENWART UND ABWESENHEIT VON 1 MM DTT **74**

ABBILDUNG 24: ABNAHME DER DTT-KONZENTRATION IN EINEM PHF-POLYMERISATIONSANSATZ ÜBER DIE INKUBATIONSZEIT **74**

ABBILDUNG 25: POLYMERISATION DER K18-CYSTEIN-MUTANTEN ZU PHFS IN PBS PH 7.4 MIT 1 MM DTT **76**
ABBILDUNG 26: POLYMERISATION DER K19 CYSTEIN-MUTANTEN ZU PHFS IN PBS PH 7.4 MIT 1 MM DTT **77**
ABBILDUNG 27: POLYMERISATION DER K19 CYSTEIN-MUTANTEN IN 20 MM MOPS PH 7.0 **79**
ABBILDUNG 28: POLYMERISATION DER K12 CYSTEIN MUTANTEN IN 20 MM MOPS PH 7.0 **80**
ABBILDUNG 29: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER K18, K19 UND K12 CYSTEIN-MUTANTEN **81**
ABBILDUNG 30: POLYMERISATION DER K19 CYSTEIN-MUTANTEN ZU PHFS MIT ARACHIDONSÄURE IN PBS PH 7.4 MIT 1 MM DTT **83**
ABBILDUNG 31: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER MIT ARACHIDONSÄURE GEBILDETEN FILAMENTE DER CYSTEIN-MUTANTEN VON K19 **84**
ABBILDUNG 32: POLYMERISATION DER K18-ΔK280 CYSTEIN-MUTANTE IN GEGENWART DES POLYANIONS HEPARIN **85**
ABBILDUNG 33: POLYMERISATION DER K18-ΔK280 CYSTEIN-MUTANTE IN ABWESENHEIT VON POLYANIONEN **86**
ABBILDUNG 34: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER IN GEGENWART UND ABWESENHEIT VON POLYANIONEN GEBILDETEN PHFS DER CYSTEIN-MUTANTEN VON K18-ΔK280 **87**
ABBILDUNG 35: BLAU-NATIVE-PAGE DER GEBILDETEN DIMERE VON K18 UND K19 CYSTEIN-MUTANTEN **88**
ABBILDUNG 36: MODELL DER β-FALTBLATTBILDUNG DURCH DIE HEXAPEPTIDE PHF6* UND PHF6 UND DER VORGESCHLAGENE EFFEKT DER FTDP-17 MUTATIONEN ΔK280 UND P301L **100**
ABBILDUNG 37: ZWEI-DIMENSIONALE DARSTELLUNG DER HEXAPEPTIDE PHF6* UND ΔK280-PHF6* IN EINER 4-STRÄNGIGEN ANTIPARALLELEN β-FALTBLATTSTRUKTUR **101**
ABBILDUNG 38: MODELL DER POLYMERISATION VON 3-REPEAT UND 4-REPEAT TAU ZU PHFS UNTER OXIDIERENDEN UND REDUZIERENDEN BEDINGUNGEN IN GEGENWART DES POLYANIONS HEPARIN **116**
ABBILDUNG 39: MODELL DES EINFLUß VON POLYMERISATIONSFÖRDERNDEN SUBSTANZEN WIE HEPARIN AUF DIE PHF-POLYMERISATION **124**

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: LOKALISATION DER FTDP-17 MUTATIONEN UND IHR EFFEKT AUF DAS ALTERNATIVE SPLEIßEN **17**
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DER ELEKTROPHORESEGELE FÜR DIE SDS-PAGE **27**
TABELLE 3: MOLEKULARGEWICHTSSTANDARD FÜR DIE SDS-PAGE **28**
TABELLE 4: PCR-PROGRAMM FÜR DIE ORTSGERICHTETE MUTAGENESE **33**
TABELLE 5: PCR-PROGRAMM FÜR DIE ZYKLISCHE SEQUENZIERUNG VON DNA **35**
TABELLE 6: FÄHIGKEIT DER MUTANTEN K18-ΔK280-ΔR3 UND K19-R3* ZUR BILDUNG VON PHFS IN ABWESENHEIT VON POLYANIONEN **66**
TABELLE 7: PROZENTUALE DIMERISIERUNG DER K18 UND K19 CYSTEIN-MUTANTEN **89**
TABELLE 8: BERECHNETE HYDROPATHIZITÄTEN DER PHF6 UND PHF6* SEQUENZEN **101**
TABELLE 9: EFFEKTE DER FTDP-17 MUTATIONEN AUF DIE MIKROTUBULI-ASSEMBLIERUNG **106**
TABELLE 10: EFFEKTE DER FTDP-17 MUTATIONEN AUF DIE AGGREGATION ZU PHFS **107**
TABELLE 11: VERGLEICH DER ERGEBNISSE ZUR POLYMERISATION VON PHFS UNTER OXIDIERENDEN UND REDUZIERENDEN BEDINGUNGEN MIT DER LITERATUR **129**

I EINLEITUNG

1 Die Alzheimer-Krankheit

Im Jahre 1907 beschrieb der Arzt Alois Alzheimer die neuropathologischen Charakteristika einer krankhaften Demenz, die nachfolgend nach ihm benannt wurde (Alzheimer 1907). Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Ursache einer im Alter auftretenden Demenz und betrifft ungefähr 10 % der Bevölkerung über 65 Jahren (Rocca *et al.* 1991). Mit zunehmendem Alter steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung. Weltweit sind circa 15 Millionen Menschen betroffen, und durch eine weiter zunehmende Lebenserwartung wird sich die Anzahl der betroffenen Personen in den nächsten Jahrzehnten schätzungsweise verdreifachen (Ernst und Hay 1994; Hebert *et al.* 1995).

Als erste Anzeichen des progressiven Krankheitsverlaufs treten im kognitiven Bereich Merkfähigkeitsstörungen (Verlust des Kurzzeitgedächtnisses), Probleme bei der Wortfindung, diskrete Einbußen bei der Auffassungsgabe oder leichte Hilflosigkeit auf (Kurz *et al.* 1991; Haupt *et al.* 1992). Im Verlauf der Krankheit kommt es zum Verlust des abstrakten Denkens (Finden von Problemlösungen), zur amnestischen Aphasie (Wortfindungsschwierigkeiten, verminderte Sprachproduktion), zur Apraxie (zum Beispiel Unfähigkeit der Erledigung alltäglicher Aufgaben), zur Agnosie (Störung des Bedeutungs-Erkennens), zu Verhaltensstörungen sowie zur zeitlichen und räumlichen Desorientierung (Gilleard *et al.* 1993; Almkvist *et al.* 1993; Rossor *et al.* 1996). Mit einer durchschnittlichen Dauer von neun Jahren stellt die klinische Phase das letzte Drittel eines Krankheitsverlaufs dar, der über einen Zeitraum von 10 - 20 Jahren zunächst klinisch stumm verläuft (Kurz 1997). Die Ausprägung der Symptome kann auf ein fortschreitendes Absterben von Nervenzellen zurückgeführt werden, das sich in einer Abnahme der gesamten Gehirnmasse manifestiert. Vom Absterben der Neuronen als erstes betroffen ist die transentorhinale Region des medialen, temporalen Lappens, gefolgt von einer Ausbreitung entlang des Hippocampus und Neocortex (Braak und Braak 1991; Braak *et al.* 1994).

Auf zellulärer Ebene ist die Alzheimer-Krankheit gekennzeichnet durch die Ablagerung von abnormal aggregierten Proteinen, die eine eindeutige Diagnose der Krankheit erst *post mortem* anhand einer histopathologischen Untersuchung ermöglicht. Diese Ablagerungen bestehen im Falle der extrazellulären Amyloid-Plaques zum Großteil aus Filamenten des Amyloid-β-Peptids und im Falle der intrazellulären neurofibrillären Bündel (NFTs, *neurofibrillary tangles*) aus dem Protein Tau. Das Amyloid-β-Peptid entsteht durch proteolytische Spaltung des β-Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP, *β-amyloid-precursor-protein*). Dabei wirken verschiedener Proteasen zusammen, die als α-, β- und γ-Sekretase bezeichnet werden. Es entstehen eine Reihe von spezifischen Fragmenten unterschiedlicher Länge. In den Amyloid-Plaques werden Peptide mit einer Länge von 40 oder 42 Aminosäuren ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$) gefunden. Zwar entsteht überwiegend $A\beta_{40}$, das $A\beta_{42}$ hat jedoch eine wesentlich größere toxische Wirkung. Die Tendenz zu den Filamenten der Amyloid-Plaques zu aggregieren ist wesentlich größer (zur Übersicht siehe (Esler und Wolfe 2001; Fassbender *et al.* 2001)). Die NFTs bestehen aus paarigen helikalen Filamenten (PHFs, *paired helical filaments* (Kidd 1963)), die aus einer Aggregation des Mikrotubulus-assoziierten Proteins Tau hervorgehen (siehe unten). Im Gegensatz zu den Amyloid-Plaques kann das Vorkommen der NFTs mit der Schwere und dem Verlauf der Krankheit korreliert werden ((Braak *et al.* 1994), zur Übersicht siehe (Tolnay und Probst 1999)).

2 Mikrotubulus-assoziierte Proteine

Das Zytoskelett von eukaryontischen Zellen wird hauptsächlich durch Mikrotubuli aufgebaut und in geringerem Maße durch Intermediär- und Mikrofilamente. Mikrotubuli erfüllen dabei verschiedene Aufgaben: Sie bilden die primäre strukturelle Komponente des Spindel-Apparats bei der Mitose, sie organisieren das Zytoplasma, sie sorgen für die Aufrechterhaltung der Zellform und sie bilden die Schienen für den intrazellulären Transport von Vesikeln sowie Zellorganellen durch Motor-Proteine. Weiterhin sind sie zentraler Bestandteil der eukaryontischen Flagellen und Cilien. Mikrotubuli sind polymere Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, deren Wände aus 13 longitudinal angeordneten Protofilamenten bestehen, die wiederum aus

Heterodimeren von α- und β-Tubulin gebildet werden (Tilney *et al.* 1973). Mikrotubuli, die aus Zellextrakten durch wiederholte Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation mit anschließender differentieller Zentrifugation gewonnen werden (Shelanski *et al.* 1973), bestehen zu circa 80 % aus Tubulin und zu 20 % aus den sogenannten Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAPs). Die MAPs werden nach ihrer Funktion in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt: Die erste Gruppe umfaßt die strukturellen MAPs, zu denen auch das Tau-Protein gehört. Sie beeinflussen die dynamische Instabilität der Mikrotubuli. Zur zweiten Gruppe gehören Motor-Proteine wie Kinesin und Dynein, die für den intrazellulären Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind, und in der dritten Gruppe sind relativ heterogene Proteine und Enzyme vereint, die den Mikrotubulus als zytoskelettären Anker nutzen (zur Übersicht siehe (Mandelkow und Mandelkow 1995)).

2.1 Strukturelle Mikrotubulus-assoziierte Proteine

Es werden zwei Gruppen von strukturellen MAPs nach einer ursprünglichen Einteilung anhand ihres Molekulargewichts unterschieden. Zu der ersten Gruppe mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 - 70 kDa gehören die Tau-Proteine, in der zweiten Gruppe mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa wurden die Proteine mit MAP1, MAP2, MAP3 und MAP4 nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt. Durch eine Sequenzhomologie der Mikrotubulus-Bindungsdomäne werden MAP2, MAP4 und die verschiedenen Isoformen des Tau-Proteins zu einer Untergruppe zusammengefaßt (Goedert *et al.* 1991). Gemeinsam sind sie charakterisiert durch drei bis fünf Sequenz-wiederholungen (Repeats) aus je 31 oder 32 Aminosäuren in der C-terminalen Mikrotubulus-Bindungsdomäne (Lee *et al.* 1988; Lewis *et al.* 1988; Aizawa *et al.* 1989; Chapin und Bulinski 1991; West *et al.* 1991; Chapin *et al.* 1995). Diese Repeats sind zusammen mit den flankierenden Regionen für die Bindung am Mikrotubulus verantwortlich und sind dadurch 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). Das Protein Tau wird hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert und ist dort überwiegend im Axon lokalisiert MAP2 dagegen überwiegend in

Dendriten (Binder *et al.* 1985; Riederer und Matus 1985). MAP4 ist nicht auf das Nervensystem beschränkt ((Bulinski und Borisy 1979; Parysek *et al.* 1984; Aizawa *et al.* 1990), zur Übersicht siehe (Tucker 1990; Schoenfeld und Obar 1994)).

2.2 Das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau

2.2.1 Struktur des Proteins Tau

Das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau wurde bei seiner Entdeckung durch Weingarten (Weingarten *et al.* 1975) als ein hitzestabiler Protein-Faktor beschrieben, der die spontane Polymerisation von α- und β-Tubulin zu Mikrotubuli fördert. Das Tau-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 17q21 (Neve *et al.* 1986) und besteht aus 16 Exons (Andreadis *et al.* 1992; Andreadis *et al.* 1995). Die Exone 4a, 6 und 8 sind jedoch nie in der mRNA des humanen Gehirns vorhanden. Durch alternatives Spleißen der Tau mRNA werden sechs Isoformen aus den verbleibenden 13 Exons von Tau im humanen zentralen Nervensystem exprimiert (Goedert *et al.* 1989; Himmler 1989). Sie unterscheiden sich durch An- oder Abwesenheit von einem oder zwei N-terminalen Einschüben aus 29 Aminosäuren und besitzen entweder drei oder vier C-terminale, unvollständige Sequenzwiederholungen aus 31-32 Aminosäuren (3-Repeat oder 4-Repeat Tau-Isoformen) innerhalb der Mikrotubulus-bindenden Domäne. Eine als „großes“ Tau (*big Tau*) bezeichnete Isoform kommt nur im peripheren Nervensystem vor und besitzt einen zusätzlichen Einschub aus 254 Aminosäuren (codiert von Exon 4a) zwischen Exon 4 und Exon 5 (Abbildung 1) (Couchie *et al.* 1992; Goedert *et al.* 1992b). Tau mRNA mit Exon 6 oder Exon 8 konnte bisher nicht in humaner mRNA nachgewiesen werden. Exon –1 ist Teil des Promotors und wird transkribiert aber nicht translatiert (zur Übersicht siehe (Buee *et al.* 2000)). Die Expression von Tau ist entwicklungsreguliert. So wird im fötalen zentralen Nervensystem zunächst nur die kürzeste 3-Repeat Tau-Isoform ohne N-terminale Einschübe (hTau23) exprimiert, im adulten Stadium alle sechs Isoformen (Kosik *et al.* 1989; Goedert und Jakes 1990). Im Gegensatz zum Menschen exprimieren adulte Mäuse (Nagetiere im Allgemeinen) nur 4-Repeat Tau (Goedert und Jakes 1990).

Biochemisch betrachtet ist Tau ein interessantes Protein. Es besteht zu 10 % aus Glycin- und Prolin-Resten und ist mit 18 % reich an Serin- und Threonin-Resten. Insgesamt tragen bei physiologischem pH-Wert 25 % der Aminosäuren eine Ladung. Das macht das Tau-Protein zu einem sehr hydrophilen Protein. Für das Tau-Protein wurde durch analytische Ultrazentrifugation ein Sedimentationskoeffizient von 2.6 S gemessen, was auf eine stark asymmetrische Form hinweist (Cleveland *et al.* 1977). Mittels Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) konnte ein äußerst geringer Anteil von Sekundärstruktur-Elementen, wie α-Helix oder β-Faltblatt an der Gesamtstruktur gemessen werden (Cleveland *et al.* 1977; Schweers *et al.* 1994). Weiterhin denaturiert Tau-Protein auch bei erhöhter Temperatur (bis 100 °C) nicht (Weingarten *et al.* 1975) und verbleibt auch in 2.5 % Perchlorsäure in Lösung (Lindwall und Cole 1984b). Bei einer elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt das Tau-Protein ein apparentes Molekulargewicht von 50 - 70 kDa, welches wesentlich über dem tatsächlichen Molekulargewicht von 36 - 46 kDa liegt. Auf Grund dieser Eigenschaften wird das Tau-Protein als ein nativ ungefaltetes Protein betrachtet.

Mit Hilfe spezieller Techniken der Elektronenmikroskopie wird dieses Bild von Tau als ein größtenteils ungefaltetes Molekül bestätigt. Das Tau-Protein konnte als ein elongiertes, filamentöses und flexibles Molekül mit einer Länge von circa 35 nm dargestellt werden (Wille *et al.* 1992b) Am Mikrotubulus gebundenes Tau konnte als senkrecht abstehende filamentöse Struktur mit einer Länge von circa 20 nm auf den Mikrotubuli sichtbar gemacht werden (Hirokawa *et al.* 1988).

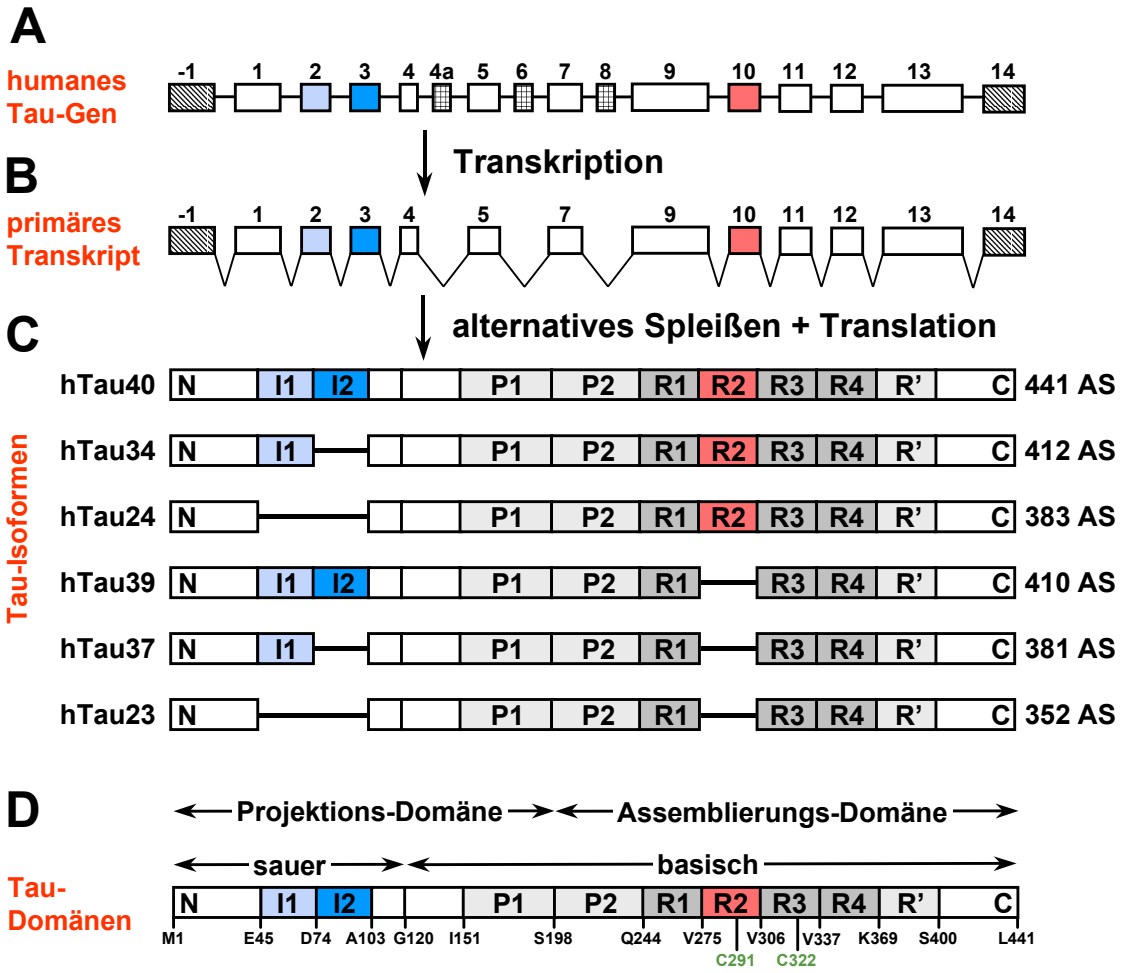

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tau-Gens und des Tau-Proteins.
(A): Das humane Tau-Gen ist auf über 100 kb auf Chromosom 17 an der Position 17q21 lokalisiert. Es enthält 16 Exons, dessen Exon –1 ein Teil des Promotors ist. Die Exone 6 und 8 werden im Menschen gar nicht transkribiert und Exon 4a codiert für einen 254 Aminosäuren großen Einschub und kommt nur im peripheren Nervensystem vor (kreuzweise gestreift dargestellt, nicht maßstabsgerecht).
(B): Das primäre Transkript enthält 13 Exons, wobei Exon –1 und Exon 14 transkribiert, aber nicht translatiert werden (diagonal gestreift dargestellt, nicht maßstabsgerecht). Die Exone 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 und 13 sind konstitutiv (weiß dargestellt) und die Exone 2, 3 und 10 werden alternativ gespleißt. Dabei codieren Exon 2 und 3 für die N-terminalen Einschübe (I1 = hellblau und I2 = dunkelblau) und Exon 10 für den 2. Repeat (R2 = rot). Auf der Basis des primären Transkripts entstehen durch alternatives Spleißen die sechs verschiedenen Tau mRNAs, die im zentralen Nervensystem translatiert werden.
(C): Die sechs verschiedenen Tau-Isoformen im humanen zentralen Nervensystem unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von ein oder zwei N-terminalen Einschüben aus 29 Aminosäuren (I1 = hellblau und I2 = dunkelblau) codiert durch Exon 2 und 3, in Kombination mit entweder drei (R1, R3, R4 = dunkelgrau) oder vier (R1, R2, R3, R4) Repeats im C-terminalen Bereich. Der 2. Repeat (R2 = rot) wird durch Exon 10 codiert und kommt nur in 4-Repeat Tau-Isoformen vor (AS = Aminosäuren).
(D): Das Tau-Protein kann in verschiedene funktionale Domänen eingeteilt werden. Die N-terminale Projektions-Domäne enthält die beiden Einschübe (I1 = hellblau und I2 = dunkelblau) und weist eine saure Region (AS 1-120) und eine allgemein basische Region auf, die sich bis zum Ende des C-Terminus fortsetzt (AS 121-441). Die C-terminale Assemblierungs-Domäne wird aus vier unvollständigen Repeats mit 31-32 Aminosäuren gebildet (R1-R4). Eine fünfte Sequenzwiederholung (R` = hellgrau) weist eine geringere Sequenzhomologie zu den Repeats R1-R4 auf. Prolin-reiche Regionen (P1 und P2 = hellgrau) flankieren die Repeat-Region C-terminal. Die beiden Cysteine (grün) von Tau sind im 2. Repeat (C291A) und 3. Repeat (C322A) lokalisiert. Abbildung modifiziert nach (Buee *et al.* 2000; Gustke *et al.* 1994).

2.2.2 Funktionen des Proteins Tau

Eine Funktion von Tau ist eine Bindung an Mikrotubuli, die dadurch stabilisiert werden. Diese Interaktion wird hauptsächlich über die Mikrotubulus-bindende Repeat-Region und den flankierenden Prolin-reichen Regionen vermittelt (Butner und Kirschner 1991; Gustke *et al.* 1994). Dabei interagieren höchstwahrscheinlich die basischen Aminosäuren der Repeat-Region mit dem Glutaminsäure-reichen C-Terminus des β-Tubulin (Goode und Feinstein 1994). Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Tau an Mikrotubuli liegt in Abhängigkeit von der Isoform nach neueren Arbeiten zwischen 0.1 - 0.5 µM (Ackmann *et al.* 2000). Für 3-Repeat Isoformen wurde eine schwächere Bindung gefunden als für 4-Repeat Isoformen (Butner und Kirschner 1991; Gustke *et al.* 1994; Ackmann *et al.* 2000). Auf Grund seiner Funktion wird der C-Terminus auch als Assemblierungs-Domäne bezeichnet. Für den als Projektionsdomäne bezeichneten N-Terminus kann keine Mikrotubuli-stabilisierende Wirkung beobachtet werden, es wird aber eine Funktion als Abstandhalter oder Bindeglied zwischen einzelnen Mikrotubuli vermutet (Chen *et al.* 1992).

An das Tau-Protein konnte eine Bindung von Proteinkinasen (Reszka *et al.* 1995; Morishima-Kawashima und Kosik 1996) und Phosphatasen beobachtet werden (Sontag *et al.* 1996; Liao *et al.* 1998; Sontag *et al.* 1999). Durch Überexpression wurde eine Beteiligung des Tau-Proteins an dem durch die Motor-Proteine Dynein und Kinesin vermittelten intrazellulären Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang der Mikrotubuli gezeigt (Ebneth *et al.* 1998).

Als eine weitere Funktion des Tau-Proteins wird eine Beteiligung an der Ausbildung von Zellfortsätzen und der neuronalen Polarität diskutiert (Matus 1988; Binder *et al.* 1985). Durch Mikroinjektion von „antisense“-mRNA des Tau-Proteins in Primärkulturzellen konnte die Ausbildung von Axonen inhibiert werden (Esmaeli-Azad *et al.* 1994; Liu *et al.* 1999). Die Expression von Tau in Sf9-Insektenzellen führt zur Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Zellfortsätzen (Knops *et al.* 1991; Baas *et al.* 1991; Biernat und Mandelkow 1999). Die Ausbildung von Zellfortsätzen innerhalb des Zytoskeletts bedingt ein enges Zusammenspiel von Mikrotubuli und Actin-Filamenten in den Wachstumskegeln. Daher wird für das Tau-Protein auch eine Interaktion mit

Actin-Filamenten vermutet. In Zellen, denen ein Actin-bindendes Protein fehlt, kann durch Mikroinjektion von Tau-Protein (oder MAP2) das normale Erscheinungsbild der Zellen wiederhergestellt werden (Cunningham *et al.* 1997). Die Funktionen des Tau-Proteins können aber anscheinend von den anderen MAPs größtenteils übernommen werden, da Tau-defiziente *knockout*-Mäuse im Phänotyp nicht auffällig sind (Harada *et al.* 1994).

2.2.3 Regulation der Tau-Funktion durch Phosphorylierung

Die Bindung von Tau am Mikrotubulus wird durch zahlreiche Phosphorylierungen reguliert (Gustke *et al.* 1992; Biernat *et al.* 1993; Lindwall und Cole 1984a; Drewes *et al.* 1995; Trinczek *et al.* 1995). Der Grad der Phosphorylierung ist entwicklungsreguliert (Pope *et al.* 1993; Mawal-Dewan *et al.* 1994; Saito *et al.* 1995). Er ist in fötalem Gewebe hoch und nimmt mit zunehmendem Alter durch eine steigende Aktivität von Phosphatasen ab (Mawal-Dewan *et al.* 1994). Eine Phosphorylierung von Tau erfolgt posttranslational an Serin- und Threonin-Resten. Man kann unterscheiden zwischen Prolin-gerichteten Kinasen, die Serin- oder Threonin-Reste phosphorylieren, welche C-terminal ein Prolin besitzen (SP- oder TP-Motive), und nicht Prolin-gerichteten Kinasen.

Eine Phosphorylierung durch eine nicht Prolin-gerichtete Kinase hat einen stark regulativen Effekt. So verhindert die MAP/Mikrotubuli Affinitäts-regulierende Kinase (MARK) (Drewes *et al.* 1995) durch Phosphorylierung an $Serin_{262}$ fast vollständig die Bindung von Tau am Mikrotubulus (Biernat *et al.* 1993). Einen ähnlichen Effekt (Illenberger *et al.* 1998) hat die nicht Prolin-gerichtete cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) (Pierre und Nunez 1983; Scott *et al.* 1993; Brandt *et al.* 1994; Drewes *et al.* 1995), die das $Serin_{214}$ phosphoryliert. Prolin-gerichtete Phosphorylierungen haben hingegen nur eine modulatorische Wirkung (Trinczek *et al.* 1995).

In vitro können folgende Kinasen das Tau-Protein phosphorylieren: die Caseinkinase I (Pierre und Nunez 1983), die Caseinkinase II (Singh *et al.* 1996), die Zellzyklus-

abhängige Kinase (CDC/Cyclin A) (Vulliet *et al.* 1992), die Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 5 (CDK2 und CDK5) (Paudel *et al.* 1993; Baumann *et al.* 1993; Liu *et al.* 1995), die Ca^{2+}/Phospholipid-abhängige Proteinkinase (PKC) (Correas *et al.* 1992), die Mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAP-Kinase) (Drewes *et al.* 1992), die Glykogen-Synthase-Kinase (GSK-3) (Mandelkow *et al.* 1992; Hanger *et al.* 1992) und die Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) (Baudier und Cole 1987; Steiner *et al.* 1990).

2.2.4 Pathologische Aggregation des Tau-Proteins

Die NFTs sind bei der Alzheimer-Krankheit neben den Amyloid-Plaques – und bei den Tauopathien (siehe unten) ausschließlich – das histopathologische Charakteristikum für die neurodegenerative Erkrankung. Elektronenmikroskopisch sind die NFTs aus einer Ansammlung von Filamenten aufgebaut. Aus Alzheimer-Gehirnen extrahierte Filamente erscheinen bei negativer Kontrastierung im Elektronenmikroskop als paarige helikale Filamente (*paired helical filaments*, PHFs) mit einer Breite von 10 - 20 nm und einer axialen Periodizität von circa 80 nm (Kidd 1963). In geringerem Maße werden auch gerade Filamente (*straight filaments*) mit einer gleichbleibenden Dicke um 15 nm gefunden (Crowther 1991).

Durch immunologische Studien (Wood *et al.* 1986; Kosik *et al.* 1986; Grundke-Iqbal *et al.* 1986a) und Sequenzierung von Peptiden, die aus einem unspezifischen Protease-Verdau resultierten (Wischik *et al.* 1988b; Kondo *et al.* 1988; Goedert *et al.* 1988; Novak *et al.* 1993), konnte der Nachweis erbracht werden, daß die PHFs aus dem Protein Tau aufgebaut sind. Bei einem Pronase-Verdau läßt sich lediglich der elektronenmikroskopisch diffus erscheinende Rand der PHFs abbauen. Der zentrale Kern der PHFs ist Pronase-resitent und besteht aus der Mikrotubulus-bindenden Repeat-Region (Wischik *et al.* 1988b; Novak *et al.* 1993).

Werden PHFs aus Alzheimer-Gehirnen wieder aufgelöst, so zeigen die Tau-Proteine bei einer elektrophoretischen Auftrennung mittels einer SDS-PAGE drei charakteristische

Banden bei 55, 64 und 69 kDa (Greenberg und Davies 1990; Lee *et al.* 1991; Greenberg *et al.* 1992; Delacourte *et al.* 1996) sowie eine weitere sehr schwache Bande bei 74 kDa (Goedert *et al.* 1992a; Sergeant *et al.* 1997). Damit weist das Alzheimer-Tau-Protein ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht auf (Grundke-Iqbal *et al.* 1986b). Durch Dephosphorylierung läßt sich dieser Effekt wieder aufheben und zeigen, daß Alzheimer-PHFs aus posttranslational phosphoryliertem Tau-Protein aller sechs Isoformen bestehen (Goedert *et al.* 1992a). Normales, lösliches Tau-Protein von gesunden Menschen weist einen Phosphorylierungsgrad von circa 2 Mol Phosphat pro Mol Tau auf (Ksiezak-Reding *et al.* 1992). Das aus den PHFs isolierte Tau-Protein ist hingegen mit bis zu 6 - 8 Mol Phosphat pro Mol Tau wesentlich stärker phosphoryliert (Ksiezak-Reding *et al.* 1992). Dieses hyperphosphorylierte Tau-Protein ist in seiner natürlichen Funktion – der Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli – gestört (Yoshida und Ihara 1993).

Die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in der Alzheimer-Krankheit kann einerseits auf eine erhöhte Aktivität von Kinasen oder andererseits auf eine verminderte Aktivität von Phosphatasen zurückzuführen sein ((Trojanowski und Lee 1995; Gong *et al.* 1995; Ladner *et al.* 1996) zur Übersicht siehe (Lovestone und Reynolds 1997)). Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die Prolin-gerichteten Kinasen, da sie die für Alzheimer-Tau typischen SP- oder TP-Stellen (Serin- oder Threonin-Reste gefolgt von einem C-terminalen Prolin-Rest) phosphorylieren (Lichtenberg-Kraag *et al.* 1992; Morishima-Kawashima *et al.* 1995). Die Hyperphosphorylierung wurde lange Zeit als Ursache für die Aggregation des Tau-Proteins zu den PHFs angesehen. Sie könnte aber auch nach der Bildung der PHFs erfolgen. Einige Ergebnisse sprechen für diese Theorie. So konnte gezeigt werden, daß phosphoryliertes Tau-Protein sogar vor einer Aggregation zu PHFs schützt (Schneider *et al.* 1999). Weiterhin ist fötales Tau-Protein ebenfalls an solchen Stellen phosphoryliert, die als spezifisch für Alzheimer-Tau gelten (Kanemaru *et al.* 1992; Bramblett *et al.* 1992). Außerdem aggregiert auch nicht-phosphoryliertes Tau-Protein *in vitro* zu PHFs (Wille *et al.* 1992a; Schweers *et al.* 1995).

In vitro Experimente mit rekombinantem Tau-Protein haben gezeigt, daß sich die Polymerisation zu PHFs in Gegenwart von anionischen Makromolekülen wie

Glykosaminoglykanen (z.B. Heparin), Ribonukleinsäuren (z.B. RNA), Peptiden (z.B. Poly-Glutaminsäure) sowie freien Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) beschleunigen läßt (Goedert *et al.* 1996; Perez *et al.* 1996; Kampers *et al.* 1996; Wilson und Binder 1997; Hasegawa *et al.* 1997; Friedhoff *et al.* 1998a). Außerdem polymerisieren Tau-Fragmente der Repeat-Region schneller zu PHFs als Tau der gesamten Länge (Wille *et al.* 1992a; Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b). Die minimale Sequenz für die Aggregation von Tau-Protein läßt sich dabei auf ein Hexapeptid ($_{306}$VQIVYK$_{311}$) innerhalb der Repeat-Region reduzieren (von Bergen *et al.* 2000).

Kontroverse Theorien existieren bezüglich des Redox-Status, der eine PHF-Bildung ermöglicht. Einerseits haben Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß eine Dimerisierung des Tau-Proteins über eine intermolekulare Disulfidbrücke unter oxidierenden Bedingungen essentiell für die PHF-Bildung ist (Wille *et al.* 1992a; Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b). Andererseits konnten Studien einer anderen Arbeitsgruppe (L. Binder, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois, USA) eine Filament-Bildung auch unter reduzierenden Bedingungen beobachten (Wilson und Binder 1995; Wilson und Binder 1997; King *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000; Abraha *et al.* 2000) (siehe Ergebnisse und Diskussion).

3 Familiäre neurodegenerative Erkrankungen

3.1 Familiäre Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, die mit zunehmendem Alter zum Großteil sporadisch auftritt. Nur ein geringer Prozentsatz aller Fälle ist familiär bedingt (familiäre Alzheimer-Krankheit) und lassen sich auf genetische Faktoren zurückführen. Dabei können vier verschiedene Gene auf unterschiedlichen Chromosomen betroffen sein, die direkt oder indirekt alle die Produktion des toxischen β-Amyloid-Peptids fördern.

Das APP-Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert und codiert für das β-Amyloid-Vorläufer-Protein APP (*β-amyloid-precursor-protein*). Mehrere Mutationen in diesem Protein (Goate *et al.* 1991) führen zur vermehrten Bildung und Ablagerung des toxischen β-Amyloid-Peptids in Form der Amyloid-Plaques (Citron *et al.* 1992; Scheuner *et al.* 1996; Hardy 1997a). Diese Mutationen sind für circa 5 - 20 % der familiären Alzheimer-Krankheit verantwortlich (Lendon *et al.* 1997). Bei der Trisomie-21 (Down-Syndrom) kann bereits in jungen Jahren ebenfalls eine Demenz auftreten und im Alter von 50 Jahren ist sie ausnahmslos vorhanden. Wahrscheinlich beruht dies auf einer erhöhten Gen-Dosis des APP durch das dreifach vorliegende Chromosom 21 (Wisniewski *et al.* 1994).

Eine Mutation im Presenilin 1-Gen (auf Chromosom 14 lokalisiert) (Sherrington *et al.* 1995) ist mit über 50 % die häufigste Ursache für die familiäre Alzheimer-Krankheit, während Mutationen im Presenilin 2-Gen (auf Chromosom 1 lokalisiert) eher selten sind (Rogaev *et al.* 1995; Haass 1996; Levy-Lahad *et al.* 1995). Die Presenilin 1 und Presenilin 2 Proteine sind transmembrane Proteine für die eine γ-Sekretase Aktivität bei der Spaltung des APP angenommen wird (zur Übersicht siehe (Esler und Wolfe 2001; Wolfe und Haass 2001)). Mutationen in beiden Presenilin-Genen führen letztendlich zu einer vermehrten Produktion des toxischen β-Amyloid-Peptids (Scheuner *et al.* 1996; Borchelt *et al.* 1996; Tomita *et al.* 1997; Citron *et al.* 1997).

Im Gegensatz zu den Mutationen, die zu einem frühen Ausbruch der Alzheimer-Krankheit führen, ist der Polymorphismus im Gen, welches für das Cholesterin-Transport-Protein Apolipoprotein E (ApoE) codiert (auf Chromosom 19 lokalisiert), ein Risikofaktor für den späten Ausbruch der Alzheimer-Krankheit (Saunders *et al.* 1993). Die Anwesenheit des ε4-Allels von ApoE erhöht das Risiko und verringert das Alter des Ausbruchs der Alzheimer-Krankheit in einer Dosis-abhängigen Korrelation (Corder *et al.* 1993). Wie auch für die Mutationen in den Genen für APP, Presenilin 1 und Presenilin 2 führt das ε4-Allels von ApoE zu einer vermehrten Produktion des β-Amyloid-Peptids (zur übersicht siehe (Esler und Wolfe 2001; Wolfe und Haass 2001; Fassbender *et al.* 2001)). Eine eher neutrale oder sogar schützende Wirkung haben hingegen die ApoE-Allele ε2 und ε3 (Corder *et al.* 1994).

Die Tatsache, daß die Mutationen im APP und den Presenilin-Genen sowie das ε4-Allel von ApoE dasselbe Charakteristikum einer vermehrten Produktion des toxischen β-Amyloid-Peptids haben, hat zur sogenannten "Amyloid-Kaskaden-Hypothese" geführt (zur Übersicht siehe (Hardy 1997b)). Demnach führt eine Fehlfunktion im Metabolismus des APP zu der Zunahme des toxischen β-Amyloid-Peptids, welches anschließend zu den Amyloid-Filamenten der Amyloid-Plaques aggregiert. Als eine Folgeerscheinung soll das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau zu den paarigen helikalen Filamenten der neurofibrillären Bündel aggregieren und letztendlich ein massives Absterben der Neuronen erfolgen.

3.2 Tauopathien

Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese" macht als grundlegende Ursache für die Ausprägung der neuropathologischen Erscheinungen der Alzheimer-Krankheit (Amyloid-Plaques aus β-Amyloid-Peptid und NFTs aus Tau-Protein) eine Fehlfunktion im Metabolismus des Proteins APP mit einer daraus resultierenden, erhöhten Konzentration des toxischen β-Amyloid-Peptids verantwortlich. Gegen diese Hypothese spricht die Tatsache, daß auch in Abwesenheit von Amyloid-Plaques die NFTs aus aggregiertem Tau-Protein in einer Reihe verschiedener anderer neurodegenerativer Erkrankungen auftreten. Zu diesen Krankheiten zählen die Pick-Krankheit (PiD, *Pick's disease*), Progressive supranukleare Lähmung (PSP, *progressive supranuclear palsy*), Cortikobasale Degeneration (CBD, *corticobasal degeneration*), Argyrophile Körner Krankheit (AgD, *argyrophilic grain disease*) und die Frontotemporalen Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17, *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*). All diesen Krankheiten ist gemeinsam, daß neuropathologisch eine Aggregation des Tau-Proteins in Form der NFTs in den Patienten-Gehirnen gefunden wird, weswegen sie zusammenfassend als „Tauopathien" (Spillantini und Goedert 1998) bezeichnet werden. Der Mechanismus, wie diese einzelnen Erkrankungen mit der Aggregation des Tau-Proteins zusammenhängen, ist unklar. Es herrscht eine große Vielfalt zwischen den einzelnen Krankheiten in Bezug

auf die betroffenen Gehirnregionen, Zelltypen und die Zusammensetzung der NFTs aus verschiedenen Tau-Isoformen und der Filament-Morphologie (zur Übersicht siehe (Feany und Dickson 1996; Tolnay und Probst 1999; Buee und Delacourte 1999; Buee *et al.* 2000; Reed *et al.* 2001)).

4 Frontotemporale Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17

Es existiert eine Vielzahl an verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, in denen eine Tau-Pathologie ohne eine gleichzeitige β-Amyloid-Pathologie auftritt. Ungeachtet dieser Tatsache stellte die Korrelation der Mutationen in den Genen für familiäre Alzheimer-Krankheit, die letztendlich alle zu einer vermehrten Produktion des toxischen β-Amyloid-Peptids führen, ein schlagkräftiges Argument für die Amyloid-Kaskaden-Hypothese dar. Als Ursache für das Absterben der Nervenzellen in der Alzheimer-Krankheit und neurodegenerativen Erkrankungen allgemein, wurde das Protein APP mit dem resultierenden β-Amyloid-Peptid diskutiert. Diese Situation änderte sich mit der Entdeckung von Mutationen im Protein Tau, die eindeutig mit einer Demenz verknüpft sind. Im Jahre 1994 konnte zum ersten Mal die Verknüpfung einer neurodegenerativen Erkrankung mit Chromosom 17 entdeckt werden (Wilhelmsen *et al.* 1994). Es folgten weitere Krankheiten, die sich demselben Gen-Lokus zuschreiben ließen. Im nachhinein wurden sie unter dem Namen Frontotemporale Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17, *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*) zusammengefaßt (Foster *et al.* 1997). Da das Tau-Gen auf Chromosom 17 lokalisiert war und die FTDP-17 Erkrankungen durch eine Filament-Bildung des Tau-Proteins gekennzeichnet sind, wurde das Tau-Gen dieser erkrankten Familienmitglieder sequenziert. Es konnten sowohl Mutationen in den Exons als auch in den Introns des Tau-Gens gefunden werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 18 exonische Mutationen und sechs intronische Mutationen bekannt (siehe unten und Tabelle 1). Die Mutationen im Tau-Protein bei den FTDP-17 Erkrankungen zeigen eindeutig, daß eine Fehlfunktion des Tau-Proteins, gefolgt von einer Aggregation zu PHFs und den NFTs alleine ausreichend ist, um eine

neurodegenerative Erkrankung sowie eine Demenz zu verursachen (Spillantini *et al.* 1998c; Hutton *et al.* 1998; Poorkaj *et al.* 1998).

4.1 Symptome der FTDP-17 Erkrankungen

Die FTDP-17 Erkrankung ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung mit einem altersabhängigen Auftreten. Zwischen und innerhalb der einzelnen Familien besteht eine gewisse Heterogenität in den klinischen Symptomen (Foster *et al.* 1997; Nasreddine *et al.* 1999; Bird *et al.* 1999; van Swieten *et al.* 1999). Histopathologisch läßt sie sich durch eine zum Großteil konsistent auftretende, frontotemporale und neocortikale Atrophie charakterisieren (Foster *et al.* 1997; Spillantini *et al.* 1998a). Variabel betroffen sind hingegen die medialen temporalen Lappenstrukturen wie zum Beispiel der entorhinale Cortex, der Hippocampus und die Amygdala (zur Übersicht siehe (Reed *et al.* 2001)). Eine Zerstörung der Basalganglien und der Sustantia Nigra ist in diesen Familien üblich. Das mittlere Alter des Ausbruchs der Krankheit variiert bei den bisher über 400 bekannten Fällen zwischen 40 - 60 Jahren (Reed *et al.* 2001) und liegt damit weit unter dem der sporadischen Alzheimer-Krankheit (erste Fälle ab ungefähr 65 Jahren). Die Dauer der Erkrankung bis zum Tod des Patienten ist durchschnittlich 10 Jahre, kann aber auch nur 3 Jahre kurz oder 30 Jahre lang sein (Foster *et al.* 1997). Trotz der Heterogenität in den klinischen Symptomen finden sich in allen Gehirnen der FTDP-17 Patienten Ablagerungen aus aggregiertem Tau-Protein. Diese Aggregate in Form der NFTs treten sowohl in Neuronen als auch in Glia-Zellen auf. Ablagerungen des β-Amyloid-Peptids in Form der Amyloid-Plaques sind in den allermeisten FTDP-17 Gehirnen abwesend.

Als erste klinische Anzeichen zeigen sich bei den Patienten Störungen im Verhalten und den motorischen Funktionen. Charakteristisch treten im Verlauf der Krankheit Verhaltensstörungen auf, die sich zum Beispiel durch ein unangepaßtes Verhalten, Apathie, soziale Isolation, Depression, verbale und physische Aggressivität sowie einem Verlust der Persönlichkeit äußern können. Im Bereich der kognitiven Beeinträchtigungen können im frühen Stadium bei einer allgemein guten Erhaltung des

Gedächtnisses und der Orientierung, Sprachstörungen mit einer ausgeprägten Aphasie (Wortfindungsschwierigkeiten, verminderte Sprachproduktion), Probleme bei der mentalen Flexibilität, der Planung sowie Ausführung von Aufgaben auftreten. In späteren Stadien kommt es unter anderem zu einem fortschreitenden Verlust des Gedächtnisses und einer Orientierungslosigkeit. Im motorischen Bereich kommt es zu einer extrapyramidalen Erkrankung mit Parkinson-Symptomen, wie einer Bradykinesie (allgemeine Verlangsamung der Bewegungen), Rigidität (Steifheit, Muskelstarre), posturaler Instabilität, jedoch ohne einen Tremor. Durch die motorischen Störungen unterscheidet sich die FTDP-17 Erkrankung von der Alzheimer-Krankheit, bei der ein Gedächtnisverlust und kognitive Beeinträchtigungen vorherrschen (zur Übersicht siehe (Foster *et al.* 1997)).

4.2 Mutationen im Tau-Protein bei FTDP-17

In den weltweit über 50 Familien (Reed *et al.* 2001) mit einer FTDP-17 Erkrankung konnten Mutationen innerhalb der Exons und auch innerhalb der Introns des Tau-Gens gefunden werden (Tabelle 1 und Abbildung 2). Die exonischen Mutationen führen in 13 Fällen zu einem Austausch und in zwei Fällen zur Deletion einer Aminosäure. In drei Fällen ist die Mutation still, das heißt sie führt zu keiner Veränderung des Tau-Proteins. Auffällig ist, daß die exonischen Mutationen fast ausschließlich in der Repeat-Region auftreten. Diese ist einerseits für die Bindung von Tau am Mikrotubulus verantwortlich (Butner und Kirschner 1991; Lee und Rook 1992; Gustke *et al.* 1994; Trinczek *et al.* 1995), stellt andererseits aber auch den elementaren Bestandteil der Tau-Aggregate in Form der PHFs dar (Wischik *et al.* 1988b; Novak *et al.* 1993). Als pathogene Wirkung der FTDP-17 Tau-Mutationen lassen sich daher eine veränderte Stabilität des Mikrotubuli-Zytoskeletts oder eine erhöhte Tendenz zur Aggregation des Tau-Proteins in die unlöslichen Filamente (die PHFs) der NFTs vermuten.

Tabelle 1: Lokalisation der FTDP-17 Mutationen und ihr Effekt auf das alternative Spleißen

	Lokalisation		Auswirkung auf Protein-Ebene	Auswirkung auf alternatives Spleißen	Referenz(en) der ersten Beschreibung
	Exon Nr. / intronisch	Protein-Domäne			
K257T	9	R1	Austausch	n.u.	(Rizzini *et al.* 2000)
I260V	9	R1	Austausch	n.u.	M. Hutton (pers. Kommunikation)
G272V	9	R1	Austausch	4R ~ 3R	(Hutton *et al.* 1998)
N279K	10	R2	Austausch	vermehrt 4R	(Clark *et al.* 1998)
ΔK280	10	R2	Deletion	vermehrt 3R	(Rizzu *et al.* 1999)
L284L	10	R2	still	vermehrt 4R	(D'Souza *et al.* 1999)
N296N	10	R2	still	n.u.	(Spillantini *et al.* 2000)
N296H	10	R2	Austausch	n.u.	(Iseki *et al.* 2001)
ΔN296	10	R2	Deletion	n.u.	M. Hutton (pers. Kommunikation)
P301L	10	R2	Austausch	4R ~ 3R	(Hutton *et al.* 1998; Clark *et al.* 1998; Poorkaj *et al.* 1998)
P301S	10	R2	Austausch	4R ~ 3R	(Bugiani *et al.* 1999)
S305N	10	R2	Austausch	vermehrt 4R	(Iijima *et al.* 1999)
S305S	10	R2	still	vermehrt 4R	(Stanford *et al.* 2000)
V337M	12	R4	Austausch	4R ~ 3R	(Poorkaj *et al.* 1998)
E342V	12	R4	Austausch	n.u.	M. Hutton (pers. Kommunikation)
K369I	12	R´	Austausch	n.u.	M. Hutton (pers. Kommunikation)
G389R	13	R´	Austausch	4R ~ 3R	(Murrell *et al.* 1999)
R406W	13	C-term.	Austausch	4R ~ 3R	(Hutton *et al.* 1998)
+3	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Spillantini *et al.* 1998c)
+12	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Yasuda *et al.* 2000)
+13	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Hutton *et al.* 1998)
+14	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Hutton *et al.* 1998)
+16	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Hutton *et al.* 1998; Goedert *et al.* 1999b)
+33	intronisch	–	–	vermehrt 4R	(Rizzu *et al.* 1999)

Die FTDP-17 Mutationen können sowohl im Bereich eines Exons als auch eines Introns auftreten. Die exonischen Mutationen sind fast ausschließlich in der Repeat-Region gelegen (zur Organisation des Tau-Gens und der Definition der Tau-Domänen siehe Abbildung 1; R1 - R4 = 1. - 4. Repeat der Repeat-Region, R´ = fünfte unvollständige Repeat, C-term. = C-terminale Domäne). Auf Proteinebene wirken sich die exonischen Mutationen entweder in dem Austausch oder der Deletion einer Aminosäure aus. Sie können auch still sein. Zusätzlich können sie das normalerweise äquimolare Verhältnis der 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Isoformen (im Wild-Typ) durch einen Effekt auf das alternative Spleißen verschieben. Die intronischen Mutationen wirken alleinig auf das alternative Spleißen und führen zur vermehrten Bildung von 4-Repeat Tau-Isoformen (n.u. = nicht untersucht).

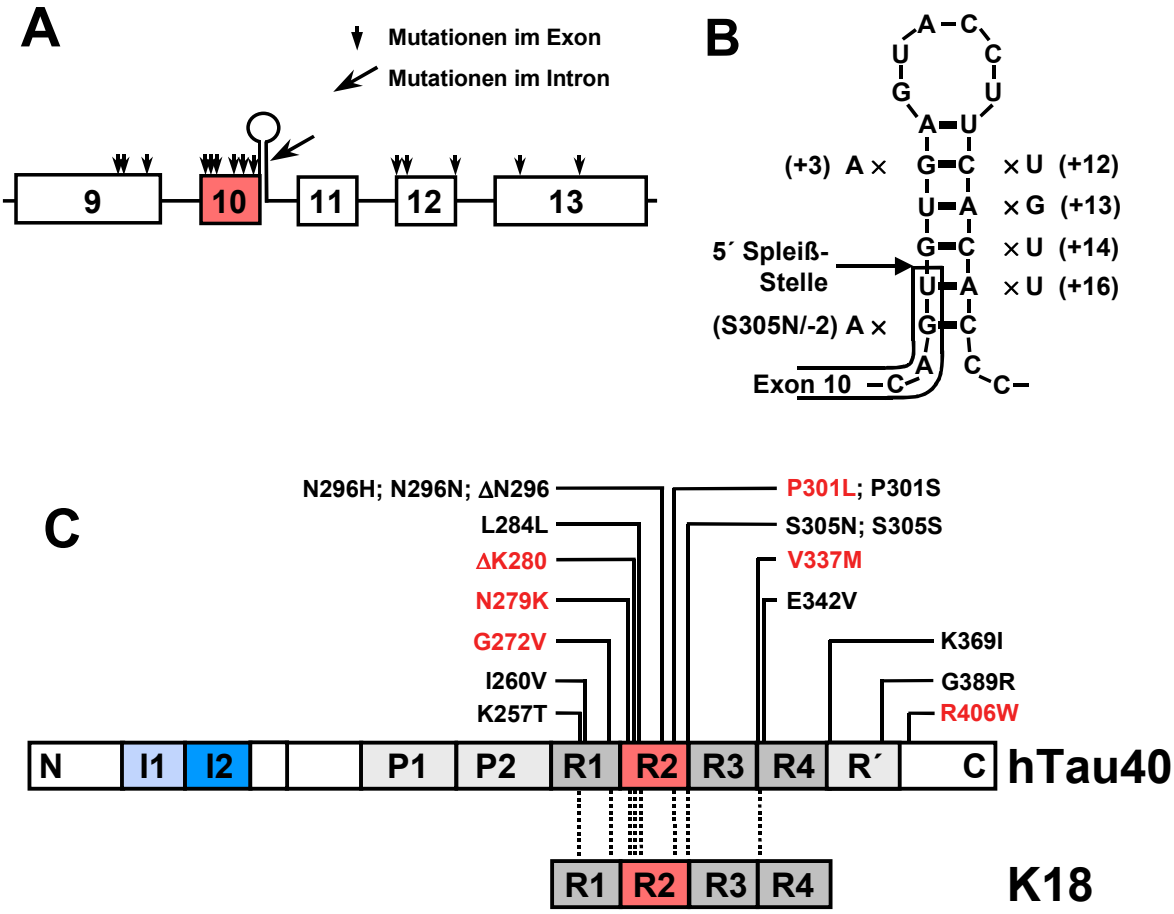

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der FTDP-17 Mutationen auf dem Tau-Gen und im Tau-Protein.
(A): Die FTDP-17 Mutationen sind auf dem Tau-Gen sowohl in den Exons als auch in den Introns lokalisiert. Exonische Mutationen treten in Exon 9, 10, 12 und 13 auf. Exon 10 (rot) codiert für den alternativ gespleißten 2. Repeat, der nur in 4-Repeat Tau-Isoformen vorkommt. Die intronischen Mutationen sind in der 5´ Spleiß-Stelle nach Exon 10 gelegen.
(B): Intronische Sequenz der 5´ Spleiß-Stelle nach Exon 10, die durch intramolekulare Basen-Paarung eine Haarnadel-Struktur ausbildet. Die FTDP-17 Mutationen führen durch den Austausch einer Base innerhalb der Haarnadel-Struktur zu einer „fehlerhaften" Basen-Paarung, was eine geringere Stabilität dieser Sekundärstruktur zur Folge hat (Varani *et al.* 1999). Die Bindung des Spleiß-Faktors U1snRNP ist dadurch erleichtert, als Folge entsteht mehr mRNA, die für 4-Repeat Tau-Isoformen codiert (siehe Abbildung 3).
(C): Dargestellt ist die längste humane 4-Repeat Tau-Isoform hTau40 mit vier Repeats (R1, R3, R4 = dunkelgrau und der alternativ gespleißte 2. Repeat, R2 = rot) sowie zwei N-terminalen Einschüben (I1 = hellblau und I2 = dunkelblau) und das in dieser Arbeit verwendete 4-Repeat Konstrukt K18. Die exonischen FTDP-17 Mutationen sind auf dem Tau-Protein fast ausschließlich in der Repeat-Region lokalisiert, die einerseits für die Bindung am Mikrotubulus verantwortlich ist, aber auch den Protease-resistenten Kern der PHFs bildet. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen auf der Basis von hTau40 und dem 4-Repeat Konstrukt K18 sind rot dargestellt.
Für eine genauere Beschreibung des Tau-Gens und der Domänen des Tau-Proteins siehe Abbildung 1.

In der Zelle existiert normalerweise ein äquimolares Verhältnis von 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Isoformen. Die intronischen FTDP-17 Mutationen sind in unmittelbarer Nähe der Sequenz für das Exon 10 lokalisiert (Abbildung 2), das für den alternativ gespleißten 2. Repeat codiert (Andreadis *et al.* 1992; Andreadis *et al.* 1995). Diese als 5´-Spleiß-Stelle nach Exon 10 bezeichnete Region hat eine wichtige Funktion beim alternativen Spleißen der prä-mRNA zu mRNA, die für 3-Repeat oder für 4-Repeat Tau-Isoformen codiert. Die FTDP-17 Mutationen in dieser Region wirken sich daher auf das Verhältnis von 3-Repeat zu 4-Repeat Tau-Isoformen aus (Hutton *et al.* 1998; Hong *et al.* 1998; Spillantini *et al.* 1998c; Grover *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; D'Souza und Schellenberg 2000; Gao *et al.* 2000).

4.2.1 Effekt der FTDP-17 Mutationen auf das alternative Spleißen der Tau mRNA

Eukaryotische mRNA wird als Vorläufer-Molekül transkribiert. Die für die Protein-Sequenz codierenden Exons sind durch nicht-codierende Introns unterbrochen. Durch das alternative Spleißen werden die Introns entfernt. Es können jedoch auch Exons entfernt werden, was die Erzeugung von mRNA ermöglicht, die für verschiedene Protein-Isoformen codiert. Bemerkenswert an dem Vorgang des Spleißens ist, mit welcher Präzision aus der Vielzahl der möglichen falschen Stellen die korrekten Spleiß-Stellen-Paare erkannt werden. Die hohe Selektivität wird jedoch nur durch äußerst kurze und mangelhaft konservierte Erkennungs-Sequenzen gewährleistet. Mutationen in den Erkennungssequenzen der Spleiß-Stellen sind für circa 15 % aller genetisch bedingten Krankheiten verantwortlich (Smith und Valcarcel 2000).

Wichtig für die Erkennung der Spleiß-Stellen ist eine Konsensus-Sequenz. An der 5´- und 3´-Spleiß-Stelle besteht sie aus exonischen und intronischen Sequenzen. Intronisch liegen eine Verzweigungsstelle und ein Poly-Pyrimidin-Bereich (Abbildung 3a). Eine Regulation des alternativen Spleißens erfolgt häufig durch mehr oder weniger starke Bindungsstellen für Spleiß-Faktoren in einem sogenannten Exon-Definitions-Komplex ((Berget 1995) (Abbildung 3b)). Dabei bindet ein als U1snRNP (*U1 small nuclear ribonucleoprotein*) bezeichneter Faktor an die 5´-Spleiß-Stelle nach

dem zu spleißenden Exon (stromabwärts). Ein Serin-Arginin-Protein (SRp) bindet an eine Exon-Verstärker-Sequenz (ESE, *exon splicing enhancer*) innerhalb des Exons und vermittelt über das Exon hinweg stromaufwärts eine Bindung an weitere Faktoren, die intronisch an der 3´-Spleiß-Stelle binden. Dazu gehören der unterstützende Faktor U2 (U2AF, *U2 auxiliary factor*) mit seiner 35 kDa-Untereinheit und das Verzweigungsstellen-Protein (BBP, *branch point protein*). Im folgenden kommt es zur Annäherung der stromaufwärts gelegenen 5´-Spleiß-Stelle an die 3´-Spleiß-Stelle und unter Bindung weiterer Faktoren zur Bildung des katalytisch aktiven Spleißosoms. Kann einer der Faktoren wie U1snRNP oder SRp nicht binden, so kann der Exon-Definitions-Komplex nicht gebildet werden. Dies hat zur Folge, daß diese exonische Sequenz nicht als Exon erkannt, sondern als Intron behandelt wird. Letztendlich ist dieses Exon nicht in der gespleißten mRNA enthalten und wird folglich auch nicht in der Protein-Sequenz translatiert (zur Übersicht siehe (Smith und Valcarcel 2000; Blencowe 2000; Grabowski und Black 2001; Hastings und Krainer 2001)).

Für das Tau-Protein wird eine Regulation des alternativen Spleißens der 3-Repeat und 4-Repeat Isoformen durch einen exonischen ESE in Kombination mit einer schwachen intronischen 5´-Spleiß-Stelle nach Exon 10 angenommen (zur Übersicht siehe (Philips und Cooper 2000; van Slegtenhorst *et al.* 2000; D'Souza und Schellenberg 2000; Gao *et al.* 2000)). Das alternativ gespleißte Exon 10 codiert für den 2. Repeat der Mikrotubulus-bindenden Domäne (Abbildung 1). In der Wild-Typ Sequenz der 5´-Spleiß-Stelle nach Exon 10 bildet das primäre Transkript der Tau mRNA (Tau prä-mRNA) durch intramolekulare Basen-Paarung eine Haarnadel-Struktur (*stem-loop-structure*) aus (Abbildung 3c). Durch diese prä-mRNA Sekundärstruktur ist die Bindung des Faktors U1snRNP erschwert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von ungefähr 50 % kann der Exon-Definitions-Komplex nicht gebildet werden. Es resultiert ein etwa äquimolares Verhältnis von mRNA für 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Isoformen.

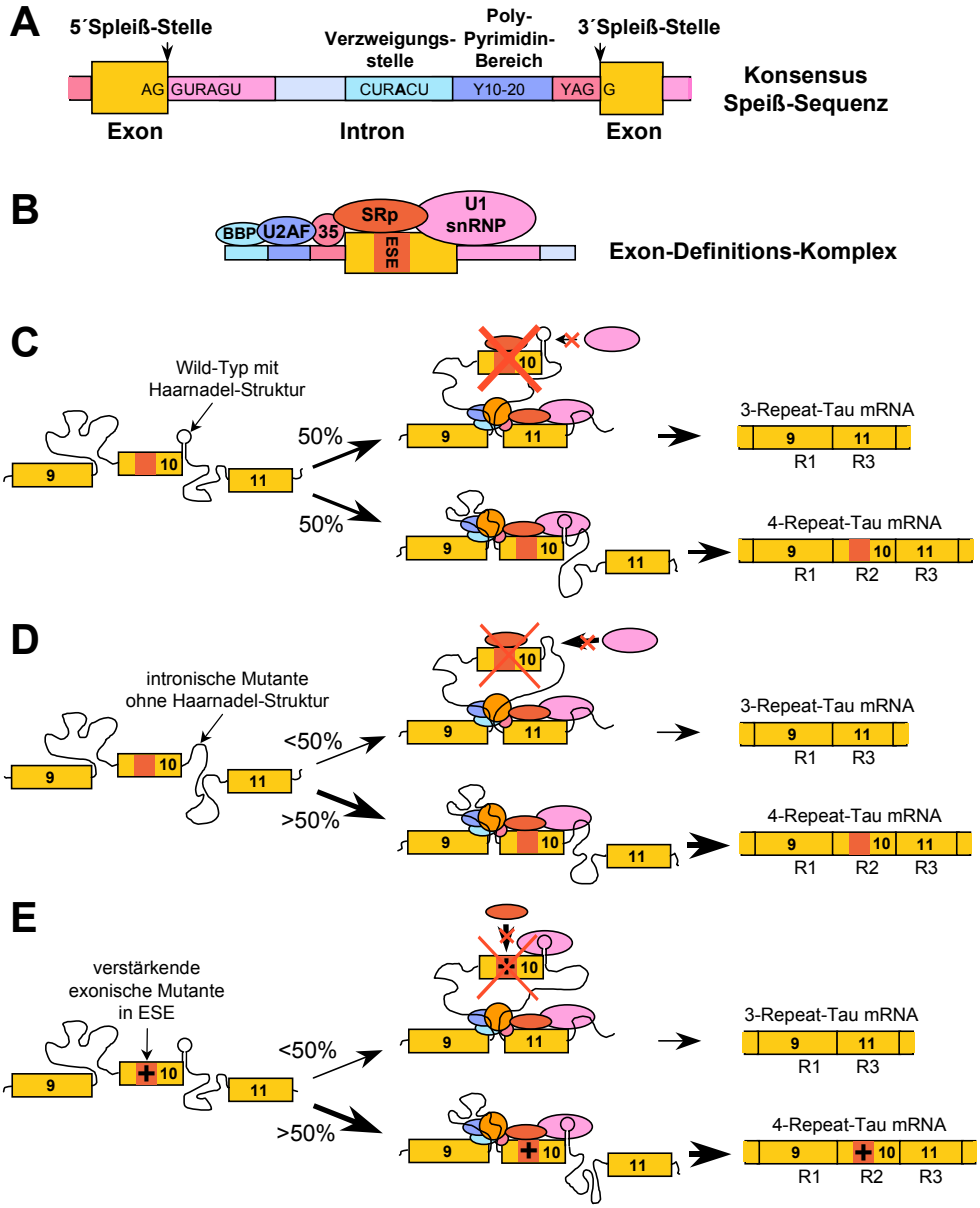

Abbildung 3: Alternatives Spleißen von mRNA und die Effekte der FTDP-17 Tau-Mutationen.
(A): Konsensus Spleiß-Sequenz für Säugetiere (Y = Pyrimidin, R = Purin, N = beliebiges Nukleotid).
(B): Im Exon-Definitions-Komplex bindet U1snRNP an die hinter dem zu spleißenden Exon liegende (stromabwärts) 5´ Spleiß-Stelle. Ein Serin-Arginin-Protein (SRp) bindet an die Sequenz eines möglichen regulatorischen *Exon-Splicing-Enhancer* (ESE). Als weitere Faktoren binden U2AF (*U2 auxiliary factor*) mit seiner 35 kDa Untereinheit (35) und das BBP (*branch point protein*). Zusammen definieren sie über die Exon-Sequenz hinweg stromaufwärts das Exon.
(C): Im Wild-Typ der Tau prä-mRNA kann durch die Haarnadel-Struktur an der 5´-Spleiß-Stelle nach Exon 10 (codiert für R2, Tau-Gen siehe Abbildung 1) U1snRNP nicht effektiv binden. Zu ungefähr 50 % wird die Exon 10-Sequenz nicht als Exon definiert und es entsteht 3-Repeat Tau-Isoformen mRNA.
(D): Durch die intronischen FTDP-17 Mutationen wird die Haarnadel-Struktur destabilisiert, U1snRNP kann verstärkt binden und das Exon definieren, was einen erhöhten Anteil an 4-Repeat Tau-Isoformen mRNA bewirkt.
(E): Einige exonische FTDP-17 Mutationen (z.B. N279K, siehe Tabelle 1) bewirken durch eine Verstärkung des ESE eine erhöhte Bindung des SRp, wodurch der Exon-Definitions-Komplex gefestigt wird und vermehrt 4-Repeat Tau-Isoformen mRNA entsteht. Die Mutation ΔK280 zerstört in einem gegenteiligen Effekt den ESE und führt zu überwiegend 3-Repeat Tau-Isoformen mRNA.
Teil A und B der Abbildung modifiziert nach (Smith und Valcarcel 2000; Blencowe 2000).

Die intronischen FTDP-17 Mutationen haben durch eine „fehlerhafte“ Paarung der Basen eine verminderte Stabilität (Varani *et al.* 1999) der Haarnadel-Struktur an der 5´-Spleiß-Stelle nach Exon 10 zur Folge (Abbildung 2b). Dadurch kann U1snRNP verstärkt binden und das Exon definieren (Abbildung 3c). Es resultiert ein erhöhter Anteil an mRNA für 4-Repeat Tau-Isoformen. Auf das Verhältnis der 3-Repeat zu 4-Repeat Tau-Isoformen haben allerdings auch einige exonische Mutationen einen Einfluß. Die Mutation N279K zum Beispiel liegt innerhalb einer ESE-Sequenz für Exon 10 (Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; D'Souza und Schellenberg 2000). Sie verstärkt diese ESE-Sequenz, und mit einer größeren Wahrscheinlichkeit wird ein extrem potenter Exon-Definitions-Komplex gebildet (Abbildung 3e). Die Exon 10-Sequenz wird dadurch als Exon erkannt und durch den Vorgang des Spleißens in die mRNA eingebaut. Es wird vermehrt mRNA für 4-Repeat Tau-Isoformen gebildet (Hong *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza und Schellenberg 2000; Gao *et al.* 2000). Die ΔK280 Mutation hat genau den entgegengesetzten Effekt, da sie die ESE-Sequenz zerstört und fast ausschließlich mRNA für 3-Repeat Tau-Isoformen entsteht (D'Souza *et al.* 1999; D'Souza und Schellenberg 2000). Für den komplexen Vorgang des alternativen Spleißens der Tau prä-mRNA (zur Übersicht siehe (Philips und Cooper 2000; van Slegtenhorst *et al.* 2000; D'Souza und Schellenberg 2000; Gao *et al.* 2000)) werden weitere *trans*- und *cis*-regulierende Faktoren vermutet (Gao *et al.* 2000; D'Souza und Schellenberg 2000).

4.3 Pathogene Wirkung der FTDP-17 Mutationen

Die pathogenen Wirkungen der FTDP-17 Mutationen können divers sein. Bei den exonischen Mutationen, die eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben, läßt sich durch ihre fast ausschließliche Lage in der Repeat-Region eine Wirkung auf die Mikrotubulus-Bindung oder die Tendenz zur Aggregation in unlösliche Filamente vermuten. Durch *in vitro* Bindungsstudien (Hong *et al.* 1998; Barghorn *et al.* 2000) und Mikrotubuli-Assemblierungs-Tests (Hong *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; Barghorn *et al.* 2000) konnte tatsächlich eine verminderte Bindung des FTDP-17 Tau-Proteins an Mikrotubuli nachgewiesen werden.

Dieser Effekt war mit durchschnittlich 10 –20 % jedoch nicht sehr ausgeprägt und variierte zwischen den einzelnen Mutanten sowie unterschiedlichen Arbeiten. Andererseits könnten die exonischen FTDP-17 Mutationen aber auch die Tendenz des Tau-Proteins zur Aggregation in die histopathologisch auftretenden PHFs erhöhen. Auch dieses Thema ist anhand von verschiedenen Tau-Isoformen und Methoden in mehreren Arbeiten, inklusive dieser, untersucht worden (siehe Diskussion, (Arrasate *et al.* 1999; Nacharaju *et al.* 1999; Goedert *et al.* 1999a; Rizzini *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000; Barghorn *et al.* 2000)).

5 Ziel der Arbeit

Die neurodegenerative Erkrankung der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17) ist sehr eng mit der Alzheimer-Krankheit verwandt. Sie unterscheidet sich jedoch durch das Vorkommen von Mutationen im Tau-Gen. Das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau wird sowohl bei der FTDP-17 Erkrankung als auch bei der Alzheimer-Krankheit und anderen Tauopathien in den Gehirnen der Patienten aggregiert in Form unlöslicher Filamente gefunden. Die abnorme Aggregation des Tau-Proteins wird daher als ein möglicher pathogener Mechanismus dieser neurodegenerativen Erkrankungen vermutet. Ein Ziel dieser Arbeit war, die biochemischen und strukturellen Auswirkungen der FTDP-17 Mutationen im Tau-Gen auf der Ebene der Proteine zu untersuchen. Als zentrale Frage sollte gezeigt werden, ob sich FTDP-17 Tau-Proteine vom Wild-Typ in der Tendenz unterscheiden, zu den histopathologisch auftretenden paarigen helikalen Filamente (PHFs) zu aggregieren. Zu diesem Zweck sollten die FTDP-17 Mutationen zunächst in verschiedene Tau-Isoformen und Konstrukte kloniert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels HPLC aufgereinigt werden. Die Aggregation der FTDP-17 Tau-Proteine sollte in ihrer Geschwindigkeit und ihrem Ausmaß mittels eines Fluoreszenz-basierten Meßverfahrens zur Quantifizierung von Tau-Filamenten verfolgt werden. Gebildete Filamente sollten durch Elektronenmikroskopie in ihrem Erscheinungsbild untersucht werden. Mit Hilfe spektroskopischer Methoden sollte weiterhin analysiert werden, ob die FTDP-17 Mutationen zu strukturellen Änderungen in löslichem und aggregiertem Tau-Protein führen.

Die Alzheimer-Krankheit konnte mit oxidativem Streß in Verbindung gebracht werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, den Einfluß reduzierender und oxidierender Bedingungen auf die Aggregation des Tau-Proteins zu Filamenten zu untersuchen. *In vitro* Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten oxidierende Bedingungen als Grundlage für eine Dimerisierung des Tau-Proteins über eine intermolekulare Disulfidbrücke als ersten und essentiellen Schritt der Aggregation des Tau-Proteins zu PHFs belegen. Kontrovers stehen dem Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gegenüber, die eine Tau-Aggregation auch unter reduzierenden Bedingungen finden. Anhand von

Cystein-Mutanten sowie oxidierenden und reduzierenden Puffer-Bedingungen sollte der Einfluß des Redox-Status und der Dimerisierung auf die Aggregation des Tau-Proteins zu PHFs weitergehend untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluß verschiedener Substanzen getestet, welche die Aggregation von Tau-Protein fördern.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Proteinbiochemische Techniken

1.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde für hTau40 mit dem Bio-Rad Proteinassay Reagenz nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Dazu wurde 40 µL verdünnte Probe mit 960 µL Reagenz vermischt (im Meßbereich von 1 - 5 mg mL^{-1} Protein). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3000 pro, Pharmacia Biotech) gemessen.

Bei K18 und K19 Tau-Konstrukten erwies sich die Bradford-Methode als ungenau. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß der Farbstoff relativ unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Die Wechselwirkung mit Arginin ist dabei am wichtigsten, welches in den Konstrukten K18 und K19 nur einmal vorhanden ist. Daher wurde für diese Konstrukte die UV-Absorption der Peptidbindung als Grundlage zur Proteinbestimmung gewählt. Für die verwendeten Pufferbedingungen wurde eine Absorption bei 214 nm als optimal ermittelt. Im Allgemeinen wurden bei dieser Methode 5 µL Probe mit 95 µL H_2O vermischt (im Meßbereich von 1 - 5 mg mL^{-1} Protein) und in einer Quarz-Küvette in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 pro, Pharmacia Biotech) vermessen. Für den Nullwert-Abgleich wurde der jeweilige Puffer der Probe verwendet.

Parallel wurde bei beiden Methoden zu jeder Messung eine Eichreihe mit BSA erstellt und daraus die Proteinkonzentration in mg mL^{-1} berechnet.

1.2 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die 0.5 mm dicken Gele bestanden aus einem 4 %igem Sammelgel und einem 10 %, 15 % oder 17 %igem Trenngel (siehe Tabelle 2 (Matsudaira und Burgess 1978) modifiziert (Mandelkow *et al.* 1985)).

Die Proteine wurden 1:1 (v/v) in 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. Sollten Proben auf ihren Gehalt an Dimeren, Tetrameren, usw. untersucht werden, wurde Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol verwendet. Diese Multimere können beim Tau-Protein durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen Cysteinen entstehen. Zur Identifikation der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (siehe Tabelle 3) jeweils mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 250 V in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS). Die Trocknung der angefärbten (siehe unten) Gele erfolgte unter Vakuum in einem beheizbaren Geltrockner (Modell 583, Bio-Rad) zwischen zwei Zellophanfolien, die zuvor in 10 % Glycerin getränkt worden waren.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Elektrophoresegele für die SDS-PAGE

	Sammelgel (4 %)	**10 %**	**15 %**	**17 %**
40 %iges Acrylamid/ Bis-Acrylamid (38/1)	5.4 mL	15 mL	22.6 mL	25.6 mL
1 M Tris-HCl pH 8.8	–	22 mL	22 mL	22 mL
0.25 M Tris-HCl pH 6.8	27 mL	–	–	–
H_2O	20.9 mL	22 mL	14.4 mL	11.4 mL
10 %iges SDS	0.54 mL	0.6 mL	0.6 mL	0.6 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

Tabelle 3: Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE

	kDa
β-Galaktosidase	116
Phosphorylase b	97
BSA	66
Ovalbumin	45
Glycerolaldehydphosphat-Dehydrogenase	35
Carboanhydrase	29
β-Lactoglobulin	18
Lysozym	14

1.3 Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) (Schagger *et al.* 1994) wurde als Nachweis verwendet für Dimere des Tau-Proteins, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbundenen sind. Bei dieser Methode bindet anstelle des denaturierenden SDS bei der SDS-PAGE der negativ geladene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue an das Protein und führt zur Migration der Proteine im Gel zur Anode. Das Coomassie zerstört im Gegensatz zum SDS dabei nicht die nicht-kovalenten Wechselwirkungen von Multimeren.

Die BN-PAGE wurde mit einem Acrylamid-Gradienten (5-18 %) in 50 mM Tris, 34 mM HCl, 5 % Glycerol, pH 8.5 (bei 4°C) durchgeführt. Das Acrylamid bestand zu einem Teil aus 40 %igem Acrylamid / Bis-Acrylamid (38 : 2) und vier Teilen 40 %igem Acrylamid / Bis-Acrylamid (37.5 : 1). Das Sammelgel besaß eine Konzentration von 5 % Acrylamid in demselben Puffersystem wie das Trenngel. Die Elektrophorese wurde in einem Kathodenpuffer mit 25 mM Tris, 20 mM Tricin und 0.02 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (AppliChem) (w/v), pH 8.5 (bei 4°C) und einem Anodenpuffer mit 50 mM Tris, 34 mM HCl, pH 8.5 (bei 4°C) durchgeführt. Der Probenpuffer enthielt 15 % Glycerol (v/v) und 0.02 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v). Die bereits mit Coomassie gefärbten Gele wurden zur Quantifizierung der Proteinbanden eingescannt und mittels der TINA-Software Version 2.01 (Raytest) ausgewertet. Zur Visualisierung geringster Mengen Tau-Multimere wurde das Gel wieder entfärbt und mit der Silberfärbemethode gefärbt.

1.4 Coomassie Färbung von Proteingelen

Angefärbt wurden Proteingele standardmäßig mit einer Lösung aus 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45 % Methanol (v/v) und 9 % Essigsäure (v/v) für 20 min, entfärbt für 20 min in Intensiventfärber (50 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)) und mindestens 1 h in Normalentfärber (5 % Methanol (v/v), 7.5 % Essigsäure (v/v)).

1.5 Silberfärbung von Proteingelen

Sollten geringe Proteinmengen in Polyacrylamidgelen nachgewiesen werden, wurde eine Silberfärbung (modifiziert nach (Heukeshoven und Dernick 1988)) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine im Gel 20 min 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) (25 %ig), 0.2 % Natriumthiosulfat). Nach intensivem Waschen (dreimal 10 min) wurde mit Silber-Färbelösung gefärbt (0.1 % Silbernitrat, 0.02 % Formaldehyd (v/v) (35 %ig)), erneut gewaschen und das Gel im Anschluß bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden entwickelt (2.5 % Natriumcarbonat, 0.01 % Formaldehyd (v/v) (35 %ig)). Die Farbreaktion wurde durch Inkubation in 0.05 M EDTA-Lösung gestoppt.

1.6 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der Proteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) (Studier *et al.* 1990). Mehrere Klone eines Konstrukts wurden auf ihre Expression hin getestet. Dazu wurden 5 mL LB-Medium (mit 50 µg mL^{-1} Carbenicillin) mit 100 µL einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0.6 - 0.8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0.4 mM IPTG induziert. Nach weiteren 2.5 h Inkubation wurden 1 mL Zellsuspension bei 16 000 × *g* pelletiert, in 70 µL Probenpuffer resuspendiert,

5 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf erfolgreiche Proteinexpression 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^{-1} Carbenicillin) mit 300 mL einer Übernachtkultur angeimpft, bis zu einer OD_{600} von 0.8-1.0 inkubiert und mit 0.4 mM IPTG für 2.5 h induziert. Durch den Fermenter wurden folgende Parameter konstant gehalten: 37 °C, pH 7.0, Rühren bei 600 rpm und O_2-Versorgung (gefilterte Umgebungsluft, 0.2 µm Porendurchmesser). In einer Durchflußzentrifuge (Contifuge 17RS, Rotor HCT 22.300, Heraeus) wurden die Zellen bei 10 000 Upm und 4 °C geerntet und das Pellet in 70 mL Resuspensionspuffer (20 mM MES, 1 mM EGTA, 0.2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg mL^{-1} Leupeptin, 2 mM Benzamidin, 10 µg mL^{-1} Pepstatin A, pH 6.8) auf Eis resuspendiert.

1.7 Aufreinigung von rekombinanten Tau-Proteinen

Die aus der Fermentation gewonnenen Zellen in Suspension wurden anschließend mittels einer French-Press (SLM Aminco, SLM Instruments Inc.) aufgeschlossen. Nach der Abtrennung von Zellbestandteilen durch eine Zentrifugation von 40 min bei 127 000 × *g* wurde zum Überstand 500 mM NaCl (Endkonzentration) zugegeben und 20 min bei 100 °C erhitzt. Das Pellet der Zentrifugation wurde resuspendiert (50 mM PIPES, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, pH 6.9) und ebenfalls 20 min gekocht. Bei dieser Behandlung werden nahezu alle Proteine denaturiert. 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). Anschließend wurden beide Suspensionen für 40 min bei 127 000 × *g* zentrifugiert, die Überstände vereint und zweimal gegen 1 L SP-Sepharose A-Puffer (20 mM MES, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 6.8) über Nacht (erster Pufferwechsel nach 2-4 h) bei 4 °C in einem Dialyseschlauch (Reichelt Chemietechnik) mit einer Ausschlußgrenze von 3.5 kDa unter Rühren dialysiert. Das

Dialysat wurde durch Zentrifugation bei 127 000 × *g* geklärt und durch einen 0.45 µM Porenfilter filtriert.

Mit einer 50 mL Auftragsschleife (Superloop, Pharmacia) wurde das Dialysat in einem ersten Aufreinigungsschritt auf eine selbst hergestellte Kationenaustauscher-Säule (SP-Sepharose fast flow Säulenmaterial, XK16-Säule, Pharmacia) an einer FPLC-Anlage (LKB-Pharmacia) mit einem Fluß von 3.5 mL min^{-1} mit SP-Sepharose A-Puffer aufgetragen und danach mit 60 mL Puffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten durch steigende Konzentration von SP-Sepharose B-Puffer (20 mM MES, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 6.8). Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und geeignete Tau-Fraktionen vereint. Für den zweiten Aufreinigungsschritt wurden 6 mg Protein durch Zentrifugations-Konzentratoren (5 kDa Ausschlußgröße (K18 Tau-Konstrukte) oder 10 kDa Ausschlußgröße (hTau40), Ultrafree, Millipore) auf ungefähr 0.5 mL konzentriert, 10 mM DTT Endkonzentration eingestellt und 5 min bei 50 °C inkubiert. Durch diese Vorbehandlung sollten Protein-Dimere (potentiell über Disulfidbrücken gebildet) aufgebrochen werden.

Im zweiten Reinigungsschritt wurden Multimere und Abbauprodukte des Tau-Proteins durch Gelpermeations-Chromatographie vom Protein der Gesamtlänge abgetrennt. Dieser Schritt war besonders wichtig für die nachfolgenden Untersuchungen zur Kinetik der PHF-Aggregation, da gezeigt wurde, daß Dimere und bestimmte kürzere Fragmente des Tau-Proteins eine schnellere PHF-Bildung *in vitro* zeigen als Tau der gesamten Länge (Friedhoff *et al.* 1998b; von Bergen *et al.* 2000). Das aufkonzentrierte Protein wurde über eine Auftragsschleife auf einer äquilibrierten Gelfiltrations-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 (hTau40) oder Superdex 75 (Tau-Konstrukte) prep grade, Pharmacia) aufgetragen und mit einer Flußrate von 0.5 –1.0 mL min^{-1} mit Puffer (PBS, pH 7.4 mit 1 oder 10 mM DTT) eluiert. Nach einer Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden geeignete Monomer-Fraktionen vereint und die Proteinkonzentration bestimmt. Die einzelnen Schritte der Expression und Aufreinigung sind in Abbildung 4 exemplarisch für das 4-Repeat Tau-Konstrukt K18 (MW = 13.8 kDa) dargestellt.

Charakteristisch für die Konstrukte K18 und K19 bei einer elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE waren jeweils zwei Banden für monomeres und dimeres Protein (Abbildung 4). Mittels N-terminaler Sequenzierung und MALDI-TOF Massenbestimmung konnte gezeigt werden, daß es sich bei der zweiten, im SDS-PAGE weiter unten laufenden Bande nicht um ein spezifisches Abbauprodukt handelt, da beide Banden dieselbe Masse besitzen. Beide Banden wurden in gleichem Maße in PHFs inkorporiert, wie eine elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE von wieder aufgelösten PHFs gezeigt hatte (Daten nicht gezeigt).

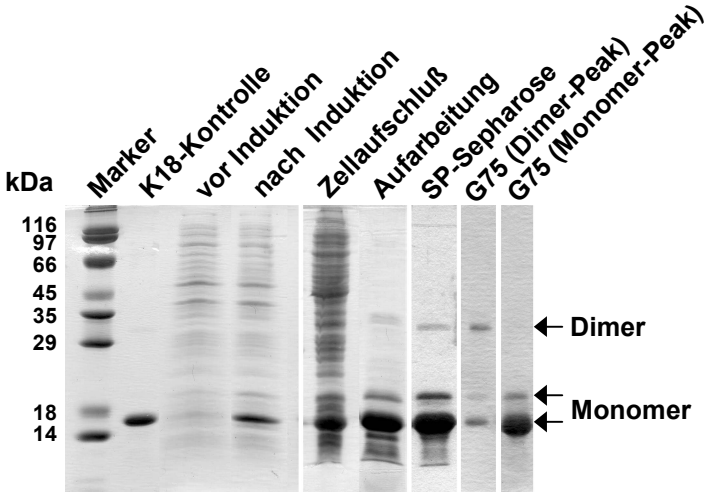

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Expression und Aufreinigung des 4-Repeat Tau-Konstrukts K18. Die Proben wurden mit Probenpuffer vermischt, auf einem 15 %igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und anschließend mit der Coomassie-Methode gefärbt. Bei der Probe vor Zugabe des IPTG zur Induktion (vor Induktion) ist nur geringfügig Protein exprimiert worden. Nach Zugabe von IPTG zur Induktion und weiteren 2.5 h Inkubation ist eine eindeutige Überexpression des K18-Proteins zu erkennen (nach Induktion). Nach dem Aufschluß der Zellen (Zellaufschluß) und der anschließenden Behandlung durch Erhitzen auf 100 °C in 500 mM NaCl und Pelletierung sind im Überstand bereits die meisten Fremd-Proteine vom Tau-Protein abgetrennt (Aufarbeitung). Eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung des Proteins erfolgt über SP-Sepharose Kationenaustausch-Chromatographie (SP-Sepharose). In der letzten Aufreinigungsstufe, einer Gelpermeations-Chromatographie werden effektiv die Dimere (G75 (Dimer-Peak)) vom monomeren Protein (G75 (Monomer-Peak)) und Abbauprodukten des K18-Konstrukts getrennt.

1.8 Bestimmung der DTT-Konzentration

Die Bestimmung der DTT-Konzentration erfolgte mit 5,5´-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Im Meßansatz wurden 10 µL Probe und 10 µL DTNB-

Lösung (5 mM in 100 mM NaP-Puffer, pH 8.0) eingesetzt und mit PBS auf 100 µL aufgefüllt. Für die Eichreihe wurde L-Lysin (Sigma) in einem Konzentrationsbereich von 5 - 120 µM verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 412 nm in einer Quarz-Küvette in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3000 pro, Pharmacia Biotech) gemessen.

2 Molekulargenetische Methoden

2.1 Mutagenese der Tau-Konstrukte

Als Expressionsvektor diente der in unserem Labor klonierte Vektor pNG2 (Biernat *et al.* 1992) der wiederum auf dem Vektor pET-3 beruht (Studier *et al.* 1990). In den pNG2 Vektor wurden die Tau-Konstrukte kloniert. Auf dieser Grundlage wurden die FTDP-17 Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange Site directed Mutagensis Kit (Stratagene) hergestellt (für die Sequenzen der *primer* siehe Anhang). Im PCR-Ansatz wurden je 1 µL 10 pMol μL^{-1} vorwärts- und rückwärts-*primer*, 0.5 µL 10 mM dNTPs (je 2.5 mM) 2.5 µL 10× Pfu-Puffer, 5-200 ng Vektor DNA sowie 0.5 µL Pfu-Polymerase eingesetzt und mit sterilem H_2O auf ein endgültiges Volumen von 25 µL aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz nur der vorwärts-*primer* eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 4 beschrieben. Dabei wurde eine einmalige Denaturierungsphase (Phase 0) durchgeführt, gefolgt von 16 Zyklen der Phasen 1 - 3.

Tabelle 4: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese

PCR-Phase	**Temperatur**	**Dauer**	**Wiederholungen**
0. Denaturierung	95 °C	30 sec	1
1. Denaturierung	95 °C	30 sec	16
2. Annealing	55 °C	1 min	16
3. Verlängerung	68 °C	10 min	16

Nach der PCR wurde die Matrizen-DNA, welche nicht die gewünschte einzuführende Mutation enthält, durch das Restriktionsenzym Dpn I (New England Biolabs) verdaut. Dpn I schneidet spezifisch methylierte DNA, wie sie in der aus *E.coli* isolierten Matrizen-DNA vorliegt, jedoch nicht in den PCR-Produkten. Für den Verdau wurde zum PCR-Produkt 1 µl Dpn I gegeben und sorgfältig durchmischt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1.5 h wurde nochmals dieselbe Menge Enzym dazugegeben und für weitere 1.5 h inkubiert.

Von dem verdauten PCR-Ansatz wurde 1 µL zu 15 µL XL2-Blue ultrakompetenten Zellen (Epicurian Coli XL2-Blue MRF´ Ultracompetent Cells, Stratagene) gegeben und die Transformation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit der DNA 30 min auf Eis, dann 30 sec bei 42 °C und wiederum auf Eis für 2 min inkubiert. Danach wurden 200 µL 42 °C temperiertes NZY+ Medium zugegeben (pro Liter: 10 g NZ-Amine (Casein Hydrolysat), 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und nach dem Autoklavieren folgende sterilfiltrierte Lösungen direkt vor Gebrauch zugegeben: 12.5 mL 1 M $MgSO_4$, 12.5 mL 1 M $MgCl_2$, 10 mL 2 M Glucose).

Zur Identifizierung der erfolgreichen Mutagenese wurden während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf der Basis der *primer* Restriktionsschnittstellen deletiert oder neu in das Plasmid eingeführt und dann über Restriktionsschnittstellen-Analyse nachgewiesen. Endgültig verifiziert wurden Mutanten durch Sequenzierung beider DNA-Stränge des Tau-Konstrukts auf dem Vektor.

2.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungs-Reaktion wurde durch direktes zyklisches Sequenzieren nach der Sanger-Didesoxy-Methode (Sanger *et al.* 1977) in der Robocycler Gradient 96 (Stratagene) PCR-Maschine durchgeführt. In der PCR wurde ein Programm verwendet, wie in Tabelle 5 beschrieben. Für den Reaktionsansatz wurden 1.2 µg Plasmid-DNA als Matrize, 3 µL PCR-Reaktionsgemisch (BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystems)), 5 µL Reaktionspuffer (Half-term (Applied Biosystems)), je

1 µL vorwärts- und rückwärts-*primer* (5 pMol μL^{-1}) eingesetzt und mit sterilem H_2O auf 20 µL aufgefüllt.

Die Sequenzierungsprodukte wurden von nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden (Terminatoren) durch Zentrifugation durch Zentrifugations-Säulen (DyeEx, Qiagen) gereinigt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) nach dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 5: PCR-Programm für die zyklische Sequenzierung von DNA

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1. Denaturierung	96 °C	30 sec	25
2. Annealing	40 °C	30 sec	25
3. Verlängerung	60 °C	4 min	25

3 Spezielle Methoden zur Aggregation von Tau-Protein zu PHFs

3.1 *In vitro* PHF-Polymerisation

Die Untersuchungen zur Kinetik der PHF-Polymerisation der verschiedenen Tau-Konstrukte wurden ausschließlich mit Proteinen durchgeführt, die durch zwei Reinigungsstufen (s.o.) von anderen Proteinen und von Tau-Multimeren und Tau-Abbauprodukten gereinigt worden waren.

Die Polymerisation der Tau-Isoformen und Tau-Konstrukte wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit dem Polyanion Heparin (MW ~ 6000 Da, Sigma) induziert. Dazu wurde Tau im Bereich von 5 - 50 µM in Volumina von 20 - 500 µL im molaren Verhältnis von 4:1 mit Heparin vermischt und in der Regel bei 37 °C inkubiert. Ansätzen von hTau40 wurde ein Gemisch von Protease-Inhibitoren zugesetzt (Endkonzentration: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 µg mL^{-1} Pepstatin, 1 µg mL^{-1} Leupeptin, 1 µg mL^{-1} Aprotenin). Es wurde im Allgemeinen derselbe Puffer (PBS, pH 7.4 mit

1 oder 10 mM DTT) für die PHF-Polymerisation verwendet wie für den letzten Schritt der Aufreinigung.

Vor der Inkubation und Zugabe des Heparin wurden die Proben für 5 min bei 50 °C erhitzt (außer bei Ansätzen von Cystein-Mutanten oder oxidierenden Reaktionsbedingungen). Vermittelt durch das Reduktionsmittel DTT sollte diese Vorbehandlung eine völlige Reduktion von multimerem Tau-Protein zu Monomeren sicherstellen. Die Inkubationszeiten der PHF-Polymerisation variierten zwischen einigen Stunden und mehreren Tagen.

Für die Ansätze mit der Fettsäure Arachidonsäure (Sigma) wurde zunächst aus der lyophylisierten Arachidonsäure in 100 % Ethanol eine Stammlösung mit 100 mg mL^{-1} hergestellt. Diese wurde bei -80 °C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde daraus auf Eis eine Gebrauchslösung mit 10 mM hergestellt (3.05 µL 100 mg mL^{-1} Arachidonsäure und 96.05 µL 100 % Ethanol). Die endgültige Konzentration der Arachidonsäure in den PHF-Ansätzen betrug das 18.75-fache der eingesetzten Tau-Konzentration und entspricht damit demselben Verhältnis, wie es die Arbeitsgruppe um L. Binder einsetzt (King *et al.* 2000). Als Kontrolle wurde immer ein Ansatz ohne Protein parallel bearbeitet, die Arachidonsäure hatte keinen Einfluß auf die gemessene ThS-Fluoreszenz.

Die Quantifizierung der gebildeten PHFs erfolgte mit dem ThS-Assay (Friedhoff *et al.* 1998a). Dazu wurde zu den gewählten Zeitpunkten aus den Ansätzen jeweils ein Aliquot entnommen. Am Endpunkt der PHF-Bildung wurde aus denselben Reaktionsansätzen ein Aliquot für die elektronenmikroskopische Untersuchung und Bestätigung der PHF-Bildung entnommen.

3.2 Fluoreszenzmessungen von *in vitro* PHFs

Die *in vitro* erzeugten PHFs wurden durch Zugabe des Farbstoffs Thioflavin S (Sigma) und dessen Fluoreszenz bei der Interaktion mit den prä-assemblierten PHFs

entsprechend der Methode von Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998a) quantifiziert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Fluoroskan Ascent Spektrofluorometer (Labsystems) mit einem Exitationsfilter bei 440 nm und einem Emissionsfilter bei 510 nm und einer Integrationszeit von 60 Millisekunden in schwarzen 384 Loch Mikrotiterplatten (Cliniplate 384, Labsystems) gemessen. Vor dem Messen wurden die Proben in den Mikrotiterplatten bei 420 rpm (geräteinterne Einstellung) für 5 sec gemischt. Die Messungen wurden im Auflichtmodus bei Raumtemperatur in PBS pH 7.4 mit 10 µM ThS jede Minute für eine Gesamtzeit von 30 min gemessen. Vom Endwert wurde die vor Zugabe der Probe gemessene Hintergrund-Fluoreszenz abgezogen.

3.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurde die Bildung von PHFs aus Tau-Protein bestätigt und das Erscheinungsbild der Filamente dokumentiert. Als Träger für die Proben wurden Kupfernetze (600 *mesh*) verwendet. Diese wurden zunächst mit einem Kohlefilm belegt, der zuvor auf eine frisch gespaltene Glimmerschicht in einem Hochvakuum-Pumpenstand (BAE 080T, Balzer) bei einem Druck von $2 - 4 \times 10^{-6}$ hPascal aufgedampft worden war.

Zur besseren Adsorption der Proben wurden die Netze in einem Beglimmungsapparat (CTA 010, Balzer) für zweimal 30 sec bei einem konstanten Stromfluß von 35 - 40 mA beglimmt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde mit H_2O auf 0.1 - 0.5 mg mL^{-1} eingestellt und das beglimmte Netz mit der Oberseite (Kohlefilm-Seite) auf 10 µL dieser Lösung gelegt und 45 sec inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgezogen und das Netz mit zwei Tropfen H_2O auf dieselbe Weise gewaschen und für 45 sec mit 20 µL 2 % Uranylacetat (w/v) (pH 4.5) gefärbt. Alle verwendeten Lösungen wurden direkt vor Gebrauch durch einen 0.2 µm Filter filtriert.

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde standardmäßig bei einer Vergrößerung von 40 000 mit einem TEM CM12 (Philipps) mit einer Wolframelektrode bei einer Beschleunigungs-Spannung von 100 kV durchgeführt. Als Negativmaterial zur

Dokumentation der PHFs wurde Kodak electron image film SO-163 Estar thick base 8.3 × 10.2 cm verwendet. Von diesen wurden anschließend Positiv-Abzüge gemacht.

4 Spektroskopische Methoden

4.1 Fourier Transform Infrarot-Spektroskopie

Für die Untersuchung der Sekundärstrukturen von Proteinen eignet sich die Aufnahme von Fourier Transform Infrarot Spektren (FTIR-Spektren). Statt der Wellenlänge λ wird die Wellenzahl (Anzahl der Wellenzüge pro cm, 1/λ) angegeben. Gemessen wird dabei die Absorption der Amid-I-Bande bei 1600 - 1700 cm^{-1}. Die Absorption der Amid-I-Bande in diesem Bereich des infraroten Lichts beruht zu circa 80 % auf der Streckschwingung der Carbonylgruppe der Peptidbindung. Die Frequenz und Intensität dieser Schwingung ist im hohen Maße von der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe abhängig. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in unterschiedlichen Sekundärstrukturen wie α-Helix, β-Faltblatt und β-Schleifen führt auch zu einer für diese Strukturen charakteristischen Amid-I-Absorption und läßt sich von der Struktur eines Zufallsknäuels (*random coil*) unterscheiden (zur Übersicht siehe (Susi und Byler 1986; Byler und Susi 1986)). Da H_2O im selben spektralen Bereich absorbiert wie die Amid-I-Bande, wird eine Messung in D_2O bevorzugt.

Als Vorbereitung zur FTIR-Spektroskopie der Tau-Proteine wurden die löslichen Tau-Monomere in 80 % Aceton für mehrere Stunden bei –20 °C gefällt und anschließend 10 min bei 16 000 × *g* und 4 °C pelletiert. Die Pellets wurden in 90 % Ethanol in H_2O gewaschen, im Vakuum getrocknet und in D_2O (Sigma) aufgenommen.

PHFs wurden bei 100 000 × *g* pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden zweimal mit 100 µL D_2O überschichtet, der Überstand jeweils verworfen und die Pellets schließlich in D_2O resuspendiert. Die Proben wurden vor der Aufnahme der

Spektren mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert, um einen vollständigen Austausch des Wasserstoffs durch Deuterium zu gewährleisten.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mittels des Jasco FT-IR410 Instruments (Jasco). Durch intensives Spülen mit Stickstoff wurde atmosphärischer Wasserdampf aus der Probenkammer entfernt. Gemessen wurde zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 1 cm^{-1}. Für jedes Spektrum wurden 128 Einzel-Spektren gemittelt. Als Proben-Küvette wurden zwei CaF_2-Fenster verwendet, die durch Abstandhalter einer Dicke von 25 µm getrennt waren.

An jedem Meßtag wurde ein Hintergrund-Spektrum des Geräts und der verwendeten D_2O-Charge vor den Proben-Spektren aufgenommen. Der Wasserdampf-Hintergrund wurde sowohl von dem gemessenen D_2O-Spektrum als auch von dem Proben-Spektrum abgezogen, bevor das D_2O-Spektrum vom Proben-Spektrum abgezogen wurde. Um die Spektren besser vergleichen zu können, wurden sie in Bezug auf ihr Maximum normalisiert.

III ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit verwendeten Isoformen und Konstrukte von Tau sind in Abbildung 5 zusammengefaßt. Für die Untersuchung der FTDP-17 Mutanten wurde die längste Tau-Isoform hTau40 und das 4-Repeat-Konstrukt K18 verwendet. Die kürzeste Tau-Isoform hTau 23 wurde ausschließlich für die Aufnahme von FTIR-Spektren verwendet. Der Einfluß von reduzierenden und oxidierenden Bedingungen auf die Polymerisation von Tau zu PHFs wurde anhand des 4-Repeat Konstrukts K18 sowie der 3-Repeat-Konstrukte K19 und K12 untersucht.

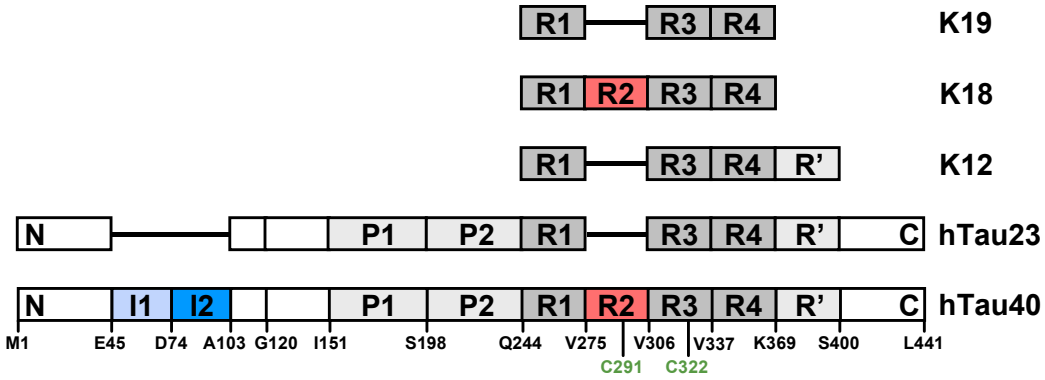

Abbildung 5: Für die Polymerisation zu PHFs verwendete Isoformen und Konstrukte von Tau. Die längste humane Tau-Isoform hTau40 enthält zwei N-terminale Einschübe (I1 und I2 = blau) sowie den alternativ gespleißten 2. Repeat (R2 = rot). Die kürzeste Tau-Isoform hTau23 enthält weder N-terminale Einschübe, noch den 2. Repeat. Das 4-Repeat-Konstrukt K18 besteht aus den vier Repeats der Mikrotubulus-bindenden Domäne. Bei den 3-Repeat Konstrukten K19 und K12 ist der 2. Repeat abwesend. K12 enthält weiterhin einen als R´ bezeichneten unvollständigen Repeat. Für eine detailierte Beschreibung der Domänen von Tau siehe Abbildung 1.

1 FTDP-17 Mutanten des Tau-Proteins

Im Gehirn von Alzheimer-Patienten findet man abnormal aggregierte Proteine, die für die eindeutige Diagnose der Krankheit *post mortem* charakteristisch sind. Diese Ablagerungen bestehen im Falle der Amyloid-Plaques zum Großteil aus dem Amyloid-β-Peptid und im Falle der neurofibrillären Bündel (NFTs) aus Tau-Protein.

Ein gewisser Prozentsatz an Alzheimer-Fällen korreliert mit Mutationen in speziellen Genen, wie zum Beispiel APP, Presinilin 1 und Presinilin 2 (Selkoe 1998; Esler und Wolfe 2001). Im Gegensatz dazu waren für das Tau-Gen lange Zeit keine Mutationen bekannt. Die Situation änderte sich, als bei einer Gruppe von frontotemporalen Demenzen, die unter dem Namen FTDP-17 (*frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17* (Foster *et al.* 1997)) zusammengefaßt werden, mehrere Mutationen im Tau-Gen gefunden wurden. Bei dieser Krankheit aggregiert vergleichbar mit der Alzheimer-Krankheit das Tau-Protein zu Filamenten (den PHFs). Größere Konglomerate dieser Filamente, die neurofibrillären Bündel (NFTs) lassen sich intrazellulär nach einer speziellen Anfärbung in Gehirnschnitten finden. Amyloid-Plaques sind jedoch abwesend (Foster *et al.* 1997).

Diese Tatsache legt die Annahme nahe, daß die Mutationen im Tau-Protein ursächlich für die Ausbildung der Krankheitssymptome bei FTDP-17 sind. In dieser Arbeit sollten deswegen die Mutationen des Tau-Proteins auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die für frontotemporale Demenzen und die Alzheimer-Krankheit charakteristischen PHFs zu bilden. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, grundlegende Mechanismen zu finden, die der Alzheimer-Krankheit und anderen verwandten Tauopathien zu Grunde liegen.

1.1 Polymerisation von FTDP-17 Tau-Protein zu PHFs

1.1.1 Kinetik der PHF-Bildung von FTDP-17 Mutanten auf der Basis von hTau40

Der Einfluß der FTDP-17 Mutationen auf die Bildung von PHFs aus monomerem Tau-Protein wurde zunächst auf der Basis der längsten Isoform hTau40 (Abbildung 1 und Abbildung 2) untersucht. Dies bot die Möglichkeit, die ausgewählten Mutationen in einem natürlich vorkommenden Molekül (Protein-Isoform) zu untersuchen.

Durch den Einsatz von Polyanionen wie Heparin, t-RNA, oder Poly-Glutaminsäure kann die Bildung von PHFs aus monomerem Tau beschleunigt werden (Goedert *et al.* 1996; Perez *et al.* 1996; Kampers *et al.* 1996). Für die Experimente zur Polymerisation von FTDP-17 Tau-Protein zu PHFs wurde ausschließlich das Glykosaminoglykan Heparin (MW ~ 6000 Da) verwendet. Die Bildung der PHFs wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin S (ThS) gemessen. Bei dieser Methode interagiert der Farbstoff mit den PHFs und fluoresziert bei spezifischer Anregung. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zum Ausmaß (Masse) der gebildeten PHFs (Friedhoff *et al.* 1998a).

Es zeigte sich, daß alle Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ schneller und zu einem größeren Ausmaß PHFs bilden (Abbildung 6). Wild-Typ hTau40 polymerisierte über einen Zeitraum von 11 Tagen nur zu einem geringen Ausmaß. Eine Gruppe von Mutanten, bestehend aus G272V, N279K, V337M und R406W, zeigte im Vergleich zum Wild-Typ hTau40 eine schnellere Polymerisation mit einer Halbwertzeit von 2.5 - 3 Tagen sowie ein 1.5 - 2-fach höheres endgültiges Ausmaß der Polymerisation. Besonders auffällig sind die Mutanten ΔK280 und P301L. Sie bilden eine Gruppe mit extrem hoher Polymerisations-Effizienz. Die Mutante ΔK280 zeigte eine Halbwertzeit von 3.5 h und ein 5-fach höheres Ausmaß, die P301L Mutante eine Halbwertzeit von 1.5 Tagen und ein 3-fach höheres Ausmaß der PHF-Polymerisation.

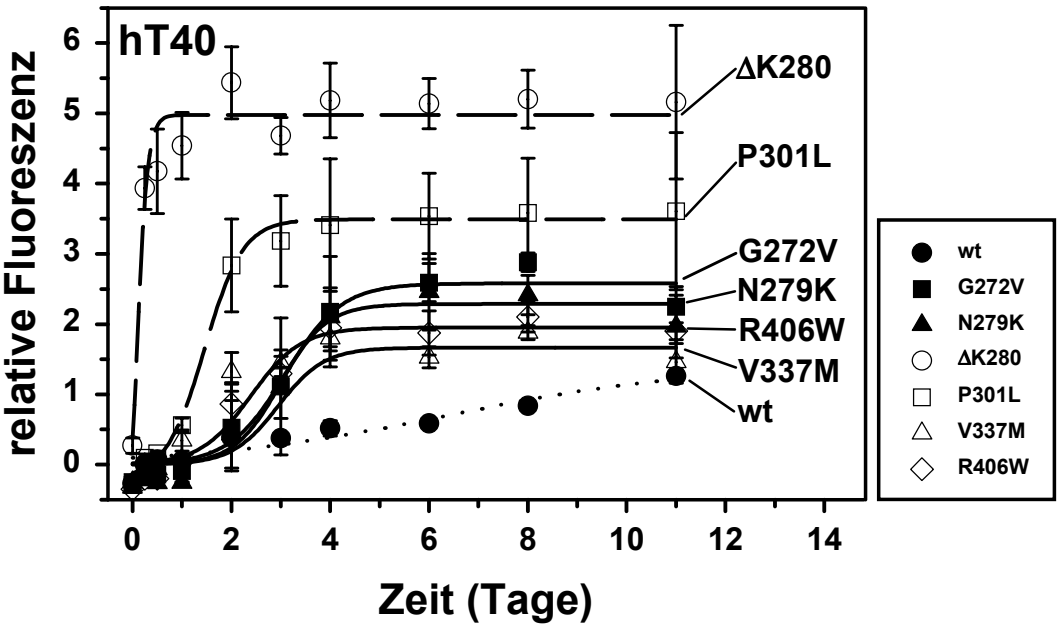

Abbildung 6: Polymerisation der hTau40 FTDP-17 Mutanten zu PHFs. Die Kinetik der Polymerisation der hTau40 Mutanten wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThS gemessen. Eingesetzt wurden 50 µM hTau40 Monomer in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 12.5 µM Heparin induziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Alle Mutanten zeigen eine beschleunigte PHF-Bildung im Vergleich zum Wild-Typ (gepunktete Linie), bei dem auch nach einer Inkubationszeit von 11 Tagen nur ein Teil zu PHFs polymerisiert ist. Die Mutanten können in zwei Gruppen unterschieden werden: Eine Gruppe, mit einer mittelmäßigen Effizienz ((G272V, N279K, V337M und R406W) (durchgezogene Linien)), mit einer Halbwertzeit von 2.5 - 3 Tagen und einem 1.5 - 2-fachen endgültigen Ausmaß der Polymerisation im Vergleich zum Wild-Typ hTau40 sowie eine Gruppe hoher Effizienz (gestrichelte Linien) mit einer Halbwertzeit von 3.5 h (ΔK280) bis 1.5 Tagen (P301L) und einem circa 3 - 5-fach höheren endgültigen Ausmaß der Polymerisation.

1.1.2 Kinetik der PHF-Bildung von FTDP-17 Mutanten auf Basis des Konstrukts K18

Die FTDP-17 Mutationen sind fast ausschließlich in der Repeat-Region lokalisiert (Abbildung 2). Diese Region ist einerseits für Bindung und damit Stabilisierung von Mikrotubuli verantwortlich (Gustke *et al.* 1994; Goode und Feinstein 1994). Andererseits bildet sie den Protease-resistenten Kern der PHFs (Wischik *et al.* 1988b; Novak *et al.* 1993) und Konstrukte aus der Repeat-Region bilden leichter PHFs als das gesamte Tau (Wille *et al.* 1992a). Um den Einfluß der FTDP-17 Mutationen innerhalb der Repeat-Region im Speziellen zu untersuchen, wurde die Bildung von PHFs aus Monomeren des Tau-Konstrukts K18 (Abbildung 2) untersucht.

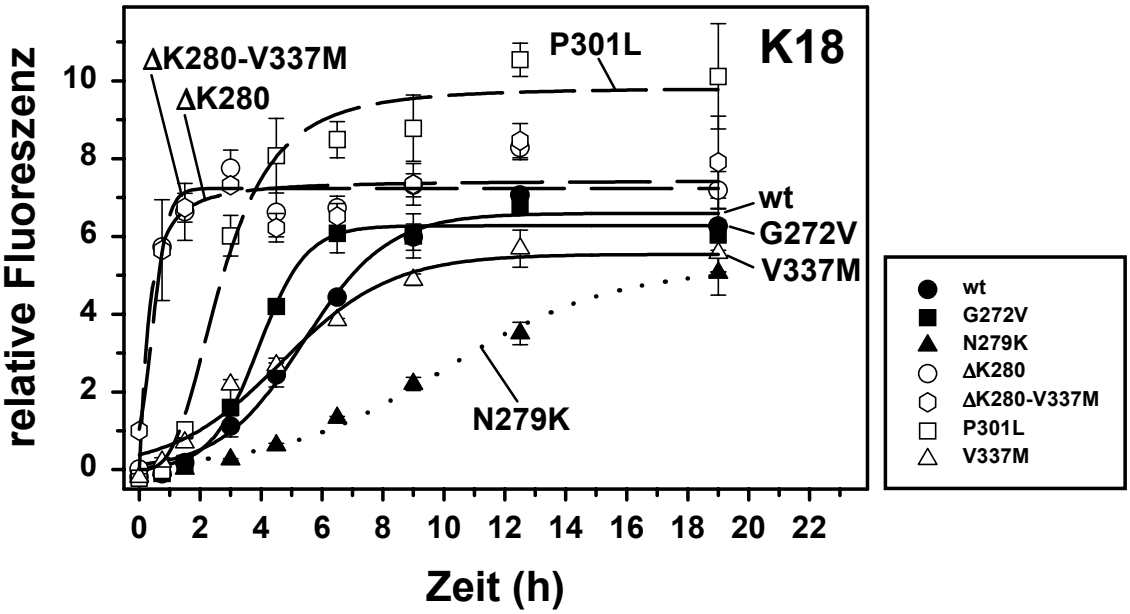

Abbildung 7: Polymerisation der K18 FTDP-17 Mutanten zu PHFs. Die Bedingungen der PHF-Polymerisation waren wie in Abbildung 6, mit der Ausnahme, daß 15 µM K18 und 3.8 µM Heparin eingesetzt wurden und der PBS-Puffer 10 mM DTT enthielt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Im Vergleich zu hTau40 zeigt das Konstrukt K18 im Allgemeinen eine viel schnellere PHF-Polymerisation. Die PHF-Bildung ist hier nach circa 11 h abgeschlossen und nicht wie bei hTau40 erst nach fast zwei Wochen Inkubation. Wie auch schon bei hTau40 bilden die Mutanten ΔK280 und P301L eine Gruppe hoher Effizienz (gestrichelte Linie) und polymerisieren schneller und zu einem höheren Ausmaß zu PHFs. Die Doppelmutante ΔK280-V337M zeigt dasselbe Verhalten wie ΔK280 (gestrichelte Linien). Die Mutanten G272V und V337M bilden mit dem Wild-Typ zusammen eine Gruppe mittlerer Effizienz und aggregieren mit derselben Geschwindigkeit (Halbwertzeit 4 - 5.5 h) und im selben Ausmaß (durchgezogene Linien). Eine verlangsamte PHF-Bildung ist bei N279K zu beobachten (gepunktete Linie).

Es zeigte sich, daß das Konstrukt K18 im Vergleich zu hTau40 generell viel schneller PHFs bildet. Die PHF-Polymerisation ist bei K18 bereits nach circa 11 h abgeschlossen, im Vergleich zu einer fast zweiwöchigen Inkubationszeit bei hTau40. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für hTau40 bilden im Vergleich zum Wild-Typ die Mutanten ΔK280 und P301L auch auf der Basis von K18 eine Gruppe hoher Effizienz (gestrichelte Linie). Sie polymerisierten mit einer Halbwertzeit von 20 min für ΔK280 und 2.5 h für P301L wesentlich schneller und P301L bildete das 1.5-fache Ausmaß an PHFs. Die Doppelmutante ΔK280-V337M zeigte dasselbe Verhalten wie ΔK280 (gestrichelte Linien). Das zeigt, daß die Mutation V337M keinen zusätzlichen Effekt auf die PHF-Bildung ausübt und die ΔK280-Mutation dominiert. Gleichzeitig

wird durch die Doppelmutante das Ergebnis für ΔK280 bestätigt, da es sich notwendigerweise um voneinander unabhängige Proteinpräparationen handelt. Zusammen mit dem Wild-Typ bildeten die Mutanten G272V und V337M eine Gruppe mittlerer Effizienz und aggregierten mit derselben Geschwindigkeit (Halbwertzeit 4.5 - 5 h) und erreichten dasselbe Ausmaß (durchgezogene Linien). Bei N279K war im Vergleich zum Wild-Typ eine verlangsamte PHF-Bildung zu beobachten (gepunktete Linie). Dies ist insofern bemerkenswert, als daß auf Proteinebene bei der N279K Mutation eine zusätzliche positive Ladung durch das Lysin eingeführt wird, im Gegensatz zur ΔK280 Mutation, bei der eine positive Ladung wegfällt. Diese gegensätzlichen Effekte spiegeln sich tatsächlich auch in der PHF-Kinetik wider (siehe auch Diskussion Abbildung 36).

Es ist anzumerken, daß bei der ΔK280 Mutante der Anfangswert der Kinetik nicht wie bei den anderen Mutanten und dem Wild-Typ bei Null lag, sondern bei verschiedenen Präparationen wiederholt erhöht war. Dies läßt sich nicht durch die schnelle Aggregation in Gegenwart von Heparin begründen, da der Nullwert standardmäßig vor der Zugabe von Heparin gemessen wurde. Auf diesen Punkt wird im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen.

1.1.3 Elektronenmikroskopie der Tau-Filamente aus FTDP-17 Mutanten

Die Ansätze zur PHF-Kinetik von den hTau40 und K18 Mutanten wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Dadurch sollte geprüft werden, ob die durch ThS-Fluoreszenz nachgewiesenen Filamente in ihrem Erscheinungsbild PHFs ähneln. Dazu wurde aus den Ansätzen zur PHF-Kinetik ein Aliquot nach Abschluß der PHF-Bildung entnommen und auf elektronenmikroskopischen Trägern (Netzen) mit Uranylacetat negativ gefärbt. Bei hTau40 zeigten der Wild-Typ und die Mutanten G272V, ΔK280 und P301L die für PHFs typischen paarigen helikalen und geraden Filamente. Im Gegensatz dazu waren die Filamente von N279K, V337M und R406W überwiegend gerade.

Bei dem Konstrukt K18 bildeten der Wild-Typ und die Mutanten G272V, N279K, ΔK280 und V337M überwiegend paarige helikale Filamente und die Mutante P301L wies vorherrschend gerade Filamente auf.

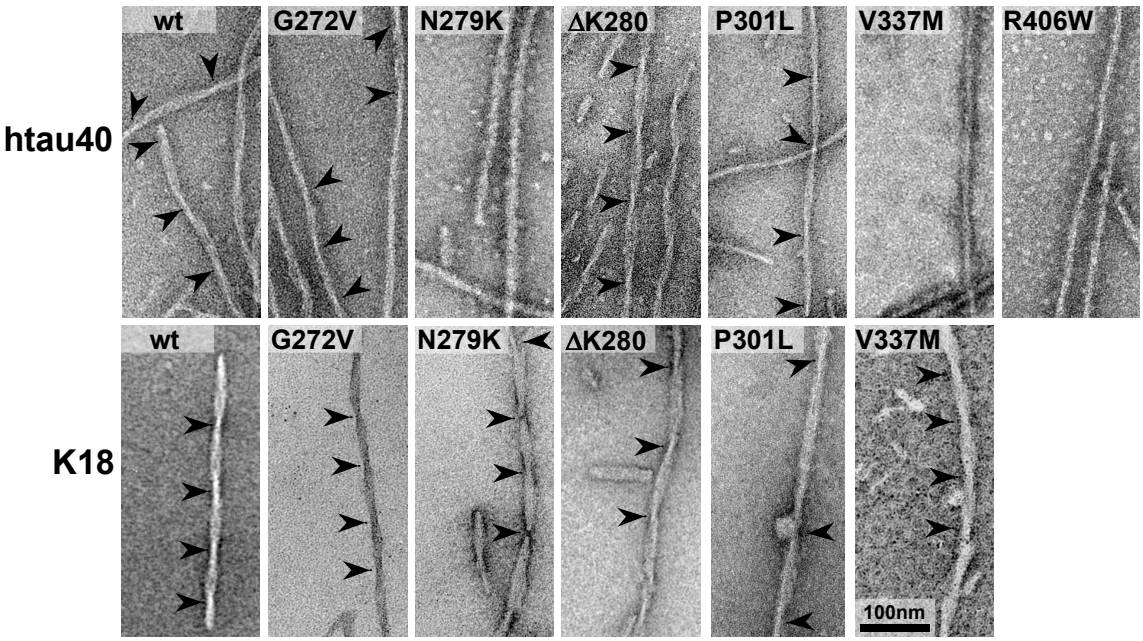

Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten Filamenten der FTDP-17 Mutanten. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Aggregation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Der Wild-Typ von hTau40 und die Mutanten G272V, ΔK280 und P301L zeigen paarige helikale Filamente. Im Gegensatz dazu überwiegen bei den Mutanten N279K, V337M und R406W gerade Filamente (obere Reihe). Bei dem Konstrukt K18 (untere Reihe) wurden beim Wild-Typ und den Mutanten G272V, N279K, ΔK280 und V337M hauptsächlich paarige helikale Filamente und bei der P301L Mutante vermehrt gerade Filamente gefunden.

1.2 Die Polymerisation von Tau und FTDP-17 Mutanten zu PHFs führt zu β-Faltblattstruktur in der Repeat-Region

Ein gemeinsames Prinzip bei der Aggregation von Proteinen, wie zum Beispiel des β-Amyloid-Peptids im Falle der Alzheimer-Krankheit, Huntingtin bei der Huntington-Krankheit und α-Synuclein bei der Parkinson-Krankheit, ist die Ausbildung einer

β-Faltblattstruktur bei der Polymerisation zu Filamenten (zur Übersicht siehe (Rochet und Lansbury 2000)). Die Bildung der Filamente wird dabei als Ursache für die neurodegenerative Erkrankungen angesehen.

Im Falle des Tau-Proteins wird mit den Techniken der Röntgen-Kleinwinkel-Streuung, CD-Spektroskopie und der FTIR-Spektroskopie weitgehend die Struktur eines Zufallsknäuels (*random coil*) für lösliches, monomeres Protein gefunden (Cleveland *et al.* 1977; Schweers *et al.* 1994). Frühere Studien konnten auch für PHFs, die aus Alzheimer-Gehirnen isoliert wurden, keinen bemerkenswerten Anteil an β-Faltblatt oder α-Helix feststellen (Schweers *et al.* 1994). Mit der Annahme, daß für die PHF-Bildung die Repeat-Region entscheidend ist, wurden in einer Studie durch von Bergen *et al.* (von Bergen *et al.* 2000) strukturelle Untersuchungen auf diesen Bereich beschränkt, um dadurch möglichst den Anteil strukturgebender Elemente im Verhältnis zu ungeordneten Strukturen innerhalb der PHFs zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, daß für die Polymerisation des 3-Repeat Tau-Konstrukts K19 (Abbildung 5) zu PHFs ein Hexapeptid-Motiv ($_{306}$VQIVYK$_{311}$ = PHF6) zu Beginn des 3. Repeats durch Bildung lokaler β-Faltblattstruktur essentiell ist. Eine homologe Hexapeptid-Sequenz befindet sich im 2. Repeat des Konstrukts K18 (PHF6* = $_{275}$VQIINK$_{280}$), fehlt aber im 1. und 4. Repeat.

Die FTDP-17 Mutationen liegen überwiegend im Bereich der Repeat-Region und damit auch in der Nähe oder innerhalb (ΔK280 in PHF6*) dieser beiden Hexapeptide. Ob bei dem 4-Repeat Konstrukt K18 bei der Bildung von PHFs β-Faltblattstrukturen entstehen und welchen Einfluß die FTDP-17 Mutationen auf diese abnorme Protein-Polymerisation haben, wurde mittels der FTIR-Spektroskopie untersucht. Eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Strukturelemente, wie α-Helix, β-Faltblatt und β-Schleife ist auf Basis der Amid-I-Bande nur für β-Faltblatt-Strukturen möglich, weil diese auf Grund ihrer charakteristischen Absorption bei 1615 - 1635 cm^{-1} von den anderen Sekundärstrukturelementen mit Absorptionsmaxima zwischen 1640 - 1660 cm^{-1} unterschieden werden können (Surewicz *et al.* 1993).

Das Spektrum für monomeres Protein der natürlichen Isoformen hTau40 und hTau23 sowie des Wild-Typ Tau-Konstrukts K18 (Abbildung 5) zeigen eine maximale Absorption bei circa 1645 cm^{-1} (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dieses Absorptionsmaximum ist spezifisch für eine überwiegend ungeordnete Sekundärstruktur (Surewicz *et al.* 1993). Nach einer Polymerisation zu PHFs zeigen die vollständigen Isoformen nur eine geringe Zunahme an β-Faltblattstruktur (Abbildung 9).

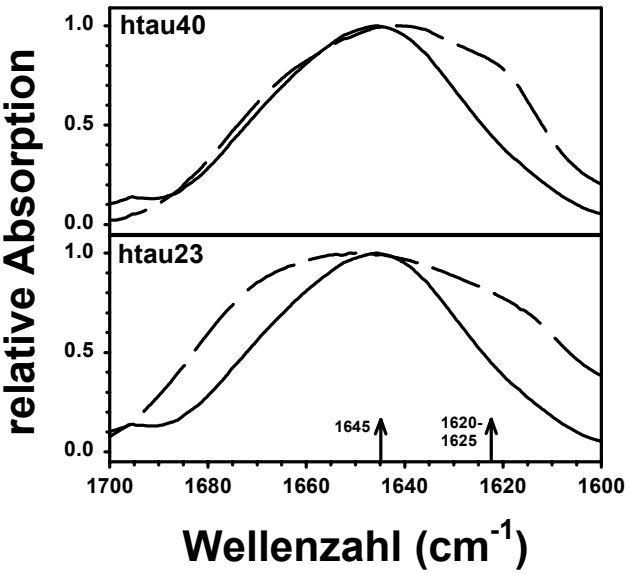

Abbildung 9: FTIR-Spektren der Tau Isoformen hTau40 und hTau23. Für die Spektren monomeren Tau-Proteins wurde Aceton gefälltes Protein in D_2O resuspendiert. PHFs wurden von verbliebenem Monomer durch Pelletieren getrennt und ebenfalls in D_2O resuspendiert. Die Polymerisation zu PHFs wurde durch das Polyanion Heparin induziert. Die Spektren für monomeres Protein (durchgezogene Linien) zeigen ein für eine Zufallsknäuel-Struktur typisches Absorptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1}. Nach einer Polymerisation zu PHF (gestrichelte Linien) verbleibt bei den Isoformen hTau40 und hTau23 das Absporptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1}. Es läßt sich lediglich eine leichte Schulter (hTau40) oder eine Peak-Verbreiterung (hTau23) bei einer Absporption von 1620 - 1625 cm^{-1} erkennen. Das weist auf einen geringen Anteil an Sekundärstruktur in Form von β-Faltblattstruktur hin, in einer ansonsten von einer Zufallsknäuel-Struktur dominierten Gesamtstruktur.

Die β-Faltblattstuktur wird dagegen deutlicher, wenn nur die PHF-bildende Repeat-Region betrachtet wird. Beim Wild-Typ des 4-Repeat Konstrukts K18 geht die Polymerisation von monomerem Protein zu PHFs mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Amid-I-Bande auf circa 1620 - 1625 cm^{-1} einher (Abbildung 10). Dieser Effekt zeigt eindeutig den Übergang von ungeordneter Struktur zu mehr Sekundärstruktur in Form von β-Faltblatt an (Susi und Byler 1986; Byler und Susi 1986; Surewicz *et al.* 1993). Die FTDP-17 Mutanten auf der Basis von K18 zeigen im Vergleich zum Wild-Typ einen vergleichbaren Anteil an Sekundärstruktur-

Elementen. Das gilt sowohl für die monomeren Proteine, die eine vorwiegende Struktur eines Zufallsknäuels zeigen sowie für die Proteine nach einer Polymerisation zu PHFs, mit einer Zunahme an β-Faltblattstruktur.

Eine Ausnahme bezüglich des Spektrums für monomeres (nicht polymerisiertes) Protein bildet die Mutante ΔK280. Hier weist das Spektrum bereits vor einer durch das Polyanion Heparin induzierten Aggregation eine distinkte Schulter bei 1625 cm^{-1} auf. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen.

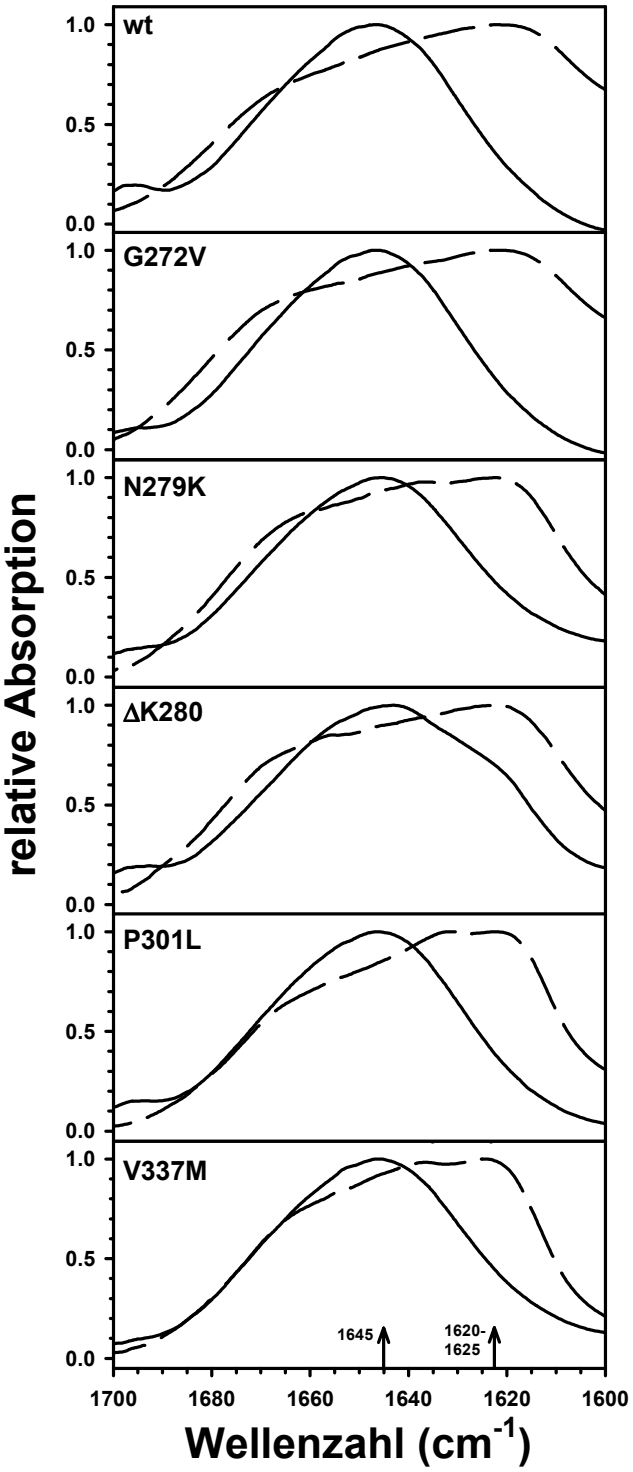

Abbildung 10: FTIR-Spektren von löslichem und zu PHFs polymerisierten FTDP-17 Mutanten des Tau-Konstrukts K18. Für die Spektren monomeren Tau-Proteins wurde Aceton gefälltes Protein in D_2O resuspendiert. PHFs wurden von verbliebenem Monomer durch Pelletieren getrennt und ebenfalls in D_2O resuspendiert. Die Polymerisation zu PHFs wurde durch das Polyanion Heparin induziert. Sowohl der Wild-Typ von K18 als auch alle FTDP-17 Mutanten zeigen in ihrem Spektrum für das monomere Protein (durchgezogene Linien) ein für eine Zufallsknäuel-Struktur typisches Absorptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1}. Mit der Polymerisation zu PHFs zeigen der Wild-Typ und alle Mutanten einen Übergang der Sekundärstruktur zu mehr β-Faltblattstruktur, der sich in einem Absorptionsmaximum bei 1620 - 1625 cm^{-1} verdeutlicht (gestrichelte Linien). Anzumerken ist die Schulter bei 1625 cm^{-1} bei nicht polymerisiertem ΔK280.

1.3 Besondere Eigenschaften der auf die PHF-Polymerisation extrem förderlich wirkenden FTDP-17 Mutation ΔK280

Beim letzten Aufreinigungsschritt der FTDP-17 Mutanten des Tau-Konstrukts K18 trat bei der Mutante ΔK280 im Vergleich zum Wild-Typ und den anderen FTDP-17 Mutanten eine Besonderheit auf. In der Gelpermeations-Chromatographie eluierte das Protein in zwei Peaks. Ein 1. Peak eluierte im Ausschlußvolumen der Säule und ein 2. Peak war der erwartete Monomer-Peak (Abbildung 11a). Wurde das Protein des 1. Peaks elektronenmikroskopisch untersucht, so konnten kleine Proteinaggregate gefunden werden (Abbildung 11b). Diese Oligomere ließen sich auch auf einem SDS-PAGE-Gel darstellen. Sie liefen nicht in das Trenngel ein, sondern verblieben im Sammelgel und zum Teil in der Geltasche (Abbildung 11c). Bei einer negativen Kontrastierung zeigten die Oligomere im elektronenmikroskopischen Bild eine Größe von circa 10×10 nm für die überwiegend vorkommenden globulären Partikel. Längliche Strukturen waren 10 nm breit und $15 - 40$ nm lang. Zum Teil ließen sich parallele Anlagerungen zweier globulärer oder länglicher Partikel erkennen.

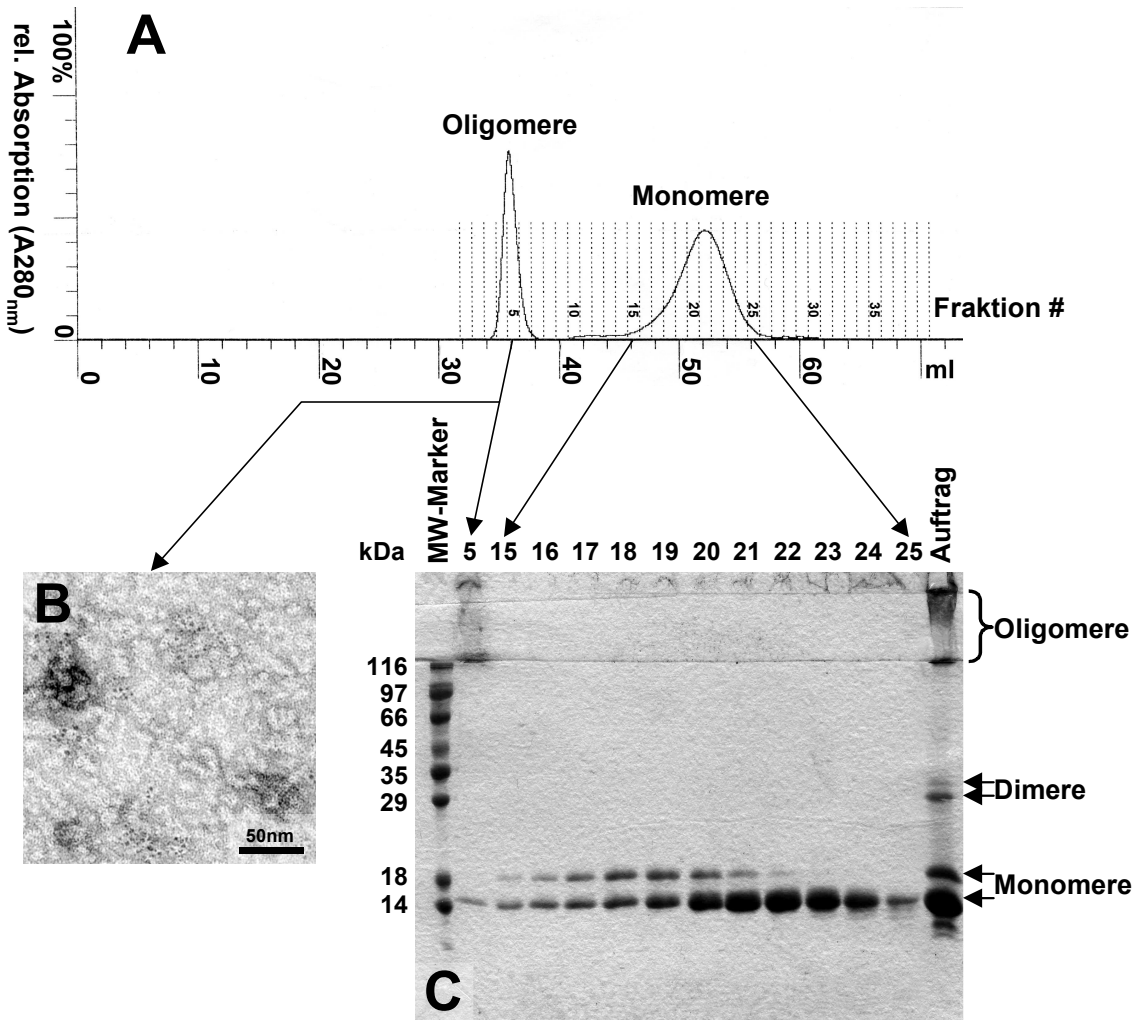

Abbildung 11: Auftrennung der K18 Mutante ΔK280 bei einer Gelpermeations-Chromatographie.
(A) Im Chromatogram treten zwei Protein-Peaks auf. Dabei liegt der 1. Peak im Ausschlußvolumen der Säule, was bereits auf eine Oligomerisierung des Proteins hindeutet.
(B) Die Oligomerisierung konnte mit einer elektronenmikroskopischen Untersuchung (Färbung mit Uranylacetat) bestätigt werden. Das Protein des 1. Peaks zeigt kleine Proteinaggregate, die als Nuklei für die PHF-Polymerisation wirken könnten.
(C) Die Auftrennung des Auftrags durch die Gelpermeations-Chromatographie in eine Oligomer-Fraktion und eine Monomer-Fraktion ist auf einem 15 %igem SDS-PAGE Gel dargestellt.

1.3.1 Die FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 bildet auch in Abwesenheit von Polyanionen PHFs

Die Aggregation der K18-ΔK280 Mutante zu Oligomeren während der Aufreinigung deutete auf eine starke Eigentendenz zur Polymerisation auch ohne induzierende Polyanionen hin. Diese Vermutung wird zusätzlich durch das Verhalten der K18-ΔK280 Mutante bei den Kinetiken zur PHF-Polymerisation gestützt. Es wurde bereits ein erhöhtes ThS-Fluoreszenzsignal gemessen bevor Heparin zugegeben wurde (Abbildung 7 und Abbildung 12). Auf Grund dieser Beobachtungen lag es nahe, die Fähigkeit zur PHF-Bildung der ΔK280 Mutante und der anderen FTDP-17 Mutanten in Abwesenheit des polymerisationsfördernden Polyanions Heparin zu testen.

In Abwesenheit von Heparin bildeten der Wild-Typ von K18 und die Mutanten G272V, N279K, P301L und V337M über einen Zeitraum von vier Tagen keine PHFs (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu konnte eine eindeutige PHF-Bildung für die Mutante ΔK280 im ThS-Fluoreszenzassay gemessen werden. Mit einer Halbwertzeit von circa 10 h war die PHF-Bildung zwar langsamer als bei Zugabe von Heparin mit einer Halbwertzeit von circa 20 min, es wurde jedoch ein vergleichbares endgültiges Ausmaß an PHFs gebildet. Auch hier zeigten die Ansätze für ΔK280 ein anfänglich erhöhtes Fluoreszenzsignal. Trotz der vorgeschalteten Gelpermeations-Chromatographie, in der die Oligomere vom monomeren Protein abgetrennt wurden, scheinen sich spontan wieder Oligomere zu bilden. Diese Oligomere sind wahrscheinlich für das erhöhte ThS-Fluoreszenzsignal sowie die distinkte Schulter in den FTIR-Spektren (Abbildung 10) verantwortlich. Eine eindeutige Konzentrations-abhängigkeit der Oligomerisation konnte festgestellt werden. In einigen Präparationen der K18-ΔK280 Mutante mit auffallend niedriger Proteinkonzentration konnte keine erhöhte ThS-Anfangsfluoreszenz gemessen werden. Die Bildung von PHFs in Abwesenheit von Heparin wurde dadurch aber nicht beeinträchtigt.

Die Fähigkeit der K18 Mutanten G272V, N279K, P301L, V337M und des Wild-Typs, in Gegenwart von Heparin PHFs zu bilden, wurde in diesem Versuch als Kontrolle getestet und war in allen Fällen positiv (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abbildung 7).

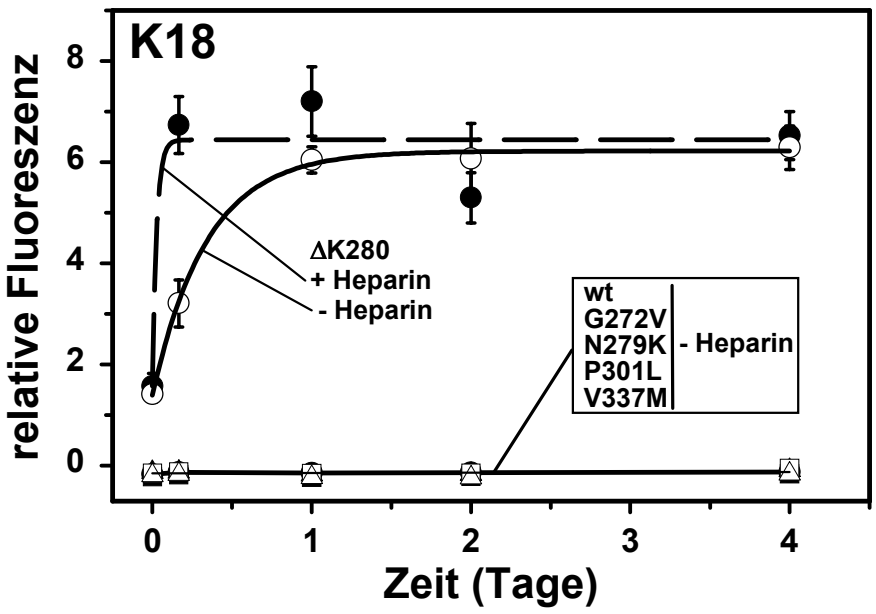

Abbildung 12: Polymerisation der K18 FTDP-17 Mutanten zu PHFs in Abwesenheit von Polyanionen. Die Bedingungen der PHF-Polymerisation waren wie in Abbildung 7 (15 µM K18 in PBS pH 7.4 mit 10 mM DTT), mit der Ausnahme, daß für Ansätze ohne Heparin dieses weggelassen wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Der Wild-Typ und die Mutanten G272V, N279K, P301L und V337M zeigen keine Filamentbildung nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen (untere durchgezogene Linie). Im Gegensatz dazu bildet die Mutante ΔK280 in Abwesenheit von Heparin (gestrichelte Linie) mit einer Halbwertzeit von circa 10 h dasselbe endgültige Ausmaß an PHFs wie in Gegenwart von Heparin. Die Geschwindigkeit der Polymerisation kann allerdings bei ΔK280 durch Heparin-Zugabe auf eine Halbwertzeit von circa 20 min beschleunigt werden (durchgezogene Linie). Für alle Mutanten und den Wild-Typ wurde als Kontrolle die PHF-Bildung in Gegenwart von Heparin in diesem Versuch getestet und war positiv (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abbildung 7).

1.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Abwesenheit von Polyanionen gebildeten PHFs der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280

Die Bildung von PHFs der K18-ΔK280 Mutante in Abwesenheit von Heparin wurde elektronenmikroskopisch verifiziert. Die gebildeten Filamente zeigten ein besonders klares Erscheinungsbild für paarige helikale Filamente (Abbildung 13). Sie wiesen eine regelmäßige Periodizität von 60 - 70 nm auf und tendierten nicht dazu, zu verklumpen. Verklumpungen zu größeren Konglomeraten waren bei PHFs anderer Mutanten, die in Gegenwart von Heparin polymerisiert worden waren, häufig der Fall. Im Vergleich dazu zeigten die Filamente von ΔK280, die in Gegenwart von Heparin gebildet worden waren alle Charakteristika von paarigen helikalen Filamenten. Die Periodizität war mit

circa 50 - 60 nm jedoch etwas geringer und die Filamente waren mit ungeordneten Proteinaggregaten dekoriert und tendierten eher dazu, zu verklumpen.

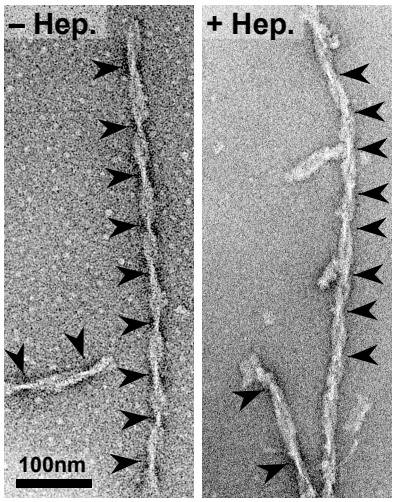

Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Abwesenheit und Gegenwart von Polyanionen gebildeten PHFs der K18 Mutante ΔK280. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen ein exemplarisches Erscheinungsbild für paarige helikale Filamente mit einer Periodizität von circa 50 – 70 nm.

1.3.3 Die Polymerisation der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 zu PHFs führt unabhängig von Polyanionen zu β-Faltblattstruktur in der Repeat-Region

Mittels FTIR-Spektrokopie wurden die PHFs der Mutante K18-ΔK280 analysiert, die in Abwesenheit und Gegenwart von Heparin polymerisiert worden waren. Die Spektren der Amid-I-Bande für die PHFs (Abbildung 14, gestrichelte Linie) zeigen in beiden Fällen ein Maximum bei 1620 - 1625 cm^{-1} und weichen ansonsten nur geringfügig voneinander ab. Sie sind ebenso vergleichbar mit den Spektren der PHFs für den Wild-Typ und die anderen FTDP-17 Mutanten (siehe auch Abbildung 10). Monomere Proteine (K18 Wild-Typ und ΔK280) sind, wie bereits in Abbildung 10 gezeigt, durch ein Maximum bei 1645 cm^{-1} gekennzeichnet, was auf eine ungeordnete Struktur schließen läßt. Die klare Schulter bei monomerem Protein der ΔK280 Mutante bei

1625 cm^{-1} kann auf eine spontane Aggregation zu Oligomeren zurückgeführt werden (siehe oben).

Zusammenfassend zeigt sich – unabhängig vom Polyanion Heparin – bei der Polymerisation von K18-ΔK280 zu PHFs eine Zunahme des Anteils von β-Faltblatt an der Gesamtstruktur.

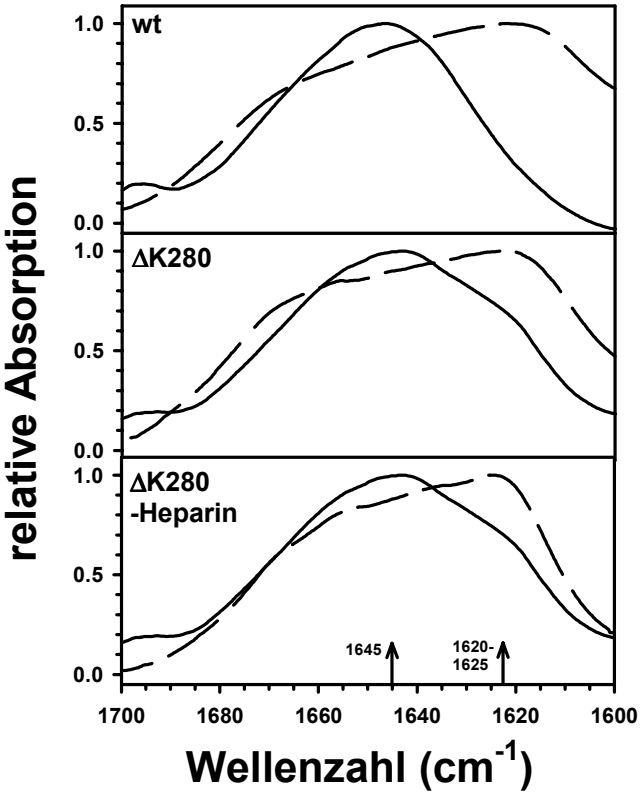

Abbildung 14: FTIR-Spektren von PHFs der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280, die in Abwesenheit und Gegenwart von Polyanionen polymerisierten. Die Präparation monomeren Tau-Proteins und der PHFs war wie in Abbildung 10 beschrieben. Die PHFs wurden in Abwesenheit von Heparin (- Heparin) oder in Gegenwart des Polyanions Heparin (+ Heparin) gebildet. Sowohl der Wild-Typ von K18 als auch die Mutante ΔK280 zeigen in ihrem Spektrum für das monomere Protein (durchgezogene Linien) ein für eine Zufallsknäuel-Struktur typisches Absorptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1}. Mit der Polymerisation zu PHFs zeigen der Wild-Typ und die ΔK280 Mutante (in Gegenwart und in Abwesenheit von Heparin polymerisiert) einen Übergang zu mehr Sekundärstruktur in Form von β-Faltblatt, der sich mit einem Absorptionsmaximum bei 1620 - 1625 cm^{-1} darstellt (gestrichelte Linien). Anzumerken ist die Schulter bei 1625 cm^{-1} bei nicht polymerisiertem ΔK280 die durch bereits gebildete Oligomere erklärt werden kann.

1.3.4 Temperatur-Abhängigkeit der PHF-Polymerisation von K18-ΔK280 in Abwesenheit von Heparin

In früheren Experimenten konnten Friedhoff *et al.* zeigen, daß die PHF-Bildung von Tau in Gegenwart von Heparin im starken Maße von der Temperatur abhängig ist (Friedhoff *et al.* 1998a). Mit der K18-ΔK280 Mutante läßt sich dieses Verhalten auch in Abwesenheit von Polyanionen untersuchen.

In Abbildung 15a sind die einzelnen PHF-Kinetiken bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Aus diesen Kurven wurde die relative Rate der PHF-Polymerisation anhand der Steigung ermittelt und gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 15b). Die PHF-Polymerisation war bei 4 °C fast vollständig inhibiert und nimmt bei höheren Temperaturen exponentiell zu. Bemerkenswert war die unverminderte PHF-Polymerisation bei der relativ hohen Temperatur von 50 °C. Dies spricht für eine hohe Stabilität der gebildeten Filamente auch ohne Polyanionen. Die Polymerisation bei den Ansätzen für 4 °C und 22 °C war zwar noch nicht vollständig abgeschlossen, es kann jedoch angenommen werden, daß die gebildete Masse an Filamenten mit der Temperatur zunimmt. Diese Tatsache zeigt, daß die Temperatur nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch das chemische Gleichgewicht zwischen Reaktionsedukten und Reaktionsprodukten beeinflußt. Die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts kann durch die Änderung der freien Energie der Reaktion begründet werden. Dies läßt sich auf eine von der Temperatur proportional abhängigen Zunahme der Entropie durch den hydrophoben Effekt (zunehmende Ordnung für die PHFs selber, zunehmende Unordnung des umgebenden Wassers) zurückführen.

Die Abnahme der Fluoreszenzwerte nach Erreichen eines maximalen Wertes war ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Die Masse der Filamente nimmt dabei nicht ab, es tritt lediglich eine fortschreitende Verklumpung der Filamente zu großen Konglomeraten auf, die sich auch elektronenmikroskopisch finden ließen. Die Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffs mit den PHFs scheint dann nicht mehr absolut quantitativ zu sein. Die Bildung von PHFs wurde in allen Ansätzen elektronenmikroskopisch verifiziert.

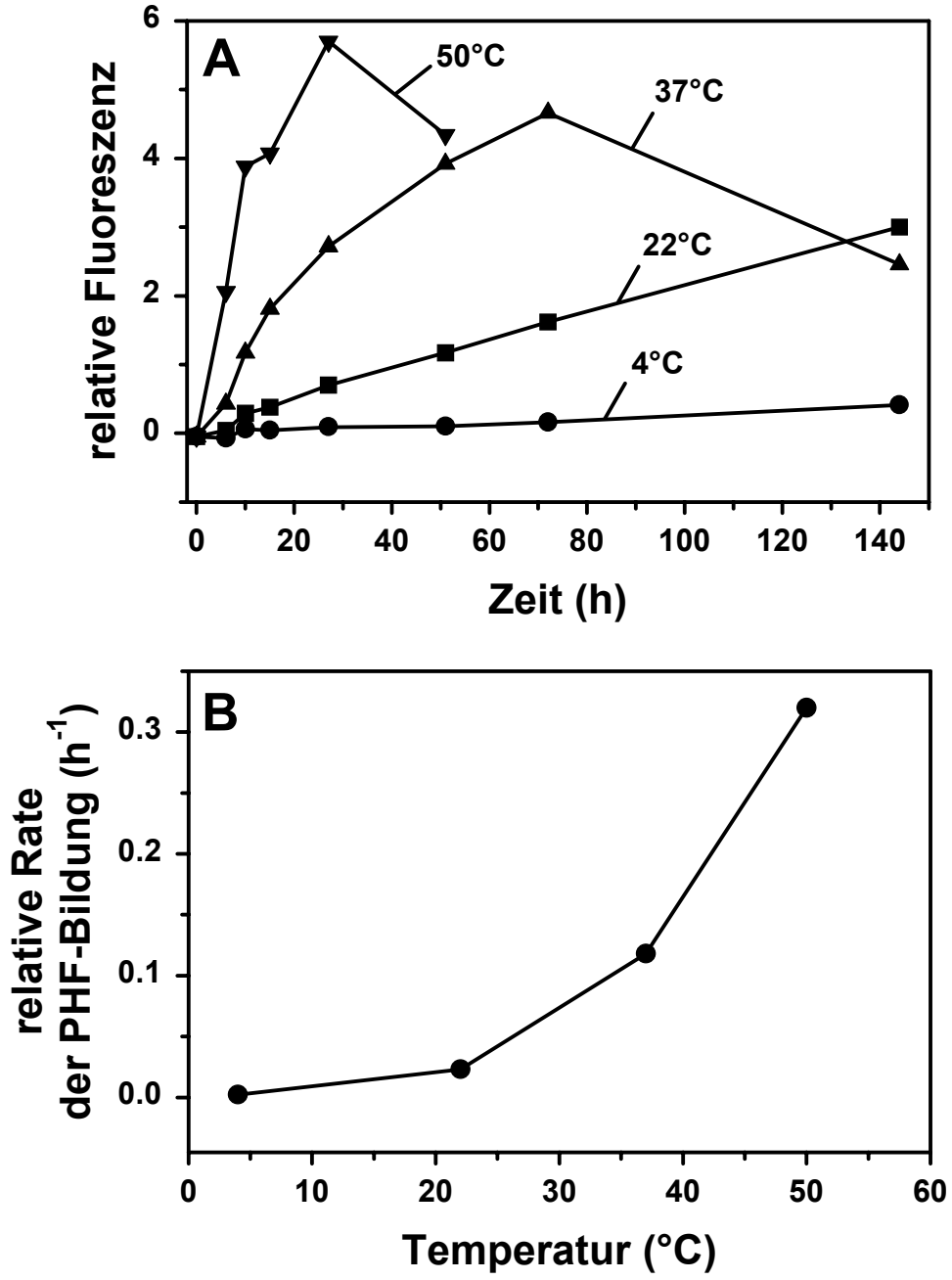

Abbildung 15: Temperatur-Abhängigkeit der PHF-Polymerisation der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 in Abwesenheit von Polyanionen. Eingesetzt wurden 20 µM K18-ΔK280 Monomer in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT. Die Ansätze wurden in Abwesenheit von Heparin bei 4 , 22 , 37 und 50 °C inkubiert.
(A) Die Kinetik der PHF-Polymerisation wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff ThS gemessen. Die PHF-Polymerisation zeigt einen starke Beschleunigung bei erhöhten Temperaturen und ist bei 4 °C fast vollständig inhibiert.
(B) Die Steigungen der Kurven der PHF-Kinetik wurden gegen die Temperatur aufgetragen, um den starken Anstieg der PHF-Polymerisation bei höheren Temperaturen zu verdeutlichen.

1.3.5 PHF-Bildung der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 mit N-terminalem HA-Tag

Auf der Basis von K18-ΔK280 wurde ein Konstrukt kloniert, das N-terminal einen HA-Tag trägt. Dieses Konstrukt sollte auf seine Fähigkeit hin überprüft werden, ob es trotz des artifiziellen Anhangs noch in der Lage ist, PHFs zu bilden. Mit diesem Konstrukt sollte in der Zellkultur der Nachweis von möglicherweise gebildeten intrazellulären PHFs ermöglicht werden. Weiterhin sollte das äußere Erscheinungsbild der Filamente mit den PHFs aus Alzheimer-Gehirnen verglichen werden sowie untersucht werden, ob ihnen dasselbe Bauprinzip der Ausbildung von β-Faltblattstruktur zu Grunde liegt.

Die Mutante HA-K18-ΔK280 zeigte bereits nach weniger als einem Tag Inkubation in Gegenwart von Heparin ein eindeutiges ThS-Fluoreszenzsignal (Abbildung 16a). Im Gegensatz zur reinen K18-ΔK280 Mutante bildeten sich jedoch keine Filamente in Abwesenheit von Heparin. Die gebildeten Filamente zeigen mit einer Periodizität von circa 80 nm die typischen Charakteristika von paarigen helikalen Filamenten (Abbildung 16b). Auch im FTIR-Spektrum unterscheidet sich die HA-K18-ΔK280 Mutante nicht von anderen untersuchten Tau-Mutanten (Abbildung 16c, zum Vergleich siehe auch Abbildung 10). Für monomeres Protein ergibt sich mit einem Absorptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1} die Struktur eines Zufallsknäuels, die sich nach Polymerisation zu PHFs in einen vermehrten Anteil an β-Faltblattstruktur (Absorptionsmaximum bei 1620 - 1625 cm^{-1}) ändert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die HA-K18-ΔK280 Mutante in der Lage ist, PHFs zu bilden und sich in den untersuchten Kriterien nicht von PHFs anderer Konstrukte oder Isoformen unterscheidet. Im Vergleich zur K18-ΔK280 Mutante wird durch den N-terminalen HA-Tag die Tendenz der ΔK280 Mutation abgeschwächt, PHFs zu bilden. Eine Bildung von PHFs in Abwesenheit von Polyanionen unter den getesteten Bedingungen fand nicht statt. Da eine PHF-Bildung nur in Gegenwart von Polyanionen stattfand, wurde das eigentliche Ziel – der Einsatz in der Zellkultur zur intrazellulären Identifikation von möglicherweise gebildeten PHFs – nicht weiter verfolgt.

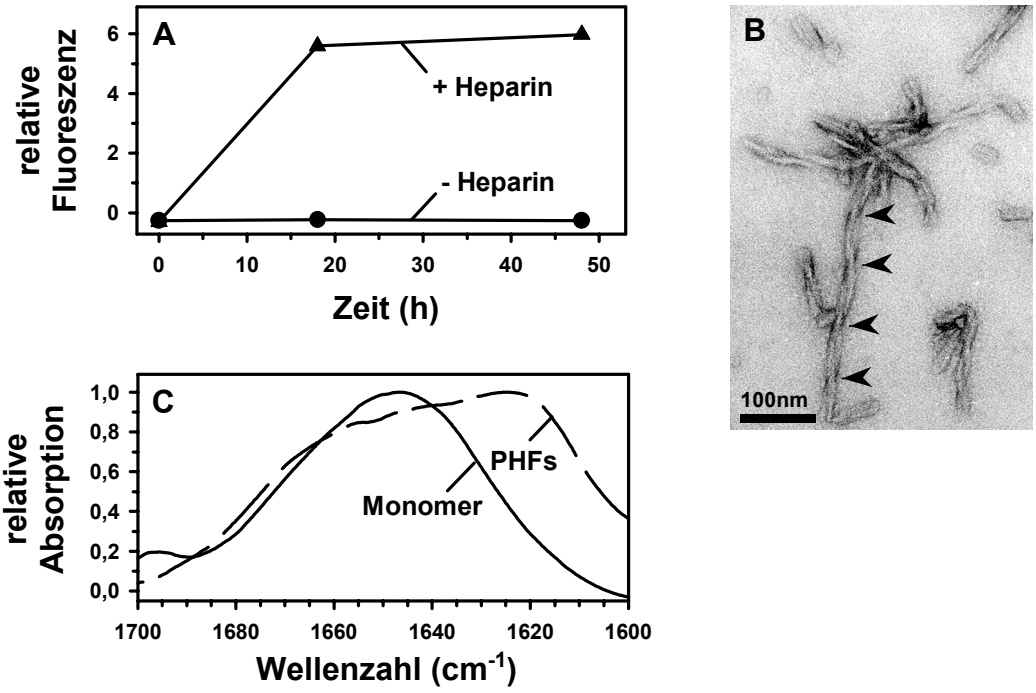

Abbildung 16: PHF-Bildung der HA-K18-ΔK280 Mutante. Eingesetzt wurden 43 µM HA-K18-ΔK280 Monomer in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT.
(A) Die Kinetik der PHF-Polymerisation wurde in Gegenwart und Abwesenheit von 10.75 µM Heparin mittels ThS-Fluoreszenz verfolgt. Nur HA-K18-ΔK280 mit polmerisationsförderndem Heparin bildet meßbar Filamente.
(B) Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Gegenwart von Heparin gebildeten PHFs der Mutante HA-K18-ΔK280. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen ein typisches Erscheinungsbild für paarige helikale Filamente mit einer Periodizität von circa 80 nm.
(C) FTIR-Spektren des HA-K18-ΔK280 Proteins. Monomeres und zu Filamenten aggregiertes Protein wurde wie in Abbildung 10 beschrieben gemessen. Das Spektrum für monomeres Protein (durchgezogene Linien) weist ein für eine Zufallsknäuel-Struktur typisches Absorptionsmaximum bei circa 1645 cm^{-1} auf. Mit der Polymerisation zu PHFs zeigt sich ein Übergang der Sekundärstruktur zu einem höheren Anteil an β-Faltblattstruktur an der Gesamtstruktur, der sich in einem Absorptionsmaximum bei 1620 - 1625 cm^{-1} verdeutlicht (gestrichelte Linien).

*1.3.6 Die FTDP-17 Mutation ΔK280 im PHF-bildenden Motiv PHF6 und PHF6**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die FTDP-17 Mutation ΔK280 zu einer extremen Beschleunigung der PHF-Bildung führt. Im Falle des Konstrukts K18 mit der Mutation ΔK280 ist die PHF-Bildung unabhängig von Polyanionen. In einer Studie durch von Bergen *et al.* (von Bergen *et al.* 2000) konnte ein Hexapeptid-Motiv ($_{306}$VQIVYK$_{311}$ = PHF6) zu Beginn des 3. Repeats gefunden werden, das für die Polymerisation des 3-Repeat Tau-Konstrukts K19 (Abbildung 17) zu PHFs essientiell ist. Die Wirkung dieses Motivs beruht auf der lokalen Bildung von β-Faltblattstruktur. Eine sehr ähnliche Hexapeptid-Sequenz befindet sich in dem 2. Repeat des Konstrukts K18 (PHF6* = $_{275}$VQIINK$_{280}$).

Wenn die Deletion des Lysin$_{280}$ (ΔK280), das am Ende dieses PHF6* Motivs liegt, einen derart großen Einfluß auf die PHF-Bildung hat, so stellte sich die Frage, ob auch bei dem 3-Repeat Konstrukt K19 die Änderung des PHF6 Motivs in das ΔK280-PHF6* Motiv zu einer beschleunigten PHF-Polymerisation führt. Dazu wurde in der K19-R3* benannten Mutante das PHF6 Motiv in das PHF6* Motiv der ΔK280 Mutante geändert (Abbildung 17). Dabei wurden die Aminosäuren Valin$_{309}$ zu Isoleucin und Tyrosin$_{310}$ zu Asparagin geändert sowie Prolin$_{312}$ deletiert.

Um gleichzeitig untersuchen zu können, welchen Einluß der 2. und 3. Repeat auf die veränderten Motive PHF6 und PHF6* haben, wurde bei der K18-ΔK280 Mutante der gesamte 3. Repeat deletiert (benannt K18-ΔK280-ΔR3). Mit dieser Mutante erhält man ein 3-Repeat Konstrukt, welches das ΔK280-PHF6* Motiv im 2. Repeat trägt und kann es mit dem 3-Repeat Konstrukt K19-R3* vergleichen, welches das ΔK280-PHF6* Motiv im 3. Repeat trägt.

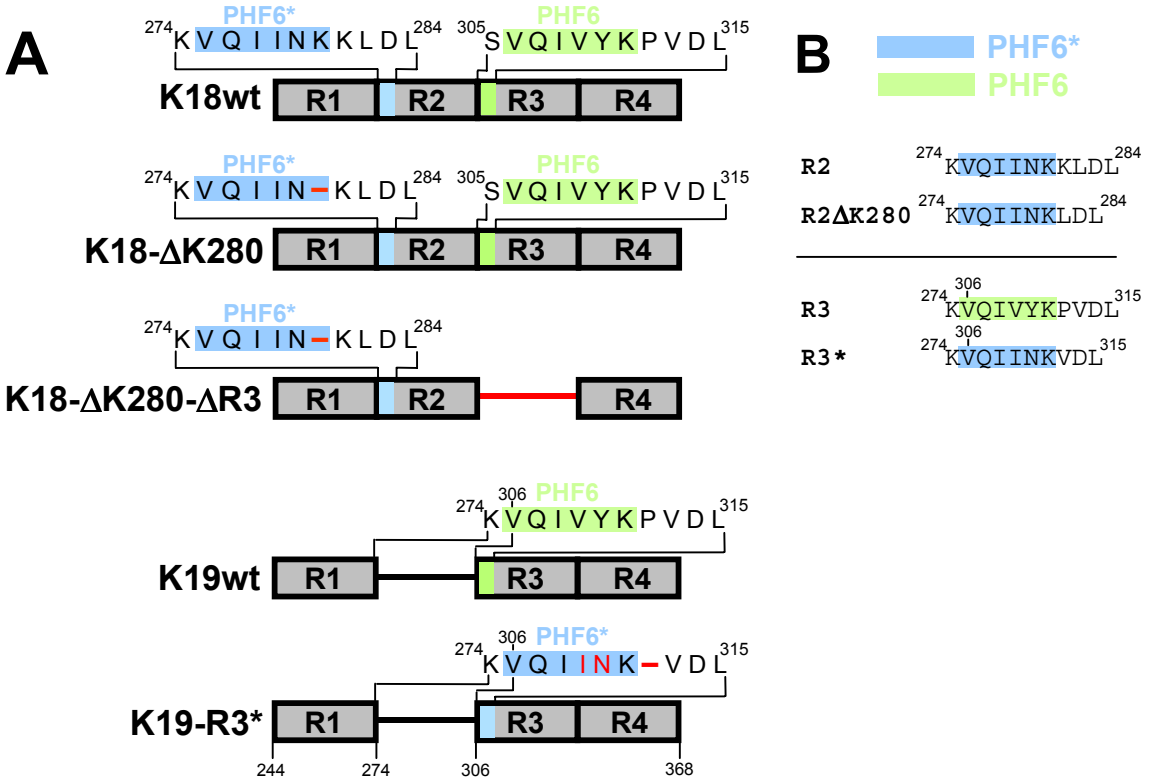

Abbildung 17: Schematische Darstellung der PHF6 und PHF6* Mutanten in den Tau-Konstrukten K18 und K19.
(A) Im 4-Repeat Konstrukt K18 liegen die für die PHF-Bildung grundlegenden Motive PHF6* (blau unterlegt) zu Beginn des 2. Repeats und PHF6 (grün unterlegt) zu Beginn des 3. Repeats. Bei der Mutante K18-ΔK280 wird das PHF6* Motiv durch die Deletion des K280 (rot) verändert, es folgt jedoch an Position 281 ein weiteres Lysin (K), so daß das PHF6* Motiv eigentlich unverändert bleibt, nur die nachfolgende Sequenz rückt eine Aminosäure weiter auf. Zusätzlich zur K280-Deletion ist in der K18-ΔK280-ΔR3 Mutante der 3. Repeat deletiert worden (rot), so daß bei diesem Konstrukt das PHF6 Motiv wegfällt. Im 3-Repeat Konstrukt K19 existiert nur das PHF6 Motiv zu Beginn des 3. Repeats. Dieses PHF6 Motiv wurde in der Mutante K19-R3* in das ΔK280-PHF6* Motiv geändert (Änderungen in rot).
(B) Es sind nochmals die Sequenzen für die Mutanten ΔK280 im 2. Repeat (R2-ΔK280) und die Änderung des PHF6 Motivs in das ΔK280-PHF6* Motiv (R3*) im Vergleich zu den Wild-Typ Sequenzen des 2. Repeats (R2) und des 3. Repeats (R3) dargestellt.

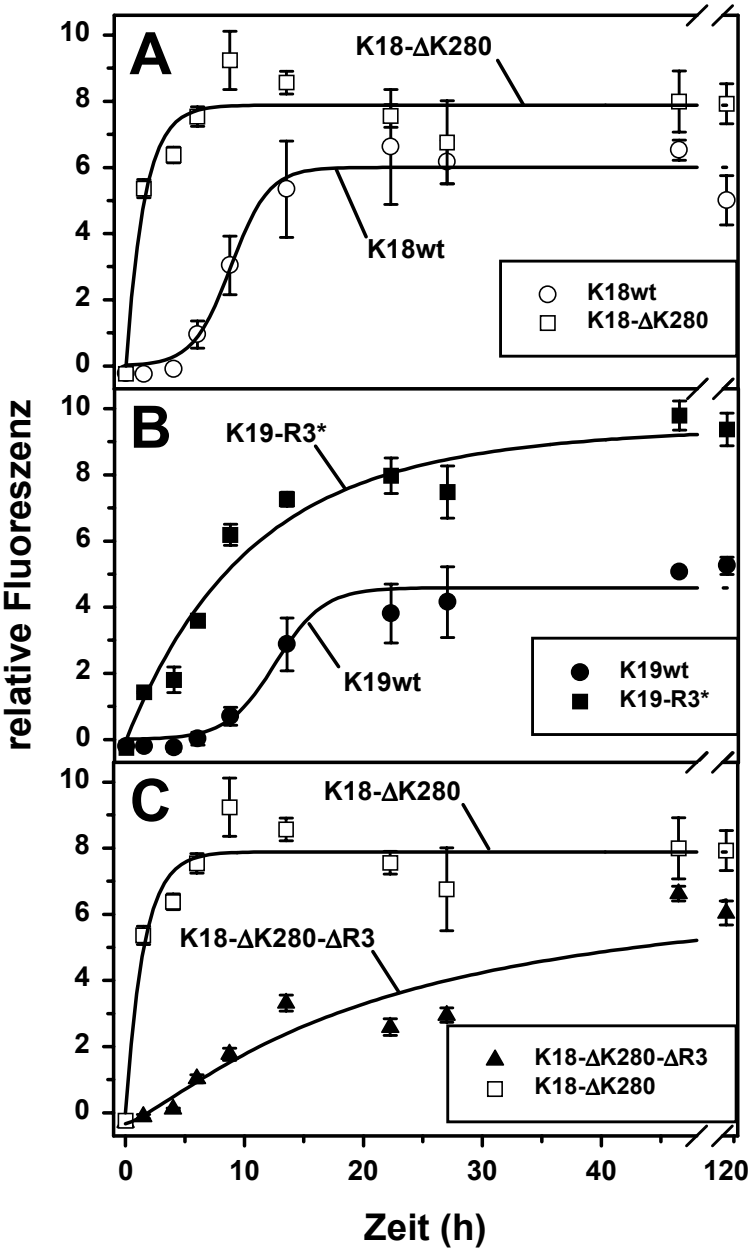

Abbildung 18: Einfluß der FTDP-17 Mutation ΔK280 in den PHF bildenden Motiven PHF6 und PHF6* auf die PHF-Kinetik. Es wurden 20 µM Protein in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT und 5 µM Heparin eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Offene Symbole bezeichnen 4-Repeat Konstrukte und geschlossene Symbole 3-Repeat Konstrukte.
(A) Wie bereits beschrieben, bildet die K18-ΔK280 Mutante (Halbwertzeit circa 1 h) im Vergleich zu K18wt (Halbwertzeit circa 8.5 h) wesentlich schneller PHFs. Das Ausmaß der PHF-Bildung ist bei K18-ΔK280 um 30 % höher.
(B) Wird in K19-R3* das PHF6 Motiv des 3. Repeats in das ΔK280-PHF6* Motiv geändert, so führt dies ebenfalls zu einer stark beschleunigten PHF-Bildung (Halbwertzeit 6 h) im Vergleich zu K19wt (Halbwertzeit 12 h). Das Ausmaß der PHF-Bildung ist bei K19-R3* doppelt so hoch wie bei K19wt.
(C) Die K18-ΔK280-ΔR3 Mutante als ein artifizielles 3-Repeat Konstrukt bildet PHFs wesentlich langsamer (Halbwertzeit circa 17 h) als das 4-Repeat Konstrukt K18-ΔK280 (Halbwertzeit circa 1 h) und das 3-Repeat Konstrukt K19-R3* (vergleiche Graph in **B**). Das Ausmaß der PHF-Bildung ist bei K18-ΔK280 um 30 % größer. Anzumerken ist, daß bei Konstrukten mit dem ΔK280-PHF6* Motiv die Verzögerungs-Phase der PHF-Bildung ausbleibt.

Wie bereits vorher gezeigt, führt die Deletion des K280 am Ende des PHF6* Motivs im Konstrukt K18-ΔK280 im Vergleich zu K18wt zu einer drastischen Beschleunigung der PHF-Polymerisation. Die Halbwertzeit wurde von 8.5 h auf 1 h verkürzt und das Ausmaß an gebildeten PHFs war bei K18-ΔK280 um circa 30 % höher als beim Wild-Typ (Abbildung 18a). Wird das PHF6 Motiv innerhalb des 3-Repeat Konstrukts in das ΔK280-PHF6* Motiv geändert, so führte auch dies zu einer eindeutig schnelleren PHF-Polymerisation. Diese K19-R3* Mutante zeigte in der PHF-Polymerisation eine Halbwertzeit von 6 h im Vergleich zu K19wt mit einer Halbwertzeit von 12 h und ein doppelt so hohes Ausmaß an gebildeten PHFs (Abbildung 18b). Wird auf der Basis von K18-ΔK280 der 3. Repeat deletiert, erhält man mit K18-ΔK280-ΔR3 ein 3-Repeat Konstrukt, das im Vergleich zu K18-ΔK280 und K19-R3* deutlich langsamer PHFs bildete (Halbwertzeit 17 h) und auch ein geringeres Ausmaß an PHFs bildete (Abbildung 18c). Dieses Ergebnis zeigt den Einfluß der Repeat-Sequenzen, die das PHF6* Motiv umgeben, auf die PHF-Polymerisation. Die K19-R3* Mutante besteht wie die K18-ΔK280-ΔR3 aus 3-Repeats. Im K19-R3* Konstrukt ist hingegen nur das PHF6 Motiv geändert und die natürliche Reihenfolge der Repeats R1-R3-R4 einer 3-Repeat Isoform bleibt. Im Gegenteil dazu ist bei K18-ΔK280-ΔR3 zusätzlich zum geänderten PHF6* Motiv die Reihenfolge der Repeats nach R1-R2-R4 geändert wie sie natürlicherweise nicht vorkommt.

Augenfällig ist weiterhin, daß alle Mutanten, die das ΔK280-PHF6* Motiv tragen (K18-ΔK280, K19-R3* und K18-ΔK280-ΔR3), im Gegensatz zu den beiden Wild-Typ Konstrukten K18 und K19, keine Verzögerungs-Phase in der PHF-Kinetik zeigen. Das läßt entweder auf einen unterschiedlichen Mechanismus der PHF-Polymerisation oder auf eine extrem schnelle und unter diesen Bedingungen nicht mehr meßbare Nukleation schließen. Letzteres ist sehr viel wahrscheinlicher, da die starke Tendenz zur Nukleation bereits durch die Oligomerisierung der K18-ΔK280 Mutante in der Gelpermeations-Chromatographie gezeigt wurde (Abbildung 11).

Die Bildung von PHFs wurde standardgemäß auch für die beschriebenen Mutanten mittels Elektronenmikroskopie verifiziert. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Mutante K19-R3* als auch die K18-ΔK280-ΔR3 fast ausschließlich gerade Filamente bilden

(Abbildung 19). Lediglich wenige paarige helikale Filamente konnten für K18-ΔK280-ΔR3 gefunden werden. Bemerkenswert war auch die ausgeprägte Tendenz der K19-R3* Mutante zur lateralen Assoziation der geraden Filamente.

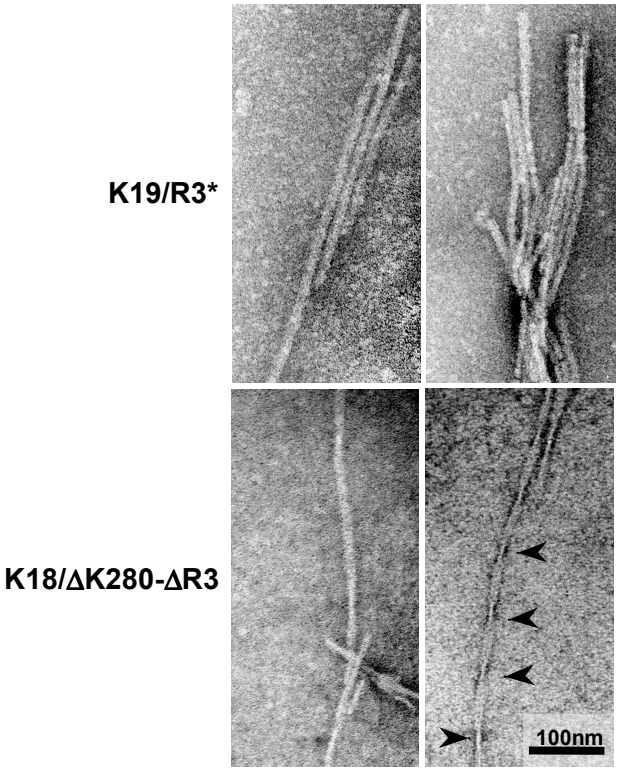

Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Gegenwart von Heparin gebildeten PHFs der Mutanten K19-R3* und K18-ΔK280-ΔR3. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen für K19-R3* ausschließlich gerade Filamente und für K18-ΔK280-ΔR3 vorwiegend gerade Filamente und wenige paarige helikale Filamente mit einer Periodizität von 70 - 90 nm.

Ein wichtiges Merkmal der K18-ΔK280 Mutante ist die Unabhängigkeit der PHF-Bildung von Polyanionen. Die oben beschriebenen Mutanten wurden auch auf diese Eigenschaft hin überprüft. Für die Ansätze wurde die höchste zur Verfügung stehende Konzentration der Mutanten eingesetzt, da es bei diesem Test nicht auf eine kinetische Verfolgung ankam. Wie in Tabelle 6 zusammengefaßt, erzeugen alle Mutanten mit dem ΔK280-PHF6* Motiv auch ohne Polyanionen ein ThS-Fluoreszenzsignal. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab jedoch, daß lediglich die K18-ΔK280 Mutante (siehe auch Abbildung 13) wirkliche PHFs erzeugte. Die Mutanten K19-R3*

und K18-ΔK280-ΔR3 bildeten hingegen nur amorphe Proteinaggregate (Daten nicht gezeigt). Daraus läßt sich schließen, daß das ΔK280-PHF6* Motiv in jedem Fall die Protein-Protein Interaktionen fördert und auch zu einer Aggregation des Proteins führt, die sich mittels ThS-Fluoreszenz nachweisen läßt. Für die Ausbildung der geordneten Struktur von PHFs reicht die es umgebende Sequenz dieser artifiziellen 3-Repeat Konstrukte, im Gegensatz zum 4-Repeat Konstrukt K18-ΔK280, dagegen nicht aus.

Tabelle 6: Fähigkeit der Mutanten K18-ΔK280-ΔR3 und K19-R3* zur Bildung von PHFs in Abwesenheit von Polyanionen

Mutante	eingesetzte Proteinkonz. (µM)	ThS-Signal	Aggregationsform
K18wt	48	–	–
K19wt	90	–	–
K18-ΔK280	39	+++	PHFs
K18-ΔK280-ΔR3	82	+	amorphe Aggregate
K19-R3*	88	+	amorphe Aggregate

Die Inkubation der Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen bei 37 °C erfolgte über eine Zeitraum von 14 Tagen. Bei der K18-ΔK280 Mutante konnte bereits nach einem Tag Inkubation ein Anstieg des ThS-Signals gemessen werden, für die Mutanten K18-ΔK280-ΔR3 und K19-R3* deutlich nach fünf Tagen. Am Ende der Inkubationszeit konnten nur für K18-ΔK280 eindeutig PHFs elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, die Mutanten K18-ΔK280-ΔR3 und K19-R3* zeigten lediglich amorphe Proteinaggregate.
(– = negatives Ergebnis, + bis +++ = zunehmend positives Ergebnis).

2 Aggregation von Wild-Typ Tau und Cystein-Mutanten zu PHFs unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen

Für den Mechanismus der Polymerisation von Tau zu PHFs gibt es zwei kontroverse Theorien. In unserer Arbeitsgruppe wird eine Dimerisierung als erster und essentieller Schritt unter oxidierenden Bedingungen angenommen. Die Arbeitsgruppe um L. Binder hingegen geht von einer Oxidations-unabhängigen PHF-Polymerisation unter reduzierenden Bedingungen aus. Es stellte sich daher die Frage, welche Faktoren für diese Diskrepanz verantwortlich sein könnten oder ob die verschiedenen Standpunkte durch weitere Experimente zu diesem Thema vereint werden könnten. Daher sollte untersucht werden, ob es eine Polymerisation von monomerem Tau-Protein zu PHFs gibt, die nicht durch einen oxidativen Schritt der Dimerisierung über Disulfidbrückenbildung vermittelt wird. Anhand von Cystein-Mutanten von 3-Repeat und 4-Repeat Konstrukten sollte dieses Thema bearbeitet werden. Um die unterschiedlichen Theorien und die hier durchgeführten Versuche besser zu verstehen, werden die bisherigen relevanten Ergebnisse beider Gruppen hier kurz dargestellt.

Im Tau-Protein kommen zwei Cysteine vor, eines an der Position 291 im 2. Repeat und eines im 3. Repeat an der Position 322 (Abbildung 1d). Daher können 3-Repeat Tau-Isoformen nur intermolekulare Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Molekülen ausbilden, 4-Repeat Tau-Isoformen können dagegen auch intramolekulare Disulfidbrücken formen. Dieses Verhalten von Tau hat einen starken Einfluß auf die Polymerisation zu PHFs.

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß bei 4-Repeat Tau durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken die Bildung von PHFs in Abwesenheit von Polyanionen vermindert oder sogar völlig inhibiert wird (Schweers *et al.* 1995). Dabei faltet sich das flexible Tau-Molekül (Schweers *et al.* 1994) unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen $Cystein_{291}$ und $Cystein_{322}$ zu einer Art Haarnadel. Diese Konformation wurde als „kompakter Monomer“ bezeichnet (siehe Diskussion Abbildung 38). Die Inhibition ließ sich durch Austausch des $Cysteins_{291}$ gegen ein Alanin, gefolgt von einer bereitwilligen Dimerisierung dieser Cystein-Mutante, wieder aufheben (Schweers *et al.* 1995). Tau-Proteine mit 3-Repeats bildeten

unter oxidierenden Bedingungen hingegen direkt einen großen Anteil antiparalleler Dimere (Wille *et al.* 1992a) und waren nicht durch die Ausbildung eines „kompakten Monomers“ in der Bildung von PHFs inhibiert. Wurde dagegen eine Dimerisierung verhindert, wie zum Beispiel durch Gegenwart von Reduktionsmitteln (zum Beispiel DTT) oder durch Mutation des $Cystein_{291}$ in dem 3-Repeat Konstrukt K12 (Abbildung 20), fand keine Polymerisation von Tau zu PHFs mehr statt. Dieser Effekt wurde von Schweers *et al.* (Schweers *et al.* 1995) in Abwesenheit von Polyanionen und von Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b) in Gegenwart des Polyanions Heparin beobachtet. Bisher wurde in keiner dieser Arbeiten die PHF-Bildung von 4-Repeat Konstrukten mit einem Austausch des $Cystein_{322}$ oder einem gleichzeitigen Austausch beider Cysteine untersucht. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Bildung eines Dimers über das $Cystein_{322}$ als erster und essentieller Schritt für die Polymerisation von Tau zu PHFs beschrieben (Wille *et al.* 1992a; Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b).

Dieser Oxidations-abhängigen Theorie der PHF-Polymerisation widersprechen Experimente der Arbeitsgruppe um L. Binder (Wilson und Binder 1995; King *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000; Abraha *et al.* 2000). In deren Experimenten wird eine Bildung von Filamenten unter reduzierenden Bedingungen (Gegenwart von 5 mM DTT) beobachtet, jedoch nur für Tau-Isoformen mit mindestens einem N-terminalen Einschub (King *et al.* 2000). Auf dieser Grundlage postulieren sie eine Oxidations-unabhängige Filament-Bildung. Als induzierendes Agenz verwendet diese Arbeitsgruppe allerdings die Fettsäure Arachidonsäure im Gegensatz zum vielfältig verwendeten Polyanion Heparin, das auch in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt wird. Im Unterschied zu Filamenten aus Alzheimer-Gehirnen (Kidd 1963; Iqbal *et al.* 1984; Wischik *et al.* 1985; Greenberg und Davies 1990) und *in vitro* hergestellten Filamenten anderer Arbeitsgruppen (Goedert *et al.* 1996; Hasegawa *et al.* 1997), einschließlich unserer (Wille *et al.* 1992a; Kampers *et al.* 1996; Friedhoff *et al.* 1998a), sind die gebildeten Filamente unter den Bedingungen von L. Binder indessen von fast ausschließlich gerader Natur. Eine Bildung von PHFs soll jedoch zu einem geringen Ausmaß durch parallele Anlagerung von zwei einzelnen geraden Filamenten und anschließender Verdrillung über die Zeit möglich sein (King *et al.* 1999).

Dieser offensichtliche Widerspruch zwischen einer Polymerisation von Tau zu PHFs unter reduzierenden Bedingungen und einer Polymerisation unter strikt oxidativen Bedingungen über eine essentielle Dimerisierung sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Zur Untersuchung der Fragestellung eignen sich idealerweise die Konstrukte K18 mit 4-Repeats und das 3-Repeat Konstrukt K19. Die durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugten Cystein-Mutanten sind in Abbildung 20 dargestellt.

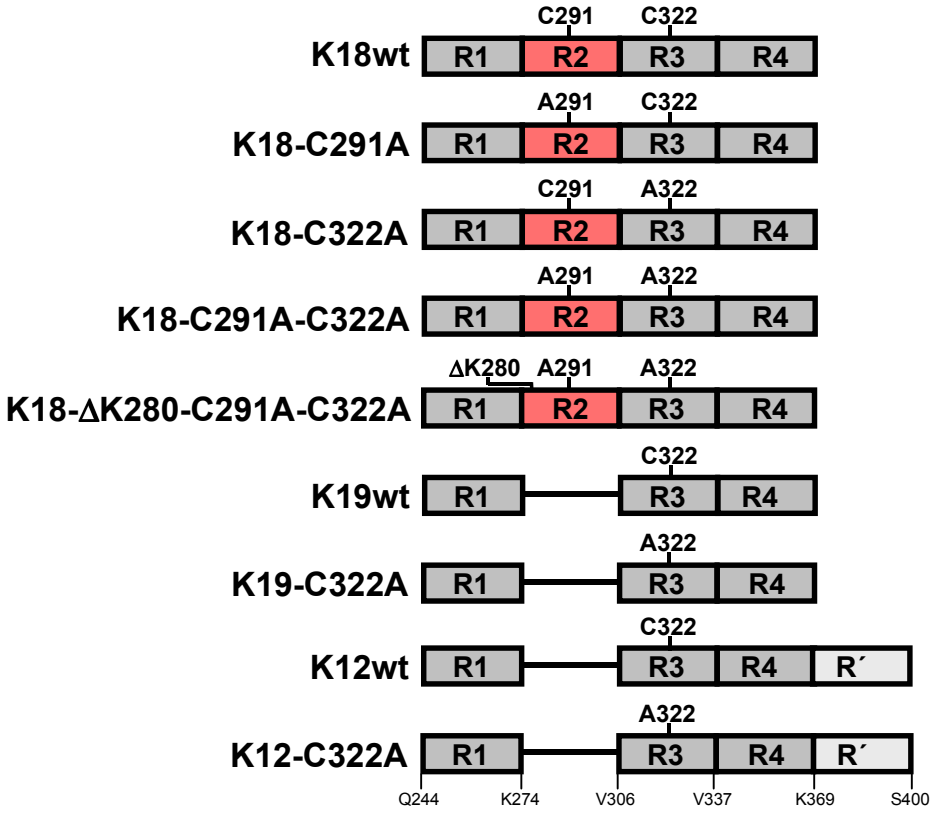

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Cystein-Mutanten in den Tau-Konstrukten K18, K19 und K12. Der alternativ gespleißte 2. Repeat im Konstrukt K18 ist rot dargestellt und der fünfte unvollständige Repeat (R´) im Konstrukt K12 in hellgrau. In dem 4-Repeat Konstrukt K18 wurde sowohl das $Cystein_{291}$ im 2. Repeat als auch das $Cystein_{322}$ im 3. Repeat jeweils alleine sowie beide Cysteine zugleich gegen ein Alanin ausgetauscht. Auf der Basis der K18-ΔK280 Mutante wurden bei K18-ΔK280-C291A-C322A beide Cysteine und bei den 3-Repeat Konstrukten K19-C322A und K12-C322A das einzige vorkommende $Cystein_{322}$ gegen Alanin ersetzt.

2.1 Dimerisierungsgrad der verwendeten Cystein-Mutanten

Die verwendeten Cystein-Mutanten wurden elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dadurch sollte dokumentiert werden, welchen Grad der Dimerisierung die einzelnen Konstrukte zu Beginn der PHF-Polymerisation vor der Zugabe von Polyanionen hatten. Proteine in PBS-Puffer mit 1 mM DTT wiesen nach der Aufreinigung mittels einer Gelpermeations-Chromatographie erwartungsgemäß nur Monomere auf. Nach einer Umpufferung mittels Größenausschluß-Chromatographie wiesen die 3-Repeat Konstrukte K19wt und K12wt in den Puffern PBS pH 7.4 oder 20 mM MOPS pH 7.0 in Abwesenheit von Reduktionsmitteln durch Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken hingegen einen gewissen Anteil an Dimeren auf. K18wt in reinem PBS-Puffer wies nur Monomere auf (Abbildung 21).

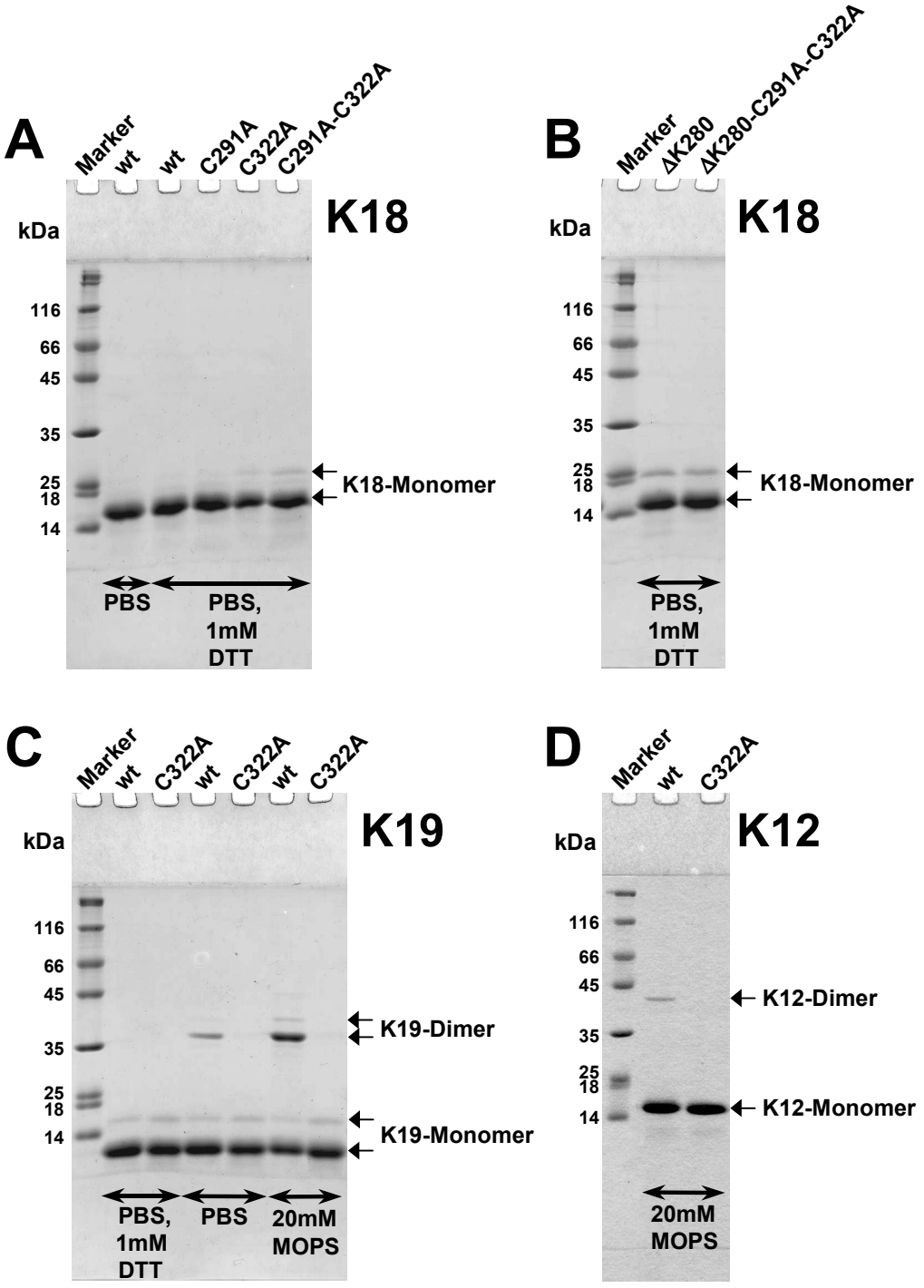

Abbildung 21: Darstellung der K18, K19 und K12 Cystein-Mutanten auf einem SDS-PAGE-Gel. Auf 17 %ige SDS-PAGE-Gele wurden jeweils 0.8 µg Protein in Probenpuffer ohne Reduktionsmittel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-blue gefärbt.
(A, B): Die 4-Repeat Konstrukte K18 und K18-ΔK280 sowie deren Cystein-Mutanten weisen in PBS-Puffer mit 1 mM DTT nur Monomere auf. Dies gilt auch für K18wt in reinem PBS.
(C, D): Die 3-Repeat-Konstrukte K19wt und K12wt weisen in PBS-Puffer mit 1 mM DTT nur Monomere und in reinem PBS oder 20 mM MOPS pH 7.0 einen Anteil an Dimeren auf. Die C322A Mutanten weisen unabhängig vom Reduktionsmittel DTT nur Monomere auf.

2.2 Bedingungen der PHF-Polymerisation von Cystein-Mutanten

Als Bedingung für die Experimente stellte sich jedoch zunächst die Frage, welcher Puffer für die PHF-Polymerisation genutzt werden sollte. Die Verwendung des Standard-Puffers PBS mit 1 mM DTT scheint zunächst nicht sinnvoll. Durch das DTT werden die Cysteine in der reduzierten Form gehalten und ihre eigentlichen Effekte – die inter- und intramolekulare Disulfibrückenbildung – dadurch maskiert. Andererseits haben frühere Experimente mit 4-Repeat Tau-Konstrukten gezeigt, daß die PHF-Polymerisation in Abwesenheit von Polyanionen in Puffer ohne Reduktionsmittel nur sehr langsam und unzureichend ist (Schweers *et al.* 1995).

2.2.1 Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Wild-Typ Tau-Konstrukten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart des Polyanions Heparin

Die Ergebnisse von Schweers *et al.* zur Polymerisation von 4-Repeat Tau unter oxidierenden Bedingungen konnten in dieser Arbeit auch für eine PHF-Bildung in Gegenwart von Heparin bestätigt werden. Wurde ein Aliquot von K18wt in PBS mit 1 mM DTT mittels einer Größenausschluß-Chromatographie in reines PBS umgepuffert, zeigte es bei einer Polymerisation ein um das 2.5-fach geringeres Ausmaß an gebildeten PHFs im Vergleich zum Protein in PBS mit DTT (Abbildung 22). Dieser Effekt läßt sich durch zwei gleichzeitig auftretende Reaktionen erklären. Durch die Umpufferung des Proteins wird zum einen über eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen dem $Cystein_{291}$ und dem $Cystein_{322}$ ein „kompakter Monomer“ gebildet (Schweers *et al.* 1995). Zum anderen kann es zu einer Multimerisierung des Proteins über intermolekulare Disulfidbrücken mehrerer K18wt Moleküle kommen. Letzteres scheint vernachlässigbar zu sein, wie eine elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE zeigte (Abbildung 21a). In einem oder beiden Fällen scheint das Tau-Molekül nicht die richtige Konformation für eine geordnete Polymerisation zu PHFs zu haben, wenn das polymerisationsfördernde Polyanion Heparin zugegeben wird.

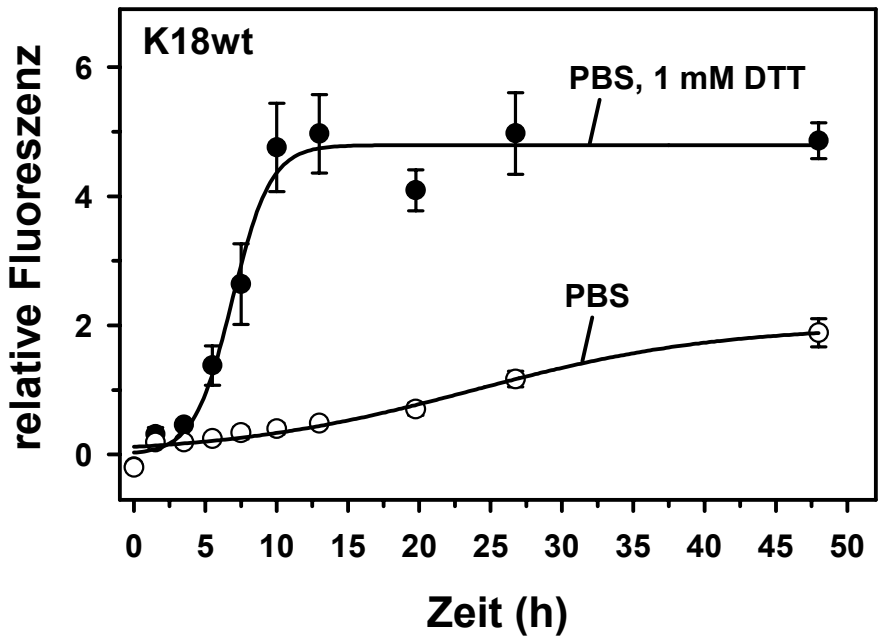

Abbildung 22: PHF-Polymerisation von K18wt in PBS pH 7.4 in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM DTT. Es wurden je 20 µM Protein und 5 µM Heparin eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. K18wt ohne reduzierendes DTT im Puffer polymerisiert zu einem 2.5-fach geringerem Ausmaß zu PHFs und mit einer verlängerten Halbwertzeit von 23 h im Vergleich zum Protein in PBS mit 1 mM DTT mit einer Halbwertzeit von 7 h.

Einen gegenteiligen Effekt zeigte das 3-Repeat Konstrukt K19wt. Da dieses Konstrukt nur das Cystein[322] besitzt, kann es zu keiner intramolekularen Disulfidbrücken-Bildung kommen. Wird hier das DTT aus dem PBS-Puffer entfernt, so wird die Dimerisierung des Proteins in einer für die PHF-Polymerisation förderlichen Weise begünstigt. So zeigte das Protein K19wt in reinem PBS-Puffer bereits vor der PHF-Polymerisation einen Anteil an Dimeren (Abbildung 21c). K19wt in reinem PBS bildete vermehrt PHFs (2-faches Ausmaß) und mit einer kürzeren Halbwertzeit (20 h) als K19wt in PBS mit 1 mM DTT (Halbwertzeit 24 h) (Abbildung 23).

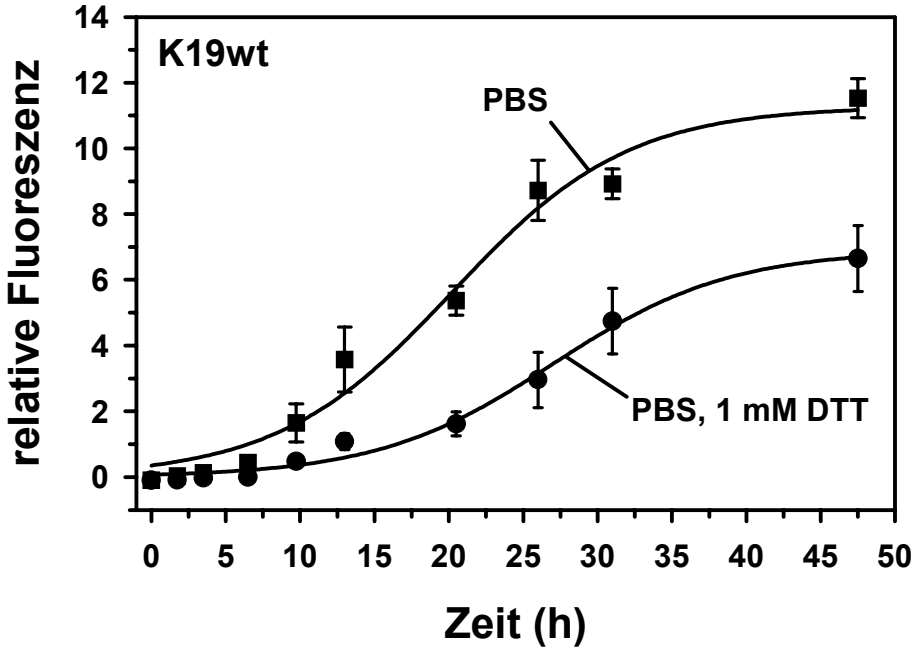

Abbildung 23: PHF-Polymerisation von K19wt in PBS pH 7.4 in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM DTT. Es wurden je 20 µM Protein und 5 µM Heparin eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. K19wt ohne reduzierendes DTT im Puffer polymerisiert zu einem 2-fach höherem Ausmaß zu PHFs und mit einer geringfügig verkürzten Halbwertzeit von 20 h im Vergleich zum Protein in PBS mit 1 mM DTT mit einer Halbwertzeit von 24 h.

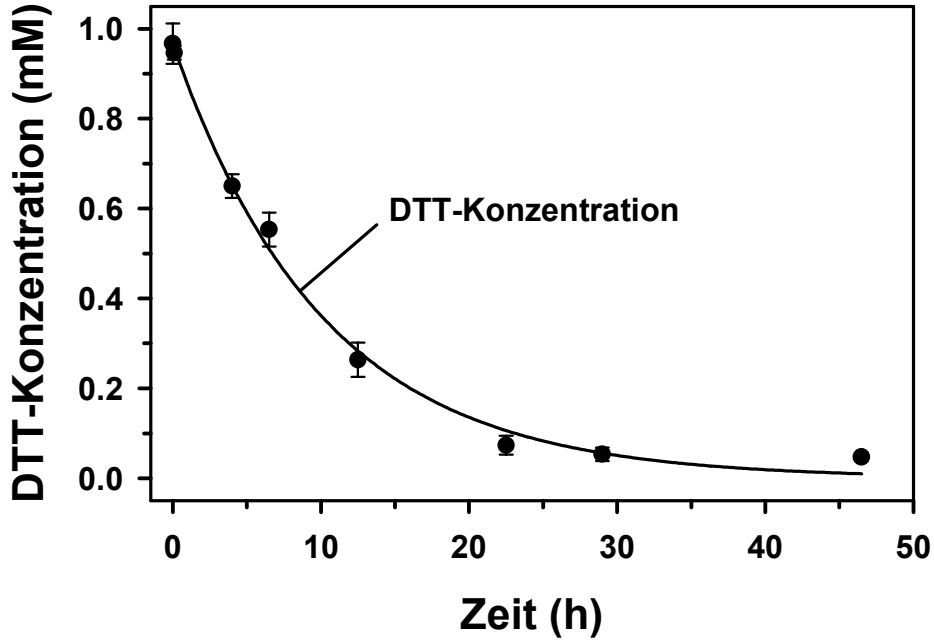

Abbildung 24: Abnahme der DTT-Konzentration in einem PHF-Polymerisationsansatz über die Inkubationszeit. Ein Ansatz aus PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT wurde wie ein PHF-Ansatz behandelt. Aus dem zu den jeweiligen Inkubationszeiten entnommen Aliquots wurde die DTT-Konzentration mittels DTNB bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Die reduktive Kraft des DTT nimmt mit einer Halbwertzeit von 9 h ab.

Als Kontrolle wurde exemplarisch die reduktive Kraft des Puffers über die Zeit verfolgt. Dazu wurde ein Ansatz aus PBS-Puffer mit 1 mM DTT wie ein PHF-Ansatz behandelt und im Anschluß die freien Sulfhydryl-Gruppen des DTT mittels DTNB bestimmt. Die Konzentration an reduktivem DTT nahm durch eine Reaktion mit dem Sauerstoff in Lösung mit einer Halbwertzeit von 9 h exponentiell ab (Abbildung 24).

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde für die Ansätze zur Polymerisation der Cystein-Mutanten zu PHFs PBS-Puffer mit 1 mM DTT verwendet. Der PBS-Puffer wurde gewählt, weil er mit einem pH-Wert von 7.4 und einer Ionenstärke die Situation *in vivo* am besten widerspiegelt. Durch die reduzierenden Bedingungen sollte gewährleistet werden, daß die Polymerisation aller Mutanten zu PHFs auf demselben Status des Monomers beginnt (siehe Abbildung 21). Weiterhin wird verhindert, daß beim Wild-Typ vom 4-Repeat Konstrukt K18 die PHF-Bildung durch die Ausbildung eines „kompakten Monomers“ inhibiert ist.

2.3 Polymerisation der K18 und K19 Cystein-Mutanten zu PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin

Für das 4-Repeat Konstrukt K18 zeigte sich, daß die Fähigkeit, PHFs zu bilden, erstaunlicherweise weitgehend unabhängig von Cysteinen ist. Die K18 Mutante, bei der beide Cysteine durch Alanine ersetzt wurden (K18-C291A-C322A), und auch die Mutanten mit je einem Cystein-Austausch (K18-C291A und K18-C322A) zeigten alle eine Polymerisation zu PHFs (Abbildung 25). Sogar das Ausmaß der PHF-Bildung war bei den Mutanten K18-C291A-C322A und K18-C322A mit dem Wild-Typ vergleichbar. Lediglich K18-C291A bildete eine um die Hälfte verringerte Masse an PHFs.

Vergleicht man die Kinetik der PHF-Polymerisation, so lassen sich einige interessante Aspekte gewinnen. Der Wild-Typ polymerisierte mit einer Halbwertzeit von circa 10.5 h. Im Vergleich dazu zeigten die Cystein-Doppelmutante K18-C291A-C322A (Halbwertzeit 7.5 h) eine deutliche und die Cystein-Einzelmutante K18-C322A

(Halbwertzeit 9 h) eine geringfügig beschleunigte PHF-Bildung. Als Erklärung hierfür kann man spekulieren, daß es durch die reduzierten Cysteine bei K18wt zu einer sterischen Behinderung bei der Protein-Interaktion kommt, die bei der Mutante K18-C291A-C322A durch die mutierten Alanine entfällt. Die Mutante K18-C322A könnte über das verbleibende $Cystein_{291}$ trotz der reduzierenden Bedingungen in der Lage sein, effektiver eine Disulfidbrücke auszubilden als die Mutante K18-C291A über das $Cystein_{322}$. Eine weitere Möglichkeit ist die vermehrte Bildung eines Dimers der über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden ist (nachfolgend als nicht-kovalenter Dimer bezeichnet, siehe Diskussion).

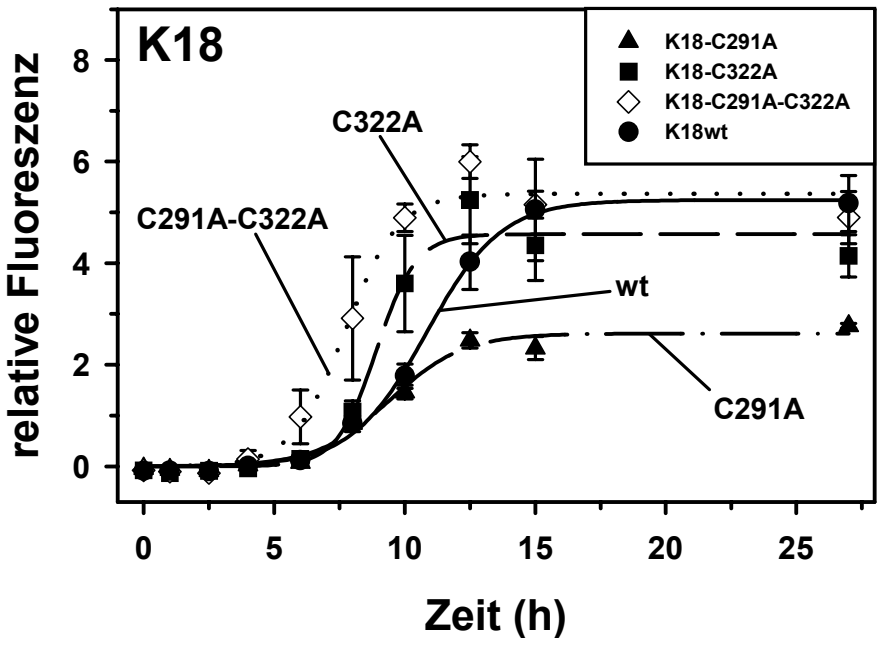

Abbildung 25: Polymerisation der K18-Cystein-Mutanten zu PHFs in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT. Es wurden je 10 µM Protein und 2.5 µM Heparin in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Alle Cystein-Mutanten zeigen eine Polymerisation zu PHFs. Das Ausmaß der PHF-Bildung von K18-C291A-C322A und K18-C322A ist mit dem von K18wt vergleichbar, während es bei K18-C291A um etwa 50 % erniedrigt ist.

Für die K19 Cystein-Mutante ergab sich ein vergleichbares Bild. Auch bei diesem 3-Repeat Konstrukt zeigte die Mutante ohne ein Cystein (K19-C322A) eine im Ausmaß vergleichbare PHF-Bildung wie der Wild-Typ (Abbildung 26). Die Polymerisation der Mutante ohne Cystein war im Vergleich zum Wild-Typ ebenfalls beschleunigt.

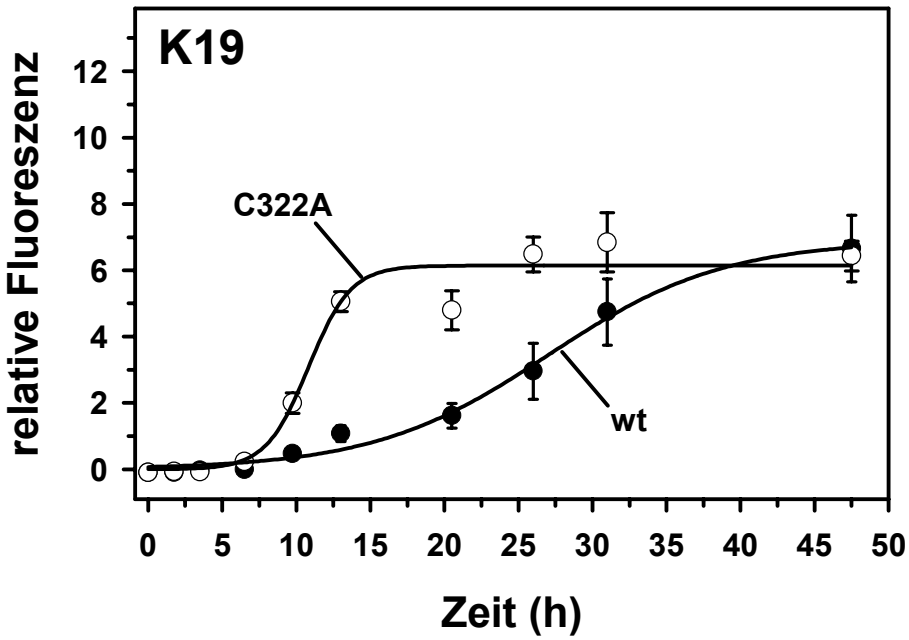

Abbildung 26: Polymerisation der K19 Cystein-Mutanten zu PHFs in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT. Es wurden je 20 µM Protein und 5 µM Heparin in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Die K19 Mutante ohne Cysteine (K19-C322A) zeigt ein mit dem Wild-Typ von K19 vergleichbares Ausmaß an gebildeten PHFs.

2.3.1 Polymerisation der Cystein-Mutanten in Abhängigkeit vom Puffer

Die Tatsache, daß die Cystein-Mutanten in der Lage sind, PHFs zu bilden, war vom Standpunkt früherer Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b) aus betrachtet unerwartet. Die Daten von Schweers *et al.* lassen sich allerdings nur schwer mit denen dieser Arbeit vergleichen, da eine Polymerisation von PHFs in Abwesenheit von Polyanionen stattfand und keine Quantifizierung erfolgte. Deswegen werden die Daten dieser Arbeit eingehend nur mit denen von Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b) verglichen. Es stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen verwendeten Pufferbedingungen und Konstrukte für die Tatsache verantwortlich sind, daß Friedhoff *et al*. keine PHF-Polymerisation feststellen konnten. In dieser Studie war das 3-Repeat Konstrukt K12 verwendet worden, das aus R1-R3-R4 und einem als R´ bezeichnetem Pseudo-Repeat besteht (Abbildung 20). Als Puffer wurde 20 mM MOPS pH 7.0 verwendet und die Protein-Konzentration betrug 20 µM (zur Zusammenfassung der Pufferbedingungen siehe Tabelle 11). Die PHF-Polymerisation

wurde durch Heparin (5 µM) unterstützt und fand in Abwesenheit von Reduktionsmitteln statt. Auch bei einer erhöhten Proteinkonzentration von 100 µM und 6 Tagen Inkubation trat bei Friedhoff *et al*. keine meßbare PHF-Polymerisation auf.

Deshalb wurde der Einfluß der Puffer-Bedingungen auf das bereits gut charakterisierte 3-Repeat Konstrukt K19wt und die K19-C322A Mutante untersucht. Die Proteine, die sich in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT befanden, wurden durch Größenausschluß-Chromatographie in 20 mM MOPS pH 7.0 umgepuffert. Zusätzlich wurde das 3-Repeat Konstrukt K12wt und die Mutante K12-C322A unter den von Friedhoff *et al.* verwendeten Bedingungen auf eine PHF-Bildung hin getestet.

Die unterschiedlichen Pufferbedingungen hatten einen eindeutigen Effekt auf die PHF-Bildung von K19. Die PHF-Bildung war durch die Verwendung des MOPS-Puffers jedoch nicht inhibiert, sondern im Vergleich zum PBS-Puffer sogar eindeutig beschleunigt (Abbildung 27). Mit einer Halbwertzeit von nur 2 h war die Polymerisation bei K19wt um ein Vielfaches beschleunigt im Vergleich zur K19-C322A Mutante mit einer Halbwertzeit von 12 h (vergleiche mit Abbildung 26). Das Ausmaß der PHF-Bildung war bei K19wt um 30 % leicht erhöht.

Wie schon im Falle der Polymerisation von K19wt in PBS (Abbildung 23) zeigt sich auch in diesem Versuch, daß eine Polymerisation von K19wt zu PHFs in Abwesenheit von DTT durch die ermöglichte Dimerisierung beschleunigt wird. Das Konstrukt K19wt zeigte bereits vor der PHF-Polymerisation einen deutlichen Anteil an Dimeren (Abbildung 21c). Verglichen mit dem K19wt Ansatz in PBS pH 7.4 ist die Bildung von PHFs in 20 mM MOPS pH 7.0 noch gefördert. Dieser Unterschied läßt sich neben dem eindeutig größeren Anteil an Dimeren zu Beginn der Polymerisation, durch die niedrigere Ionenstärke und den niedrigeren pH-Wert des MOPS-Puffers erklären (Ionenstärke: PBS = 150 mM und MOPS = 20 mM; pH-Wert: PBS = 7.4 und MOPS = 7.0) (Friedhoff *et al.* 1998a).

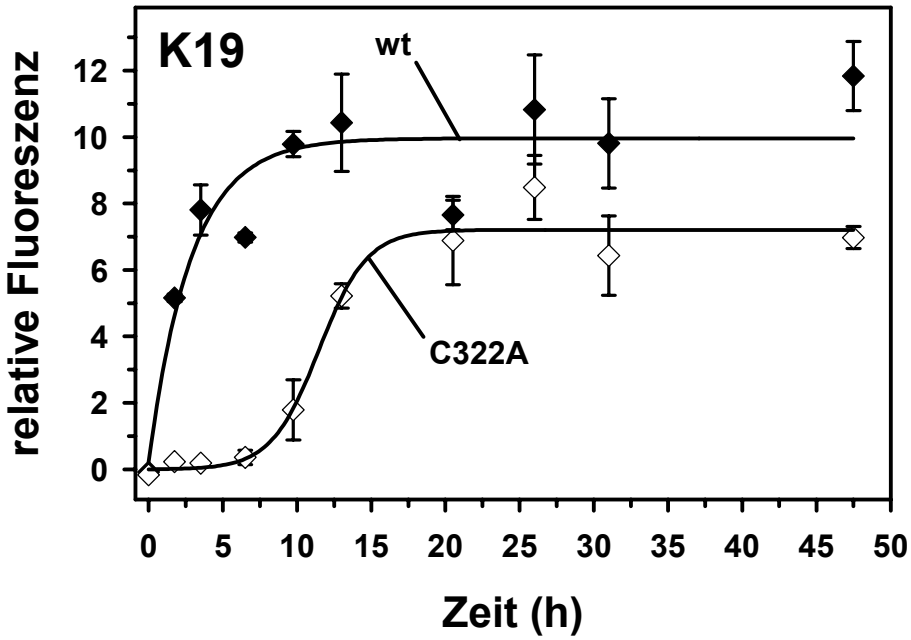

Abbildung 27: Polymerisation der K19 Cystein-Mutanten in 20 mM MOPS pH 7.0. Es wurden je 20 µM Protein und 5 µM Heparin eingesetzt (Bedingungen wie bei Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b)). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. K19wt zeigt mit einer Halbwertzeit von 2 h eine schnellere Polymerisation zu PHFs als die Cystein-Mutante K19-C322A (Halbwertzeit 12 h). Das Ausmaß der Polymerisation ist bei K19wt um 30 % erhöht.

Im Unterschied zur Studie von Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b) konnte auch für K12-C322A unter denselben Bedingungen wie bei Friedhoff *et al.* eine PHF-Bildung beobachtet werden (Abbildung 28). Verglichen mit dem anderen 3-Repeat Konstrukt K19 war die Polymerisation zu PHFs – insbesondere der Cystein-Mutante – hingegen stark verlangsamt (vergleiche Abbildung 27). Der Wild-Typ von K12 wies bereits vor der Polymerisation einen gewissen Anteil an Dimeren auf (Abbildung 21d) und polymerisierte mit einer Halbwertzeit von 5 h zu PHFs. Die Mutante K12-C322A polymerisierte mit einer Halbwertzeit von 70 h zu PHFs (Abbildung 28). Außerdem konnte für die Cystein-Mutante eine starke Schwankung in dem zeitlichen Beginn der Polymerisation beobachtet werden, die sich in der großen Standardabweichnung der Meßwerte in der Anstiegsphase der Kinetik verdeutlichte. Der zusätzliche C-terminale Pseudo-Repeat hat demnach eine inhibitorische Wirkung auf die PHF-Bildung, die sich in einer verlängerten Nukleationsphase ausdrückt.

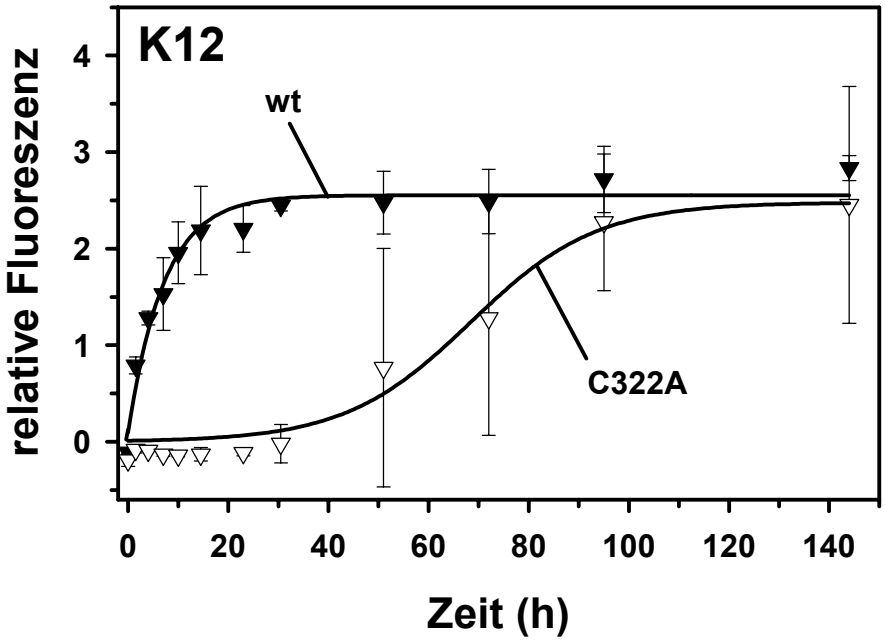

Abbildung 28: Polymerisation der K12 Cystein Mutanten in 20 mM MOPS pH 7.0. Es wurden je 20 µM Protein und 5 µM Heparin eingesetzt (Bedingungen wie bei Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b)). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. K12wt zeigt mit einer Halbwertzeit von 5 h eine schnellere Polymerisation zu PHFs als die Cystein-Mutante K12-C322A (Halbwertzeit 70 h). Das Ausmaß der Polymerisation ist bei K12wt und K12-C322A vergleichbar.

Durch Elektronenmikroskopie wurde die Bildung von PHFs der Cystein-Mutanten bestätigt. Bis auf die Mutanten K18-C291A und K12-C322A wiesen alle Konstrukte und Cystein-Mutanten ein für paarige helikale Filamente typisches Erscheinungsbild auf (Abbildung 29). Dabei machte es für den Wild-Typ von K19 und die K19-C322A keinen Unterschied, ob die Polymerisation in PBS mit 1mM DTT oder 20 mM MOPS pH 7.0 durchgeführt wurde. Bei der Cystein-Mutante K18-C291A konnten nur gerade Filamente gefunden werden und bei der Mutante K12-C322A wurden sowohl paarige helikale Filamente als auch sehr dünne gerade Filamente gefunden, die höchstwahrscheinlich Protofilamente der PHFs darstellen.

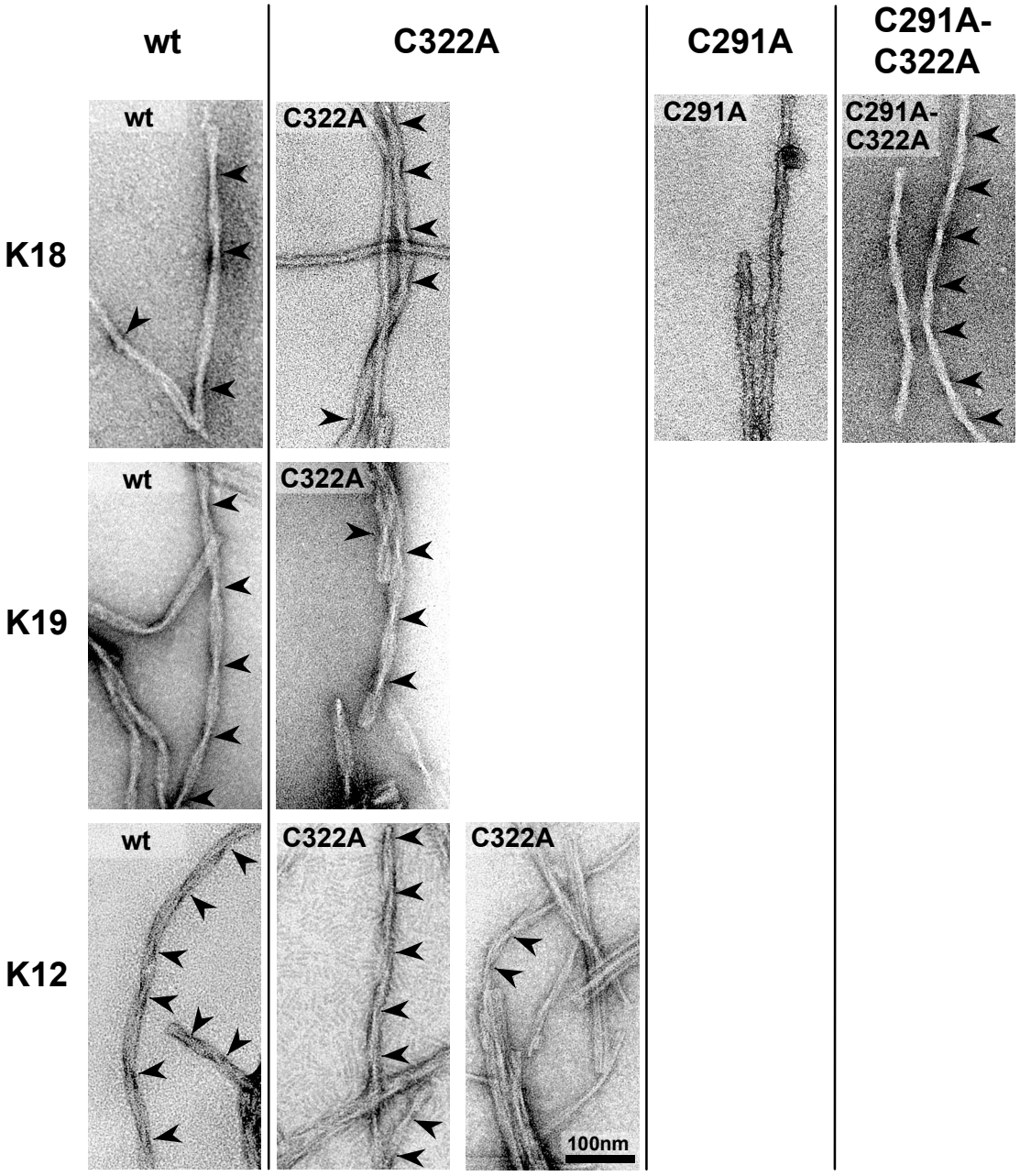

Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Untersuchung der K18, K19 und K12 Cystein-Mutanten. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen für K18-C291A ausschließlich gerade Filamente, für K12-C322A paarige helikale und dünne gerade Filamente und für alle anderen Konstrukte und Mutanten paarige helikale Filamente mit einer Periodizität von 70 - 90 nm.

2.3.2 Polymerisation des 3-Repeat Tau-Konstrukts K19 zu PHFs in Gegenwart der polymerisationsfördernden Fettsäure Arachidonsäure

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, ist eine PHF-Bildung auch unter reduzierenden Bedingungen respektive in Konstrukten ohne Cysteine möglich. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit denen der Arbeitsgruppe um L. Binder, die von einer PHF-Polymerisation unter reduzierenden Bedingungen ausgehen (siehe oben) (Wilson und Binder 1995; King *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000; Abraha *et al.* 2000). Ein wesentlicher Unterschied ist allerdings bei L. Binder *et al.* die Verwendung der Fettsäure Arachidonsäure als polymerisationsfördernde Substanz und die vorherrschende Bildung von geraden Filamenten. Ob dieses Phänomen auf die Arachidonsäure zurückzuführen ist, sollte exemplarisch an dem 3-Repeat Konstrukt K19 und der Cystein-Mutante K19-C322A untersucht werden, da diese mit dem Polyanion Heparin fast ausschließlich paarige helikale Filamente (PHFs) bilden.

Im Vergleich zum Ansatz mit Heparin (vergleiche Abbildung 26) zeigte sich bei dem Ansatz mit Arachidonsäure als polymerisationsfördernde Substanz eine stark beschleunigte Polymerisation von Tau zu Filamenten (Abbildung 30). Die Ergebnisse können direkt verglichen werden, da es sich um parallele Experimente handelt und nur Heparin durch Arachidonsäure ersetzt wurde. Das maximale Ausmaß der PHF-Bildung war in Gegenwart von Arachidonsäure sowohl beim Wild-Typ von K19 als auch bei der Cystein-Mutante K19-C322A bereits zum Zeitpunkt der ersten Messung nach 1.75 h erreicht. Im Vergleich zum Ansatz mit Heparin erreichten diese Ansätze ein um etwa 50 % erhöhtes, endgültiges Ausmaß an gebildeten Filamenten und polymerisierten mit einer nicht genau bestimmbaren Halbwertzeit von unter 1 h wesentlich schneller (Halbwertzeit mit Heparin: K19wt = 25 h und K19-C322A = 11 h).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Polymerisation von Tau zu Filamenten in Gegenwart von Heparin oder Arachidonsäure zeigte sich bei der elektronen-mikroskopischen Untersuchung. Die Filamente, die unter Einfluß von Arachidonsäure gebildet wurden, zeigten ausschließlich gerade Filamente (Abbildung 31). Ein fast

ausschließlich paariges helikales Erscheinungsbild zeigten im Gegensatz dazu die unter Einfluß von Heparin gebildeten Filamente (vergleiche Abbildung 29).

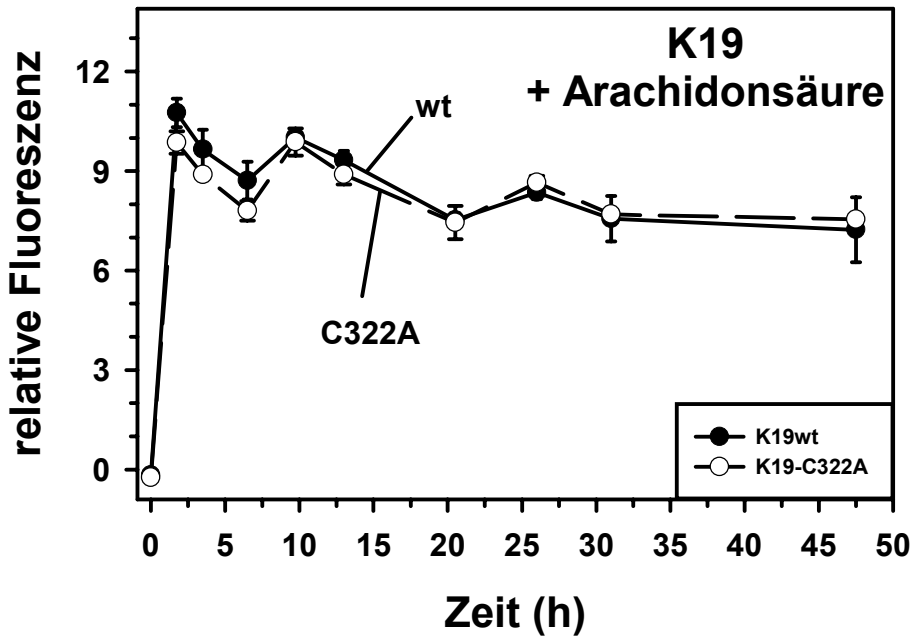

Abbildung 30: Polymerisation der K19 Cystein-Mutanten zu PHFs mit Arachidonsäure in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT. Es wurden je 20 µM Protein und 375 µM Arachidonsäure in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT eingesetzt. Durch die Zugabe der Arachidonsäure, die in 100 % Ethanol gelöst ist, enthält der Ansatz eine endgültige Konzentration von 3.75 % Ethanol. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Der Wild-Typ von K19 und die Mutante ohne Cysteine (K19-C322A) zeigen eine sprunghafte Bildung von Filamenten innerhalb von 2 h, die weiteren Meßwerte schwanken um diesen anfänglichen Maximalwert.

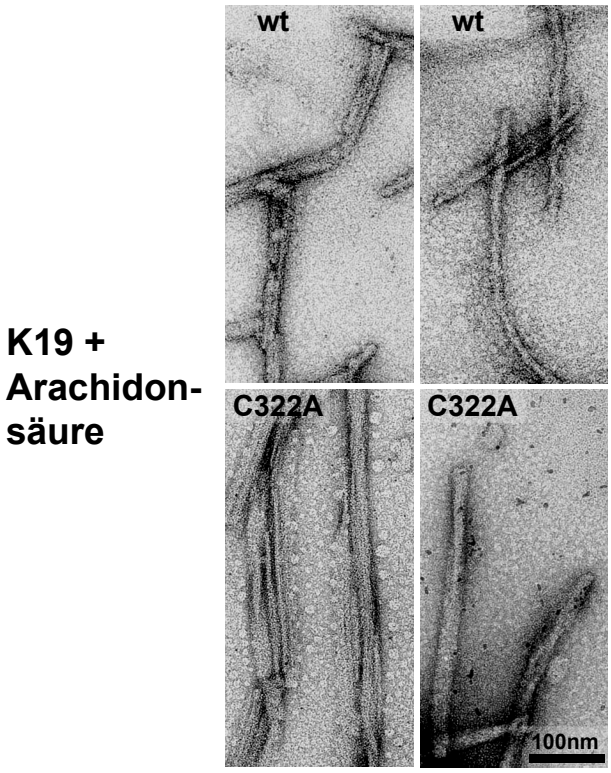

Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Untersuchung der mit Arachidonsäure gebildeten Filamente der Cystein-Mutanten von K19. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen für K19 und K19-C322A ausschließlich gerade Filamente.

2.4 Polymerisation der FTDP-17 Mutante K18-ΔK280 ohne Cysteine in Abwesenheit von Polyanionen

Schweers *et al.* untersuchte den Einfluß des Redox-Status auf die Polymerisation von Tau zu PHFs in Abwesenheit von Polyanionen anhand des 3-Repeat Tau-Konstrukts K12 (Abbildung 21) unter extremen nicht-physiologischen Bedingungen (zur Zusammenfassung der Puffer-Bedingungen siehe Tabelle 11). Unter den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen und Puffer-Bedingungen ließ sich in Abwesenheit von Polyanionen eine PHF-Bildung nur für die FTDP-17 Mutante ΔK280 des 4-Repeat Tau-Konstrukts K18 beobachten (siehe oben). Diese Mutation hat eine auf die PHF-Polymerisation extrem förderliche Wirkung.

Ob auch in Abwesenheit von Polyanionen eine PHF-Polymerisation unabhängig von einer Dimerisierung über Disulfidbrücken erfolgen kann, wurde mit der K18-ΔK280 Mutante untersucht, bei der beide Cysteine gegen Alanin ausgetauscht worden waren (K18-ΔK280-C291A-C322A, Abbildung 20). Die Konstrukte K18-ΔK280 und K18-ΔK280-C291A-C322A wiesen in PBS-Puffer mit 1 mM DTT einen rein monomeren Status zu Beginn der Polymerisation auf (Abbildung 21b).

Als Kontrolle wurde zunächst die Bildung von PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin getestet. Wie erwartet ist auch die Mutante K18-ΔK280-C291A-C322A in der Lage, in Gegenwart von Heparin PHFs zu bilden (Abbildung 32).

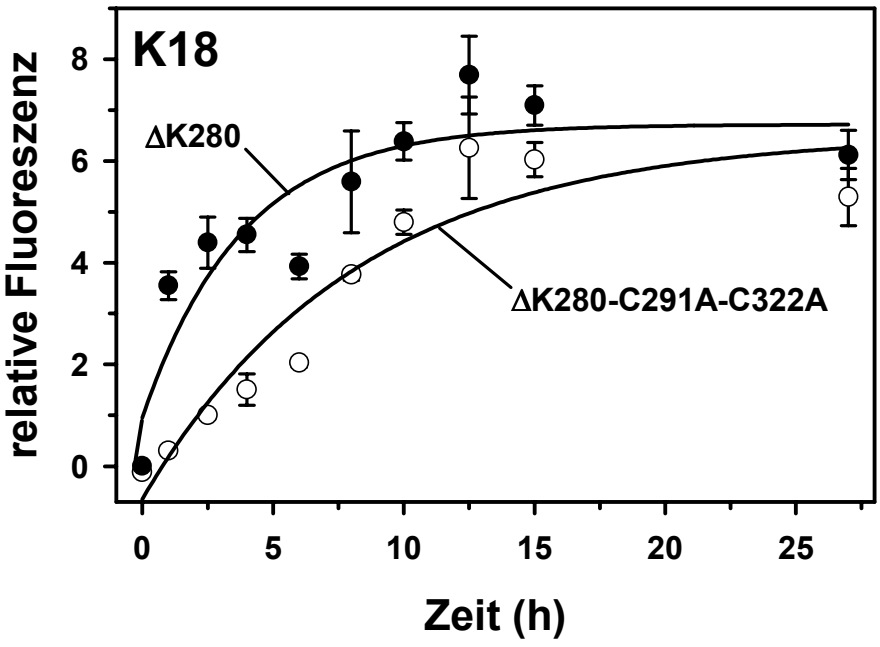

Abbildung 32: Polymerisation der K18-ΔK280 Cystein-Mutante in Gegenwart des Polyanions Heparin. Es wurden je 10 µM Protein und 2.5 µM Heparin in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Die K18-ΔK280-C291A-C322A Mutante bildet etwas langsamer, aber zu einem vergleichbarem Ausmaß, PHFs wie K18-ΔK280.

In dem Ansatz in Abwesenheit von Polyanionen zeigte die Cystein-Mutante eine extrem verlangsamte und im Ausmaß verringerte Polymerisation zu PHFs (Abbildung 33). Dieses Ergebnis zeigt dennoch eindeutig, daß eine Polymerisation von Tau – zumindest jedoch für die stark polymerisationsfördernde Mutante K18-ΔK280 Mutante – ohne

eine Dimerisierung über Cysteine möglich ist. Damit steht diese Ergebnis im Kontrast zu den Experimenten von Schweers *et al.* (Schweers *et al.* 1995), bei dem in Abwesenheit von Polyanionen keine PHF-Bildung beobachtet wurde.

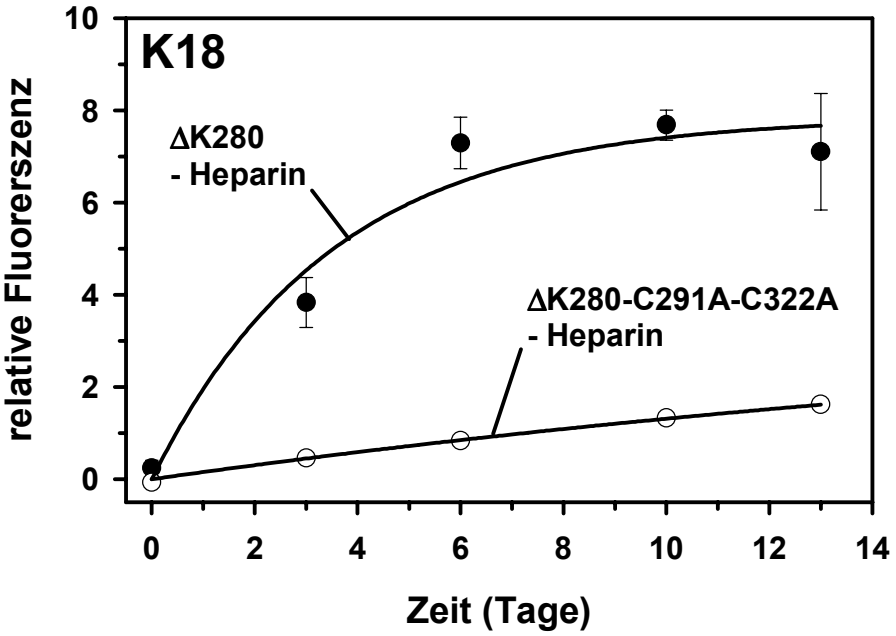

Abbildung 33: Polymerisation der K18-ΔK280 Cystein-Mutante in Abwesenheit von Polyanionen. Es wurden je 60 µM Protein in PBS pH 7.4 mit 1 mM DTT eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei parallelen Experimenten mit der Standardabweichung. Die K18-ΔK280-C291A-C322A Mutante bildet zu einem eindeutig geringeren Ausmaß PHFs wie K18-ΔK280.

Die Bildung von PHFs wurde elektronenmikroskopisch bestätigt. Dabei zeigte die K18-ΔK280 Mutante wie auch die K18-ΔK280-C291A-C322A Mutante typische paarige helikale Filamente.

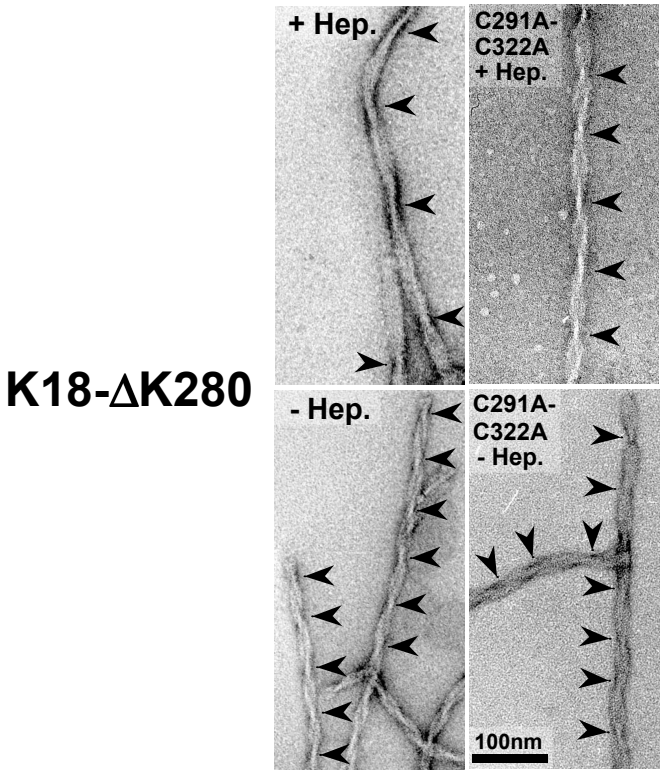

Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Untersuchung der in Gegenwart und Abwesenheit von Polyanionen gebildeten PHFs der Cystein-Mutanten von K18-ΔK280. Für die Präparation wurde ein Aliquot aus dem Ansatz zur PHF-Kinetik zum Endpunkt der Polymerisation verwendet. Die Pfeilköpfe zeigen auf die regelmäßig auftretenden Einschnürungen der Filamente und geben die Periodizität an. Der Balken entspricht 100 nm. Die mit Uranylacetat kontrastierten Filamente zeigen für K18-ΔK280 und K18-ΔK280-C291A-C322A paarige helikale Filamente mit einer Periodizität von 70 - 90 nm.

2.5 Dimerisierung der Tau-Konstrukte ohne Cysteine

Eine Polymerisation von Tau-Monomeren, bei denen die Cysteine gegen Alanine ausgetauscht worden waren, zu PHFs konnte gezeigt werden. Die daraus resultierende Frage war, ob eine Dimerisierung wirklich der erste Schritt der PHF-Polymerisation ist (Wille *et al.* 1992a; Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b). Eine Dimerisierung

kann in den Mutanten ohne Cysteine nicht über eine Disulfidbrücke vermittelt werden, sondern nur durch nicht-kovalente Wechselwirkungen.

Zum Nachweis dieses möglichen Dimers, der über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden ist (nicht-kovalenter Dimer), wurden Tau-Monomere in PBS mit 1 mM DTT ohne Zugabe von Polyanionen bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden sie mittels einer nicht denaturierenden Blau-Nativen-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das reduzierende DTT sollte nach circa 1 Tag nicht mehr wirksam sein (siehe Abbildung 24).

Es zeigte sich, daß die Mutanten ohne Cysteine (K19-C322A, K18-C291A-C322A und K18-ΔK280-C291A-C322A) zu einem sehr geringen, aber eindeutig nachweisbaren Ausmaß von 1-2 % nicht-kovalente Dimere bilden (Abbildung 35 und Tabelle 7). Der Wild-Typ von K19 bildete 43 % Dimere und von K18 5 % Dimere (K18-ΔK280 = 7 %). Bei den K18 Mutanten mit einem einfachen Austausch eines Cysteins wurden für K18-C291A 28 % und für K18-C322A 41 % Dimere nachgewiesen.

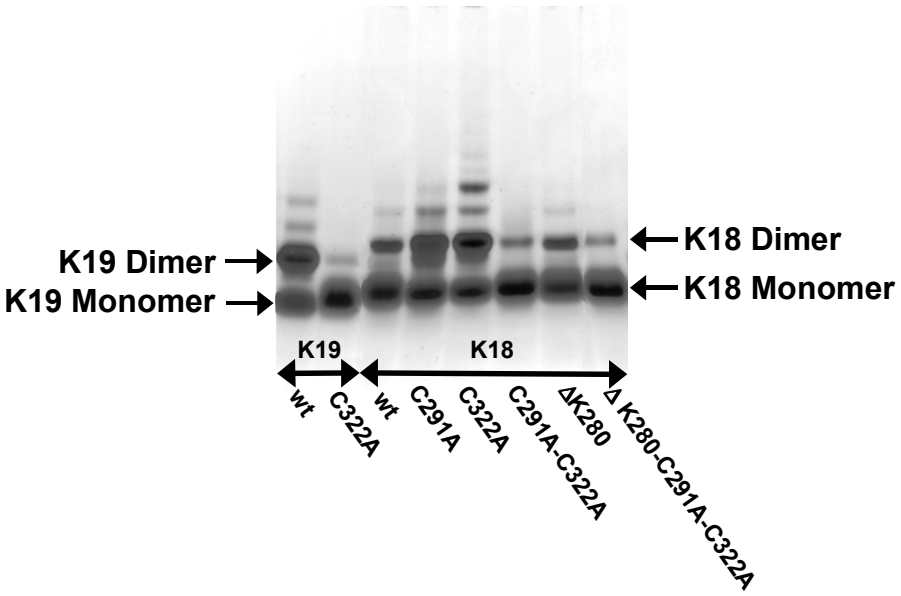

Abbildung 35: Blau-native-PAGE der gebildeten Dimere von K18 und K19 Cystein-Mutanten. Es wurden für K18 Mutanten 12 µM und für K19 Mutanten 24 µM Protein in PBS mit 1 mM DTT für 4 Tage bei 37 °C inkubiert und je 0.7 µg mittels einer nicht denaturierenden Blau-Nativen-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das bereits während der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-blue gefärbte Gel wurde nach der Quantifizierung (Tabelle 7) wieder entfärbt. Um schwache Banden für die Dokumentation besser sichtbar zu machen, wurde es anschließend mit der Silber-Färbemethode gefärbt (wie oben dargestellt).

Tabelle 7: Prozentuale Dimerisierung der K18 und K19 Cystein-Mutanten

	K19 wt	K19-C322A	K18 wt	K18-C291A	K18-C322A	K18-C291A-C322A	K18-ΔK280	K18-ΔK280-C291A-C322A
% Monomer	56	99	95	71	58	98	93	99
% Dimer	43	1	5	28	40	2	7	1

Die Quantifizierung der Monomere und Dimere wurde mittels Bildanalyse anhand des Coomassie-Brilliant-blue gefärbten Gels mit der TINA-Software durchgeführt. Höhere Aggregate wurden nicht quantifiziert, weswegen zum Teil Monomer und Dimer nicht auf 100 % addieren.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl 3-Repeat Tau-Konstrukte als auch 4-Repeat Tau-Konstrukte in der Lage sind, unter reduzierenden Bedingungen PHFs zu bilden. Dies haben die Experimente mit Wild-Typ Tau und den Mutanten ohne Cysteine gezeigt. Diese Fähigkeit läßt sich zurückführen auf die Ausbildung eines Dimers, der über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden ist. Eine Dimerisierung von 3-Repeat Tau unter oxidierenden Verhältnissen beschleunigt die PHF-Polymerisation. Eine Oxidation von 4-Repeat Tau führt präferentiell zu einem „kompakten Monomer“, der auf die Polymerisation inhibierend wirkt. Damit wurden frühere Ergebnisse für 3-Repeat Tau (Wild-Typ und C322A) von Schweers *et al*. (Schweers *et al.* 1995) um eine Polymerisation in Gegenwart von Polyanionen erweitert und diesbezügliche Ergebnisse von Friedhoff *et al.* (Friedhoff *et al.* 1998b) zum Teil korrigiert. Erstmalig wurde eine Polymerisation von 4-Repeat Tau ohne Cysteine untersucht. Die Bildung gerader Filamente im Gegensatz zu paarigen helikalen Filamenten läßt sich auf die Verwendung der unterschiedlichen PHF-induzierenden Substanzen Heparin (PHFs) und Arachidonsäure (gerade Filamente) zurückführen. In Bezug auf die Bildung gerader Filamente konnten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von L. Binder nachvollzogen werden und für eine Polymerisation unter reduzierenden Bedingungen konnte allgemein eine Annäherung der Ergebnisse erreicht werden.

IV DISKUSSION

Die Alzheimer-Krankheit ist durch das Vorkommen von abnormal aggregierten Proteinen im Gehirn gekennzeichnet. Als Hauptbestandteile dieser Ablagerungen wird im Falle der Amyloid-Plaques das β-Amyloid-Peptid und im Falle der neurofibrillären Bündel, das Protein Tau gefunden. Die Aggregation von Proteinen zu Filamenten und deren Ablagerung im Gehirn ist ein gemeinsames Merkmal vieler Krankheiten. So aggregiert bei der Huntington-Krankheit das durch einen Poly-Glutamin-Einschub verlängerte Protein Huntingtin (zur Übersicht siehe (Tobin und Signer 2000; Wanker 2000)), bei der Parkinson-Krankheit das α-Synuklein (zur Übersicht siehe (Rajagopalan und Andersen 2001; Wanker 2000)) und bei Prionen-Krankheiten ein in der Konformation verändertes Prion-Protein (zur Übersicht siehe (Jackson und Clarke 2000)). In ihrer natürlichen Funktion und den biochemischen Eigenschaften sind diese Proteine sehr unterschiedlich. Der pathologischen Aggregation der Proteine zu Filamenten scheint jedoch mit der Ausbildung von intermolekularen β-Faltblattstrukturen ein gemeinsames Prinzip zu Grunde zu liegen (Tremblay *et al.* 1998; Rochet und Lansbury 2000). Im Gegensatz zu den anderen Proteinen wurde eine Bildung von β-Faltblattstrukturen für die Aggregation von Tau zu PHFs zwar vermutet, konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Schweers *et al.* 1994). Dies war eine Frage mit der sich diese Arbeit beschäftigt.

1 FTDP-17 Mutationen im Tau-Protein

Die Aggregation von Tau zu paarigen helikalen Filamenten und die nachfolgende Akkumulation zu neurofibrillären Bündeln ist nicht nur für die Alzheimer-Krankheit charakteristisch. Abnorme Ablagerungen des Proteins Tau finden sich bei einer Reihe von Krankheiten, wie CBD, PSP, PiD, AgD und der Gruppe der FTDP-17 Erkrankungen. Zusammenfassend werden sie als Tauopathien bezeichnet ((Feany und Dickson 1996; Spillantini *et al.* 1998b; Buee und Delacourte 1999; Tolnay und Probst 1999) zur Übersicht siehe (Buee *et al.* 2000)).

Die Gruppe der FTDP-17 Erkrankungen ist dabei besonders interessant, da sie als gemeinsame Grundlage eine Mutation im Tau-Gen tragen. Das unterscheidet sie von der Alzheimer-Krankheit und den anderen Tauopathien. Es treten sowohl Mutationen in den Introns als auch den Exons auf (siehe Abbildung 2). Intronische Mutationen führen durch eine veränderte Regulation des alternativen Spleißens auf der Basis der mutierten Tau m-RNA Sequenz zu einem veränderten Verhältnis der 4-Repeat zu 3-Repeat Tau-Isoformen (Abbildung 3). Das beim Wild-Typ normalerweise äquimolares Verhältnis wird zu überwiegend 4-Repeat Tau-Isoformen hin verschoben. Exonische Mutationen können einerseits ohne Auswirkung im Protein bleiben (zum Beispiel L284L, N296N, usw.) oder manifestieren sich im Austausch (zum Beispiel G272V, P301L, usw.) oder einer Deletion (ΔK280 und ΔN296) einer Aminosäure und führen somit zu einer biochemischen Änderung des Proteins. Zusätzlich können sie sich wie zum Beispiel im Falle von N279K aber auch auf das alternative Spleißen auswirken. Diese Mutation verstärkt eine Exon-Verstärker-Sequenz (ESE, *exon splicing enhancer*) und führt zu einem erhöhten Anteil an 4-Repeat Tau-Isoformen. Die ΔK280 hat den gegenteiligen Effekt. Sie zerstört die ESE-Sequenz und hat fast ausschließlich 3 Repeat Tau-Isoformen zur Folge (zur Übersicht der Lokalisation siehe Abbildung 2 und zur Auswirkung der FTDP-17 Mutanten Tabelle 1). Da die ΔK280 Mutation nur in 4-Repeat Tau-Isoformen vorkommt, ist die Konzentration an Tau mit der ΔK280 Mutation in der Zelle eher gering (Hutton *et al.* 1998; Clark *et al.* 1998; Varani *et al.* 1999; Grover *et al.* 1999; Hong *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; Gao *et al.* 2000; D'Souza und Schellenberg 2000; Stoss *et al.* 2001).

Zur Zeit gibt es keine einheitliche Theorie zur pathogenen Wirkungsweise dieser unterschiedlichen Mutationen. Die exonischen FTDP-17 Mutationen treten innerhalb der Repeat-Region auf. Diese Region ist sowohl für die natürliche Funktion von Tau verantwortlich – der Bindung und Stabilisierung an Mikrotubuli – gleichzeitig bildet sie aber auch den essentiellen Bestandteil der PHFs. Daher sind als pathogene Mechanismen der FTDP-17 Tau-Mutationen sowohl ein Verlust der natürlichen Funktion (*loss of function*) als auch eine Zunahme der pathalogischen Funktion (*gain of toxic function*) denkbar.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß der exonischen FTDP-17 Mutationen im Tau-Protein bezüglich einer Zunahme der pathalogischen Funktion – der Polymerisation zu PHFs – zu untersuchen. Diese Frage ist nicht nur für die FTDP-17 Erkrankung von Bedeutung, sondern erlaubt wertvolle Rückschlüsse auf andere neurodegenerative Erkrankungen wie die zahlenmäßig vorherrschende Alzheimer-Krankheit und andere Tauopathien, bei denen Tau in derselben Weise abnormal aggregiert.

1.2 Polymerisation der FTDP-17 Tau-Mutanten zu PHFs

Die FTDP-17 Mutationen wurden zunächst auf der Basis der längsten Tau-Isoform hTau40 (Abbildung 2) in ihren kinetischen Eigenschaften der Polymerisation zu PHFs untersucht. Es zeigte sich, daß alle getesteten Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ schneller PHFs bildeten. Dabei wirkten die Mutanten G272V, N279K, V337M und R406W mit einer mittleren Effizienz beschleunigend und wiesen ebenfalls ein höheres Niveau an gebildeten Filamenten auf. Besonders auffällig waren die Mutanten ΔK280 und P301L, die wesentlich schneller und auch zu einem größerem Ausmaß PHFs bildeten (Abbildung 6). Ein vergleichbares Bild ergibt sich, wenn das Tau-Protein auf die Repeat-Region beschränkt wird. Diese Region ist einerseits für die natürliche Interaktion mit Mikrotubuli verantwortlich (Gustke *et al.* 1994; Goode und Feinstein 1994), andererseits bildet sie auch den Kern der PHFs (Wischik *et al.* 1988b; Novak *et al.* 1993; Goedert *et al.* 1988; Jakes *et al.* 1991) und führt zu einer schnelleren Filament-Polymerisation im Vergleich zum Tau-Protein mit der gesamten Länge (Wille *et al.* 1992a; Friedhoff *et al.* 1998b; von Bergen *et al.* 2000). So polymerisierten die K18 Mutanten (Abbildung 2) im allgemeinen wesentlich schneller (innerhalb von Stunden) zu PHFs als die hTau40 Mutanten (innerhalb von Tagen). Auch bei diesem Konstrukt K18 zeigten die Mutanten ΔK280 und P301L eine extrem beschleunigte PHF-Polymerisation (Abbildung 7) und im Falle von P301L auch zu einem höheren Ausmaß. Eine vergleichbare Geschwindigkeit der PHF-Polymerisation wie beim Wild-Typ konnte für die Mutanten G272V und V337M gefunden werden. Langsamer als der Wild-Typ von K18 bildete die Mutante N279K PHFs.

Die P301L Mutation ist die häufigste FTDP-17 Mutation (Reed *et al.* 2001) und sie wurde als eine der ersten entdeckt (Hutton *et al.* 1998; Poorkaj *et al.* 1998; Clark *et al.* 1998; Mirra *et al.* 1999). Aus diesem Grunde ist sie auch eine der am besten untersuchtesten Mutationen. Alle bisherigen Arbeiten konnten für die P301L Mutation eine effizientere PHF-Polymerisation nachweisen (Arrasate *et al.* 1999; Nacharaju *et al.* 1999; Goedert *et al.* 1999a; Gamblin *et al.* 2000). Die anderen hier untersuchten Mutationen wurden in diesen Arbeiten nicht so eingehend bearbeitet und sind daher weniger konsistent in ihrem Effekt belegt (zur Zusammenfassung der jeweiligen Ergebnisse siehe Tabelle 10). So konnten Arrasate *et al.* (Arrasate *et al.* 1999) und Gamblin *et al.* (Gamblin *et al.* 2000) für die Mutation G272V keinen Effekt auf die PHF-Polymerisation finden, im Gegensatz zu Goedert *et al.* (Goedert *et al.* 1999a), der eine vermehrte PHF-Bildung fand. Noch drastischer unterscheiden sich die Ergebnisse für die Mutation V337M. Nacharaju *et al.* (Nacharaju *et al.* 1999) und Goedert *et al.* (Goedert *et al.* 1999a) fanden keinen Effekt, Gamblin *et al.* (Gamblin *et al.* 2000) jedoch eine beschleunigte und im Ausmaß stark erhöhte PHF-Polymerisation.

Ein Grund für diese Inkonsistenz der Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Tau-Proteine und Methoden zur Verfolgung der Aggregation sein (siehe Tabelle 10). Eine elektronenmikroskopische Auswertung der Ansätze zur Tau-Aggregation ist unerläßlich als Nachweis für die tatsächliche Bildung und das Erscheinungsbild der Filamente. Die Quantifizierung und Verfolgung der Kinetik der Aggregation ist elektronenmikroskopisch (EM) (Goedert *et al.* 1999a; Nacharaju *et al.* 1999) aber aus mehreren Gründen schwierig: (1) Da nur eine kleine Menge des Reaktionsansatzes untersucht wird, kann es auf Grund von häufig auftretenden Verklumpungs-erscheinungen der Filamente (eigene Beobachtung und (King *et al.* 2000)) zu einer nicht-repräsentativen Probenentnahme kommen. (2) Die EM-Proben-Netzchen zeigen im Allgemeinen eine unterschiedliche Adsorption und Verteilung der Proben, was zu Fehleinschätzungen der aggregierten Masse an Tau führt. Als weitere Methode der Quantifizierung ist die Bildanalyse von elektrophoretisch (SDS-PAGE) aufgetrenntem Tau-Protein aus Filament-Pellets und verbliebenem nicht aggregierten Protein kritisch zu beurteilen. Auf Grund der mehreren aufeinanderfolgenden methodischen Schritte (Zentrifugation, Trennen von Pellet und Überstand, Wiederauflösen des Pellets, SDS-PAGE und Bildanalyse) ist sie ebenfalls sehr fehleranfällig. Direktere Methoden, wie

die Laser-Licht-Streuung (LLS) von Filamenten in Lösung (Gamblin *et al.* 2000) sowie die in dieser Arbeit (Barghorn *et al.* 2000) verwendete Fluoreszenz-basierte Thioflavin S-Methode (Friedhoff *et al.* 1998a) sind in Kombination mit einer elektronenmikroskopischen Untersuchung der Filamente dagegen weniger anfällig für solche Fehler. Mit Ausnahme einer Studie (Arrasate *et al.* 1999) wurden für die Aggregation zu Filamenten immer Tau-Isoformen verwendet, da diese die natürliche Situation *in vivo* am besten widerspiegeln. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zur Isoform hTau40 das Konstrukts K18 verwendet und die Ergebnisse dadurch gestützt. Das Konstrukts K18 eignet sich für Aussagen zur Aggregation von Tau besonders gut, da es mit der Repeat-Region den essentiellen Bestandteil der PHFs repräsentiert (Wischik *et al.* 1988b; Novak *et al.* 1993; Friedhoff *et al.* 1998b; von Bergen *et al.* 2000).

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und denen anderer Studien (siehe Tabelle 10) für einige FTDP-17 Mutationen, insbesondere ΔK280 und P301L, eine Zunahme des toxischen Effekts durch eine effizientere Polymerisation zu PHFs feststellen.

1.2.1 Das Erscheinungsbild der FTDP-17 Tau-Filamente

Mittels des ThS-Assays wurde die Bildung von Filamenten aus den FTDP-17 Tau-Mutanten kinetisch verfolgt. Daß bei diesen Versuchen tatsächlich Filamente gebildet wurden, konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden. In ihrem äußeren Erscheinungsbild ließen sich sowohl paarige helikale als auch gerade Filamente nachweisen (Abbildung 8), die denen aus Alzheimer-Gehirnen isolierten Filamenten ähneln (Kidd 1963; Crowther 1991). Diese beiden Formen waren jedoch nicht absolut charakteristisch für die jeweilige Mutante. So bildeten N279K, V337M und R406W auf Basis von hTau40 gerade, auf der Basis des Konstrukts K18 hingegen paarige helikale Filamente (gilt nicht für die Mutation R406W, da diese außerhalb des Konstrukts K18 liegt). Einzig die Mutante P301L schien sowohl auf Basis von hTau40 und K18

überwiegend gerade Filamente zu bilden. Der Wild-Typ und die Mutanten G272V und ΔK280 bildeten vorwiegend PHFs.

Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht nur die Mutation an sich, sondern auch die verwendete Isoform oder das Konstrukt (hier die längste Tau-Isoform hTau40 und das 4-Repeat Konstrukt K18) für die Ausbildung gerader oder paariger helikaler Filamente sowie die Geschwindigkeit der PHF-Polymerisation ausschlaggebend sind. Einen ähnlichen Zusammenhang fanden auch Goedert *et al.* (Goedert *et al.* 1996; Goedert *et al.* 1999a). Im Gegensatz zu dieser Arbeit konnten sie für Wild-Typ und FTDP-17 Tau-Mutanten bei 4-Repeat Isoformen vorwiegend gerade Filamente nachweisen. Drei-Repeat Isoformen bildeten vorwiegend paarige helikale Filamente. Crowther und Goedert (Crowther und Goedert 2000) beschreiben eine Variation der Filament-Morphologie in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation. Vorwiegend paarige helikale und weniger gerade Filamenten bilden demnach die Mutanten V337M und R406W. Dadurch sind sie in ihrer Zusammensetzung nicht von Filamenten zu unterscheiden, die aus Alzheimer-Gehirnen isoliert wurden. Die Mutante G389R soll ausschließlich gerade Filamente sowie die P301L Mutante in Einklang mit dieser Arbeit gerade und dünne Filamente mit einer unregelmäßigen Periodizität bilden. Auch die Verwendung unterschiedlicher Substanzen zur Induktion der Filament-Polymerisation hat einen Einfluß auf das Erscheinungsbild der Filamente. Die Arbeitsgruppe um L. Binder verwendet Arachidonsäure als induzierendes Agenz (King *et al.* 2000) und erhält fast ausschließlich gerade Filamente der FTDP-17 Tau-Mutanten (Gamblin *et al.* 2000). Im allgemeinen sollen diese aber zu einem geringen Maße über die Zeit zu paarigen helikalen Filamenten reifen können (King *et al.* 1999).

Bei anderen Tauopathien treten zum Teil ebenfalls sehr spezifisch verschiedene Erscheinungsformen von Filamenten auf, die zusätzlich aus unterschiedlichen Tau-Isoformen aufgebaut sind. So sind zum Beispiel bei der PSP (Steele *et al.* 1964) die NFTs vornehmlich aus geraden Filamenten (Tellez-Nagel und Wisniewski 1973; Tomonaga 1977)) von 4-Repeat Tau-Isoformen aufgebaut (Flament *et al.* 1991; Vermersch *et al.* 1994). Dies steht im Gegensatz zur Alzheimer-Krankheit, bei der paarige helikale Filamente vorherrschen (Kidd 1963; Crowther 1991), die aus allen sechs Isoformen bestehen (Goedert *et al.* 1992a). Auch bei der CBD, die klinisch und

pathologisch mit der PSP überlappt, werden vornehmlich 4-Repeat Tau-Isoformen in breiteren, gewundenen Filamenten mit einer größeren Periodizität in den NFTs gefunden (Spillantini und Goedert 1998; Buee und Delacourte 1999; Mailliot *et al.* 1998; Sergeant *et al.* 1999). Bei der PiD, die durch charakteristische Tau-Ablagerungen in Form von sogenannten Pick-Körpern gekennzeichnet ist, werden jedoch nur 3-Repeat Isoformen in überwiegend geraden, aber auch irregulär gewundenen Filamenten nachgewiesen (Delacourte *et al.* 1996; Buee Scherrer *et al.* 1996; Spillantini und Goedert 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß weniger die Filament-Morphologie, sondern das bloße Vorhandensein von Tau-Filamenten für die Ausbildung einer Demenz verantwortlich ist (Spillantini und Goedert 1998).

1.3 Die Polymerisation von Tau führt zu β-Faltblattstruktur in den PHFs

Seit einiger Zeit gilt für die pathologische Aggregation von Proteinen bei einer Reihe von Krankheiten die Ausbildung von β-Faltblattstruktur als gemeinsames, grundlegendes Prinzip (Koo *et al.* 1999). Bei diesen sogenannten konformationellen oder amyloiden Krankheiten polymerisiert das Protein in Filamente mit einer durchschnittlichen Breite von 10 nm. Dabei ist das elementare Bauprinzip die Bildung von β-Faltblattstrukturen, die in einer Kreuz-β-Struktur vertikal zur Filament-Achse liegen (Kirschner *et al.* 1986).

Eine Ausnahme zu dieser Regel stellte lange Zeit das polymerisierte Tau-Protein in Form der PHFs dar. Monomeres, in Lösung befindliches Tau-Protein zeigt die Charakteristika eines Zufallsknäuels (*random coil*) (Cleveland *et al.* 1977; Schweers *et al.* 1994). Das heißt, die Struktur von Tau ist zum größten Teil ungeordnet, es finden sich kaum meßbare Anteile an geordneten Sekundärstrukturen wie α-Helix oder β-Faltblatt. Das Tau-Protein wird auch als ein nativ ungefaltetes Protein bezeichnet. Auch nach einer Aggregation in die unlösliche, hoch geordnete Struktur der PHFs konnte für PHFs aus Alzheimer-Gehirnen kein erhöhter Anteil an Sekundärstruktur-

Elementen wie α-Helix oder β-Faltblatt gefunden werden (Schweers *et al.* 1994). Dieser offensichtliche Widerspruch konnte erst vor kurzem durch Verwendung von *in vitro* PHFs aus kürzeren Konstrukten der Repeat-Region von Tau beseitigt werden. Mittels CD-Spektroskopie und FTIR-Spektroskopie konnte eine β-Faltblattstruktur für PHFs nachgewiesen werden (von Bergen *et al.* 2000). Dabei wurde ein Hexapeptid im 3. Repeat (PHF6 = $_{306}$VQIVYK$_{311}$) durch die Bildung von lokaler β-Faltblatt-Struktur als essentiel für die PHF-Polymerisation verantwortlich gemacht. Eine ähnliche Funktion wurde für ein zweites Hexapeptid (PHF6* = $_{275}$VQIINK$_{280}$) im 2. Repeat vermutet. Dieses Ergebnis zeigt, daß durch eine Beschränkung der PHF-Bildung auf den essentiellen Teil – die Repeat-Region – der relative Anteil an β-Faltblattstruktur an der Gesamtstruktur in den PHFs erhöht wird. Erst dadurch kann die β-Faltblattstruktur mit den spektroskopischen Methoden (CD- und FTIR-Spektroskopie) eindeutig sichtbar gemacht werden. Bei beiden Methoden liefert das gesamte Polypeptidrückgrad einen Beitrag für das gemessene Spektrum. PHFs aus dem gesamten Tau-Protein haben demnach einen geringeren Anteil an β-Faltblatt an der Gesamtstruktur, da die N-terminalen und C-terminalen Bereiche nicht an der prinzipiellen PHF-Bildung beteiligt sind und einen diffusen Mantel um die PHFs bilden (Wischik *et al.* 1988a). So zeigt sich auch für *in vitro* hergestellte PHFs aus der längsten Tau-Isoform hTau40 lediglich eine Schulter bei einer für β-Faltblatt charakteristischen Wellenzahl von 1625 cm^{-1}, und bei der kürzesten Tau-Isoform hTau23 ist eine schwer zu interpretierende Peak-Verbreiterung zu beobachten (Abbildung 9).

Wie bereits gezeigt werden konnte, polymerisieren die FTDP-17 Mutanten, insbesondere ΔK280 und P301L, schneller zu PHFs als der Wild-Typ (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Lage der Mutationen innerhalb der Repeat-Region und der Nähe der PHF6 und PHF6* Motive ist auffällig. Es stellte sich daher die Frage, ob die Zunahme an toxischer Funktion auf einer vermehrten Bildung an β-Faltblatt beruht. Auf der Basis von hTau40 konnten mittels CD-Spektroskopie für den Wild-Typ und die FTDP-17 Mutanten keine unterschiedlichen Anteile an Sekundärstruktur nachgewiesen werden (Barghorn *et al.* 2000). In löslicher Form scheinen die FTDP-17 Mutanten demnach keine größere Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstruktur zu besitzen. Geringfügige Änderungen in den Anteilen an Sekundärstruktur sind

andererseits durch die Verwendung der längsten Isoform hTau40 höchstwahrscheinlich nicht meßbar (von Bergen *et al.* 2000). Mit der Verwendung des 4-Repeat Konstrukts K18 wurde dieser Tatsache Rechnung getragen. Ein unterschiedlicher Anteil an Sekundärstuktur für monomeres Tau-Protein konnte allerdings auch hier nicht gefunden werden (Abbildung 10). Nach einer Polymerisation zu PHFs zeigen hingegen alle Mutanten (mit Ausnahme von ΔK280, siehe unten) und der Wild-Typ einen eindeutigen Übergang zu mehr β-Faltblattstruktur. Eine eindeutige Unterscheidung auf mehr oder weniger β-Faltblatt ist jedoch nicht möglich (Abbildung 10). Eine Quantifizierung des relativen Anteils an β-Faltblatt an der Gesamtstruktur ist zudem nur nach einer Dekonvolution des FTIR-Spektrums in seine einzelnen Peaks möglich (Susi und Byler 1986) und mit einem großen Fehler behaftet (Surewicz *et al.* 1993). Zu einem vergleichbaren Ergebnis für polymerisiertes Tau-Protein führt eine weitere Beschränkung der Länge des Tau-Proteins auf insgesamt zwölf respektive 16 Aminosäuren, welche die Hexapeptide PHF6* ($_{273}$GKVQIINKKLDL$_{284}$) und PHF6 ($_{296}$NIKHVPGGGSVQIVYK$_{311}$) einschließen (Hexapeptide sind unterstrichen dargestellt). Nach einer Polymerisation dieser synthetischen Peptide läßt sich für die Peptide mit der ΔK280 Mutation in PHF6* ($_{273}$GKVQIIN–KLDL$_{284}$) und der P301L Mutation bei PHF6 ($_{296}$NIKHV**L**GGGSVQIVYK$_{311}$) keine vermehrte β-Faltblattstruktur mittels FTIR-Spektroskopie im Vergleich zu den Wild-Typ Peptiden messen (von Bergen *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den Repeat-Konstrukten oder der längsten Tau-Isoform hTau40 zeigt das Peptid mit der ΔK280 Mutation ($_{273}$GKVQIIN-KLDL$_{284}$) dagegen bereits vor einer Polymerisation einen geringen Anteil an β-Faltblatt in 100 % TFE (Trifluorethanol), einem α-Helix induzierenden Lösungsmittel. Dieses auffällige Verhalten wird noch verstärkt, wenn der Anteil an TFE-Lösungsmittel durch Zugabe von PBS-Puffer verdünnt wird. Dann zeigt das ΔK280 Peptid, auch ohne Zugabe von Polyanionen, ein eindeutiges Spektrum für β-Faltblatt (von Bergen 2001).

Ein ähnlicher Effekt, wenn auch nicht so ausgeprägt, wurde auch für das 4-Repeat-Konstrukt K18-ΔK280 gefunden. Bereits bei der Aufreinigung bildeten sich Oligomere, die durch Gelpermeations-Chromatographie und Elektronenmikroskopie nachweisbar waren (Abbildung 11), und im FTIR-Spektrum zeigte sich eine leichte

Schulter bei 1620 cm^{-1}, die einen geringen Anteil β-Faltblatt anzeigt (Abbildung 10). Die Oligomere besaßen eine Größe von 10×10 nm für die überwiegend vorkommenden globulären Partikel. Längliche Strukturen waren 10 nm breit und 15 - 40 nm lang. Zum Teil ließen sich parallele Anlagerungen zweier globulärer oder länglicher Partikel erkennen. Es kann demnach vermutet werden, daß diese oligomeren Strukturen die Vorformen oder Nuklei von PHFs sind. Diese Ergebnisse bedeuten, daß die Unterschiede in der Tendenz, β-Faltblatt zu bilden, in dem prä-polymerisierten Status – insbesondere bei der ΔK280 Mutante – vorhanden sind. Nach einer Polymerisation zu PHFs verschwinden diese Unterschiede jedoch oder sind nicht mehr meßbar.

Gehen wir davon aus, daß die FTDP-17 Mutanten nicht das endgültige Ausmaß an β-Faltblattstruktur beeinflussen, dann beschleunigen sie durch eine erhöhte Tendenz, β-Faltblatt zu bilden, die Rate der PHF-Polymerisation. Anhand des Modells in Abbildung 36 läßt sich diese Annahme veranschaulichen und untermauern. Für die Mutation ΔK280, die innerhalb des Hexapeptids PHF6* liegt, ergibt sich folgendes Bild: In der ausgestreckten Form der Polypeptidkette eines β-Strangs liegen die Seitenketten alternierend ober- und unterhalb der Ebene des Faltblatts. Bei der Wild-Typ Sequenz von PHF6* ($_{273}$GKVQIINKKLDL$_{284}$) zeigen die Seitenketten der unterstrichenen Aminosäuren in eine Richtung, zum Beispiel nach unten. Das sind einerseits Seitenketten mit einem hydrophoben Charakter (wie G-V-I) aber auch polare und geladene Seitenketten (wie N-K-D). Die Deletion des Lysins an Position 280 (ΔK280) erzeugt innerhalb dieses Motivs eine Verschiebung der Aminosäuren. Die Sequenz ändert sich zu $_{273}$GKVQIINK–LDL$_{284}$. Auf der Unterseite (unterstrichen) des Faltblatts befinden sich dadurch jetzt vermehrt Seitenketten mit einem hydrophoben Charakter. Die beiden geladenen Seitenketten (K281 und D283) befinden sich jetzt auf der Oberseite und sind auf der Unterseite durch hydrophobe Leucine (L282 und L284) ersetzt worden. Gleichzeitig hat sich der hydrophile Charakter der Oberseite erhöht. Dies läßt sich anschaulich aus einer Berechnung der Hydropathizität (berechnet nach (Kyte und Doolittle 1982)) der Sequenzen für die Oberseite und die Unterseite des β-Strangs ersehen (Tabelle 8). Die Hydropathizität ist ein Maß für die hydrophile und hydrophobe Eigenschaft einer einzelnen Aminosäure oder Polypeptid-Sequenz. Mit

Hilfe von synthetischen Peptiden konnte gezeigt werden, daß solche alternierenden Abfolgen von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren die Neigung zur Ausbildung von β-Faltblattstrukturen durch ihren amphiphilen Charakter erhöhen (Hecht 1994; Xiong *et al.* 1995; West *et al.* 1999).

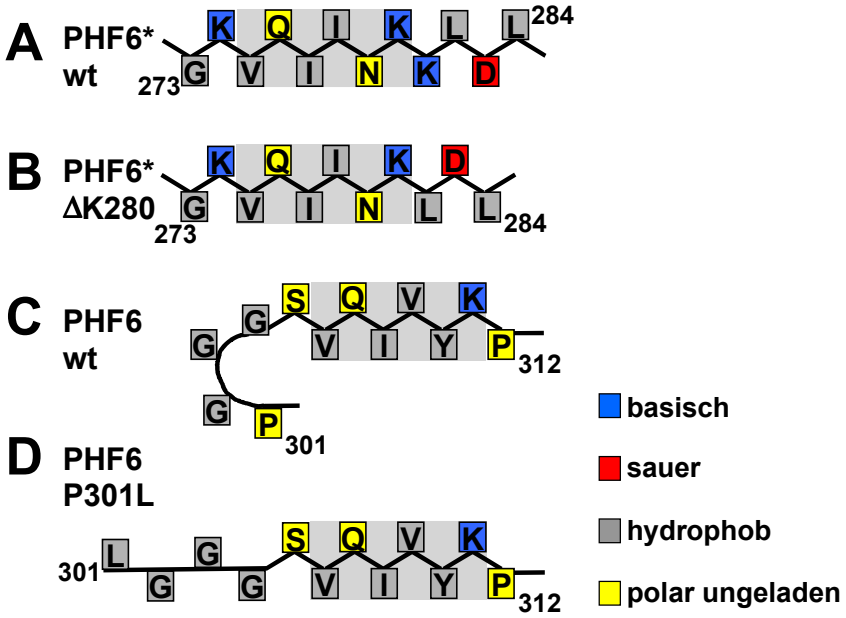

Abbildung 36: Modell der β-Faltblattbildung durch die Hexapeptide PHF6* und PHF6 und der vorgeschlagene Effekt der FTDP-17 Mutationen ΔK280 und P301L. Beide Hexapeptid-Motive enthalten Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten und Seitenketten mit einer großen intrinsischen Neigung für β-Faltblatt. Die Hexapeptid-Motive sind in β-Strang Konformation angeordnet, die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Eigenschaften der Seitenketten sind farblich gekennzeichnet: Basisch = blau , sauer = rot , hydrophob = grau und polar ungeladen = gelb . In der Kreuz-β-Struktur der PHFs, mit der Filament-Achse in der Papierebene, liegen die Seitenketten alternativ ober- und unterhalb der Papierebene. Die Abbildung wurde modifiziert nach (von Bergen *et al.* 2001).
(A) Die Sequenz um das Hexapeptid PHF6* des 2. Repeats startet bei K274 (letzte Aminosäure des 1. Repeats, Exon 9). Hydrophobe Seitenketten (grau) zeigen auf die Ober- und Unterseite und erzeugen lokal eine Stelle mit erhöhter Hydropathizität.
(B) Durch die Deletion ΔK280 werden die Seitenketten innerhalb der zweiten Hälfte des Motivs in ihrer Richtung umgedreht, so daß fast alle hydrohoben Seitenketten nach unten zeigen und dadurch die Hydropathizität und die Neigung zur Aggregation auf dieser Seite des Faltblatts erhöht wird.
(C) Die Sequenz um das Hexapeptid PHF6 des 3. Repeats startet bei der Aminosäure P301 (nahe dem Ende des 2. Repeats, Exon 10). Die meisten hydrophoben Seitenketten zeigen zu einer Seite des β-Faltblatts und erzeugen daher die Neigung zur Aggregation. Das PGGG Motiv vor dem PHF6 Motiv im nicht mutierten Tau repräsentiert eine typische β-Schleife, die höchstwahrscheinlich die β-Faltblattbildung über diesen Punkt hinaus verhindert und daher einer Aggregation entgegenwirkt.
(D) Die P301L Mutation reduziert die Neigung zur Ausbildung einer β-Schleife und ermöglicht dadurch die Bildung eines β-Faltblatts durch das PHF6 Motiv.

Die amphiphile Struktur, die durch die ΔK280 Mutation innerhalb des PHF6* Motivs entsteht, kann anhand eines modellierten β-Faltblatts aus vier einzelnen antiparallelen

β-Strängen deutlich gezeigt werden (Abbildung 37). In der Natur sind solche alternierenden Sequenzen und amphiphilen Strukturen stark benachteiligt. Höchstwahrscheinlich hat die Evolution sie ausselektiert, da sie eine inhärente Neigung zur Aggregation zu Amyloid-Filamenten haben (Broome und Hecht 2000).

Tabelle 8: Berechnete Hydropathizitäten der PHF6 und PHF6* Sequenzen

	PHF6*	ΔK280-PHF6*	PHF6	P301L-PHF6
Oberseite	+ 0.13	– 2.30	– 1.00	–0.10
Unterseite	– 0.43	+ 1.21	+ 0.83	+ 0.83

Die Hydropathizität der Sequenzen wie sie in Abbildung 36 dargestellt sind, wurden für die jeweils obere und untere Seite des β-Strangs getrennt berechnet (nach (Kyte und Doolittle 1982)). Je positiver der Wert, desto hydrophober, und je negativer der Wert, desto hydrophiler ist eine Region innerhalb einer Polypeptidkette. Durch die ΔK280 Mutation wird der Hydropathizität-Wert für die Oberseite des PHF6* Motivs negativer, die Sequenz demnach insgesamt hydrophiler. Die Unterseite wird mit einem positiveren Hydropathizität-Wert verstärkt hydrophob. Die P301L Mutation innerhalb des PHF6 Motivs zeigt keinen solchen Effekt.

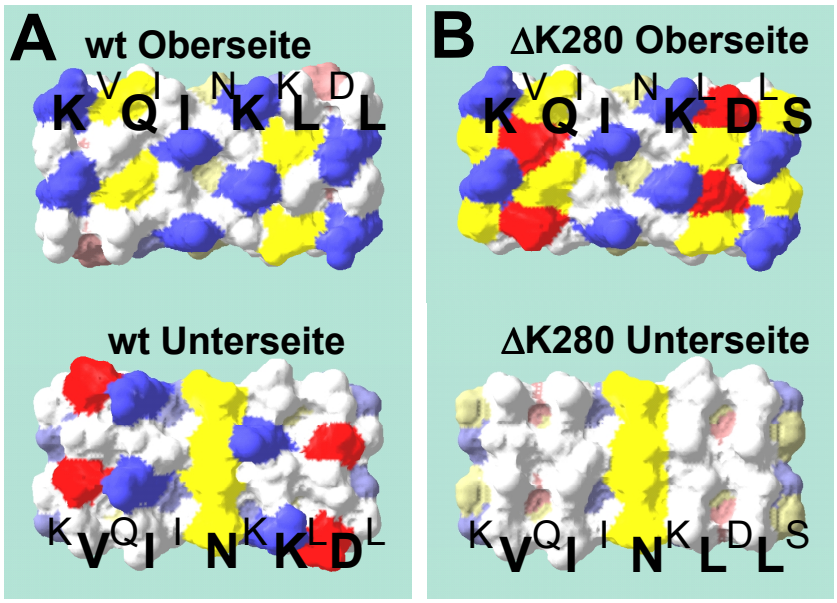

Abbildung 37: Zwei-dimensionale Darstellung der Hexapeptide PHF6* und ΔK280-PHF6* in einer 4-strängigen antiparallelen β-Faltblattstruktur. Die Eigenschaften der Seitenketten sind farblich gekennzeichnet: Basisch = blau (K), sauer = rot (D), hydrophob = grau (V, I, L) und polar ungeladen = gelb (Q, N). In der Kreuz-β-Struktur der PHFs, mit der Filament-Achse in der Papierebene, liegen die Seitenketten alternativ ober- und unterhalb der Papierebene. Seitenketten im Ein-Buchstaben-Code, die zum Betrachter zeigen, sind fett gedruckt, die verdeckten Seitenketten sind normal gedruckt. Die Modellierung wurde mit dem Programm Swiss-Pdb-Viewer erstellt (Guex und Peitsch 1997) und mit dem Programm POV-Ray for Windows nachbearbeitet.
(A): Die Wild-Typ Sequenz erzeugt Oberflächen mit gemischten Eigenschaften der Seitenketten.
(B): Die ΔK280 Sequenz separiert polare und unpolare Seitenketten auf unterschiedliche Oberflächen.
Die Abbildung wurde modifiziert nach (von Bergen *et al.* 2001).

Dieses Modell von amphiphilen β-Strängen erklärt auch, warum die Mutante K18-ΔK280 bereitwillig in der Lage ist, ohne Polyanionen zu PHFs zu polymerisieren, (Abbildung 12) und bereits bei der Reinigung der Proteine zur Oligomerisierung neigt (Abbildung 11). Durch die Deletion des Lysins wird eine positive Ladung entfernt. Dadurch wechseln die Ladungen von K281 und D283 zur selben Seite und heben sich durch ihre Nähe zueinander auf. Sowohl der hydrophobe Effekt als auch der Ladungseffekt kooperieren hier und erhöhen die Tendenz zur Aggregation. Unterstützt wird dieses Modell weiterhin durch die experimentellen Daten der K18-N279K Mutante zur PHF-Bildung. Die N279K Mutation hat auf Basis der Aminosäure-Sequenz den entgegengesetzten Effekt wie die ΔK280 Mutante, da bei ihr ein geladenes Lysin zusätzlich eingebracht wird. Dieser gegenteilige Effekt zeigt sich dann auch tatsächlich in einer langsameren Polymerisation der K18-N279K Mutante zu PHFs im Vergleich zum Wild-Typ (Abbildung 7). Die Rolle des hydrophoben Effekts bei der Polymerisation von PHFs spiegelt sich auch in der drastischen Zunahme der Masse an gebildeten PHFs (in Abwesenheit von Polyanionen) in Abhängigkeit von der Temperatur als Folge einer zunehmenden Entropie des Systems wider. Bei der längsten Tau-Isoform hTau40 geht die Tendenz der ΔK280 Mutante verloren, bereitwillig ohne Polyanionen PHFs zu bilden. Zusammen mit der Tatsache, daß die Polymerisation zu PHFs im Vergleich zum 4-Repeat-Konstrukt K18 wesentlich langsamer abläuft, zeigt dies den inhibitorischen Charakter der N-terminalen und C-terminalen Sequenzen auf die PHF-Bildung (Friedhoff *et al.* 1998b; Schweers *et al.* 1995) (Vergleiche Abbildung 6 und Abbildung 7).

Die P301L Mutation liegt in der Nähe des zweiten Hexapeptid-Motivs PHF6 ($_{301}$PGGGSVQIVYKP$_{312}$) und führt im Vergleich zum Wild-Typ ebenfalls zu einer eindeutig effizienteren PHF-Bildung. Seitenketten mit einem hydrophoben oder neutralen Charakter die zu einer Seite zeigen – zum Beispiel unten – sind unterstrichen. Glycine haben durch ihre relativ freie Beweglichkeit eine geringe intrinsische Neigung für β-Faltblatt. Außerdem wird durch das Prolin$_{301}$ die ausgestreckte Form der Polypeptidkette unterbrochen. Insgesamt ist das PGGG-Motiv im Gegenteil ein charakteristischer β-Schleifen-Bildner. Dieses Motiv wird durch den Austausch des P301 gegen ein Leucin zerstört und der negative Einfluß auf die β-Faltblatt-Bildung

aufgehoben. Die Polymerisation zu PHFs wird gefördert, da ein verlängertes β-Faltblatt gebildet werden kann. Tatsächlich findet man bei Trägern der P301L Mutation im Tau-Gen im Gehirn PHFs, die präferentiell aus dem mutierten Tau-Protein bestehen (Rizzu *et al.* 2000). Eine Umverteilung der Ladungen oder Verstärkung des amphiphilen Charakters tritt bei dieser Mutation nicht auf, wie sich anhand der berechneten Hydropathizität nachvollziehen läßt (Tabelle 8). Deshalb ist die P301L Mutante auch immer noch auf Polyanionen als Gegenionen bei der Aggregation *in vitro* angewiesen (Abbildung 12).

1.4 Interaktion und Funktion der PHF6 und PHF6* Motive innerhalb der Repeats bei der PHF-Polymerisation

Tau-Proteine mit 3-Repeats haben nur das Hexapeptid-Motiv PHF6 im 3. Repeat, 4-Repeat Tau-Isoformen besitzen hingegen zusätzlich das Hexapeptid PHF6* im 2. Repeat. Die Deletion des K280 (ΔK280) wirkt sich bei 4-Repeat Tau in einer extremen Beschleunigung der PHF-Polymerisation aus. Welchen Einfluß hat diese Veränderung des PHF6* Motivs, wenn sie analog auf das Hexapeptid PHF6 übertragen wird? Kommt es durch die Änderung des PHF6 Motivs zu ΔK280-PHF6* ebenfalls zu einer beschleunigten PHF-Polymerisation? Welchen Einfluß hat demnach der 2. Repeat und der 3. Repeat – also die um die Hexapeptide liegenden Sequenzen – auf die PHF-Polymerisation? Um diese Zusammenhänge zu testen, wurde in dem 3-Repeat Konstrukt K19 das PHF6 Motiv in das ΔK280-PHF6* Motiv mutiert (als K19-R3* bezeichnet) und bei der ΔK280 Mutante des 4-Repeat Konstrukts K18 der 3. Repeat vollständig deletiert (bezeichnet als K18-ΔK280-ΔR3). Man erhält somit in beiden Fällen ein Konstrukt mit 3-Repeats. Im ersten Fall ist das ΔK280-PHF6* Motiv im 3. Repeat vorhanden (K19-R3*) und die Reihenfolge der Repeats hat sich mit R1-R3-R4 nicht geändert. Im zweiten Fall ist das ΔK280-PHF6* Motiv im 2. Repeat an seiner „natürlichen“ Stelle, aber die Reihenfolge der Repeats hat sich nach R1-R2-R4 geändert (siehe Abbildung 17 für eine schematische Darstellung der Konstrukte). Diese Mutanten wurden in ihrer PHF-Polymerisation mit dem Wild-Typ von K18 und K19 und der K18-ΔK280 Mutante verglichen.

Auch im dritten Repeat hat das ΔK280-PHF6* Motiv in der Mutante K19-R3* im Vergleich zum Wild-Typ von K19 auf die PHF-Polymerisation eine förderliche Wirkung (Abbildung 18). Im Kontext der umliegenden Sequenzen des 3. Repeats hat das ΔK280-PHF6* Motiv offenbar ebenfalls eine erhöhte Neigung zur Ausbildung von β-Faltblatt und beschleunigt durch seinen amphiphilen Charakter die Polymerisation. Das erscheint sinnvoll, da das Hexapeptid PHF6 bei 3-Repeat Konstrukten bereits für eine PHF-Bildung ausreicht und ein Ersatz durch das potente ΔK280-PHF6* diese nach den bisherigen Ergebnissen beschleunigen sollte.

Die Situation ist für das Konstrukt K18-ΔK280-ΔR3 anders. Im Vergleich zur 4-Repeat Mutante K18-ΔK280 hat die Deletion des 3. Repeats eine inhibitorische Wirkung. Obwohl das potente ΔK280-PHF6* Motiv anwesend ist, wird eine verminderte und langsamere PHF-Polymerisation beobachtet als bei K18-ΔK280 und K19-R3*. Dafür lassen sich zwei mögliche Erklärungen finden: Einerseits könnte bei der PHF-Polymerisation von 4-Repeat Isoformen das PHF6* Motiv mit dem Hexapeptid PHF6 in Interaktion treten. PHF6* alleine würde demnach nur zu einer unzureichenden PHF-Bildung führen. Andererseits könnte durch die geänderte Reihenfolge der Repeats – auf den 2. Repeat folgt jetzt direkt der 4. Repeat – die natürliche Sequenzfolge zur Ausbildung der Konformation für PHFs gestört sein.

Die letzte Variante ist durch Versuche mit Prolin-Mutanten wahrscheinlicher. Wird in 3-Repeat Tau-Formen das PHF6 (von Bergen *et al.* 2000) oder in 4-Repeat Tau-Formen eines der beiden Hexapeptid-Motive PHF6 oder PHF6* (von Bergen *et al.* 2001) durch ein Prolin zerstört, so ist die PHF-Polymerisation vollständig inhibiert. Ein funktionelles Hexapeptid ist demnach bei 4-Repeat Tau im Gegensatz zu 3-Repeat Tau nicht ausreichend. Durch die stark polymerisationsfördernde Wirkung der ΔK280 Mutation wird jedoch die inhibierende Wirkung eines Prolins im PHF6 Motiv aufgehoben. Wird das ΔK280-PHF6* Motiv jedoch selbst durch ein Prolin zerstört, führt dies ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition der PHF-Bildung. Also sollte nach den Ergebnissen der Prolin-Mutanten und auch der Mutante K19-R3* ein ΔK280-PHF6* Motiv alleine für eine PHF-Bildung ausreichen. In dem Konstrukt K18-ΔK280-ΔR3 ist demnach die

Änderung der Repeat-Reihenfolge für die verminderte Neigung zur PHF-Polymerisation verantwortlich.

Durch beide Mutationen erfolgt ein drastischer Eingriff in die Fähigkeit zur PHF-Polymerisation, wie sich auch in der Ausbildung überwiegend gerader Filamenten von K18-ΔK280-ΔR3 und K19-R3* zeigt (Abbildung 19). Obwohl zumindest für die K19-R3* Mutante die Änderung des Proteins nicht sehr weitreichend ist. Zudem ist in Abwesenheit von Polyanionen zwar eine Aggregation anhand von ThS-Fluoreszenz meßbar, aber die gebildeten Aggregate sind amorph und zeigen keinerlei Filamentstruktur. Im Kontext mit der nicht meßbaren Verzögerungsphase aller Mutanten, die das ΔK280-PHF6* Motiv tragen (K18-ΔK280, K18-ΔK280-ΔR3, K19-R3*), läßt sich die Wirkung dieser Mutation auf eine beschleunigte und erleichterte Bildung eines Nukleus zurückführen.

Im Fazit unterstützen diese Ergebnisse das Modell der beschleunigten PHF-Polymerisation durch eine erhöhte Neigung zur β-Faltblatt-Bildung bei der ΔK280 Mutation (Abbildung 36). Sie zeigen weiterhin, daß die Polymerisation von Tau zu PHFs nicht alleinig auf die Hexapeptide PHF6 und PHF6* begründet werden kann. Synthetische Peptide der PHF6 und PHF6* Motive (von Bergen *et al.* 2001) und ein Konstrukt bestehend aus 43 Aminosäuren (PHF43) des 3. Repeat mit geringen Anteilen des 1. und 4. Repeats (von Bergen *et al.* 2000) zeigen zwar eine schnelle Aggregation, bilden jedoch Konglomerate von kurzen fibrillären Fragmenten, bestenfalls dünne kurze Filamente. Das bedeutet, daß die PHF6 und PHF6* Motive zwar als Nuklei für die Polymerisation durch Induktion von β-Faltblatt fungieren, für die Ausbildung einer wirklichen PHF-Morphologie sind dagegen mindestens 3 oder 4 Repeats (Konstrukte K19 oder K18) in ihrer natürlichen Sequenzfolge notwendig.

Tabelle 9: Effekte der FTDP-17 Mutationen auf die Mikrotubuli-Assemblierung

Referenz	Tau-Isoform	FTDP-17 Mutation	Mikrotubuli-Assemblierung
(Hong *et al.* 1998)	hTau40 (4R,2I)	N279K	–
		P301L	↓↓
		V337M	↓
		R406W	↓↓↓
(Hasegawa *et al.* 1998)	hTau34 (4R, 1I)	G272V	↓↓
		P301L	↓↓↓
		V337M	↓↓
		R406W	↓
	hTau37 (3R, 1I)	G272V	↓↓
		V337M	↓↓
		R406W	↓↓
(Hasegawa *et al.* 1999)	hTau34 (4R,1I)	N279K	–
		P301L	↓↓↓
		S305N	↑
(Rizzu *et al.* 1999)	hTau34 (4R,1I)	ΔK280	↓↓↓
		P301L	↓↓↓
(D'Souza *et al.* 1999)	hTau40 (4R,2I)	N279K	–
		ΔK280	↓↓
		P301L	↓↓
		S305N	–
(DeTure *et al.* 2000)	hTau40 (4R,2I)	P301L	↓
		V337M	↓
		R406W	↓
(Barghorn *et al.* 2000)	hTau40 (4R,2I)	G272V	↓
		N279K	↓
		ΔK280	↓
		P301L	↓
		V337M	↓
		R406W	↓

Die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten zu dem Einfluß der FTDP-17 Mutationen auf die Assemblierung von Mikrotubuli wurden durch ein einheitliches Bewertungssystem zusammengefaßt. Im Vergleich zum Wild-Typ bedeutet: ↑ = verstärkt unterstützende Wirkung von FTDP-17 Tau auf die Mikrotubuli-Assemblierung; – = kein Effekt; ↓ bis ↓↓↓ = zunehmend vermindert unterstützende Wirkung von FTDP-17 Tau auf Mikrotubuli-Assemblierung. Zu den verwendeten Tau-Isoformen (siehe auch Abbildung 1c) ist in Klammern die Anzahl der Repeats (3R = 3-Repeat-Isoform und 4R = 4-Repeat-Isoform) und die Anzahl der N-terminalen Einschübe (1I = 1 N-terminalen Einschub und 2I = 2 N-terminale Einschübe) angegeben.

Tabelle 10: Effekte der FTDP-17 Mutationen auf die Aggregation zu PHFs

Referenz	Tau-Isoform / Konstrukt	FTDP-17 Mutation	Filament-Aggregation	Filament-Quantifizierung	Filament-Morphologie (PHF / gerade Filamente)	Sekundärstruktur	
						lösliches Protein	Protein in Filamenten
(Nacharaju *et al.* 1999)	hTau40 (4R,2I)	P301L V337M R406W	↑↑ – ↑↑↑	EM	n.u.	n.u.	n.u.
(Goedert *et al.* 1999a)	hTau34 (4R, 1I)	G272V ΔK280 P301L P301S S305N V337M R406W	↑ – ↑↑ ↑↑ – – –	EM	gerade	Zufallsknäuel (CD-Spektr.)	n.u.
	hTau37 (3R, 1I)	G272V V337M R406W	↑ ↑ –	EM	PHF	n.u.	n.u.
(Jicha *et al.* 1999)	His-Tag hTau40 (4R,2I)	G272V P301L V337M R406W	n.u.	n.u.	n.u.	α-Helix (CD-Spektr.)	n.u.
(Arrasate *et al.* 1999)	Peptid aus R1	G272V	–	SDS-PAGE	n.u.	n.u.	n.u.
	Peptid aus R2	P301L	↑↑↑	SDS-PAGE	n.u.	n.u.	n.u.
(Gamblin *et al.* 2000)	His-Tag hTau40 (4R,2I)	G272V P301L V337M R406W	– ↑↑↑ ↑↑ ↑↑↑	Laser-Licht-streuung	n.u.	n.u.	n.u.
diese Arbeit (Barghorn *et al.* 2000; von Bergen *et al.* 2001)	hTau40 (4R,2I)	G272V N279K ΔK280 P301L V337M R406W	↑ ↑ ↑↑↑ ↑↑↑ ↑ ↑	ThS-Fluoreszenz Assay	PHF gerade PHF PHF gerade gerade	Zufallsknäuel (CD-Spektr.)	n.u.
	K18-Konstrukt (R1-R4)	G272V N279K ΔK280 P301L V337M	– ↓ ↑↑↑ ↑↑↑ –	ThS-Fluoreszenz Assay	PHF PHF PHF gerade PHF	Zufallsknäuel (FTIR-Spektr.)	ß-Faltblatt (FTIR-Spektr.)

Die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten zu dem Einfluß der FTDP-17 Mutationen auf die Aggregation von Tau zu Filamenten wurden durch ein einheitliches Bewertungssystem zusammengefaßt. Im Vergleich zum Wild-Typ bedeutet: ↓ = verminderte Aggregation von FTDP-17 Tau zu Filamenten; – = kein Effekt, ↑ bis ↑↑↑ = zunehmende Aggregation von FTDP-17 Tau zu Filamenten. Zu den verwendeten Tau-Isoformen (siehe auch Abbildung 1c) ist in Klammern die Anzahl der Repeats (3R = 3-Repeat-Isoform und 4R = 4-Repeat-Isoform) und die Anzahl der N-terminalen Einschübe (1I = 1 N-terminalen Einschub und 2I = 2 N-terminale Einschübe) angegeben Die Tau-Konstrukte sind anhand ihrer Zusammensetzung nach der Domänen-Einteilung (R1 - R4 = 1.Repeat bis 4. Repeat, siehe auch Abbildung 1d) zusätzlich in Klammern bezeichnet.

1.5 FTDP-17 Mutationen: Pathogene Wirkung, Stand der Forschung und Aussichten

Die Mutationen im Tau-Gen bei den FTDP-17 Erkrankungen, die gekennzeichnet sind durch eine Tau-Pathologie in Form der NFTs, bei denen aber β-Amyloid-Peptid Ablagerungen abwesend sind, liefern einen eindeutigen Beweis, daß Tau-Abnormalitäten allein ausreichend sind für eine neurodegenerative Erkrankung des Gehirns (Poorkaj *et al.* 1998; Hutton *et al.* 1998; Spillantini *et al.* 1998c). Ein Verständnis der Mechanismen durch die FTDP-17 Tau-Protein pathogen wirkt, ließe sich auf andere Tauopathien – einschließlich der Alzheimer-Krankheit – übertragen. Die FTDP-17 Mutationen wirken auf verschiedene Weise. Es konnte gezeigt werden, daß das FTDP-17 Tau-Protein in seiner natürlichen Funktion – der Bindung an Mikrotubuli – geschwächt ist (zur Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tabelle 9, (Hong *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1998; Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; Bugiani *et al.* 1999; Rizzu *et al.* 1999; Barghorn *et al.* 2000)). Durch intronische Mutationen und einige exonische Mutationen (N279K, L284L, S305N und S305S) kommt es weiterhin zu einer vermehrten Expression von 4-Repeat Tau-Isoformen. Die ΔK280 Mutation führt dagegen zu vermehrt 3-Repeat Tau-Isoformen (zur Zusammenfassung der Effekte siehe Tabelle 1, (Hutton *et al.* 1998; Hong *et al.* 1998; Varani *et al.* 1999; Spillantini *et al.* 1998c; Hasegawa *et al.* 1999; D'Souza *et al.* 1999; Grover *et al.* 1999; D'Souza und Schellenberg 2000; Gao *et al.* 2000)). Und schließlich führen einige der FTDP-17 Mutationen sowie in dieser Arbeit gezeigt, insbesondere die Mutationen ΔK280 und P301L, zu einer Zunahme des toxischen Effekts, indem sie schneller in die unlösliche Form der PHFs aggregieren (zur Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tabelle 10, (Arrasate *et al.* 1999; Nacharaju *et al.* 1999; Goedert *et al.* 1999a; Barghorn *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000)).

Diese Ergebnisse liefern keinen eindeutigen Hinweis auf einen gemeinsamen pathogenen Mechanismus der FTDP-17 Mutationen. Die Interpretation wird durch weitere Tatsachen noch erschwert. Die Bindung der FTDP-17 Tau-Mutanten an Mikrotubuli ist zwar schwächer, doch ob dieser Effekt für eine pathogene Wirkung alleine ausreicht ist aus folgenden Gründen ungewiß: (1) Die FTDP-17 Mutationen

werden autosomal dominant vererbt. Ein Tau-Allel ist also nicht betroffen und das resultierende, nicht mutierte Tau-Protein kann seine normale Funktion ausüben. (2) Die gesamte Menge an mutiertem Tau-Protein ist bei Mutationen innerhalb des 2. Repeats weiter verringert. Nur 4-Repeat Tau-Isoformen und nicht 3- Repeat Tau-Isoformen sind bei diesen Mutationen betroffen. (3) Ein verändertes Verhalten beim Spleißen führt bei einigen exonischen FTDP-17 Mutationen (N279K, L284L, S305N und S305S) zu einer gleichzeitigen Zunahme an 4-Repeat Tau-Isoformen. Dies würde einer verminderten Bindung an Mikrotubuli entgegenwirken, da 4-Repeat Tau-Isoformen um fast eine Größenordnung stärker an Mikrotubuli binden als 3-Repeat Tau-Isoformen (Gustke *et al.* 1994; Ackmann *et al.* 2000). Im Hinblick auf den letzten Punkt ist auch die Wirkung der intronischen Mutationen unklar, da diese ebenfalls zu einer vermehrten Expression von 4-Repeat Tau-Isoformen führen.

Eine wahrscheinlichere Annahme für die pathogene Wirkung der FTDP-17 Mutationen wäre, daß mutiertes Tau-Protein eher zu PHFs polymerisiert. Für die Mutationen ΔK280 und P301L konnte dieser Effekt besonders deutlich belegt werden und durch eine erhöhte Tendenz zur Ausbildung von β-Faltblattstrukturen auf molekularer Basis begründet werden. Bei der ΔK280 Mutation ist die Konzentration von mutiertem Tau-Protein im Gehirn durch den gleichzeitigen Effekt auf das alternative Spleißen (überwiegende Expression von 3-Repeat Tau-Isoformen) möglicherweise gering. Durch die potente Fähigkeit zur Aggregation dieser Mutante würde eine Bildung von Nukleationkeimen hingegen bereits ausreichen, um eine Aggregation von nicht-mutiertem Tau-Protein zu induzieren, zu fördern (Friedhoff *et al.* 1998b). Wenn die Polymerisation von Tau toxisch für Neuronen ist, so würde sich für die FTDP-17 Tau-Mutationen eine Zunahme des toxischen Effekts ergeben.

Inwieweit die Mutationen – insbesondere solche, die das alternative Spleißen beeinflussen – einen Einfluß auf die Konzentration an Tau-Protein insgesamt in den Zellen haben, ist unklar. Eine allgemeine Überexpression von Tau würde aber, durch eine mögliche Inhibition von Transportprozessen, für den Zelltod ein wichtiger Faktor sein (Ebneth *et al.* 1998). Wie diese unterschiedlichen pathogenen Mechanismen zu gewichten sind und wie sie zusammenspielen, bleibt noch zu klären.

Im Bereich der Forschung mit transgenen Mäusen haben die FTDP-17 Mutationen bereits zu einem enormen Durchbruch geführt (zur Übersicht siehe (Gotz 2001)). Im Gegensatz zu bisherigen transgenen Mäusen, die Wild-Typ Tau-Protein exprimieren (Gotz *et al.* 1995; Brion *et al.* 1999), konnte eine Tau-Pathologie durch die Verwendung von exprimiertem FTDP-17 Tau-Protein erreicht werden (Lewis *et al.* 2000; Gotz *et al.* 2001c; Gotz *et al.* 2001a).

Anhand einer transgenen Maus-Linie, welche die FTDP-17 Mutation P301L im Tau-Gen trägt, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß Verhaltenstörungen und motorische Defizite direkt verknüpft waren mit einer Alters- und Gen-Dosis abhängigen Entwicklung von neurofibrillären Bündeln (Lewis *et al.* 2000). In einer neueren Studie wurde diese P301L-Maus gekreuzt mit einer Maus, die eine mutierte Form des APP (*β-amyloid precursor protein*, das Vorläufer-Protein für die Amyloid-Plaques) exprimiert. Die zusätzliche APP-Expression führte zu einer verstärkten Tau-Pathologie im Vergleich zur transgenen Maus mit P301L Tau alleine. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie, bei der β-Amyloid-Filamente direkt ins Gehirn einer transgenen P301L Tau-Maus injiziert wurden (Gotz *et al.* 2001b). Mit diesen Experimenten ist zum ersten Mal ein Ansatz zur Lösung der Frage gelungen, ob neurofibrilläre Bündel aus Tau-Protein oder Amyloid-Plaques aus β-Amyloid-Peptid letztlich das Absterben von Neuronen bei der Alzheimer-Krankheit bewirken. Es ist unklar, ob eine der beiden Ablagerungen zuerst auftritt und daher möglicherweise die wichtigere Rolle spielt oder ob es ein Zusammenspiel beider Ablagerungen ist.

Es muß jedoch betont werden, daß diese transgenen Mäuse nicht die wirkliche Situation widerspiegeln. Transgene Mäuse, die alleinig APP mit einer familiären Alzheimer-Krankheit-Mutation exprimieren, entwickeln keine Tau-Pathologie (Games *et al.* 1995; Hsiao *et al.* 1996). Ebenso zeigen doppel-transgene Mäuse mit APP und Wild-Typ Tau keine typischen Symptome der Alzheimer-Krankheit mit Amyloid-Plaques und sie umgebenden Zellen mit neurofibrillären Bündeln (Duff *et al.* 2000). Nur die Verwendung von FTDP-17 Tau-Protein führt alleine oder in Kombination mit exprimiertem APP zu einer ähnlichen Pathologie wie bei der Alzheimer-Krankheit. Die Bedeutung der FTDP-17 Mutationen wurde auch in transgenen Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) gezeigt. Expression von humanem FTDP-17 Tau-Protein

führte zu einer verkürzten Lebensdauer der Fruchtfliegen, obwohl im Gehirn keine typische Tau-Pathologie nachgewiesen werden konnte (Wittmann *et al.* 2001).

In dieser Arbeit wurde dazu beigetragen eine der Grundlagen zu schaffen, die für das Verständnis der Wirkung der FTDP-17 Mutationen und der daraus hervorgegangenen weiteren Anwendung in Tiermodellen für die Alzheimer-Krankheit und anderen Tauopathien wichtig sind. Es konnte gezeigt werden, daß die untersuchten FTDP-17 Mutationen, insbesondere ΔK280 und P301L, eine erhöhte Tendenz zur PHF-Aggregation besitzen. Trotz der Tatsache, daß Protein mit der ΔK280-Mutation durch die präferentielle Bildung von 3-Repeat Tau-Protein während des m-RNA Spleißens in der Zelle höchstwahrscheinlich nur in geringen Konzentrationen vorkommt, könnte die stark erhöhte Neigung zur Aggregation bereits ausreichen, eine Tau-Aggregation zu induzieren und die Demenz hervorzurufen. Mit dem Modell einer verstärkten Tendenz zur Ausbildung von β-Faltblatt konnte ein wichtiger Teil des pathogenen Mechanismus der Tau-Aggregation aufgeklärt werden. Insbesondere mit der ΔK280 Mutante bieten sich durch die bereitwillige Bildung von PHFs auch ohne Polyanionen Untersuchungen zur Struktur der PHFs und Zell- und Tiermodelle an. Außerdem könnte diese Mutante auf Grund ihrer schnellen Polymerisation auch ohne Polyanionen idealerweise bei einer Suche nach Inhibitoren für die PHF-Aggregation genutzt werden.

2 Aggregation von Tau zu PHFs unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen

Oxidativer Streß wird vielfach mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht (zur Übersicht siehe (Benzi und Moretti 1995; Markesbery und Carney 1999; Varadarajan *et al.* 2000)). Die normalerweise reduzierenden Bedingungen in gesunden Zellen sind gestört, eine erhöhte oxidierende Umgebung herrscht vor. Hierfür werden verschiedene Belege gefunden. So wird eine veränderte mitochondriale Aktivität beobachtet, verbunden mit einem veränderten Redox-Status (Shigenaga *et al.* 1994; Wolvetang *et al.* 1994). Es kommt zu einer Zunahme der Oxidation von Proteinen (Smith *et al.* 1991; Lyras *et al.* 1997) und DNA (Lyras *et al.* 1997; Markesbery und Carney 1999). Weiterhin sinkt die Konzentration an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Nitsch *et al.* 1992; Svennerholm und Gottfries 1994; Prasad *et al.* 1998) bei gleichzeitiger Zunahme der Lipid-Peroxidation (Lovell *et al.* 1995; Marcus *et al.* 1998). Es treten AGEs (*advanced glycation endproducts*) auf, die als Endprodukt aus einer nicht enzymatischen Glykierung von Proteinen (auch zum Beispiel mit den PHFs) und nachfolgender Radikalbildung entstehen (Vitek *et al.* 1994; Smith *et al.* 1994; Ledesma *et al.* 1994). Außerdem kann es durch Amyloid-Plaques zu einer Produktion von Wasserstoffperoxid kommen (Behl *et al.* 1994). Eine vermehrt oxidierende Umgebung ist aber nicht nur mit Krankheiten verbunden, sondern läßt sich auch in alternden Gehirnen als „normale“ Begleiterscheinung feststellen. In Gehirnen älterer Menschen sind circa 40 - 50 % der Proteine oxidativ geschädigt (zur Übersicht siehe (Stadtman 1992; Ames *et al.* 1993; Shigenaga *et al.* 1994)).

Ein Zusammenhang von oxidativem Stress und der Aggregation des Tau-Proteins zu PHFs der Alzheimer-Krankheit konnte durch Experimente *in vitro* gezeigt werden. Das Tau-Protein besitzt zwei Cysteine. In 3-Repeat Isoformen kommt nur das $Cystein_{322}$ im 3. Repeat vor, bei 4-Repeat Isoformen zusätzlich das $Cystein_{291}$ im 2. Repeat (Abbildung 1d). Oxidierende Bedingungen ermöglichen durch Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke eine Dimerisierung des Tau-Proteins. Diese Dimerisierung ist nach Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe der erste und essentielle Schritt der Aggregation des Tau-Proteins zu PHFs (Schweers *et al.* 1995; Friedhoff

et al. 1998b). Es werden jedoch auch in gesunden Menschen in jungen Jahren im geringen Ausmaß PHFs gefunden. Ob erhöhte oxidierende Verhältnisse in diesen einzelnen betroffenen Zellen für die Aggregation verantwortlich sind oder ob die Aggregation unter physiologisch reduzierenden Bedingungen erfolgt, läßt sich *in vivo* nicht nachweisen. Mit der Frage der Abhängigkeit der PHF-Aggregation vom Redox-Status des umgebenden Milieus hat sich diese Arbeit weiterführend beschäftigt.

2.1 Die Rolle der Dimerisierung bei der PHF-Aggregation

Zur Zeit gibt es zwei kontroverse Theorien über die Rolle der Dimerisierung über eine Disulfidbrücke und des Redox-Status bei der Polymerisation von Tau-Protein zu PHFs. Die Arbeitsgruppe um L. Binder erzielt eine Polymerisation von Tau-Isoformen zu Filamenten unter reduzierenden Bedingungen. Daher messen sie einer möglichen Dimerisierung über Disulfidbrücken unter oxidierenden Bedingungen keine Bedeutung für die Polymerisation bei. Für die Polymerisation verwenden sie einen Puffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.6) der als Reduktionsmittel 5 mM DTT enthält. Die Polymerisation wird durch die Gegenwart von Arachidonsäure gefördert (Wilson und Binder 1995; Wilson und Binder 1997; King *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Gamblin *et al.* 2000; Abraha *et al.* 2000).

Im Gegensatz dazu konnte unsere Arbeitsgruppe eine Abhängigkeit der PHF-Bildung von einer Dimerisierung über Disulfidbrücken in einem oxidativen Schritt zeigen. In einer Arbeit wurde die Polymerisation von Tau-Konstrukten der Repeat-Region, in Abwesenheit von polymerisationsfördernden Agenzien untersucht. Der Puffer (200 mM Tris, 200 mM NaAc, pH 6.8) für die Polymerisation enthielt keine Reduktionsmittel (Schweers *et al.* 1995). Auch in Gegenwart des polymerisationsfördernden Heparins (Puffer: 20 mM MOPS, pH 7.0, kein Reduktionsmittel) war die PHF-Bildung Oxidations-abhängig (Friedhoff *et al.* 1998b). Eine Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen der verschiedenen Arbeiten, inklusive dieser, ist der Tabelle 11 zu entnehmen.

2.2 Polymerisation von Tau zu PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen

Wie bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b), haben Reduktionsmittel auf die Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Konstrukten zu PHFs einen unterschiedlichen Einfluß. Schweers *et al.* (Schweers *et al.* 1995) konnte in Abwesenheit von Polyanionen zeigen, daß die Bildung von PHFs bei 3-Repeat Konstrukten unter reduzierenden Bedingungen verlangsamt oder sogar vollständig inhibiert ist. Denselben Effekt zeigten Mutanten mit dem Austausch des einzigen Cysteins gegen Alanin. In dieser Arbeit wurde die Polymerisation von Tau zu PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen untersucht.

2.2.1 Polymerisation von Wild-Typ 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs

Die Ergebnisse von Schweers *et al.* für eine Polymerisation in Abwesenheit von Polyanionen konnten in dieser Arbeit für eine PHF-Polymerisation des Wild-Typ 3-Repeat Konstrukts K19 in Gegenwart des Polyanions Heparin bestätigt werden (Zusammenfassung der Polymerisationsbedingungen siehe Tabelle 11). Unter reduzierenden Bedingungen fand eine kaum meßbare PHF-Polymerisation statt. Erst mit einer fortschreitenden Abnahme der reduktiven Kraft konnte eine Polymerisation beobachtet werden. Unter oxidierenden Bedingungen war die Verzögerungsphase bis zur einsetzenden Polymerisation signifikant kürzer (Abbildung 23). Ebenso in Einklang mit Schweers *et al.* konnte bei dem 4-Repeat Konstrukt K18 unter oxidierenden Bedingungen eine verminderte PHF-Bildung durch die Ausbildung eines „kompakten Monomers“ über intramolekulare Disulfidbrücken nachvollzogen werden (Abbildung 2). Im Gegensatz zu Schweers *et al.* konnte die Bildung von PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin alleine durch reduzierende Bedingungen rekonstituiert werden. Der Austausch eines Cysteins war nicht nötig, um die Ausbildung des „kompakten Monomers“ zu verhindern.

Die Ergebnisse für die Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart des Polyanions Heparin wurden in einem Modell zusammengefaßt (Abbildung 38). Nachfolgend wird dieses Modell durch die Diskussion weiterer Experimente gestützt und erklärt. Nach dem Modell halten reduzierende Bedingungen 4-Repeat Tau in der Konformation eines „offenen Monomers“, der für die Polymerisation zu PHFs in Gegenwart von Polyanionen kompetent ist. Reduzierende Bedingungen verhindern in diesem Fall nicht die Polymerisation wie bisher angenommen. Bei 3-Repeat Tau kann es unter oxidierenden Bedingungen durch ein einzelnes Cystein im Molekül nicht zur Ausbildung eines „kompakten Monomers“ kommen, der die PHF-Polymerisation inhibiert. Eine Oxidations-vermittelte Dimerisierung beschleunigt die PHF-Bildung in An- und Abwesenheit von Polyanionen.

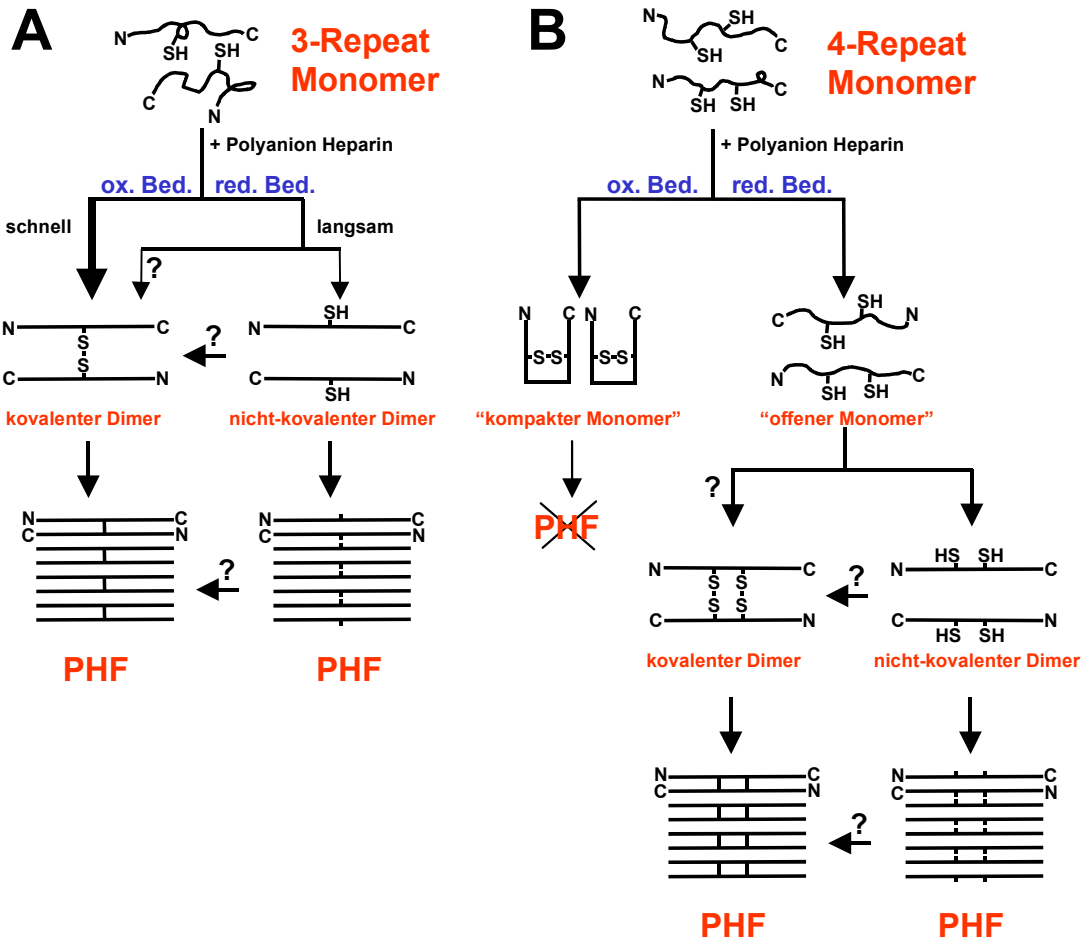

Abbildung 38: Modell der Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart des Polyanions Heparin.
(A): Bei 3-Repeat Tau ist die Ausbildung von kovalenten Dimeren über eine Disulfidbrücke unter oxidierenden Bedingungen begünstigt. Die PHF-Polymerisation ist beschleunigt. Unter reduzierenden Bedingungen bilden sich langsamer nicht-kovalente Dimere, die fortschreitend zu PHFs polymerisieren können.
(B): Bei 4-Repeat Tau bilden sich unter oxidierenden Bedingungen „kompakte Monomere", die nicht weiter zu PHFs polymerisieren. Unter reduzierenden Bedingungen wird das Tau-Molekül in der Konformation des „offenen Monomers" gehalten. Es können sich nicht-kovalente Dimere bilden, die fortschreitend zu PHFs polymerisieren.
(A, B): Unter reduzierenden Bedingungen können möglicherweise auch direkt kovalente Dimere gebildet werden. Nicht-kovalente Dimere oder bereits polymerisierte Strukturen könnten auch nachträglich in solche überführt werden und die Strukturen stabilisieren. Solche möglichen, aber nicht gesicherten Reaktionswege sind durch Fragezeichen gekennzeichnet.

2.2.2 Polymerisation von 4-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs

Für den Wild-Typ des 4-Repeat Konstrukts K18 konnte gezeigt werden, daß reduzierende Bedingungen die Bildung eines „kompakten Monomers" verhindern und

somit auf die PHF-Polymerisation in Gegenwart von Polyanionen förderlich wirken. Daß die PHF-Polymerisation in Gegenwart des Polyanions Heparin unter reduzierenden Bedingungen unabhängig von einer Dimerisierung über Disulfidbrücken ist, wird dadurch aber nicht direkt gezeigt. Dies konnte erst durch die Experimente der doppel-Cystein-Mutanten des Konstrukts K18 gezeigt werden. Die Mutante mit dem Austausch beider Cysteine sollte durch eine nicht mehr mögliche Dimerisierung über eine Disulfidbrücke nach den Schlußfolgerungen von Schweers *et al.* und Friedhoff *et al.* nicht in der Lage sein, PHFs zu bilden. Für eine Polymerisation in Gegenwart von Polyanionen kann dies nicht bestätigt werden, da die Mutante K18-C291A-C322A unter diesen reduzierenden Bedingungen sogar schneller zu PHFs polymerisierte als der Wild-Typ (Abbildung 25). Dadurch wird das aufgestellte Modell zur Polymerisation von Tau in dem Punkt der Polymerisation von 4-Repeat Wild-Typ Tau unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 38) gestützt.

2.2.3 Polymerisation von 3-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs

In den Experimenten mit dem Wild-Typ des 3-Repeat Konstrukts K19 hatte sich eine von den reduzierenden Bedingungen negativ-abhängige Bildung von PHFs gezeigt. Oxidierende Bedingungen förderten durch die Bildung eines kovalenten Dimers über eine Disulfidbrücke die Polymerisation in Gegenwart des Polyanions Heparin. Schweers *et al.* untersuchten in Abwesenheit von Polyanionen und Friedhoff *et al.* in Gegenwart des Polyanions Heparin die PHF-Polymerisation des 3 Repeat-Konstrukt K12. Dieses Konstrukt trägt im Vergleich zu K19 zusätzlich C-terminal eine als Pseudo-Repeat bezeichnete Sequenz (Abbildung 20). Sie stellten eine völlige Inhibition der PHF-Bildung unter reduzierenden Bedingungen oder bei Austausch des Cysteins gegen Alanin (K12-C322A) fest (Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b). Dem steht die bereitwillige Polymerisation der Mutante K19-C322A zu PHFs in dieser Arbeit gegenüber (Abbildung 26). Das aufgestellte Modell zur Polymerisation von PHFs (Abbildung 38) wird dadurch in einem weiteren Punkt gestützt. Analog zu den Ergebnissen der 4-Repeat Cystein-Mutanten ist eine PHF-Polymerisation auch unter

reduzierenden Bedingungen möglich. Die Ausbildung eines Dimers auf der Basis einer Disulfidbrücke ist keine Bedingung für die PHF-Bildung.

2.2.4 Einfluß des Puffers auf die Polymerisation von 3-Repeat Cystein-Mutanten zu PHFs

Es stellte sich die Frage, ob für die Ergebnisse von Schweers *et al.* und Friedhoff *et al.* die verwendeten Puffer-Bedingungen und Konstrukte verantwortlich waren. Wurden die Experimente mit dem Wild-Typ von K19 und der Mutante K19-C322A unter den Pufferbedingungen von Friedhoff *et al.* durchgeführt (siehe Tabelle 11), bildeten sich ebenfalls bereitwillig PHFs bei der Cystein-Mutante (Abbildung 27). Auch bei der Verwendung des Konstrukts K12, unter denselben Bedingungen für die Polymerisation wie bei Friedhoff *et al.*, konnte eine PHF-Polymerisation in Gegenwart von Polyanionen beobachtet werden (Abbildung 28). Die Polymerisation des Konstrukts K12 war insgesamt langsamer als bei K19. Insbesondere wurde jedoch bei der K12-C322A Mutante im Vergleich zur K19-C322A Mutante eine extrem verlängerte Nukleationsphase beobachtet und die gebildeten Filamente hatten nicht einheitlich ein paariges helikales Erscheinungsbild (Abbildung 29).

2.2.5 Die Dimerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau zu PHFs

Es wurde gezeigt, daß der Dimer über eine Disulfidbrücke nicht essentiell für eine Polymerisation ist. Gleichzeitig führt eine ermöglichte Dimerisierung des 3-Repeat Konstrukts K19 zu einer beschleunigten Polymerisation. Für das 4-Repeat Konstrukt K18 kann über die Geschwindigkeit der Polymerisation von Dimeren der Mutanten mit einem mutiertem Cystein (C291A oder C322A) keine Aussage gemacht werden. Die Polymerisations-Ansätze wurden aus den beschriebenen Gründen (siehe oben) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Dieser Zusammenhang wurde jedoch in einer vor kurzem veröffentlichten Studie (Bhattacharya *et al.* 2001) anhand von Cystein-Mutanten der kürzesten 4-Repeat Tau-Isoform hTau24 (ohne N-terminale Einschübe, siehe Abbildung 1) untersucht. Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit mit den 3-Repeat Tau-Konstrukten konnte auch für die 4-Repeat Tau-Isoform gezeigt werden, daß eine Dimerisierung die Polymerisation von Tau zu PHFs in Gegenwart des Polyanions Heparin beschleunigt. Die Mutanten mit einem mutierten Cystein (C291A oder C322A) zeigten ohne Reduktionsmittel eine unvermittelte Dimerisierung und Polymerisation. Mit steigender Konzentration des Reduktionsmittels nahm die Polymerisations-Geschwindigkeit ab (Bhattacharya *et al.* 2001). Der Dimer über eine Disulfidbrücke ist also unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Polyanions Heparin der wesentliche, geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Tau-Polymerisation.

2.2.6 Nachweis von nicht-kovalent verbundenen Dimeren bei den Tau-Mutanten ohne Cysteine

Wenn die Dimerisierung der wesentliche und geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Tau-Polymerisation ist, wie polymerisieren dann die Mutanten, bei denen die vorhandenen Cysteine gegen Alanine ausgetauscht wurden? Gibt es auch hier Dimere? Mittels einer blau-nativen-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Cystein-Mutanten konnten solche nicht-kovalent verbundenen Dimere (nicht-kovalente Dimere) nachgewiesen werden. Unter diesen nicht-denaturierenden Bedingungen wurde für die 3-Repeat und 4-Repeat Mutanten ohne Cysteine (K19-C291A und K18-C291A-C322A) nach einer Inkubation ohne Polyanionen ein Anteil von circa 1 % beziehungsweise 2 % nicht-kovalenten Dimeren gefunden (Abbildung 35 und Tabelle 7).

Das aufgestellte Modell zur Polymerisation von PHFs kann in seinem letzten Punkt unterstützt werden. Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken (bei 3-Repeat und 4-Repeat Tau) unter der Bildung von kovalenten Dimeren beschleunigt die Polymerisation zu PHFs. Unter reduzierenden Bedingungen oder wie im Fall der Mutanten ohne Cysteine können in einem langsameren Prozeß Dimere gebildet werden,

die über nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind und in Gegenwart des Polyanions Heparin weiter zu PHFs polymerisieren.

Ein interessanter Aspekt ist die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Cystein-Mutanten polymerisierten. Zu Beginn der Polymerisation besaßen die einzel-Cystein-Mutanten (C291A und C322A) durch die reduzierenden Bedingungen einen monomeren Status (Abbildung 21). Eine Dimerisierung könnte erst mit fortschreitender Abnahme der reduktiven Kraft des Reduktionsmittels über die Zeit auftreten. Trotz des anfänglich monomeren Status bildete die K18-C322A Mutante schneller und zu einem höheren Ausmaß PHFs als die K18-C291A Mutante (Abbildung 25). Der Wild-Typ hatte im Vergleich dazu eine mittlere Geschwindigkeit. Eine Dimerisierung der Mutanten mit nur einem Cystein über eine Disulfidbrücke beschleunigt die PHF-Polymerisation (Bhattacharya *et al.* 2001). Es kann spekuliert werden, daß die Mutante K18-C322A über das verbleibende $Cystein_{291}$ trotz der reduzierenden Bedingungen in der Lage ist, effektiver eine Disulfidbrücke auszubilden als die Mutante K18-C291A über das $Cystein_{322}$.

Eine weitere Möglichkeit ist die vermehrte Bildung des nicht-kovalenten Dimers. Bei einer Inkubation ohne Polyanionen bildet die Mutante K18-C322A auch tatsächlich einen größeren Anteil an Dimeren als K18-C291A (Abbildung 35). Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, daß für den Unterschied in der Polymerisations-Geschwindigkeit eine unterschiedlich starke Tendenz zur Dimerisierung (über Disulfidbrücken oder nicht-kovalent) unter den reduzierenden Bedingungen verantwortlich ist. Ferner polymerisierten die 3-Repeat und 4-Repeat Mutanten ohne Cysteine schneller als der Wild-Typ. Die reduzierenden Bedingungen halten die Cysteine in ihrer reduzierten Form. Die Ausbildung des kovalenten Dimers aber möglicherweise auch die des nicht-kovalenten Dimers könnte sterisch erschwert sein. Werden die Cysteine gegen Alanine ausgetauscht, entfällt diese sterische Behinderung. Der nicht-kovalente Dimer kann ausgebildet werden, und die PHF-Polymerisation ist im Vergleich zum Wild-Typ sowie den Mutanten mit Austausch eines Cysteins beschleunigt.

2.3 Polymerisation von Tau zu PHFs in Abwesenheit des Polyanions Heparin unter reduzierenden Bedingungen

Eine Polymerisation von Tau zu PHFs unter den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (10 - 60 µM) und Puffer-Bedingungen (PBS, pH 7.4, 1 mM DTT; Gesamtionenstärke 150 mM) in Abwesenheit von Polyanionen war nur für die stark polymerisationsfördernde Mutante ΔK280 des 4-Repeat Konstrukts K18 zu beobachten. Schweers *et al.* untersuchte dagegen das 3-Repeat Konstrukt K12 ohne Cysteine (K12-C322A) unter extremen nicht-physiologischen Bedingungen (hohe Proteinkonzentrationen (360 µM) und hohe Salzkonzentrationen im Puffer (pH 6.8; Gesamtionenstärke 400 mM) siehe auch Tabelle 11). Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen von Schweers *et al.* für eine Polymerisation von Mutanten ohne Cysteine ist deshalb nur schwer möglich.

2.3.1 Polymerisation des Tau-Konstrukts K18-ΔK280 ohne Cysteine zu PHFs

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Mutante K18-ΔK280 mit Austausch beider Cysteine zu Alanin (K18-ΔK280-C291A-C322A) bildeten sich PHFs sowohl in Gegenwart (siehe Abbildung 32) als auch in Abwesenheit (siehe Abbildung 33) des Polyanions Heparin. Im Vergleich zur ΔK280 Mutation alleine war die Rate der Polymerisation jedoch bei der doppel-Cystein-Mutante in Abwesenheit von Heparin wesentlich geringer. Die Mutante K18-ΔK280-C291A-C322A bildet zwar nicht-kovalente Dimere (Abbildung 35), doch polymerisieren diese nur nach Zugabe von Polyanionen effektiv zu PHFs.

2.4 Die Funktion von Polyanionen und anderen polymerisationsfördernden Substanzen bei der PHF-Polymerisation

Die Polymerisation von Tau in Abhängigkeit vom Redox-Status wurde in Gegenwart und Abwesenheit des polymerisationsfördernden Polyanions Heparin untersucht. Welchen Einfluß Heparin auf die Bildung von PHFs hat, wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit und früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Schweers *et al.* 1995; Friedhoff *et al.* 1998b) in einem Modell zusammengefaßt (Abbildung 39). Polyanionen beschleunigen allgemein die Polymerisations-Geschwindigkeit (Kampers *et al.* 1996; Goedert *et al.* 1996). Sie wirken dabei nicht direkt auf die Geschwindigkeit der Dimerisierung sondern auf die Elongation der PHFs und in besonders starkem Maße auf die vorausgehende Bildung von Nuklei. Indirekt verlagern sie das Reaktionsgleichgewicht von Monomer und Dimer zum Produkt hin – nämlich dem Dimer – der den Grundbaustein für die PHFs darstellt (Friedhoff *et al.* 1998b). Daher ist das Ausmaß an gebildeten Dimeren im Gleichgewicht letztendlich nicht entscheidend für die Masse an gebildeten PHFs. Auch ein geringer Anteil von nur 1 - 2 % nicht-kovalenten Dimeren im Gleichgewicht – wie bei den Mutanten ohne Cysteine – reicht aus, um PHFs in Gegenwart von Polyanionen in relativ kurzer Zeit und in großem Umfang zu bilden (Abbildung 39a). In Abwesenheit von Polyanionen entfällt die treibende Kraft der Polymerisation, die Reaktion ist im Allgemeinen langsamer. Unter reduzierenden Bedingungen oder bei den Mutanten ohne Cysteine könnte der wichtige Schritt der Nukleus-Bildung durch die fehlenden kovalenten Verknüpfungen des Dimers nicht stabil genug sein. Weiterhin könnte die kritische Konzentration an Dimeren in Abwesenheit von Polyanionen für eine Polymerisation nicht ausreichen.

Unter oxidierenden Bedingungen muß zwischen einer Polymerisation von 3-Repeat und 4-Repeat Tau unterschieden werden (Abbildung 39b). Bei 3-Repeat Tau wird durch die schnelle Dimerisierung über eine Disulfidbrücke in Gegenwart von Polyanionen die PHF-Polymerisation beschleunigt (diese Arbeit und (Friedhoff *et al.* 1998b)). In Abwesenheit von Polyanionen findet zwar eine Dimerisierung statt, die treibende Kraft der Polymerisation fehlt hingegen und die Bildung der PHFs ist stark verlangsamt (Schweers *et al.* 1995). Unter oxidierenden Bedingungen bildet 4-Repeat Tau über eine

intramolekulare Disulfidbrücke einen „kompakten Monomer“. Unabhängig von der Gegenwart von Polyanionen inhibiert diese Struktur von Tau größtenteils die Bildung von PHFs (diese Arbeit und (Schweers *et al.* 1995)).

Es bleibt zu untersuchen, ob eine Polymerisation zu PHFs unter reduzierenden Bedingungen oder von Mutanten ohne Cysteine auch mit Isoformen des Tau-Proteins in Gegenwart (oder Abwesenheit) von Polyanionen möglich ist. Die zusätzlichen N- und C-terminalen Bereiche könnten die PHF-Bildung unter reduzierenden Bedingungen verhindern. In dieser Arbeit zeigte bereits der C-terminale Pseudo-Repeat einen inhibitorischen Effekt auf die Nukleation (Abbildung 28), und bei der kürzesten Tau-Isoform hTau24 konnte mit einer Mutante ohne Cysteine gar keine PHF-Polymerisation festgestellt werden (Bhattacharya *et al.* 2001). Im Prinzip ist eine PHF-Polymerisation in Gegenwart des Polyanions Heparin ohne den Einfluß von Cysteinen möglich wie mit den 3-Repeat und 4-Repeat Konstrukten gezeigt werden konnte.

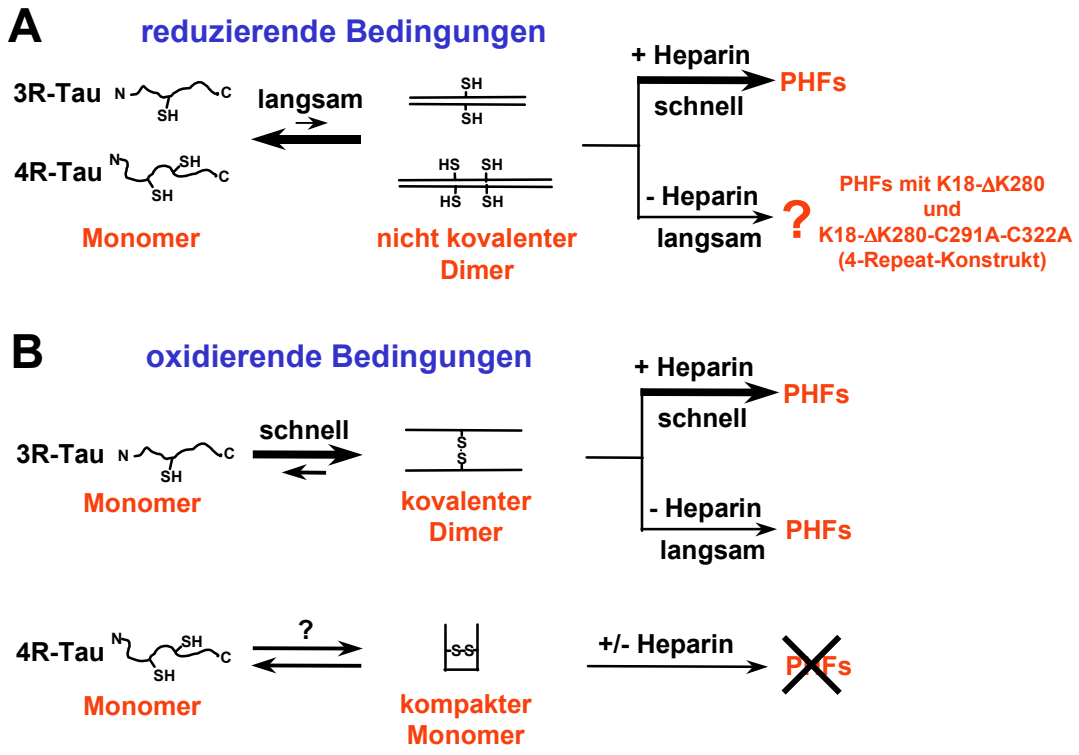

Abbildung 39: Modell des Einfluß von polymerisationsfördernden Substanzen wie Heparin auf die PHF-Polymerisation.
(A): Unter reduzierenden Bedingungen bilden 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Konstrukte in einem langsamen Prozeß über nicht-kovalente Wechselwirkungen Dimere. Unter dem Einfluß des Polyanions Heparin wird dieser geringe Anteil an Dimeren dem Reaktionsgleichgewicht entzogen durch die weiterführende Polymerisation zu PHFs. In Abwesenheit von Polyanionen konnte nur für die äußerst polymerisations-potente 4-Repeat FTDP-17 Mutante ΔK280 und deren Cystein-Mutante (K18-ΔK280-C291A-C322A) eine PHF-Bildung beobachtet werden.
(B): Unter oxidierenden Bedingungen bilden Monomere von 3-Repeat Tau-Konstrukten zu einem überwiegenden Anteil schnell über Disulfidbrücken kovalent verbundene Dimere. In Gegenwart von Heparin polymerisieren diese schnell zu PHFs. In Abwesenheit von Polyanionen konnte Schweers *et al.* (Schweers *et al.* 1995) eine PHF-Polymerisation nachweisen. 4-Repeat Tau-Konstrukte bilden unter oxidierenden Bedingungen über eine intramolekulare Disulfidbrücke zu einem unbestimmten Anteil einen „kompakten Monomer". Die PHF-Bildung wird durch diese Konformation größtenteils inhibiert.

2.4.1 PHF-Polmerisation in Gegenwart der polymerisationsfördernden Fettsäure Arachidonsäure

Exemplarisch wurde in dieser Arbeit auch die Polymerisation des 3-Repeat Tau-Konstrukts K19 unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart der polymerisationsfördernden Fettsäure Arachidonsäure untersucht. Die Arbeitsgruppe um

L. Binder geht von einer Polymerisation von Tau zu PHFs aus, die unabhängig von einer Dimerisierung über Disulfidbrücken ist. In diesem Punkt ist durch diese Arbeit eine Annäherung der zuvor kontroversen Ergebnisse erreicht worden. Auch unter den Bedingungen unserer Arbeitsgruppe kann eine Bildung von PHFs unabhängig von einer Dimerisierung über Disulfidbrücken festgestellt werden. Oxidierende Bedingungen fördern jedoch die Polymerisationsgeschwindigkeit.

Es bleibt der Unterschied in dem Erscheinungsbild der Filamente. Binder´s Arbeitsgruppe erhält nur gerade Filamente bei einer durch Arachidonsäure unterstützten Polymerisation. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Ausbildung gerader und paariger helikaler Filamente von der Art des verwendeten PHF-induzierenden Agenz abhängt. Polymerisierte der Wild-Typ von K19 sowie die Cystein-Mutante K19-C322A in einem parallelen Versuch in Gegenwart von Arachidonsäure oder Heparin, bildeten sich im Gegensatz zur Heparin-unterstützten Polymerisation beim Ansatz mit Arachidonsäure ausschließlich gerade Filamente (vergleiche Abbildung 29 und Abbildung 31). Daß sich mit diesem Konstrukt – das nur aus der Repeat-Region besteht – überhaupt Filamente bilden, spricht gegen die Beobachtung von King *et al.* (King *et al.* 2000). Unter Einfluß von Arachidonsäure stellen sie eine Filament-Bildung nur bei Tau-Isoformen fest, die mindestens einen N-terminalen Einschub besitzen. Daraus leiteten sie eine für die Polymerisation förderliche Wirkung des N-Terminus ab. Ob diese Ergebnisse mit anderen Konstrukten – und vor allem Tau-Isoformen – auch in unserem Labor nachvollzogen werden können, bleibt zu klären.

2.4.2 Vergleich der verschiedenen PHF-polymerisationsfördernden Substanzen und ihre mögliche Rolle bei der Alzheimer-Krankheit in vivo

Es ergibt sich die Frage, ob es grundlegende Unterschiede zwischen den PHF-polymerisationsfördernden Substanzen gibt. Warum werden mit Arachidonsäure im Gegensatz zu Heparin (und anderen Polyanionen) nur gerade Filamente gebildet? Und was ist die Grundlage für die Tatsache, daß in Gegenwart von Arachidonsäure die

Filament-Bildung von der Gegenwart mindestens eines N-terminalen Einschubs abhängt?

Heparin ist ein Glykosaminoglykan. Glykosaminoglykane sind lange, unverzweigte, hochgradig negativ geladene Heteropolysaccharide, die natürlicherweise als Bestandteil der extrazellulären Matrix vorkommen. Sie sind nicht frei beweglich, sondern zum Großteil an Proteine in der Zellmembran gekoppelt und bilden damit die Proteoglykane. Im Speziellen verhindert Heparin die Bildung von Blutgerinnseln nach Verletzungen und wird dazu von Mastzellen in das Blutserum freigesetzt.

Arachidonsäure ist eine C_{20}-Fettsäure, die 4-fach ungesättigt ist ($C_{20:4}$). Sie ist die wichtigste Vorstufe zur Synthese von Eicosanoidhormonen (Prostaglandine, Thomboxane und Leukotriene). Bei physiologischen pH-Werten liegt Arachidonsäure in seiner dissoziierten Form vor, ist also ebenfalls negativ geladen wie Heparin. Auf Grund seines amphipathischen Charakters bildet es ab einer Konzentration von circa 75 µM (King *et al.* 2000) im wässerigen Mileu Mizellen. Die Aggregation von Tau zu Filamenten ist bei einer Konzentration über dieser kritischen mizellären Konzentration (CMC = *critical micellar concentration*) stark erhöht (King *et al.* 2000). Die auf die Polymerisation förderliche Wirkung wird daher auf eine Interaktion von Tau mit der negativ geladenen Membranoberfläche der Arachidonsäure-Mizellen zurückgeführt. Andere für die Polymerisation förderliche Substanzen wie Poly-Glutaminsäure, Heparan-Sulfat und RNA (Kampers *et al.* 1996; Goedert *et al.* 1996) zeichnen sich ebenfalls durch ihren anionischen Charakter aus. Dabei hängt die beschleunigende Wirkung von unterschiedlichen Polysacchariden in ihrer Effizienz von der Länge und der Ladungsdichte ab (Hasegawa *et al.* 1997).

Ob alleine die mizelläre Struktur oder der amphipathische Charakter der Arachidonsäure zur Ausbildung ausschließlich gerader Tau-Filamenten führt – und das auch nur bei Tau-Isoformen mit mindestens einem N-terminalen Einschub – bleibt ungeklärt. Einzig die Förderung der Polymerisation von Tau läßt sich ziemlich sicher auf die gemeinsame anionische Eigenschaft aller dieser Substanzen zurückführen.

Eine wichtige Frage ist die Rolle, die diese Substanzen *in vivo* bei der Alzheimer-Krankheit einnehmen könnten. Glykosaminoglykane (zum Beispiel Heparin) kommen in der extrazellulären Matrix vor, andere negativ geladene Substanzen wie Fettsäuren (zum Beispiel Arachidonsäure), Ribonukleotide (zum Beispiel RNA) und Peptide (zum Beispiel Poly-Glutamin) kommen dagegen intrazellulär vor. Eine Interaktion von Tau mit den intrazellulär vorkommenden Substanzen scheint daher wahrscheinlicher als mit Heparin. So konnte in neurofibrillären Bündeln eine Anreicherung von RNA gefunden werden (Ginsberg *et al.* 1997). Außerdem interagiert Tau mit dem sauren C-Terminus von Tubulin (Schwab und McGeer 1998) und bildet zumindest amorphe Aggregate an Mikrotubuli (Ackmann *et al.* 2000).

Arachidonsäure ist zwar intrazellulär lokalisiert, aber als möglicher Interaktionspartner für die Polymerisation von Tau zu PHFs bei der Alzheimer-Krankheit und anderen Tauopathien aus den folgenden Gründen weniger wahrscheinlich: Unter Einfluß von Arachidonsäure werden nur gerade Filamente gebildet, und auch nur von Isoformen mit mindestens einem N-terminalen Einschub (King *et al.* 2000). Im Alzheimer-Gehirn finden sich aber überwiegend paarige helikale Filamente und weniger gerade Filamente, die zudem aus allen sechs Tau-Isoformen bestehen (Kidd 1963; Iqbal *et al.* 1984; Wischik *et al.* 1985; Greenberg und Davies 1990; Jakes *et al.* 1991; Goedert *et al.* 1992a).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Polymerisation von Wild-Typ Tau und deren Cystein-Mutanten unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen zu PHFs werden in Tabelle 11 mit den bisherigen Ergebnissen der Literatur nochmals zusammenfassend verglichen.

Im Fazit wurde in dieser Arbeit das grundlegende Verständnis zum prinzipiellen Mechanismus der Polymerisation von Tau-Protein zu PHFs in Abhängigkeit vom Redox-Status erweitert. Es wurde gezeigt, daß eine Polymerisation in Gegenwart des Polyanions Heparin auch unter reduzierenden Bedingungen erfolgen kann. Oxidierende Verhältnisse können einerseits die Polymerisation von 3-Repeat Tau beschleunigen, wirken hingegen auf die Polymerisation von 4-Repeat Tau inhibitorisch. Die Tatsache, daß auch in gesunden sowie jungen Menschen bereits vereinzelt Aggregate von Tau

gefunden werden, kann mit einer möglichen Polymerisation von Tau-Protein zu PHFs unter reduzierenden Bedingungen erklärt werden. Weiterhin wurde eine wichtige Annäherung an Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (L. Binder) erzielt.

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit zur Polymerisation von PHFs unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen mit der Literatur

	untersuchtes Protein	Puffer für Polymerisation	eingesetzte Proteinkon-zentration	PHF-induzierendes Agenz	PHFs mit wt-Tau unter red. Bed.	PHFs mit wt-Tau unter ox. Bed.	PHFs mit 3R-Tau C322A	PHFs mit 4R-Tau C291A-C322A	Besonder-heiten	Referenzen
Schweers *et al.*	Repeat-Konstrukte K12 (3R) K11 (4R)	200 mM Tris, 200 mM NaAc, pH 6.8	360 µM	ohne	– (3R, 4R)	+ (3R) – (4R-Inhib.)	–	n.u.	*hanging drop* Polymerisation	Schweers *et al.* 1995
Friedhoff *et al.*	Repeat-Konstrukt K12 (3R)	20 mM MOPS, pH 7.0	20-100 µM	Heparin	– (3R)	+ (3R)	–	n.u.	Elongation von Nuklei mit K12-C322A	Friedhoff *et al.* 1998
L. Binder-Gruppe	Tau-Isoformen (3R, 4R)	10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.6	4 µM	Arachidonsäure	+ (3R, 4R)	n.u.	n.u.	n.u.	Filamente nur bei Tau Isoformen mit mind. einem N-Term. Einschub	Wilson und Binder 1995, King *et al.* 1999, King *et al.* 2000
Bhattach-arya *et. al.*	hTau24 (4R)	20 mM MOPS pH 7.0	5 µM	Heparin	+ (4R)	– (4R-Inhib.)	n.u.	–	His-Tag-Protein	Bhattacharya *et al.* 2001
diese Arbeit	Repeat-Konstrukte K18 (4R), K19 (3R), K12 (3R)	PBS pH 7.4, +/- 1 mM DTT (K18, K19) und 20 mM MOPS pH 7.0 (K19, K12)	10-20 µM	Heparin (K18, K19, K12) und Arachidon-säure (K19)	+ (3R, 4R)	+ (3R) – (4R-Inhib.)	+ (K12, K19)	+ (K18 mit Heparin, K18-ΔK280 ohne Heparin)	K19wt, K19-C322A gerade Filamente mit Arachidonsäure	diese Arbeit, zum Teil in: Barghorn *et al.* 2000, von Bergen *et al.* 2001

3R = 3-Repeat-Tau; 4R = 4-Repeat-Tau; 4R-Inhib. = Inhibition der PHF-Polymerisation bei 4-Repeat-Tau durch Ausbildung eines "kompakten Monomers".
n.u. = nicht untersucht

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimer-Krankheit ist gekennzeichnet durch die Ablagerung von abnormal aggregierten Proteinen im Gehirn. Diese Ablagerungen bestehen im Falle der extrazellulären Amyloid-Plaques zum Großteil aus Filamenten des Aβ-Peptids und im Falle der intrazellulären neurofibrillären Bündel (NFTs, *neurofibrillary tangles*) aus dem Mikrotubulus-assoziierten Protein Tau. Für die familiäre Alzheimer-Krankheit werden Mutationen in verschiedenen Genen verantwortlich gemacht, die alle eine erhöhte Produktion des toxischen β-Amyloid-Peptids der Amyloid-Plaques zur Folge haben. Vor wenigen Jahren wurden bei einer Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die unter dem Namen Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17) zusammengefaßt werden, Mutationen im Tau-Gen entdeckt. Bei diesen Erkrankungen kommt es wie bei der Alzheimer-Krankheit zu der Aggregation des Proteins Tau in Form der NFTs. Es werden dagegen bei der FTDP-17 Erkrankung keine Ablagerungen von Amyloid-Plaques gefunden. Dies stellt einen eindeutigen Beweis dar, daß eine abnorme Aggregation des Tau-Proteins direkt mit einer neurodegenerativen Erkrankung in Zusammenhang steht.

In dieser Arbeit wurde die Aggregation von rekombinanten FTDP-17 Tau-Proteinen zu Filamenten mittels einer Fluoreszenz-basierten Methode in ihrer Geschwindigkeit und ihrem Ausmaß verfolgt. Es konnte gezeigt werden, daß einige FTDP-17 Mutationen, insbesondere die ΔK280 und P301L Mutation, im Vergleich zum Wild-Typ eine eindeutige Zunahme in ihrer toxischen Funktion – der Aggregation zu Filamenten – zeigen. Elektronenmikroskopisch wurde nachgewiesen, daß die gebildeten Filamente mit denen aus Alzheimer-Gehirnen isolierten in ihrem Erscheinungsbild vergleichbar sind. Spektroskopisch konnte nachgewiesen werden, daß die Aggregation von löslichem Tau-Protein zu Tau-Filamenten durch einen Übergang der Struktur eines ungeordneten Zufallsknäuels zu einer Gesamtstruktur mit einem erhöhten Anteil an β-Faltblatt gekennzeichnet ist. Die auf die Aggregation förderliche Wirkung der ΔK280 und P301L Mutation läßt sich auf eine gesteigerte Tendenz des mutierten Proteins zur Ausbildung von β-Faltblatt zurückführen.

In einem zweiten Teil wurde der Einfluß reduzierender und oxidierender Bedingungen auf die Aggregation des Tau-Proteins zu Filamenten untersucht. Dies ist von Bedeutung für die Alzheimer-Krankheit, da sie mit oxidativem Streß in Verbindung gebracht wird. Zu diesem Zweck wurden Tau-Konstrukte, die aus drei oder vier Repeats der Mikrotubulus-bindenden Domäne (Repeat-Region) bestanden, auf eine Aggregation zu Filamenten in Gegenwart des aggregationsfördernden Polyanions Heparin hin getestet. Die Repeat-Region bildet den Kern der Alzheimer-Filamente. Sie enthält zwei Cysteine, wobei in 4-Repeat Tau beide und in 3-Repeat Tau nur ein Cystein vorkommt.

Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten dahingehend bestätigt werden, daß unter oxidierenden Bedingungen eine Dimerisierung von 3-Repeat Tau-Konstrukten über die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke die Filament-Bildung beschleunigt. Unter denselben Bedingungen ist die Aggregation von 4-Repeat Tau durch die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke über die beiden Cysteine inhibiert.

Weitergehend konnte gezeigt werden, daß auch unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von Heparin eine Aggregation des 4-Repeat Tau-Konstrukts zu Filamenten erfolgt. Bei 3-Repeat Tau-Konstrukten ist die Aggregation im Vergleich zu oxidierenden Bedingungen jedoch verlangsamt. Durch eine Filament-Bildung von Mutanten der Tau-Konstrukte ohne Cysteine konnte gezeigt werden, daß die Dimerisierung des Tau-Proteins über eine Disulfidbrücke nicht Bedingung, aber förderlich für eine Aggregation ist. Eine Dimerisierung dieser Mutanten ohne Cysteine über nicht-kovalente Wechselwirkungen ist zu einem geringen Prozentsatz nachweisbar. Unabhängig von oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen und der Anwesenheit von Cysteinen bilden die 3-Repeat und 4-Repeat Tau-Konstrukte Filamente, die sich elektronenmikroskopisch nicht von denen aus Alzheimer-Gehirnen isolierten unterscheiden. Wird hingegen anstelle des Polyanions Heparin die Fettsäure Arachidonsäure zur Unterstützung der Aggregation eingesetzt, bilden sich ausschließlich gerade Filamente und keine paarigen helikalen Filamente.

Oxidierende Bedingungen sind demnach keine Bedingung für eine Aggregation von Tau-Protein zu Filamenten. Dadurch kann erklärt werden, warum sich Tau-Aggregate auch in gesunden Menschen und bereits in jungen Jahren finden lassen.

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.

Aizawa, H., Y. Emori, H. Murofushi, H. Kawasaki, H. Sakai und K. Suzuki (1990). "Molecular cloning of a ubiquitously distributed microtubule-associated protein with Mr 190,000." J. Biol. Chem. **265**(23): 13849-13855.

Aizawa, H., H. Kawasaki, H. Murofushi, S. Kotani, K. Suzuki und H. Sakai (1989). "A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly." J. Biol. Chem. **264**(10): 5885-5890.

Almkvist, O., L. Backman, H. Basun und L. O. Wahlund (1993). "Patterns of neuropsychological performance in Alzheimer's disease and vascular dementia." Cortex **29**(4): 661-673.

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

Ames, B. N., M. K. Shigenaga und T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**(17): 7915-7922.

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.

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

Arrasate, M., M. Perez, R. Armas-Portela und J. Avila (1999). "Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations." FEBS Lett. **446**(1): 199-202.

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., Q. Zheng-Fischhofer, M. Ackmann, J. Biernat, M. von Bergen und E. Mandelkow (2000). "Structure, Microtubule Interactions, and Paired Helical Filament Aggregation by Tau Mutants of Frontotemporal Dementias." Biochemistry **39**(38): 11714-11721.

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.

Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley und D. Schubert (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-827.

Benzi, G. und A. Moretti (1995). "Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?" Neurobiol. Aging **16**(4): 661-674.

Berget, S. M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." J. Biol. Chem. **270**(6): 2411-2414.

Bhattacharya, K., K. B. Rank, D. B. Evans und S. K. Sharma (2001). "Role of cysteine-291 and cysteine-322 in the polymerization of human tau into Alzheimer-like filaments." Biochem. Biophys. Res. Commun. **285**(1): 20-26.

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., 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.

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.

Bird, T. D., D. Nochlin, P. Poorkaj, M. Cherrier, J. Kaye, H. Payami, E. Peskind, T. H. Lampe, E. Nemens, P. J. Boyer und G. D. Schellenberg (1999). "A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L)." Brain **122**(Pt 4): 741-756.

Blencowe, B. J. (2000). "Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases." Trends Biochem. Sci. **25**(3): 106-110.

Borchelt, D. R., G. Thinakaran, C. B. Eckman, M. K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C. M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, H. H. Slunt, R. Wang, M. Seeger, A. I. Levey, S. E. Gandy, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Price, S. G. Younkin und S. S. Sisodia (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." Neuron **17**(5): 1005-1013.

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

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.

Bramblett, G. T., J. Q. Trojanowski und V. M. Lee (1992). "Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins)." Lab. Invest. **66**(2): 212-222.

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. P., G. Tremp und J. N. Octave (1999). "Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease." Am. J. Pathol. **154**(1): 255-270.

Broome, B. M. und M. H. Hecht (2000). "Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis." J. Mol. Biol. **296**(4): 961-968.

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.

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 Scherrer, V., P. R. Hof, L. Buee, B. Leveugle, P. Vermersch, D. P. Perl, C. W. Olanow und A. Delacourte (1996). "Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease." Acta Neuropathol **91**(4): 351-359.

Bugiani, O., J. R. Murrell, G. Giaccone, M. Hasegawa, G. Ghigo, M. Tabaton, M. Morbin, A. Primavera, F. Carella, C. Solaro, M. Grisoli, M. Savoiardo, M. G. Spillantini, F. Tagliavini, M. Goedert und B. Ghetti (1999). "Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau." J. Neuropathol. Exp. Neurol. **58**(6): 667-677.

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.

Byler, D. M. und H. Susi (1986). "Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra." Biopolymers **25**(3): 469-487.

Chapin, S. J. und J. C. Bulinski (1991). "Non-neuronal 210 x 10(3) Mr microtubule-associated protein (MAP4) contains a domain homologous to the microtubule-binding domains of neuronal MAP2 and tau." J. Cell Sci. **98**(Pt 1): 27-36.

Chapin, S. J., C. M. Lue, M. T. Yu und J. C. Bulinski (1995). "Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains." Biochemistry **34**(7): 2289-2301.

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.

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.

Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop und D. J. Selkoe (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42- residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**(1): 67-72.

Clark, L. N., P. Poorkaj, Z. Wszolek, D. H. Geschwind, Z. S. Nasreddine, B. Miller, D. Li, H. Payami, F. Awert, K. Markopoulou, A. Andreadis, I. D'Souza, V. M. Lee, L. Reed, J. Q. Trojanowski, V. Zhukareva, T. Bird, G. Schellenberg und K. C. Wilhelmsen (1998). "Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto- nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(22): 13103-13107.

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. Schmader und et al. (1994). "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease." Nat. Genet. **7**(2): 180-184.

Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines und M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.

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.

Crowther, R. A. und M. Goedert (2000). "Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases." J. Struct. Biol. **130**(2-3): 271-279.

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.

Delacourte, A., Y. Robitaille, N. Sergeant, L. Buee, P. R. Hof, A. Wattez, A. Laroche-Cholette, J. Mathieu, P. Chagnon und D. Gauvreau (1996). "Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease." J. Neuropathol. Exp. Neurol. **55**(2): 159-168.

DeTure, M., L. Ko, S. Yen, P. Nacharaju, C. Easson, J. Lewis, M. van Slegtenhorst und M. Hutton (2000). "Missense tau mutations identified in FTDP-17 have a small effect on tau- microtubule interactions." Brain Res. **853**(1): 5-14.

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., 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.

D'Souza, I., P. Poorkaj, M. Hong, D. Nochlin, V. M. Lee, T. D. Bird und G. D. Schellenberg (1999). "Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(10): 5598-5603.

D'Souza, I. und G. D. Schellenberg (2000). "Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion." J. Biol. Chem. **275**(23): 17700-17709.

Duff, K., H. Knight, L. M. Refolo, S. Sanders, X. Yu, M. Picciano, B. Malester, M. Hutton, J. Adamson, M. Goedert, K. Burki und P. Davies (2000). "Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes." Neurobiol Dis **7**(2): 87-98.

Ebneth, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek und E. Mandelkow (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." J. Cell Biol. **143**(3): 777-794.

Ernst, R. L. und J. W. Hay (1994). "The US economic and social costs of Alzheimer's disease revisited." Am J Public Health **84**(8): 1261-1264.

Esler, W. P. und M. S. Wolfe (2001). "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces." Science **293**(5534): 1449-1454.

Esmaeli-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.

Fassbender, K., C. Masters und K. Beyreuther (2001). "Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets." Naturwissenschaften **88**(6): 261-267.

Feany, M. B. und D. W. Dickson (1996). "Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review." Ann. Neurol. **40**(2): 139-148.

Flament, S., A. Delacourte, M. Verny, J. J. Hauw und F. Javoy-Agid (1991). "Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type." Acta Neuropathol **81**(6): 591-596.

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., M. E. King, H. Dawson, M. P. Vitek, J. Kuret, R. W. Berry und L. I. Binder (2000). “In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants.” Biochemistry **39**(20): 6136-6144.

Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie, T. Guido und S. Hagopian (1995). “Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein.” Nature **373**: 523-527.

Gao, Q. S., J. Memmott, R. Lafyatis, S. Stamm, G. Screaton und A. Andreadis (2000). “Complex regulation of tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia.” J. Neurochem. **74**(2): 490-500.

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.

Ginsberg, S. D., P. B. Crino, V. M. Lee, J. H. Eberwine und J. Q. Trojanowski (1997). “Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques.” Ann. Neurol. **41**(2): 200-209.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James und et al. (1991). “Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.” Nature **349**(6311): 704-706.

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. 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. Jakes und R. A. Crowther (1999a). “Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments.” FEBS Lett. **450**(3): 306-311.

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.

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., M. G. Spillantini, R. A. Crowther, S. G. Chen, P. Parchi, M. Tabaton, D. J. Lanska, W. R. Markesbery, K. C. Wilhelmsen, D. W. Dickson, R. B. Petersen und P. Gambetti (1999b). "Tau gene mutation in familial progressive subcortical gliosis." Nat Med **5**(4): 454-457.

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., 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.

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.

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.

Gotz, J. (2001). "Tau and transgenic animal models." Brain Res Brain Res Rev **35**(3): 266-286.

Gotz, J., F. Chen, R. Barmettler und R. M. Nitsch (2001a). "Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau." J. Biol. Chem. **276**(1): 529-534.

Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe und R. M. Nitsch (2001b). "Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." Science **293**(5534): 1491-1495.

Gotz, J., A. Probst, M. G. Spillantini, T. Schafer, R. Jakes, K. Burki und M. Goedert (1995). "Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform." Embo J **14**(7): 1304-1313.

Gotz, J., M. Tolnay, R. Barmettler, F. Chen, A. Probst und R. M. Nitsch (2001c). "Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau." Eur. J. Neurosci. **13**(11): 2131-2140.

Grabowski, P. J. und D. L. Black (2001). "Alternative RNA splicing in the nervous system." Prog Neurobiol **65**(3): 289-308.

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.

Greenberg, S. G., P. Davies, J. D. Schein und L. I. Binder (1992). "Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau." J. Biol. Chem. **267**(1): 564-569.

Grover, A., H. Houlden, M. Baker, J. Adamson, J. Lewis, G. Prihar, S. Pickering-Brown, K. Duff und M. Hutton (1999). "5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10." J. Biol. Chem. **274**(21): 15134-15143.

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.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. Tung, M. Quinlan, H. Wisniewski und L. Binder (1986b). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**: 4913-4917.

Guex, N. und M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling." Elektrophoresis **18**: 2714-2723.

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.

Haass, C. (1996). "Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease." Curr Opin Neurol **9**(4): 254-259.

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 small-calibre 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.

Hardy, J. (1997b). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." Trends Neurosci. **20**(4): 154-159.

Hasegawa, M., R. A. Crowther, R. Jakes und M. Goedert (1997). "Alzheimer-like changes in microtubule-associated protein Tau induced by sulfated glycosaminoglycans. Inhibition of microtubule binding, stimulation of phosphorylation, and filament assembly depend on the degree of sulfation." J. Biol. Chem. **272**: 33118-33124.

Hasegawa, M., M. J. Smith und M. Goedert (1998). "Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly." FEBS Lett. **437**(3): 207-210.

Hasegawa, M., M. J. Smith, M. Iijima, T. Tabira und M. Goedert (1999). "FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10." FEBS Lett. **443**(2): 93-96.

Hastings, M. L. und A. R. Krainer (2001). "Pre-mRNA splicing in the new millennium." Curr. Opin. Cell Biol. **13**(3): 302-309.

Haupt, M., A. Kurz, S. Pollmann und B. Romero (1992). "Psychopathologische Störungen bei beginnender Alzheimerscher Krankheit." Fortschr Neurol Psychiatr **60**(1): 3-7.

Hebert, L. E., P. A. Scherr, L. A. Beckett, M. S. Albert, D. M. Pilgrim, M. J. Chown, H. H. Funkenstein und D. A. Evans (1995). "Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population." J. Am. Chem. Soc. **273**(17): 1354-1359.

Hecht, M. H. (1994). "De novo design of beta-sheet proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**(19): 8729-8730.

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.

Hong, M., V. Zhukareva, V. Vogelsberg-Ragaglia, Z. Wszolek, L. Reed, B. I. Miller, D. H. Geschwind, T. D. Bird, D. McKeel, A. Goate, J. C. Morris, K. C. Wilhelmsen, G. D. Schellenberg, J. Q. Trojanowski und V. M. Lee (1998). "Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17." Science **282**(5395): 1914-1917.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang und G. Cole (1996). "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." Science **274**(5284): 99-102.

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.

Iijima, M., T. Tabira, P. Poorkaj, G. D. Schellenberg, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, M. L. Schmidt, K. Takahashi, T. Nabika, T. Matsumoto, Y. Yamashita, S. Yoshioka und H. Ishino (1999). "A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene." Neuroreport **10**(3): 497-501.

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., T. Zaidi, C. H. Thompson, P. A. Merz und H. M. Wisniewski (1984). "Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility, and protein composition." Acta Neuropathol **62**(3): 167-177.

Iseki, E., T. Matsumura, W. Marui, H. Hino, T. Odawara, N. Sugiyama, K. Suzuki, H. Sawada, T. Arai und K. Kosaka (2001). "Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel N296H mutation in exon 10 of the tau gene and a widespread tau accumulation in the glial cells." Acta Neuropathol **102**: 285-292.

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.

Jicha, G. A., J. M. Rockwood, B. Berenfeld, M. Hutton und P. Davies (1999). "Altered conformation of recombinant frontotemporal dementia-17 mutant tau proteins." Neurosci. Lett. **260**(3): 153-156.

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.

Kanemaru, K., K. Takio, R. Miura, K. Titani und Y. Ihara (1992). "Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments." J. Neurochem. **58**(5): 1667-1675.

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.

Kirschner, D. A., C. Abraham und D. J. Selkoe (1986). "X-ray diffraction from intraneural paired helical filaments and extraneural amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-β conformation." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**: 503-507.

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.

Koo, E. H., P. T. Lansbury und J. W. Kelly (1999). "Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(18): 9989-9990.

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. (1997). "Neurobiologie, Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit." In: Wächtler C., Demenzen, Thieme.

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.

Kyte, J. und R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J. Mol. Biol. **157**(1): 105-132.

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.

Ledesma, M. D., P. Bonay, C. Colaco und J. Avila (1994). "Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments." J. Biol. Chem. **269**(34): 21614-21619.

Lee, G., N. Cowan und M. Kirschner (1988). "The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain." Science **239**: 285-288.

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, 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.

Lendon, C. L., F. Ashall und A. M. Goate (1997). "Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics." J. Am. Chem. Soc. **277**(10): 825-831.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang und et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.

Lewis, J., E. McGowan, J. Rockwood, H. Melrose, P. Nacharaju, M. Van Slegtenhorst, K. Gwinn-Hardy, M. Paul Murphy, M. Baker, X. Yu, K. Duff, J. Hardy, A. Corral, W. L. Lin, S. H. Yen, D. W. Dickson, P. Davies und M. Hutton (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." Nat. Genet. **25**(4): 402-405.

Lewis, S. A., D. H. Wang und N. J. Cowan (1988). "Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein." Science **242**(4880): 936-939.

Liao, H., Y. Li, D. L. Brautigan und G. G. Gundersen (1998). "Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule- associated protein Tau." J. Biol. Chem. **273**(34): 21901-21908.

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.

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.

Lovell, M. A., W. D. Ehmann, S. M. Butler und W. R. Markesbery (1995). "Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease." Neurology **45**(8): 1594-1601.

Lovestone, S. und C. H. Reynolds (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." Neuroscience **78**(2): 309-324.

Lyras, L., N. J. Cairns, A. Jenner, P. Jenner und B. Halliwell (1997). "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease." J. Neurochem. **68**(5): 2061-2069.

Mailliot, C., N. Sergeant, T. Bussiere, M. L. Caillet-Boudin, A. Delacourte und L. Buee (1998). "Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes." FEBS Lett. **433**(3): 201-204.

Mandelkow, E. und E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." Curr. Opin. Cell Biol. **7**(1): 72-81.

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. M., M. Herrmann und U. Ruhl (1985). "Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies." J. Mol. Biol. **185**(2): 311-327.

Marcus, D. L., C. Thomas, C. Rodriguez, K. Simberkoff, J. S. Tsai, J. A. Strafaci und M. L. Freedman (1998). "Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease." Exp. Neurol. **150**(1): 40-44.

Markesbery, W. R. und J. M. Carney (1999). “Oxidative alterations in Alzheimer's disease.” Brain Pathol **9**(1): 133-146.

Matsudaira, P. T. und D. R. Burgess (1978). “SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis.” Anal. Biochem. **87**(2): 386-396.

Matus, A. (1988). “Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology.” Annu. Rev. Neurosci. **11**: 29-44.

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.

Mirra, S. S., J. R. Murrell, M. Gearing, M. G. Spillantini, M. Goedert, R. A. Crowther, A. I. Levey, R. Jones, J. Green, J. M. Shoffner, B. H. Wainer, M. L. Schmidt, J. Q. Trojanowski und B. Ghetti (1999). “Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau.” J. Neuropathol. Exp. Neurol. **58**(4): 335-345.

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 K. S. Kosik (1996). “The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active.” Mol. Biol. Cell **7**(6): 893-905.

Murrell, J. R., M. G. Spillantini, P. Zolo, M. Guazzelli, M. J. Smith, M. Hasegawa, F. Redi, R. A. Crowther, P. Pietrini, B. Ghetti und M. Goedert (1999). “Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits.” J. Neuropathol. Exp. Neurol. **58**(12): 1207-1226.

Nacharaju, P., J. Lewis, C. Easson, S. Yen, J. Hackett, M. Hutton und S. H. Yen (1999). “Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations.” FEBS Lett. **447**(2-3): 195-199.

Nasreddine, Z. S., M. Loginov, L. N. Clark, J. Lamarche, B. L. Miller, A. Lamontagne, V. Zhukareva, V. M. Lee, K. C. Wilhelmsen und D. H. Geschwind (1999). “From genotype to phenotype: a clinical pathological, and biochemical investigation of frontotemporal dementia and parkinsonism (FTDP-17) caused by the P301L tau mutation.” Ann. Neurol. **45**(6): 704-715.

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.

Nitsch, R. M., J. K. Blusztajn, A. G. Pittas, B. E. Slack, J. H. Growdon und R. J. Wurtman (1992). “Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**(5): 1671-1675.

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.

Parysek, L. M., J. J. Wolosewick und J. B. Olmsted (1984). “MAP 4: a microtubule-associated protein specific for a subset of tissue microtubules.” J. Cell Biol. **99**(6): 2287-2296.

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. Montejo 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.

Philips, A. V. und T. A. Cooper (2000). “RNA processing and human disease.” Cell. Mol. Life Sci. **57**(2): 235-249.

Pierre, M. und J. Nunez (1983). “Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain.” Biochem. Biophys. Res. Commun. **115**(1): 212-219.

Poorkaj, P., T. D. Bird, E. Wijsman, E. Nemens, R. M. Garruto, L. Anderson, A. Andreadis, W. C. Wiederholt, M. Raskind und G. D. Schellenberg (1998). “Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia.” Ann. Neurol. **43**(6): 815-825.

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.

Prasad, M. R., M. A. Lovell, M. Yatin, H. Dhillon und W. R. Markesbery (1998). “Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease.” Neurochem. Res. **23**(1): 81-88.

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. **122**(14): 1499-1510.

Reed, L. A., Z. K. Wszolek und M. Hutton (2001). “Phenotypic correlations in FTDP-17.” Neurobiol. Aging **22**(1): 89-107.

Reszka, A. A., R. Seger, C. D. Diltz, E. G. Krebs und E. H. Fischer (1995). “Association of mitogen-activated protein-kinase with the microtubule cytoskeleton.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 8881-8885.

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.

Rizzini, C., M. Goedert, J. R. Hodges, M. J. Smith, R. Jakes, R. Hills, J. H. Xuereb, R. A. Crowther und M. G. Spillantini (2000). "Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease." J. Neuropathol. Exp. Neurol. **59**(11): 990-1001.

Rizzu, P., M. Joosse, R. Ravid, A. Hoogeveen, W. Kamphorst, J. C. van Swieten, R. Willemsen und P. Heutink (2000). "Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients." Hum. Mol. Genet. **9**(20): 3075-3082.

Rizzu, P., J. C. Van Swieten, M. Joosse, M. Hasegawa, M. Stevens, A. Tibben, M. F. Niermeijer, M. Hillebrand, R. Ravid, B. A. Oostra, M. Goedert, C. M. van Duijn und P. Heutink (1999). "High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands." Am. J. Hum. Genet. **64**(2): 414-421.

Rocca, W. A., A. Hofman, C. Brayne, M. M. Breteler, M. Clarke, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, K. Engedal, O. Hagnell, T. J. Heeren und et al. (1991). "Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM- Prevalence Research Group." Ann. Neurol. **30**(3): 381-390.

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.

Rossor, M. N., N. C. Fox, P. A. Freeborough und R. J. Harvey (1996). "Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease." Neurodegeneration **5**(4): 393-397.

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.

Saunders, A. M., K. Schmader, J. C. Breitner, M. D. Benson, W. T. Brown, L. Goldfarb, D. Goldgaber, M. G. Manwaring, M. H. Szymanski, N. McCown und et al. (1993). "Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases." Lancet **342**(8873): 710-711.

Schagger, H., W. A. Cramer und G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." Anal. Biochem. **217**(2): 220-230.

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.

Schwab, C. und P. L. McGeer (1998). "Tubulin immunopositive structures resembling intracellular neurofibrillary tangles." Neurobiol. Aging **19**(1): 41-45.

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.

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.

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.

Selkoe, D. J. (1998). "The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol. **8**(11): 447-453.

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.

Sergeant, N., A. Wattez und A. Delacourte (1999). "Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms." J. Neurochem. **72**(3): 1243-1249.

Shelanski, M. L., F. Gaskin und C. R. Cantor (1973). "Microtubule assembly in the absence of added nucleotides." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **70**(3): 765-768.

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.

Shigenaga, M. K., T. M. Hagen und B. N. Ames (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**(23): 10771-10778.

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.

Smith, C. D., J. M. Carney, P. E. Starke-Reed, C. N. Oliver, E. R. Stadtman, R. A. Floyd und W. R. Markesbery (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**(23): 10540-10543.

Smith, C. W. und J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem. Sci. **25**(8): 381-388.

Smith, M. A., S. Taneda, P. L. Richey, S. Miyata, S. D. Yan, D. Stern, L. M. Sayre, V. M. Monnier und G. Perry (1994). "Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**(12): 5710-5714.

Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, G. S. Bloom und M. C. Mumby (1996). "Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A." Neuron **17**(6): 1201-1207.

Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, R. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, 3rd, M. C. Mumby und G. S. Bloom (1999). "Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies." J. Biol. Chem. **274**(36): 25490-25498.

Spillantini, M. G., T. D. Bird und B. Ghetti (1998a). "Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies." Brain Pathol **8**(2): 387-402.

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, W. Kamphorst, P. Heutink und J. C. van Swieten (1998b). "Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau." Am. J. Pathol. **153**(5): 1359-1363.

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 (1998c). "Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(13): 7737-7741.

Spillantini, M. G., H. Yoshida, C. Rizzini, P. L. Lantos, N. Khan, M. N. Rossor, M. Goedert und J. Brown (2000). "A novel tau mutation (N296N) in familial dementia with swollen achromatic neurons and corticobasal inclusion bodies." Ann. Neurol. **48**(6): 939-943.

Stadtman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**(5074): 1220-1224.

Stanford, P. M., G. M. Halliday, W. S. Brooks, J. B. Kwok, C. E. Storey, H. Creasey, J. G. Morris, M. J. Fulham und P. R. Schofield (2000). "Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations." Brain **123**(Pt 5): 880-893.

Steele, J. C., J. Richardson und J. Olszewski (1964). "Progressive supranuclear palsy. A heterogenous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia." Arch. Neurol.: 333-359.

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.

Stoss, O., M. Olbrich, A. M. Hartmann, H. Konig, J. Memmott, A. Andreadis und S. Stamm (2001). "The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites." J. Biol. Chem. **276**(12): 8665-8673.

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.

Svennerholm, L. und C. G. Gottfries (1994). "Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II)." J. Neurochem. **62**(3): 1039-1047.

Tellez-Nagel, I. und H. M. Wisniewski (1973). "Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson- Olszewski syndrome." Arch. Neurol. **29**(5): 324-327.

Tilney, L. G., J. Bryan, D. J. Bush, K. Fujiwara, M. S. Mooseker, D. B. Murphy und D. H. Snyder (1973). "Microtubules: evidence for 13 protofilaments." J. Cell Biol. **59**(2 Pt 1): 267-275.

Tobin, A. J. und E. R. Signer (2000). "Huntington's disease: the challenge for cell biologists." Trends Cell Biol. **10**(12): 531-536.

Tolnay, M. und A. Probst (1999). "REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders." Neuropathol Appl Neurobiol **25**(3): 171-187.

Tomita, T., K. Maruyama, T. C. Saido, H. Kume, K. Shinozaki, S. Tokuhiro, A. Capell, J. Walter, J. Grunberg, C. Haass, T. Iwatsubo und K. Obata (1997). "The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**(5): 2025-2030.

Tomonaga, M. (1977). "Ultrastructure of neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy." Acta Neuropathol (Berl) **37**(2): 177-181.

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.

van Slegtenhorst, M., J. Lewis und M. Hutton (2000). "The molecular genetics of the tauopathies." Exp Gerontol **35**(4): 461-471.

van Swieten, J. C., M. Stevens, S. M. Rosso, P. Rizzu, M. Joosse, I. de Koning, W. Kamphorst, R. Ravid, M. G. Spillantini, Niermeijer und P. Heutink (1999). "Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations." Ann. Neurol. **46**(4): 617-626.

Varadarajan, S., S. Yatin, M. Aksenova und D. A. Butterfield (2000). "Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity." J. Struct. Biol. **130**(2-3): 184-208.

Varani, L., M. Hasegawa, M. G. Spillantini, M. J. Smith, J. R. Murrell, B. Ghetti, A. Klug, M. Goedert und G. Varani (1999). "Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(14): 8229-8234.

Vermersch, P., Y. Robitaille, L. Bernier, A. Wattez, D. Gauvreau und A. Delacourte (1994). "Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement." Acta Neuropathol **87**(6): 572-577.

Vitek, M. P., K. Bhattacharya, J. M. Glendening, E. Stopa, H. Vlassara, R. Bucala, K. Manogue und A. Cerami (1994). "Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**(11): 4766-4770.

von Bergen, M., S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (2001). "Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure." J. Biol. Chem. **17**: 17. in press, online available.

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). "Proline-directed 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.

West, M. W., W. Wang, J. Patterson, J. D. Mancias, J. R. Beasley und M. H. Hecht (1999). "De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(20): 11211-11216.

West, R. R., K. M. Tenbarge und J. B. Olmsted (1991). "A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences." J. Biol. Chem. **266**(32): 21886-21896.

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 microtubule-associated 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 (1995). "Polymerization of microtubule-associated protein tau under near- physiological conditions." J. Biol. Chem. **270**(41): 24306-24314.

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., R. A. Crowther, M. Stewart und M. Roth (1985). "Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease." J. Cell Biol. **100**(6): 1905-1912.

Wischik, C. M., M. Novak, P. C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar und R. A. Crowther (1988a). "Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**(13): 4884-4888.

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.

Wittmann, C. W., M. F. Wszolek, J. M. Shulman, P. M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton und M. B. Feany (2001). "Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles." Science **293**(5530): 711-714.

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

Wolvetang, E. J., K. L. Johnson, K. Krauer, S. J. Ralph und A. W. Linnane (1994). "Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis." FEBS Lett. **339**(1-2): 40-44.

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.

Xiong, H., B. L. Buckwalter, H. M. Shieh und M. H. Hecht (1995). "Periodicity of polar and nonpolar amino acids is the major determinant of secondary structure in self-assembling oligomeric peptides." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**(14): 6349-6353.

Yasuda, M., J. Takamatsu, I. D'Souza, R. A. Crowther, T. Kawamata, M. Hasegawa, H. Hasegawa, M. G. Spillantini, S. Tanimukai, P. Poorkaj, L. Varani, G. Varani, T. Iwatsubo, M. Goedert, D. G. Schellenberg und C. Tanaka (2000). "A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto)." Ann. Neurol. **47**(4): 422-429.

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.

VII ANHANG

1 *Primer*-Sequenzen der ortsgerichteten Mutagenese von Tau

G272V:

5´ TCCACTGAGAACCTTAAGCACCAGCCGGGAGTCGGGAAGGTGCAG 3´
3´ AGGTGACTCTTGGAATTCGTGGTCGGCCCTCAGCCCTTCCACGTC 5´

N279K:

5´ GGTGCAGATAATTAAAAAGAAGCTGGATC 3´
3´ CCACGTCTATTAATTTTTCTTCGACCTAG 5´

ΔK280:

5´ GGAAGGTGCAGATAATTAACAAGCTGGATCTTAGCAACG 3´
3´ CCTTCCACGTCTATTAATTGTTCGACCTAGAATCGTTGC 5´

P301L:

5´ AAGGATAATATTAAACACGTCCTGGGAGGCGGCAGTGTGCAA 3´
3´ TTCCTATTATAATTTGTGCAGGACCCTCCGCCGTCACACGTT 5´

V337M:

5´ GGAGGTGGCCAGATGGAAGTAAAATCTGAGAAACTTGACTTCAAGG 3´
3´ CCTCCACCGGTCTACCTTCATTTTAGACTCTTTGAACTGAAGTTCC 5´

R406W:

5´ GGGGACACGTCTCCATGGCATCTCAGCAATG 3´
3´ CCCCTGTGCAGAGGTACCGTAGAGTCGTTAC 5´

C322A:

SB01: 5´ GACCTGAGCAAGGTGACGTCCAAGGCTGGCTCATTAGGCAAC 3´
SB02: 3´ CTGGACTCGTTCCACTGCAGGTTCCGACCGAGTAATCCGTTG 5´

C291A:

SB03: 5´ GTCCAGTCCAAGGCTGGCTCAAAGGATAATATTAAACAGGTCCCG 3´
SB04: 3´ CAGGTCAGGTTCCGACCGAGTTTCCTATTATAATTTGTCCAGGGC 5´

R3*:

SB05: 5´ GGCGGGAAGGTGCAAATAATAAACAAA---GTTGACCTGAGCAAGGTGACGTCCAAGTGTGGC 3´
SB06: 3´ CCGCCCTTCCACGTTTATTATTTGTTT---CAACTGGACTCGTTCCACTGCAGGTTCACACCG 5´

ΔR3:

SB07: 5´ GGAGGCGGCAGT◂ ▸GTGGAAGTAAAATCTGAGAAG 3´
SB08: 3´ GTGCAGGGCCCTCCGCCGTCA◂ ▸CACCTTCATTTT 5´

2 Abkürzungen

Aβ	Amyloid β-Peptid
AgD	Argyrophile Körner Krankheit (*argyrophilic grain disease*)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	β-Amyloid-Vorläufer-Protein (β-*amyloid precursor protein*)
AS	Aminosäure(n)
BBP	Verzweigungsstellen-Protein (*branch point protein)*
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
CBD	Cortikobasale Degeneration (*corticobasal degeneration*)
CD	Circular-Dichroismus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
DTNB	5,5´-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N,N,-tetraacetat
ESE	Exon-Spleiß-Verstärker (*exon splicing enhancer*)
FTDP-17	Frontotemporale Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (*frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*)
FTIR	Fourier Transform Infrarot
HA	Hämagglutinin
HEPES	(4-(2-Hydroxyethl)-piperazino)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (*high performance liquid chromatography*)
hTau	Human Tau
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani

MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation – Zeit des Flugs (*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight*)
MAP	Mikrotubulus-assoziierte Proteine
MES	2-(Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	*messanger* Ribonukleinsäure (*messanger ribonucleic acid*)
MW	Molekulargwicht (*molecular weight*)
NFT	Neurofibrilläre Bündel *(neurofibrillary tangles)*
n.u.	nicht untersucht
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
PHF	paarige helikale Filamente (*paired helical filaments*)
PiD	Pick-Krankheit (*Pick's disease*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	Progressive supranukleare Lähmung (*progressive supranuclear palsy*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
Sf9	Insektenovarienzelle
SRp	Serin-Arginin-Protein
ThS	Thioflavin S
TP	Threonin-Prolin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U1snRNP	kleines nukleares Ribonukleoprotein U1 (*U1 small nuclear ribonucleoprotein*)
U2AF	unterstützender Faktor U2 (*U2 auxiliary factor*)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wild-Typ

3 Lebenslauf

persönliche Daten:

Stefan Barghorn
geboren am 16.03.1970 in Oldenburg
ledig

Schulausbildung:

08/76-07/80	Grundschule in Loy
08/80-05/82	Orientierungsschule in Rastede
06/82-05/89	gymnasiale Oberstufe der Kooperativen Gesamtschule Rastede Abschluß: Abitur

Wehrdienst:

06/89-08/90	als Grundwehrdienstleistender

Studium:

10/90-06/97	Diplom-Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg Diplomarbeit am Institut für Chemie und Biologie des Meeres Thema: Molekularbiologische Analyse von Bakteriengemeinschaften in holozänen Sedimenten Abschluß: Diplom

Auslandsaufenthalte:

10/93-08/94	Studium an der Royal University of Edinburgh (Schottland)

Weiterbildungen:

10/97-07/98	Weiterbildung zur „Führungskraft Online-Marketing“ am Forschungs- und Qualifizierungszentrum GraTeach in Kamp-Lintfort

Promotion:

08/98-12/01	Promotion an der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie in Hamburg Thema: *In vitro* Analyse der biochemischen und strukturellen Auswirkungen von Mutationen im Tau-Protein bei frontotemporalen Demenzen – Implikationen für die Alzheimer-Krankheit

4 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 benutzten 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, 07. November 2001