

Einfluss der humanen Cyclophiline A und D auf die fibrilläre Aggregation von humanem Amyloid $\beta(1-40)$

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Marten Villmow

geb. am 27.08.1981 in Lübben

verteidigt am 01.06.2017 in Halle an der Saale

Gutachter:

Professor Dr. Gunter Fischer (Max-Planck-Gesellschaft)

Professor Dr. Mike Schutkowski (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Professor Dr. Holger Barth (Universität Ulm)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| I | Abkürzungsverzeichnis | |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Faltungshelferenzyme | 1 |
| 1.2 | Ein-Domänen-Cyclophiline und ihre Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen | 3 |
| 1.2.1 | Cyclophilin A | 3 |
| 1.2.2 | Cyclophilin B | 6 |
| 1.2.3 | Cyclophilin D | 6 |
| 1.3 | Morbus Alzheimer und das Peptid Amyloid $\beta(1-40)$ bzw. $(1-42)$ | 8 |
| 1.3.1 | Assemblierung von $A\beta$ -Oligomeren und $A\beta$ -Fibrillen | 9 |
| 1.3.2 | Der Einfluss von Faltungshelferproteinen auf die Bildung von Amyloid-Fibrillen | 11 |
| 1.4 | Die neurotoxische Interaktion von CypD und $A\beta$ | 14 |
| 1.5 | Ziele und Aufgabenstellung der Dissertation | 16 |
| 2 | Materialien | 17 |
| 2.1 | Verwendete Antibiotika, Antikörper, Chemikalien und Enzyme | 17 |
| 2.2 | Zubehör und Geräte | 18 |
| 2.3 | Verwendete Chromatographiesäulen und -materialien | 19 |
| 2.4 | Puffer und Lösungen | 20 |
| 2.5 | Expressionsvektoren | 20 |
| 3 | Methoden | 21 |
| 3.1 | Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 3.1.1 | PCR und Sequenzierung | 21 |
| 3.1.2 | Ortsspezifische Mutagenese von CypD | 21 |
| 3.2 | Proteinpräparation und Analytik | 21 |
| 3.2.1 | Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression rekombinanter Proteine | 21 |
| 3.2.2 | Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen zur Expression von $^{13}C/^{15}N$ -markiertem CypD | 22 |
| 3.2.3 | Aufschluss der Zellen zur Proteinreinigung | 22 |
| 3.2.4 | Reinigung von CypA | 22 |
| 3.2.5 | Reinigung von His ₆ -CypD und seiner Varianten | 22 |
| 3.2.6 | Expression oder Synthese der verwendeten Peptide | 23 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2.7 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 23 |
| 3.2.8 | Coomassiefärbung von SDS-PAGE-Gelen | 24 |
| 3.2.9 | Western Blot..... | 24 |
| 3.2.10 | HPLC..... | 24 |
| 3.2.11 | Bestimmung der PPlase-Aktivität von CypA, CypD und CypD-Varianten..... | 25 |
| 3.2.12 | Inhibierung der PPlase-Aktivität von Cyclophilinen durch CsA und CsA-Derivate | 25 |
| 3.2.13 | Massenspektrometrische Analysen | 26 |
| 3.2.14 | <i>Peptide SPOT Arrays</i> der Interaktionsstelle von CypD/A β (1-40)..... | 26 |
| 3.3 | Biophysikalische Methoden | 27 |
| 3.3.1 | Konzentrationsbestimmung von Peptiden und Proteinen..... | 27 |
| 3.3.2 | NMR-Spektroskopie..... | 28 |
| 3.3.3 | Circulardichroismus-Spektroskopie..... | 29 |
| 3.3.4 | Isotherme Titrationskalorimetrie von CypD mit A β (16-20) | 30 |
| 3.3.5 | Thioflavin T-Fluoreszenzassay der A β (1-40)-Aggregationskinetiken | 30 |
| 3.3.6 | Bestimmung des K_D -Wertes durch Messung der intrinsischen Fluoreszenz von CypD. 30 | |
| 3.3.7 | Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)..... | 31 |
| 3.3.8 | Transmissionselektronenmikroskopie..... | 33 |
| 3.4 | Zellkultur der humanen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y | 33 |
| 3.4.1 | Zellkulturbedingungen | 33 |
| 3.4.2 | Untersuchung zur Zytotoxizität von A β (1-40) und A β (16-20)..... | 34 |
| 3.4.3 | <i>Cell Titer Blue</i> TM -Assay zur Bestimmung der Zellvitalität | 34 |
| 3.5 | Statistik..... | 34 |
| 4 | Ergebnisse..... | 35 |
| 4.1 | Expression und Reinigung von humanen Cyclophilinen | 35 |
| 4.1.1 | Expression und Reinigung von humanen CypA und CypD | 35 |
| 4.1.2 | Expression und Reinigung von ¹⁵ N- und ¹³ C/ ¹⁵ N-markiertem Cyclophilin D..... | 36 |
| 4.2 | Charakterisierung der PPlase-Aktivität der Cyclophiline | 36 |
| 4.2.1 | Die PPlase-Aktivität von CypA und CypD..... | 36 |
| 4.2.2 | Inhibition von CypD durch das Cyclosporin A-Derivat MM258..... | 39 |
| 4.2.3 | Analyse der Sekundärstrukturen von CypD und seiner Varianten..... | 40 |
| 4.3 | Einfluss von Cyclophilinen auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)..... | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.1 | Einfluss von CypA und CypD auf die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen..... | 41 |
| 4.3.2 | Einfluß von Cyclophilin-Inhibitoren auf die Cyclophilin/A β (1-40)-Interaktion..... | 43 |
| 4.3.3 | Der Einfluss von Cyclophilin-Varianten auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) | 46 |
| 4.4 | Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der fibrillären Aggregation von A β (1-40)..... | 48 |
| 4.5 | Identifizierung der CypD-Interaktionsstelle in A β (1-40) durch <i>Peptide SPOT Array</i> | 49 |
| 4.6 | NMR-spektroskopische Untersuchung der Interaktionsstellen von CypD und A β (1-40) | 51 |
| 4.7 | Charakterisierung der Interaktion von A β (16-20) mit Cyclophilinen..... | 55 |
| 4.7.1 | Inhibition der PPIase-Aktivität von CypA und CypD durch A β (16-20)..... | 55 |
| 4.7.2 | Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Interaktion durch isotherme Titrationskalorimetrie..... | 57 |
| 4.7.3 | Analyse der Bindung von A β (16-20) mittels der intrinsischen Fluoreszenz von CypD.. | 59 |
| 4.8 | Analyse von A β (1-40)-Oligomeren durch photochemisches <i>cross-linking</i> | 60 |
| 4.9 | Einfluss von A β (1-40) und A β (16-20) auf die Vitalität einer Neuroblastomazelllinie (SH-SY5Y)..... | 62 |
| 5 | Diskussion der Ergebnisse | 64 |
| 5.1 | Der Einfluss von Cyclophilinen auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)..... | 64 |
| 5.2 | Identifizierung der interagierenden A β -Spezies und der Bindungsstellen | 72 |
| 6 | Zusammenfassung der vorgelegten Dissertation | 77 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 78 |
| 8 | Referenzen..... | 80 |
| 9 | Anhang..... | 96 |
| 9.1 | Ergänzung zu 4.3.1 | 96 |
| 9.2 | Ergänzung zu 4.3.2 | 98 |

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| A β | Amyloid β |
| AD | Alzheimer'sche Krankheit (Synonym: Morbus Alzheimer) |
| ANS | 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure |
| ANT | Adeninnukleotidtranslokator |
| APIase | Sekundäramid-Peptidbindungs- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| APP | <i>amyloid precursor protein</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| CCD | <i>charge coupled detection</i> |
| CD | Circulardichroismus |
| CTB | <i>CellTiterBlue™</i> |
| CypA | Cyclophilin A |
| CypB | Cyclophilin B |
| CypD | Cyclophilin D |
| CsA | Cyclosporin A |
| CsH | Cyclosporin H |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie |
| FAD | <i>Familial Alzheimer's Disease</i> |
| FBS | <i>Fetale Bovine Serum</i> |
| FKBP | FK506-bindendes Protein |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| IMM | innere Mitochondrienmembran |
| ITC | isotherme Titrationskalorimetrie |
| ISP | isomerspezifische Proteolyse |
| LB | <i>Lysogeny Broth</i> |
| LTP | <i>long term potentiation</i> |

| | |
|---------|---|
| mPTP | mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore |
| mtDNA | mitochondriale Desoxyribonukleinsäure |
| mtRNA | mitochondriale Ribonukleinsäure |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| OD | optische Dichte |
| OMM | äußere Mitochondrienmembran |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PCTIase | Peptidbindungs- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| PDB | Proteindatenbank (<i>protein data base</i>) |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| pNA | <i>p</i> -Nitroanilid |
| PPIase | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SPR | <i>surface plasmon resonance</i> |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFE | Trifluorethanol |
| ThT | Thioflavin T |
| TOM | <i>transporter of outer membrane</i> |
| UV | Ultraviolett |
| VDAC | <i>Voltage dependent anion channel</i> |
| wt | Wildtyp |

1 Einleitung

1.1 Faltungshelferenzyme

Als Faltungshelferenzyme bezeichnet man Proteine, welche die Fähigkeit besitzen, langsame Schritte der Proteinfaltung katalytisch zu beschleunigen. Das unterscheidet sie von Chaperonen, welche die korrekte Faltung von Proteinen durch die Stabilisierung von z. B. aggregationsanfälligen Faltungsintermediaten unterstützen. Zu den Faltungshelferenzymen gehört die Gruppe der Peptidbindungs-*cis/trans*-Isomerasen (PCTIsen [1]). Es werden zwei Arten von PCTIsen unterschieden, die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8 [2]) und die Sekundäramid-Peptidbindungs-*cis/trans*-Isomerasen (APIasen [3]). PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen N-terminal von einem Prolin (Prolylbindung) (Abbildung 1), APIasen katalysieren die Isomerisierung von sekundären amidischen Peptidbindungen [3], [4]. Die *cis*- und *trans*-Konformere einer Peptidbindung ergeben sich aus dem partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung. Dieser Doppelbindungscharakter erhöht die energetische Barriere für eine freie Rotation der Aminosäuren um diese Peptidbindung [5]. Die C_{α} -Atome der an der Peptidbindung beteiligten Aminosäuren nehmen eine planare Konformation mit einem Torsionswinkel (ω) von 0° (*cis*) oder 180° (*trans*) zueinander ein.

Aufgrund sterischer Besonderheiten ist bei Prolylbindungen der Anteil der *cis*-Konformation in funktionalen Proteinstrukturen mit ca. 6% höher als bei anderen Peptidbindungen [6],[7]. Im Vergleich zu einer *cis/trans*-Isomerisierung in nicht-prolinhaltigen Peptidbindungen ist die Rotation um eine Prolylbindung relativ langsam. Die hohe Rotationsbarriere ergibt sich aus der zyklischen Struktur von Prolin, in der sowohl das zentrale C_{α} -Atom als auch die Seitenkette kovalent an das Stickstoffatom der Aminogruppe gebunden sind [8]. Die Isomerisierung einer Prolylbindung zu der im nativen Protein bevorzugten Konformation bildet potentiell einen langsamen Schritt während der Faltung eines Proteins [9].

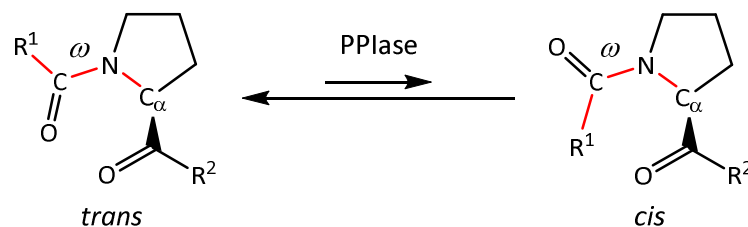


Abbildung 1 **Darstellung der *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolylbindung.** PPIasen beschleunigen das Einstellen des chemischen Gleichgewichtes zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation der Prolylbindung. Der Torsionswinkel ω der Peptidbindung kann 0° (*cis*) oder 180° (*trans*) betragen.

Neben Proteinfaltungsvorgängen sind PPIasen an einer Vielzahl weiterer wichtiger biologischer Prozesse beteiligt [10], [11]. So können sie ihre Substratproteine, wie zum Beispiel Rezeptoren, in

eine funktionale Konformation schalten [12] und dienen als Signaltransmitter für zelluläre Stressantworten [5,6].

Die Enzymklasse der PPlasen wird in drei Familien unterteilt. Die Familie der Cyclophiline ist durch ihre Eigenschaft charakterisiert, das zyklische Undecapeptid Cyclosporin A (CsA) aus dem Ascomyceten *Tolypocladium inflatum* zu binden. CsA inhibiert die PPlase-Aktivität der Cyclophiline und hat im humanen Organismus eine immunsuppressive Wirkung, welche allerdings nicht auf der Inhibition der PPlase-Aktivität beruht [15]. Es gibt derzeit 18 beschriebene humane Isoformen von Cyclophilinen (Übersicht in [1]). Der prototypische Vertreter der Cyclophiline ist das ca. 18 kDa große Cyclophilin A (CypA), welches nur aus einer katalytisch aktiven PPlase-Domäne besteht und zytosolisch lokalisiert ist [16].

Die zweite bekannte PPlase-Familie umfasst die *FK506-bindenden Proteine* (FKBPs). Diese Enzyme erhielten ihren Namen aufgrund der Eigenschaft, das von *Streptomyces tsukubaensis* synthetisierte Macrolidlacton FK506, auch Tacrolimus genannt, zu binden [17]. FK506 inhibiert die PPlase-Aktivität von FKBPs im mikromolaren bis nanomolaren Bereich [18]. Auch das aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* isolierte Rapamycin (auch Sirolimus) ist ein Inhibitor der PPlase-Aktivität der FKBPs. Sowohl Rapamycin als auch FK506 wirken immunsupprimierend im humanen Organismus [19].

Es sind aktuell 16 humane Isoformen der FKBPs beschrieben [1]. Das prototypische FKBP ist das 12 kDa große FKBP12 (codiert durch das Gen *FKBP1A*), welches ubiquitär im menschlichen Organismus exprimiert wird [20], [21]. Für die verschiedenen FKBPs wurden diverse Spleißvarianten beschrieben, wodurch die Anzahl der funktional exprimierten FKBPs erhöht wird. Sie sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. So bindet FKBP12 an die skeletale und kardiale Isoform des Ryanodinrezeptors (RyR), ein Kalziumkanaltyp der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Der Ryanodinrezeptor steuert über seine Öffnungswahrscheinlichkeit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und somit die elektromechanische Kopplung der neuronalen Muskelaktivierung. FKBP12 moduliert die Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals [22], [23].

Für die Familie der Parvuline wurden zwei humane Isoformen beschrieben, Pin1 und Parvulin 14. Pin1 ist eine der bisher am besten untersuchten PPlasen. Es bindet spezifisch phosphorylierte Ser/Thr-Pro-Motive, hat eine Vielzahl von Interaktionspartnern und ist in eine große Anzahl zellulärer Prozesse involviert. Von großem Interesse ist die Interaktion von Pin1 mit dem Transkriptionsfaktor p53. Pin1 stabilisiert p53 in einem Komplex und ändert seine Konformation. Bei oxidativem Stress und DNA-Schäden können so DNA-Reparaturmechanismen induziert werden. Bei weiterer Akkumulation von stabilen Pin1/p53-Komplexen, zum Beispiel bei anhaltender DNA-Schädigung und oxidativem Stress, wird die Apoptose eingeleitet [24]. Pin1 hat auch eine regulatorische Funktion bei der Prozessierung von *amyloid precursor protein* (APP) und der Bildung von A β -Peptiden und spielt somit bei der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit eine Rolle. Es wurde gezeigt, dass Pin1 das pThr668-Pro-Motiv in APP erkennt und dessen *cis/trans*-Isomerisierung katalysiert [25]. Dies beeinflusst die proteolytische Prozessierung von APP durch β - und γ -Sekretase. Ein genetischer *knock out* von Pin1 im Mausmodell führt zu erhöhten Konzentrationen von löslichen A β (1-42)-Monomeren

im Blutplasma, während eine Überexpression von Pin1 die Blutkonzentration von A β (1-42)-Monomeren senkt [25].

Zu den APlasen zählt das *E. coli*-Hsp70-Chaperon DnaK [3], welches die *cis/trans*-Isomerisierung einer Vielzahl von Peptidbindungen katalysiert, allerdings nicht von Prolylbindungen.

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Katalyse von PPlasen und APlasen sind noch nicht vollständig geklärt. Der Katalyse-Mechanismus der Prolylisomerisierung durch Cyclophiline war Gegenstand von einigen Untersuchungen. Mit Hilfe von Varianten des aktiven Zentrums von CypA gelang es, an der Katalyse beteiligte Aminosäuren zu identifizieren. Eine gut untersuchte und charakterisierte Variante ist CypA R55A, welche im PPlase-Enzymassay eine sehr geringe enzymatische Aktivität aufweist [26].

Eine reduzierte Stabilität der polaren Resonanzstruktur der Prolylbindung des Substrats im unpolaren aktiven Zentrum von CypA könnte die Isomerisierung erleichtern [27]. Im Modell kann das Lösungsmittel Wasser durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Sauerstoffatom der Carbonylgruppe der Prolylbindung einen Übergangszustand stabilisieren (*solvent assisted*) [28]. Dabei dient die Guanidiniumgruppe von Arginin 55 im aktiven Zentrum von CypA als Donor für ein Proton. Dieses Proton könnte eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom der Prolylbindung ausbilden und so die energetische Rotationsbarriere verringern.

Ein weiteres Modell ist, dass Cyclophiline Spannung bzw. Verformung in das Substrat induzieren, indem sie die Energie der Enzym-Substrat-Bindung nutzen. Sie binden dabei einen Übergangszustand des Substrates mit einer teilweise rotierten Peptidbindung [27]. Als möglicher Mechanismus wurde der nukleophile Angriff einer aktivierten Sulfhydrylgruppe an das C-Atoms der Carbonylgruppe der Prolylbindung und der Ausbildung eines kovalenten Hemithioorthoamids unter Auflösung der partiellen Doppelbindung vermutet [29]. Durch den Verlust der Resonanzstabilisierung wäre die Rotationsbarriere an der Peptidbindung erheblich verringert. Allerdings sind Varianten von bakteriellen Cyclophilinen, in denen die Cysteine des aktiven Zentrums sukzessive gegen Alanin substituiert wurden, noch katalytisch aktiv [30]. Dies lässt eine direkte Beteiligung von Cystein an der Reaktion unwahrscheinlich erscheinen.

1.2 Ein-Domänen-Cyclophiline und ihre Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen

1.2.1 Cyclophilin A

CypA (Cyp18) ist eine 18 kDa große, globuläre PPlase. Es ist das erste Protein, für das PPlase-Aktivität nachgewiesen wurde [2]. Im menschlichen Organismus wird CypA durch das Gen *PPIA* codiert. Es ist auf Chromosom 7 in der Region 7p13 lokalisiert [31]. Seine genomische Struktur umfasst fünf Exons sowie eine TATA-Box in der Promotorregion. CypA ist ein Ein-Domänen-Protein. Es besteht aus zwei α -Helizes und acht antiparallelen β -Strängen, die eine Fassstruktur (*β -barrel*) ausbilden [32]. CypA wurde sowohl intrazellulär im Zytoplasma als auch extrazellulär gefunden [33].

Diese Sekundärstrukturmerkmale finden sich auch bei anderen Cyclophilinen mit denen CypA gleichzeitig eine hohe Identität der Primärstruktur aufweist. So beträgt die Sequenzidentität der PPlase-Domäne zu CypB 48,6 % und zu CypD 59,9% (siehe Abbildung 2).

CsA bindet im aktiven Zentrum von CypA und inhibiert reversibel die PPlase-Aktivität des Enzyms [29], [34]. CsA wirkt im menschlichen Organismus immunsupprimierend und ist daher nach Allotransplantationen indiziert, um eine ungewollte Immunreaktion gegen das Allograft zu verhindern [35],[36]. Cyp A wurde als Vermittler der immunsupprimierenden Eigenschaften von CsA identifiziert [16]. Die CsA-induzierte Immunsuppression beruht auf der über einen *gain of function*-Mechanismus erfolgenden Inhibition der Phosphatase Calcineurin [37], die in der T-Zellaktivierung und -proliferation eine entscheidende Rolle spielt. Bei Applikation von CsA entsteht ein aus CypA, CsA und Calcineurin bestehender ternärer Komplex [38]. Im Komplex gebunden, kann Calcineurin nicht den Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) dephosphorylieren. Dadurch wird die T-Zellproliferation inhibiert und die Immunantwort unterdrückt.

CypA zeigt eine Vielzahl von intermolekularen Interaktionen und ist Gegenstand vieler Untersuchungen, welche zum Beispiel die Bedeutung von CypA bei neurodegenerativen Veränderungen im Alter beleuchten. So wurde im Tiermodell gezeigt, dass bei Überschuss an CypA durch die Aktivierung der Matrixmetalloproteinase MMP-9 Komponenten der Blut-Hirn-Schranke zerstört werden. Der Gehalt an CypA in Perizyten wird durch die zwei Isoformen ApoE2 und ApoE3, aber nicht durch die dritte Isoform ApoE4 des für den menschlichen Fettstoffwechsel wichtigen Apolipoprotein E kontrolliert [39]. Um die physiologische CypA-Konzentration in Perizyten zu erhalten, ist die Interaktion von ApoE mit seinem Rezeptor LRP-1 (*low density lipoprotein receptor related protein 1*) erforderlich. Eine solche Bindung ist für die Isoform ApoE4 nicht nachweisbar.

In transgenen Mäusen, in denen das murine Apoe fehlt (*Apoe*^{-/-}-Mäuse) oder in denen das humane ApoE4 anstelle des murinen Apoe exprimiert wird (APOE4-Mäuse), zeigt sich ein Verlust der Blut-hirnschranke. Durch Gabe von CsA oder durch Deletion des CypA-Gens wurde die Schädigung bzw. der Verlust der Blut-Hirn-Schranke in *Apoe*^{-/-} und in APOE4-Mäusen verhindert. Die sich entwickelnden neuronalen und synaptischen Fehlfunktionen in *Apoe*^{-/-} und in APOE4-Mäusen konnten durch CsA verringert werden. Das heißt, der Gehalt an CypA und seine isomerspezifische Regulation durch ApoE kontrolliert die zerebrovaskuläre Integrität, die für die normale neuronale Funktion wichtig ist [39]. Interessanterweise ist die systemische Expression der Isoform APOE4, die den CypA-Gehalt nicht kontrollieren kann, mit einer erhöhten genetischen Disposition für eine Alzheimer-Erkrankung und der für das Down-Syndrom typischen Demenz verbunden [40].

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei Verlust der Blut-Hirn-Schranke mehr neurotoxische Peptide, wie A β (1-40) und A β (1-42), aus dem somatischen Blutkreislauf in das Gehirn diffundieren können [41].

CypA wird auch mit positiven Effekten, wie dem Schutz von Zellen vor oxidativem Stress, in Verbindung gebracht. In einer Studie wurden Zellen einer neuronalen Zelllinie mit A β (25-35) und CypA co-inkubiert. Zellen, denen nur A β (25-35) in das Medium zugegeben wurde, zeigten eine wesentlich geringere Vitalität als Zellen, welche zusätzlich CypA im Medium enthielten [42]. Es wird

vermutet, dass CypA effektiv gegen oxidativen Stress schützt, der durch A β (25-35) verursacht wird. Oxidativer Stress führt bei Kardiomyozyten zu einer erhöhten Expression des Membranrezeptors CD147 und von CypA [43]. Die erhöhte Expression der Proteine wird als ein Schutzmechanismus der Zellen diskutiert.

```

PPIA_HUMAN -----MVNPT 5
PPIB_HUMAN MLRLSERNMKVLAAALIAGSVFFLLL-----PGPSA-----ADEKKGPKVTVK 45
PPIF_HUMAN -----MLALRCGSRWLGLLSVPRSVPLRLPAARACSKGSGDPSSSSSSGNPL 47

PPIA_HUMAN VFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGSCFHRIIPGFMCQGG 65
PPIB_HUMAN VYFDLRIGDEDVGRVIFGLFGKTVPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDFMIQGG 105
PPIF_HUMAN VYLDVDANGKPLGRVVLELKADVVPKTAENFRALCTGEKGFYKGSTFHRVIPSFMCQAG 107
      *::*:      : :*** : * .. ****.:** *.***** * ***:* ** *.*

PPIA_HUMAN DFTRHNNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGLSMANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGK 125
PPIB_HUMAN DFTRGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYGPWVSMANAGKDTNGSQFFITTVKTAWLDGK 165
PPIF_HUMAN DFTNHNNGTGGKSIYGSRFPDENFTLKHVGPVLSMANAGPNTNGSQFFICTIKTDWLDGK 167
      ***. :*****.:* **** ** * * :***** :***** * ** *****

PPIA_HUMAN HVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRN-GKTSKKITIADCGQLE----- 165
PPIB_HUMAN HVVFGKVLEGMVVRKVESTKTDSRDKPLKDVIADCGKIEVEKPFIAIAKE 216
PPIF_HUMAN HVVFGHVKEGMDVVKKIESFGSKS-GRTSKKIVITDCGQLS----- 207
      *****:* ***:.* :* : . : *.:*:***:..
    
```

Abbildung 2 **Alignment der Aminosäuresequenzen von humanem CypA, CypB und CypD.** Die Aminosäurereste, die an der Bindung von CypA an CsA beteiligt sind, wurden rot hervorgehoben (nach [32], [44]). Wenn diese Aminosäurereste in den Isoformen CypB und CypD konserviert vorliegen, sind sie in den Aminosäuresequenzen dieser Enzyme fett hervorgehoben. Das dargestellte Alignment wurde mit Clustalw¹ erstellt. Die Identität von CypB zu CypA beträgt 48,6 % und von CypD zu CypA 59,9 %. CypA und CypB besitzen 105 identische und zusätzlich 28 ähnliche Reste. CypA und CypD haben 124 identische und zusätzlich 28 ähnliche Reste in ihren Sequenzen. Identische Reste sind mit * und ähnliche Reste mit : markiert.

SH-SY5Y-Zellen, welche in Zellkultur mit A β (1-42) inkubiert werden, zeigen ebenfalls eine erhöhte Expression des Membranrezeptors CD147 [14]. Die verstärkte CD147-Expression wirkt sich aber nur dann positiv auf die Vitalität der Zellen aus, wenn gleichzeitig rekombinantes CypA in das Nährmedium der Zellen gegeben wird.

CypA wird im Rahmen inflammatorischer Prozesse von Zellen in den umgebenden Extrazellularraum sezerniert und aktiviert Leukozyten. CypA ist ein Chemoattraktor für Leukozyten. Diese wandern dem chemischen Gradienten von CypA entlang zum Entzündungsherd [33]. Die Induktion der Chemotaxis wird durch die Interaktion von CypA mit dem membranständigen Rezeptor CD147 vermittelt [45]. PPIase-inaktive Varianten von CypA sind nicht in der Lage, mit CD147 zu interagieren und Chemotaxis zu induzieren [46], [47].

¹ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

1.2.2 Cyclophilin B

Ein weiteres typisches Ein-Domänen-Cyclophilin ist Cyclophilin B (CypB, Cyp23) mit einer molekularen Masse von 23,7 kDa. Im Menschen wird CypB durch das Gen *PPIB* codiert [48], welches auf Chromosom 15 in der Region q21-q22 lokalisiert ist. Das Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Exon 1 codiert eine 33 Aminosäuren lange Transportsequenz, die CypB zum endoplasmatischen Retikulum leitet [48]. Diese Transportsequenz ist auch für die Sekretion von CypB in den extrazellulären Raum erforderlich.

Die fünf Exons *downstream* von Exon 1 codieren die PPIase-Domäne [48]. Diese besitzt eine hohe Sequenzhomologie von 49,3 % zu CypA (Abbildung 2). Die Tertiärstruktur von CypB besteht wie die von CypA aus acht antiparallelen β -Faltblättern, welche eine Fassform (β -*barrel*) einnehmen, und zwei α -Helizes [49].

CypB wurde ähnlich wie CypA als Chemoattraktor für Leukozyten beschrieben [45], [50]. Asthmapatienten haben hohe Konzentrationen von CypB in der Bronchialflüssigkeit. Ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer Rolle von CypB als Chemoattraktor für Immunzellen wird diskutiert [51].

1.2.3 Cyclophilin D

Cyclophilin D (CypD, Cyclophilin F, Cyp22) ist das prototypische mitochondriale Cyclophilin [52]. Es wird im Menschen durch das Gen *PPIF* codiert [53], welches auf Chromosom 10 in der Region q22-q23 lokalisiert ist. Die Genstruktur besteht aus fünf Introns, sechs Exons und einer TATA-Box, welche *upstream* (ca. 110 bp) vom Startcodon liegt [54]. Es wird wie die meisten mitochondrialen Proteine im Zellkern codiert und transkribiert. Das Präkursor-Protein hat eine Länge von 207 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 22 kDa. Es besteht aus einer 109 Aminosäuren langen Cyclophilin-Domäne und einer N-terminalen mitochondrialen Transitsequenz, die während des mitochondrialen Imports proteolytisch abgespalten wird [55].

Es konnten Kristallstrukturen von CypD und von CypD-Ligand-Komplexen (z. B. CypD/CsA) generiert werden. Diese zeigen, dass CypD strukturell CypA sehr ähnlich ist. CypD besteht aus acht β -Strängen, welche ein β -*barrel* bilden, zwei α -Helizes und einer 3_{10} -Helix [56], [57]. Es ist zu bemerken, dass für die Bestimmung der Kristallstruktur nicht das Wildtypenzym von CypD verwendet wurde, sondern CypD K133I. Das Wildtypenzym bildet unter den getesteten Bedingungen keine stabilen Kristalle.

Es ist bekannt, dass CypD in Neuronen, Hepatozyten, Kardiomyozyten und geringer auch in Zellen anderer Organe exprimiert wird [53]. In Kardiomyozyten von Mäusen wurde gezeigt, dass CypD die Kalziumhomöostase und das mitochondriale Proteom beeinflusst. So ist in *Ppif*^{-/-}-Zellen der mitochondriale Ca²⁺-Spiegel verglichen zu *Ppif*^{+/+}-Zellen erhöht [58]. Außerdem wurde in CypD-defizienten Mäusen eine verringerte Expression von Succinatdehydrogenase, Elektronentransferflavoproteinen und Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) nachgewiesen [59].

CypD verändert den Acetylierungszustand diverser Proteine im Mitochondrium. Eine Analyse des Acetyloms von murinen kardialen Mitochondrien zeigt, dass die Acetylierung an Lysin im mitochondrialen Proteom um 45 % erhöht ist, wenn die Mäuse einen CypD^{-/-} genotypischen

Hintergrund hatten. Die Veränderungen betreffen unter anderem Proteine der Elektronentransportkette und Transportproteine [60].

CypD besitzt eine wichtige Funktion in der Regulierung der mitochondrialen Membranintegrität durch die Kontrolle der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP).

Die Funktionalität eines Mitochondriums hängt entscheidend von seiner Fähigkeit ab, Ladungs- und Konzentrationsunterschiede an seiner inneren und äußeren Membran aufzubauen. Um elektrochemische Gradienten zu erzeugen, zu erhalten und zur Energiegewinnung zu nutzen, besitzen Mitochondrien eine Vielfalt an Ionenpumpen (Ionentransporter), Poren und Proteintransportkanälen in der inneren (IMM) und äußeren mitochondrialen Membran (OMM). Die IMM ist generell impermeabel und trägt so zum Erhalt des elektrochemischen Protonengradienten bei, welcher für die intrazelluläre ATP-Synthese wichtig ist. Das Phänomen des Permeabilitätsüberganges (*permeability transition*) bezeichnet die plötzliche transiente Permeabilitätszunahme der inneren Mitochondrienmembran für Ionen, Wasser und Makromoleküle. Dieser Permeabilitätsübergang wurde in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts mit einer Pore in Verbindung gebracht, der mPTP [61]. Die mPTP hat eine physiologisch und metabolisch wichtige Funktion bei der Regulation der mitochondrialen Kalziumhomöostase, der Apoptose und der Nekrose einer Zelle. Eine längere Öffnung der Pore führt zur Depolarisation der Mitochondrienmembran, zum Verlust des elektrochemischen Protonengradienten, zur Schwellung des Mitochondriums und zum Verlust der Membranintegrität. Dies führt zur Störung des zellulären Stoffwechsels, zur Freisetzung von Apoptose-induzierenden Faktoren, wie z. B. Bcl-2, und zur Störung der Ca^{2+} -Homöostase [62]. Die Zelle geht in Nekrose oder Apoptose und wird sukzessive abgebaut. Man weiß, dass die mPTP eine Leitfähigkeit von bis zu 1,5 nS besitzt [63] und permeabel für Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa ist [64]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird der sogenannte *mitochondrial mega channel*, welcher zuerst elektrophysiologisch charakterisiert wurde, heute mit der mPTP gleichgesetzt [65].

1988 wurde gezeigt, dass CsA den Permeabilitätsübergang inhibiert [66]. Damit wurde ein Zusammenhang zwischen der hypothetischen mitochondrialen Pore und CypD hergestellt. Obwohl die genaue Zusammensetzung der Pore derzeit noch diskutiert wird, gelten als Bestandteile der Pore zur Zeit der spannungsabhängige Anionentransporter (VDAC, *voltage dependent anion channel*) in der OMM, der Adeninnukleotidtranslokator (ANT) der IMM und das mitochondriale Matrixprotein CypD [67]. CypD erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP, vor allem bei oxidativem Stress.

In den folgenden Jahren war die Rolle und Funktion von CypD in der mPTP Gegenstand einer Vielzahl weiterer Untersuchungen [68]. Eine funktionale Rolle von CypD wurde in Zusammenhang mit der Regulation des mPTP [66] durch Modulierung der Aktivität der F_0F_1 -ATP-Synthase beschrieben [69]. Es konnte gezeigt werden, dass CypD verschiedene posttranslationale Modifikationen erfährt und diese seine Funktion modulieren. Rasola *et al.* berichten, dass die Öffnung der mPTP in Krebszellen durch die Glykogensynthase-Kinase-3-abhängige Phosphorylierung von CypD verringert wird [70]. Auch eine Nitrosylierung scheint Einfluss auf die Funktion von CypD zu haben. Die Autorengruppe um T.T. Nguyen berichtete 2011, dass CypD an Cystein 203 eine S-Nitrosylierung erfährt und diese die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP erhöht [71].

Eine tragende Rolle von ANT und VDAC bei der Ausbildung der mPTP konnte allerdings in tierischen *knock out*-Modellen nicht nachgewiesen werden [72], [73]. Eine neuere Studie legt die Beteiligung eines Dimers der F_0F_1 -ATP-Synthase (Komplex V) bei der Ausbildung der mPTP nahe [69]. Bei Anwesenheit von anorganischem Phosphat (P_i) bindet CypD an die laterale Untereinheit OSCP der F_0F_1 -ATP-Synthase. Eine Folge davon ist, dass die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die ATP-Synthase verstärkt wird [74].

Da CypD die Öffnung der mPTP steuert, hat dieses Enzym direkten Einfluss auf den Zelltod mit positiven Folgen bei der Beseitigung von Krebszellen [75] und mit negativen Folgen für Gewebe nach temporärer Ischämie, zum Beispiel am Herzen [76].

In verschiedenen Studien war CypD Ziel für potentielle therapeutische Ansätze, z. B. in Modellen für Reperfusion nach einer Ischämie im Herzen. Um die Öffnung der Pore zu verhindern, wurde CypD mit CsA inhibiert. Die Bindung von CypD an Komplex V erhöht dessen Affinität für Ca^{2+} -Ionen, welche die Öffnung der mPTP triggern [74]. CsA inhibiert die Bindung von CypD an Komplex V, desensitiviert so die mPTP und verringert ihre Öffnungswahrscheinlichkeit. Diese Beobachtung wird durch Befunde gestärkt, die zeigen, dass in *Ppif*^{-/-}-Mäusen die Öffnung der mPTP nicht durch CsA inhibiert werden kann [77]. Die CsA-vermittelte Inhibierung der Öffnung der Pore durch reaktive Sauerstoffspezies und eine erhöhte Konzentration an Ca^{2+} -Ionen birgt jedoch ein Krankheitsrisiko [66]. Patienten, die nach einer Organtransplantation CsA zur Immunsupprimierung erhalten, haben ein erhöhtes Krebsrisiko. Man hat dies mit einer Unterdrückung der Apoptose in putativen Krebszellen durch Inhibierung der Öffnung der mPTP durch CsA interpretiert [75].

1.3 Morbus Alzheimer und das Peptid Amyloid $\beta(1-40)$ bzw. $(1-42)$

Morbus Alzheimer, oder Alzheimer'sche Krankheit (AD), ist eine primäre Demenz, die durch histologische Veränderungen des menschlichen Gehirns verursacht wird. Sie ist die häufigste Form der altersassoziierten Demenz mit einem Anteil von 60 % an der Gesamtanzahl an primären Demenzerkrankungen [78]. Die Krankheit wurde zum ersten Mal phänotypisch vom Arzt Alois Alzheimer (1864-1915) im Jahr 1907 beschrieben [79]. Alois Alzheimer sah eine Verbindung zwischen der von ihm beschriebenen präsenilen Form der Demenz und sogenannten senilen Plaques, die bereits 1892 in der grauen Substanz des Gehirns aufgefunden wurden [80]. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Stärkekörnern wurden diese proteinogenen Ablagerungen Amyloid-Plaques (abgeleitet von dem Wort Amylose für Stärke) genannt. Lange wurde von der Toxizität der Plaques als Ursache für die Gewebläsionen bei Morbus Alzheimer ausgegangen. Die Plaques bestehen im Wesentlichen aus Fibrillen der Peptide $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ [81], die proteolytische Spaltprodukte des APP sind. APP ist ein membranständiges Protein [82] mit derzeit noch nicht bekannter Funktion. Das codierende Gen heißt *APP* und ist auf Chromosom 21 lokalisiert [82]. APP wird in derzeit drei bekannten Isoformen, APP 695, APP 770 und APP 751, exprimiert, welche nach der Länge ihrer Aminosäuresequenz benannt sind. Unter diesen Isoformen wird APP 695 im Gehirn und im Nervengewebe exprimiert. APP wird membranständig durch die Endoproteasen α -, β - und γ -

Sekretase proteolytisch prozessiert. Die Spaltung durch β - und γ -Sekretase wird als amyloidogener Proteolyseweg bezeichnet, da durch diesen die Peptide $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ gebildet werden [83]. Diese gelten als primär pathogene Agenzien in der Ätiologie der Alzheimererkrankung.

Es gibt zwei Arten von Morbus Alzheimer, die altersassoziierte spontane Form der Erkrankung und die genetische Form der früheinsetzenden (*early onset*) Demenz, die sich bereits ab dem 30. Lebensjahr bei Patienten manifestieren kann. Diese früheinsetzende Form wird auch *Familial Alzheimer's Disease* (FAD) genannt. Bei den bisher beschriebenen Formen der FAD sind Punktmutationen in verschiedenen an der Genese der Krankheit beteiligten Genen beschrieben, wie z. B. Punktmutationen in *APP*, die zu einer erhöhten proteolytischen Spaltung von APP durch β - und γ -Sekretase oder zu verstärkt aggregierenden Formen von $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ führen [84]. Als Resultat führen diese genetischen Veränderungen zu erhöhten Konzentrationen von $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ im Plasma und einer erhöhten Bildung bzw. Ablagerung von senilen Plaques. Die Neurotoxizität der senilen Plaques wurde jedoch durch Ergebnisse der sogenannten „Nonnenstudie“ von Snowdon *et al.* in Frage gestellt. Die Studie zeigte, dass kognitive Einschränkungen und Plaques-Ablagerungen im Gehirn nicht kausal korrelieren [85]. Als putativ pathogene und neurotoxische $A\beta$ -Spezies gelten nun lösliche Oligomere, die durch verschiedene Assemblierungswege entstehen. Erste Untersuchungen zeigten bereits 1994, dass fibrillenfreie $A\beta$ -Lösungen auf Zellkulturen zytotoxisch wirken [86]. Lösliche und diffusible Oligomere von $A\beta(1-42)$ wirken neurotoxisch [87]. Dabei konnten die verwendeten $A\beta$ -Oligomere bereits nach kurzer Verweildauer auf Longitudinalschnitten von Mäusehirnen die *long term potentiation* (LTP) negativ beeinflussen.

In vivo werden durch die unterschiedliche Prozessierung von APP durch das Enzym γ -Sekretase verschiedene $A\beta$ -Peptidfragmente generiert, wobei die Fragmentlänge zwischen $A\beta(1-39)$ und $A\beta(1-42)$ variiert [88]. Ihre Rollen in der Genese von Morbus Alzheimer sind noch nicht vollständig geklärt. Erste Berichte belegen in den amyloiden Plaques von Neuriten vor allem $A\beta(1-42)$ [89]. In zerebrovaskulären Plaques wurde vor allem $A\beta(1-40)$ beschrieben. $A\beta(1-40)$ aggregiert weniger schnell als $A\beta(1-42)$ *in vitro* [90]. Der hydrophobe C-Terminus von $A\beta(1-42)$ beeinflusst die Aggregation. $A\beta(1-42)$ bildet schneller und in geringeren Konzentrationen Protofibrillen und Fibrillen als $A\beta(1-40)$ [90]. In Zellkulturexperimenten wurde $A\beta(1-42)$ als toxischer wirkend beschrieben als $A\beta(1-40)$ [91]. Ob dies bei der Ausbildung von Morbus Alzheimer eine wesentliche Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt. Für beide Peptide wurde eine Interaktion mit CypD beschrieben [92] und beide sind an der Genese von Morbus Alzheimer beteiligt [93]. Eine Rolle bei der Bildung von amyloiden Plaques spielt aber das Verhältnis von $A\beta(1-42)$ zu $A\beta(1-40)$ [94].

1.3.1 Assemblierung von $A\beta$ -Oligomeren und $A\beta$ -Fibrillen

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Amyloid-Fibrillen ist eine generelle Eigenschaft von vielen Peptiden und Proteinen. Die Neigung zur Fibrillierung hängt sehr stark von der Aminosäuresequenz des betreffenden Peptids oder Proteins ab. Sind hydrophobe Bereiche von Proteinen aufgrund falscher Faltung lösungsmittel exponiert, verringert dies die Löslichkeit und initiiert den Prozess der fibrillären Aggregation. Die ungefalteten Proteine lagern sich an den hydrophoben Bereichen zusammen und

fallen aus [95]. Die Fibrillierung wird von den physikochemischen Umgebungsbedingungen, wie unter anderem Salzkonzentration, pH-Wert und initialer Monomerkonzentration, beeinflusst [96]–[99]. Die Entstehung von Amyloid-Fibrillen im menschlichen Körper führt zur Bildung von Amyloidosen, die Proteinfehlfaltungserkrankungen sind. Es sind derzeit ca. 20 Amyloidosen bekannt und beschrieben, welche durch fibrilläre Ablagerungen, wie extrazelluläre Plaques oder intrazelluläre Einschlüsse, charakterisiert sind [100].

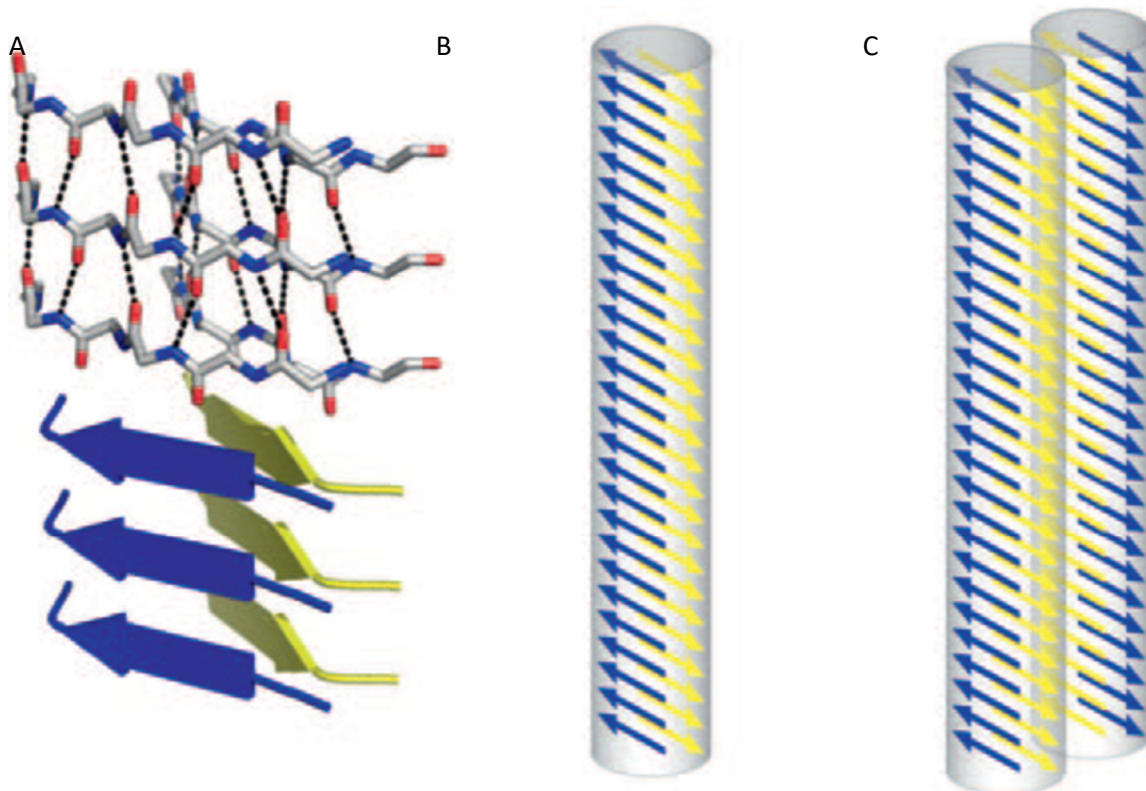


Abbildung 3 **Modell der Entstehung von Amyloidfibrillen** (aus [101] entnommen). Peptide lagern sich senkrecht zur Fibrillenachse zu intermolekularen β -Faltblattmotiven zusammen. Diese Struktur wird als *cross β -sheet* bezeichnet. Die A β -Monomere lagern sich sukzessive antiparallel aneinander und bilden so einen Aggregationskeim (Bild A), welcher zur Protofibrille heranreift (Bild B). Mehrere Protofibrillen lagern sich dann in gleicher räumlicher Orientierung zu einer reifen Fibrille zusammen (Bild C). Die reife Fibrille hat eine Länge von bis zu 1 μ M, eine Stärke von 10 bis 20 nm und besteht aus mehreren aneinander gelagerten Protofibrillen [102].

Die Bildung amyloidogener Fibrillen beginnt mit dem intermolekularen Aneinanderlagern von antiparallelen β -Strängen des Peptides. Dieser Prozess wiederholt sich, bis eine Protofibrille entstanden ist. Die entstandenen Protofibrillen können dann zu einer reifen Fibrille assemblieren (Abbildung 3) [101].

Kinetisch lassen sich diese Prozesse durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) an die β -Faltblätter der Amyloidaggregate beobachten, die zu einer Fluoreszenzerhöhung und einer Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums des Farbstoffes führt [103]. Es werden im Verlauf der Aggregationsreaktion drei Phasen unterschieden. Die fibrilläre Aggregation beginnt mit einer *Lag*-Phase, welche als Nukleationsphase interpretiert wird, in der sich Aggregationskeime bilden. Die Bildung von solchen Aggregationskeimen kann durch Salze, Schwermetalle und Verunreinigungen im

Reaktionsansatz beschleunigt werden. Die zweite Phase ist eine exponentielle Wachstumsphase. Diese ist durch ein schnelles Wachstum der Protofibrillen bzw. Zusammenlagerung von Protofibrillen zu reifen Fibrillen gekennzeichnet und durch einen exponentiellen Anstieg der ThT-Fluoreszenz charakterisiert. In der dritten Phase ist die Bildung von reifen Fibrillen abgeschlossen. Diese Phase ist stationär und der Endpunkt der fibrillären Aggregation. Reife A β -Fibrillen können eine Länge von mehr als 1 μ m haben und besitzen einen Durchmesser von 10 bis 20 nm [102]. Sie bestehen aus mehreren aneinander gelagerten Protofibrillen, welche wiederum aus intermolekularen β -Faltblättern bestehen. Diese sind senkrecht zur Fibrillenlängsachse angeordnet und bilden eine *cross β -sheet* genannte Struktur [104], [105]. Das *cross β -sheet* wird durch die den β -Strang bildenden Aminosäurereste, die sich im Zentrum (18-26) und am C-Terminus (31-42 bzw. 31-40) von A β befinden, ausgebildet [106]. Sowohl bei der *in vitro*-Bildung von Fibrillen als auch bei der Fibrillierung unter physiologischen Bedingungen *in vivo* entstehen Fibrillen mit unterschiedlicher Morphologie [107].

1.3.2 Der Einfluss von Faltungshelferproteinen auf die Bildung von Amyloid-Fibrillen

Für verschiedene Faltungshelferproteine, sowohl für PPlasen als auch für Chaperone, wurde gezeigt, dass sie in unterschiedlicher Weise die Bildung von Amyloidfibrillen, die in verschiedenen Amyloidosen eine Rolle spielen, beeinflussen können.

Für das Protein Tau (τ) wurde die Inhibierung der fibrillären Aggregation durch PPlasen der FKBP Familie gefunden. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das die Assemblierung des Zytoskelets orchestriert. Die Hyperphosphorylierung des helikalen τ -Filamentes verhindert den Einbau des Proteins in Mikrotubuli. Hyperphosphoryliertes τ -Protein fibrilliert und ist dann als neurofibrilläre Ablagerung (*tangles*) sichtbar [108]. Dies wird als eine der Ursachen für AD diskutiert.

Das prototypische FKBP FKBP12 inhibiert die Fibrillierung von τ -Fragmenten. PPlase-inaktive Varianten von FKBP12 zeigen diese antiaggregierende Eigenschaft nicht [109]. FKBP12 wird adhärent an τ -Protein-Ablagerungen in Neuronen von Alzheimer-Patienten gefunden [110]. Verglichen mit gesunden Probanden zeigen Alzheimer-Patienten eine wesentlich geringere Expression von FKBP12. Daher wird eine regulative Interaktion von FKBP12 mit τ -Protein vermutet [110].

Auch FKBP51 wirkt inhibierend auf die fibrilläre Aggregation von τ -Protein, wie in einem murinen Überexpressionsmodell für intrazelluläres τ -Protein gezeigt wurde. Die Überexpression von FKBP51 beschleunigte jedoch das Erscheinen von Alzheimer-assoziierten neurologischen Beeinträchtigungen in τ -transgenen Mäusen [111]. Als möglicher Mechanismus wird daher die Stabilisierung toxischer τ -Protein-Oligomeren durch FKBP51 vermutet.

Auch die zur Parvulin-Familie gehörende PPlase Pin1 interagiert mit τ -Protein, wie bei Alzheimer- und Parkinson-Patienten gezeigt werden konnte [112], [113]. Die beobachteten Effekte der Pin1/ τ -Interaktion sind dabei von der Erkrankung abhängig. Pin1 bindet spezifisch an hyperphosphoryliertes τ -Protein an das pThr231-Pro-Motiv. Diese Modifikation inaktiviert das τ -Protein, welches in der Folge nicht mehr an Mikrotubuli bindet. Pin1 vermittelt diese Bindung von phosphoryliertem τ -Protein an Mikrotubuli wieder und übt so eine neuroprotektive Funktion aus [107].

Chaperone der Hsp70-Familie inhibieren ebenfalls die fibrilläre Aggregation von τ -Molekülen und schützen Neuronen so vor Störungen des schnellen axonalen Transportes durch präfibrilläre Aggregate von τ -Protein [114].

Aggregiertes α -Synuclein bildet den Hauptbestandteil von aus Proteinablagerungen bestehenden Lewis-Körpern, einem Kennzeichen der neurodegenerativen Krankheit Parkinson. α -Synuclein wurde lange als intrinsisch unstrukturiertes Protein betrachtet. Neuere Daten über endogenes α -Synuclein zeigen jedoch die Ausbildung eines strukturierten Tetramers [115]. Pathologische Prozesse können zur fibrillären Aggregation von α -Synuclein in Neuronen führen.

Das in Neuronen exprimierte FKBP12 beschleunigt die Fibrillierung von α -Synuclein [116]. Der FKBP-Inhibitor FK506 kann die Fibrillenbildung in Anwesenheit von FKBP12 *in vitro* unterdrücken. Auch *per os*-Applikation von FK506 in Mausmodellen von Parkinson reduziert die Bildung von α -Synuclein-Aggregaten [117].

Die Fibrillierung von α -Synuclein wird außerdem durch Hsp90 moduliert. Das Chaperon Hsp90 ist ein Faltungshelferprotein, das in Anwesenheit von ATP die Bildung von Fibrillen und in Abwesenheit von ATP die Bildung von Oligomeren von α -Synuclein beschleunigt [118].

Die fibrilläre Aggregation von Stefin B, einem Modellprotein für die Bildung von Amyloid-Fibrillen, wird durch CypA dual moduliert. Zum einen verlängert CypA die *Lag*-Phase der Fibrillierung, zum anderen erhöht es die Menge an gebildeten Fibrillen [119]. Die Bedeutung der PPlase-Aktivität von CypA bei den initialen Schritten der Fibrillierung wird deutlich, weil eine PPlase-inaktive Variante von CypA die *Lag*-Phase unter Versuchsbedingungen nicht verlängert. Der Aminosäurerest Pro74 von Stefin B ist für die effiziente Fibrillierung des Proteins wichtig. Die Proteinvariante StefinB P74S fibrillierte im ThT-Assay bei 25 °C nach mehr als 500 Stunden, während der Wildtyp bereits nach ca. 50 Stunden Fibrillen bildete [119].

Auch die fibrilläre Aggregation von $A\beta(1-42)$ wird *in vitro* durch Hsp70 und Hsp90 in substöchiometrischen Verhältnissen ($\sim 1:50$) inhibiert [120]. Neuronale Zellen in Kultur, welche $A\beta(1-42)$ überexprimieren, zeigen eine hohe Mortalität und eine erhöhte Expression von Hsp70. Wird Hsp70 parallel in diesen Zellen überexprimiert, so haben sie eine signifikant verringerte Mortalität [121]. Dieser neuroprotektive Effekt von Hsp70 stellt einen potentiellen therapeutischen Ansatz dar. In Mausmodellen von AD konnte bereits ein positiver Einfluss von nasal appliziertem Hsp70 gezeigt werden [122]. Nach der Behandlung der transgenen Mäuse mit Hsp70 war deren Neuronendichte in betroffenen Hirnarealen erhöht und die Belastung mit Amyloid-Plaques verringert. Diese histologischen Befunde wurden durch verhaltensbiologische Experimente gestützt, in denen die verwendeten transgenen Tiere bessere Lernleistungen nach nasaler Applikation von Hsp70 zeigten als die unbehandelte Kontrollgruppe [122]. Andere Ansätze verfolgen den Einsatz von Hsp90- bzw. Hsp70-Inhibitoren, welche durch positive Feedbackschleifen die Expression der Chaperone erhöhen und so putativ neuroprotektiv wirken. Die Zugabe des Novobiocin-Analogen A4 zu kultivierten Neuronen induziert eine höhere Expression von Hsp90 und Hsp70 in den Zellen und schützt diese vor toxischen Effekten von $A\beta(1-40)$ [123].

Tabelle 1 Übersicht der derzeit bekannten Interaktionen von Faltungshelferenzymen mit zur Aggregation neigenden Peptiden bzw. Proteinen.

| Faltungshelfer | Substrat | Aggregation ^(a) | Bemerkung | Literatur |
|--|---------------------|--|--|----------------|
| CypA | Stefin B | Verlängerung der <i>Lag</i> -Zeit, Erhöhung der Fibrillenmenge | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung | [119] |
| FKBP12 | α -Synuclein | + | Inhibierbar mit FK506 | [117] |
| FKBP12 | Amyloid β | | FKBP12 akkumuliert in Fibrillen | [124] |
| FKBP12 | τ -Protein | - | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung | [109] |
| FKBP51 | τ -Protein | + | Inhibierbar mit FK506 | [111] |
| FKBP52 | α -Synuclein | + | Inhibierbar mit FK506 | [110], [117] |
| Pin1 | α -Synuclein | + | Bindung an hyperphosphoryliertes τ | [112], [113] |
| Pin 1 | APP | - | Pin1 isomerisiert die Bindung an pThr668-Pro in APP | [25] |
| Hsp40 | Poly-Glu-Proteine | - | | [125] |
| Hsp90 | α -Synuclein | + | ATP-abhängig | [118] |
| Hsp90 | α -Synuclein | - | Hsp90 interagiert mit α -Syn-Oligomeren | [126] |
| Hsp90 | τ -Protein | - | Mit FKBP51 | [111] |
| Hsp90 | Amyloid β | - | | [120] [127] |
| Hsp70 | τ -Protein | - | Hsp70 bindet an präfibrilläre Aggregate und schwach an Fibrillen | [114] |
| Hsp70 | Amyloid β | - | Intrazelluläre Expression von Amyloid β führt zu erhöhter Expression von Hsp70, überexprimiertes Hsp70 wirkt protektiv | [121] [120] |
| Hsp70 | Poly-Glu-Proteine | - | | [125] |
| sHsp (Hsp20, Hsp27, HspB8, α -Kristallin) | Amyloid β | - | | [128]–[130] |

^(a) (+) Beschleunigung der Aggregation durch den betreffenden Faltungshelfer, (-) Inhibierung der Aggregation durch den betreffenden Faltungshelfer

Kleine Hitzeschockproteine (sHsps) wie Hsp20, Hsp27, HspB2/B3 oder α -Crystallin wurden co-lokalisiert mit A β -Plaques in Gewebematerial von AD-Patienten gefunden. Bei *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass diese Hitzeschockproteine die Bildung von Fibrillen aus initial monomer vorliegendem A β (1-40) bzw. A β (1-42) inhibieren können. Als inhibierender Mechanismus wird die Stabilisierung der α -Helix-Struktur der Monomere bzw. die Inhibierung der Ausbildung von β -Faltblättern angenommen [128]–[130].

1.4 Die neurotoxische Interaktion von CypD und A β

Mitochondrien spielen in der Genese von Neuropathologien eine entscheidende Rolle. Im alternden Organismus akkumulieren Schäden der mtDNA in Mitochondrien. Diese Mutationen können unter anderem zu posttranslationalen Modifikationen von Proteinen der oxidativen Atmungskette des Mitochondriums führen [131]. Diese Modifikationen stören die Proteinfunktion und führen wiederum zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (NOS). Die entstandenen Radikale modifizieren posttranslational Proteine, stören die Homöostase und beeinträchtigen die zelluläre ATP-Produktion [132]–[134].

Zwischen mitochondrialer Dysfunktion und altersassoziierten Erkrankungen werden kausale Zusammenhänge vermutet. Krankheiten, die mit einer Veränderung der mitochondrialen Funktion in Zusammenhang gebracht werden, sind z. B. AD, Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose.

A β spielt eine wichtige Rolle in der Störung der Zellhomöostase, wobei noch nicht geklärt ist, über welchen Mechanismus seine Toxizität vermittelt wird. Intrazellulär produziertes A β wird über den *transporter of outer membrane* (TOM)-Komplex in neuronale Mitochondrien importiert und dort auch abgebaut [135]. Die physiologische Funktion von A β (1-40) in neuronalen Mitochondrien ist noch nicht bekannt. Beschrieben wurde bisher eine Vielzahl von Interaktionspartnern von A β in neuronalen Mitochondrien. Zum Beispiel wurde eine Bindung von APP und A β an der mitochondrialen ATP-Synthase gefunden [136]. Die Interaktion führt zu einer verringerten Bildung von extrazellulären ATP und könnte einen physiologischen Regulierungsmechanismus darstellen.

Wenn der Abbau von A β gestört ist, erhöht sich die Bildung von mitochondrialen ROS. Dies führt in der Folge zu einer gesenkten Widerstandsfähigkeit der Mitochondrien gegenüber Ca²⁺-induziertem Anschwellen [137]–[139]. Auch die Bildung von apoptotischen bzw. toxischen mitochondrialen NOS wird durch A β erhöht [140]. A β vermittelt seine Toxizität auch über die Interaktion mit mitochondrial lokalisierten Proteinen, wie zum Beispiel der A β -bindenden Alkohol-Dehydrogenase (ABAD). A β bindet an das aktive Zentrum von ABAD und inhibiert so seine Funktion [117]. Dies führt in der Folge u.a. zu einer erhöhten Bildung von ROS und einer verringerten Vitalität der Neuronen [118].

Im Jahr 2008 berichteten Du *et al.* über die Interaktion von A β und CypD [92]. Mäuse, welche einen genetischen mAPP-*Ppif*^{-/-}-Hintergrund hatten, zeigten im Gegensatz zu Tieren mit dem genetischen Hintergrund hAPP^{+/+} keine Beeinträchtigung ihrer Lern- und Merkleistung, wie zum Beispiel im Wasserlabyrinth-Test (*water maze test*). Tiere, welche systemische Gabe von CsA erhielten, zeigten denselben Phänotyp wie transgene Tiere mit einem mAPP-*Ppif*^{-/-}-Genotyp. Es wurde auch gezeigt,

dass die Mitochondrien des *Ppif*^{-/-}-Genotyps besser gegen den von A β induzierten oxidativen Stress geschützt sind.

Mit *surface plasmon resonance* (SPR) wurden die Interaktionen von CypD mit monomerem und oligomerem A β (1-40) analysiert, wobei sich K_D-Werte von 1,7 μ M für monomeres bzw. von 227 nM für oligomeres A β (1-40) ergaben [92]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Interaktion von CypD mit A β direkt Apoptose einleiten kann. Akut isolierte und kultivierte murine Neuronen von Wildtypmäusen und transgenen (*Ppif*^{-/-}) Mäusen wurden mit A β (1-42) inkubiert und ihre Vitalität gemessen. Neurone von *Ppif*^{-/-}-Mäusen erweisen sich als robuster und vitaler als Neurone mit *Ppif*^{+/-}-Genotyp. Wenn mAPP-Zellen (Überexpressionsmodell von murinem APP) gleichzeitig mit CsA inkubiert wurden, zeigten sie eine ähnlich geringe Mortalität wie Neuronen mit dem mAPP-*Ppif*^{-/-}-Genotyp. Die Kapazität der Ca²⁺-Aufnahme ist in mAPP-Mitochondrien wesentlich verringert und ihre osmotisch verursachte Schwellung größer als in mAPP-*Ppif*^{-/-}-Mitochondrien. Auch die A β -induzierte Produktion von ROS war in in mAPP-*Ppif*^{-/-}-Zellen signifikant geringer als in mAPP-Zellen.

Die Störung des axonalen mitochondrialen Transports gilt als einer der Gründe für eine verringerte Plastizität von neuronalen Synapsen und der verringerten Lern- und Gedächtnisleistung in AD-Modellen [142]. A β -induzierte ROS modulieren den für den neuroaxonalen Transport von Mitochondrien wichtigen Signalweg über die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38. Die genetische Deletion von CypD verbessert die Motilität und den axonalen Transport von neuronalen Mitochondrien [143]. CypD-Defizienz wirkt protektiv gegen A β -induzierte Beeinträchtigungen des PKA/CREB-Signalweges in Neuronen. Dieser Signalweg ist wichtig bei der synaptischen Signalverarbeitung [144]. Zellen mit einem *Ppif*^{-/-}-Genotyp sind besser gegen ROS vermittelte Beeinträchtigung von Proteinkinase A geschützt.

1.5 Ziele und Aufgabenstellung der Dissertation

Die Beteiligung von CypD an biologischen und pathologischen Vorgängen ist in der Literatur vielfältig dargestellt. Besonders seine Rolle bei der Genese von Morbus Alzheimer und seine Interaktion mit dem A β -Peptid sind von Interesse. Die Interaktion anderer Faltungshelfer mit zur Aggregation neigenden Peptiden bzw. Proteinen werfen die Frage nach einem generellen Mechanismus zur Inhibierung der fibrillären Aggregation auf. Dazu finden sich in der Literatur bisher keine Daten. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die physikalische Interaktion von A β (1-40) mit CypA bzw. CypD untersucht werden. Die Bindestelle im Peptid und in CypD sollte identifiziert und der Einfluss der Interaktion auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) beleuchtet werden.

2 Materialien

2.1 Verwendete Antibiotika, Antikörper, Chemikalien und Enzyme

| | |
|--|---|
| Acetonitril | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| Agar-Agar | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| Ampicillin-Natriumsalz | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| ¹⁵ N-Ammoniumchlorid | Isotec™, Sigma-Aldrich Co. LLC, 3050 Spruce St., St. Louis, Missouri 63103, USA |
| Ammoniumpersulfat | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg, D |
| Anti-A β -Antikörper, monoklonal | Klon WO-2 Millipore Corporation, 28820 Single Oak Drive, Temecula, CA, USA |
| Anti-Maus-IgG-Antikörper, polyklonal | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Borsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| CellTiterBlue® Cell Viability Assay | Promega GmbH, High-Tech-Park, Schildkrötstraße 15, 68199 Mannheim, D |
| Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat | Honeywell Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze, D |
| Coomassie-Brillant-Blau G-250 | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg, D |
| Coomassie-Brillant-Blau R-250 | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg, D |
| Cyclosporin A | LC Laboratories, 165 New Boston Street, Woburn, MA 01801, USA |
| Cyclosporin H | LC Laboratories, 165 New Boston Street, Woburn, MA 01801, USA |
| Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat | Honeywell Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze, D |
| Dithiothreitol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| DMEM | PAA, Pasching, A, jetzt GE Healthcare Life Sciences |
| Dimethylsulfoxid, Uvasol® | Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64271 Darmstadt, D |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Essigsäure (96 %) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Ethanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Eisen(III)-citrat | Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64271 Darmstadt, D |
| Fetales Rinderserum | Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64271 Darmstadt, D |
| ¹³ C-Glucose | Isotec™, Sigma-Aldrich Co. LLC, 3050 Spruce St., St. Louis, Missouri 63103, USA |
| Glycerin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Glycin | MP Biomedicals LLC., Parc d'Innovation, BP 50067 Illkirch, Frankreich |
| Hefeextrakt | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg, D |
| HEPES | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| HindIII | New England BioLabs GmbH, Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt am Main, D |
| Kanamycin-Sulfat | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| Kaliumchlorid | Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, D |
| Lithiumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Magnesiumchlorid | Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64271 Darmstadt, D |

| | |
|---|--|
| Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Methanol | VWR International LLC, P.O. Box 6660 100 Matsonford Road Radnor, PA 19087, USA |
| Natriumchlorid | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Dinatriummolybdat-Dihydrat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Natriumselenit | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| <i>Ndel</i> | New England BioLabs GmbH, Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt am Main, D |
| Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Phusion™ DNA Polymerase | New England Biolabs GmbH, Brüningstr. 50, Geb. B852, 65926 Frankfurt a.Main, D |
| PIC complete EDTA free™ | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| Polyacrylamid-Bisacrylamid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Rotiphorese 30 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Rinderserumalbumin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Salzsäure (36 %) | VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt |
| SDS | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg, D |
| TEMED | Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| Tricin | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg, D |
| Tris | AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt, D |
| Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro- ruthenium(II) Hexahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Tween™ 20 | SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg, D |
| T4-DNA-Ligase | New England Biolabs GmbH, Brüningstr. 50, Geb. B852, 65926 Frankfurt a.Main, D |
| Trypsin | New England Biolabs GmbH, Brüningstr. 50, Geb. B852, 65926 Frankfurt a.Main, D |
| Thrombin, Restriction Grade | Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, D |
| Wasserstoffperoxid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim, D |
| Zinksulfat-Heptahydrat | Honeywell Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze, D |

Das CsA-Derivat MM258 wurde von Herrn Dr. Miroslav Malešević (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2 Zubehör und Geräte

| | |
|--|--|
| Agarose-Gel-Apparatur | BIOTEC-FISCHER GmbH, Daimlerstr. 6, 35447 Reiskirchen, D |
| ÄKTAprime-plus-System | GE Healthcare, Little Chalfont, UK |
| BioTrace™- Nitrocellulosemembran | Pall Corporation, Pensacola, USA |
| Circulardichroismus-Spektrometer J-710 | JASCO Labor- und Datentechnik GmbH, Robert-Bosch-Str.11, 64823 Gross-Umstadt; D |
| Diodenarray-Spektrophotometer HP 8452A | Hewlett Packard, USA |
| Eppendorf Mastercycler | Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, D |
| Formvar/Carbon 200 mesh, Copper Grids | Ted Pella Inc., Redding, CA 96049-2477, USA |

| | |
|--|--|
| Fraktionssammler RediFrac | Pharmacia Biotech, Uppsala, S |
| Hochdruckaufschlusssystem TS0.75kW | Constant Systems Ltd. Low March, Daventry, Northants, NN11 4SD, UK |
| GenElute™ Plasmid-Miniprep-Kit | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D |
| FluoroMax-2 Spektralfluorimeter | HORIBA Jobin Yvon GmbH, Neuhofstrasse 9, 64625 Bensheim, D |
| Heraeus Fresco 21 Kühlzentrifuge | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Heizblock/Blockthermostat HBT130 | Digital Biomedical Imaging Systems AG, Freiburger Str. 3, 75179 Pforzheim, D |
| Laborschüttler KS 260 basic | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Janke & Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen, D |
| Magnetrührer MR3001 | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, D |
| Minigel-Twin | Biometra GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 30, 37079 Göttingen, D |
| Multifuge 3 S-R Heraeus | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Multimode-Mikroplatten-Reader FluoStar | BMG LABTECH GmbH, Allmendgrün 8, 77799 Ortenberg, D |
| Multimode-Mikroplatten-Reader Synergy™ HT | BioTek, USA |
| Peristaltikpumpe P1 | Pharmacia LKB-Produkte AB, Box 305, S-16126 Bromma, S |
| Photospektrometer NanoDrop 2000™ | ThermoScientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Plattformschüttler Polymax 1040 | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, D |
| Power Pack P25 Low Voltage Power Supply | Biometra GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 30, 37079 Göttingen, D |
| Rotilabo®-Spritzenfilter, PES, steril, 0,22 µM | Carl Roth GmbH+Co.KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, D |
| RTE-111 Refrigerated Bath Chiller Circulator | NESLAB™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA |
| Spektrophotometer LKB Novaspec II | Amersham Biosciences, Munzinger Str. 9, 79111 Freiburg, D |
| Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstraße 164, 80939 München, D |
| Thermomixer comfort™ | Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, D |
| UV-Detektor Uvicord SII | Pharmacia LKB-Produkte AB, Box 305, S-16126 Bromma, S |
| VP-ITC | MicroCal Inc., 6025 Scott Way Commerce, CA 90040, USA |
| Xpress Micro Dialyzer Cartridge 6-8 kDa | Scienova™ GmbH, Wildenbruchstraße 15, 07745 Jena, D |
| 96-Well-Microplatte µCLEAR®, Non-Binding | Greiner Bio-One GmbH, Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen, D |

2.3 Verwendete Chromatographiesäulen und -materialien

| | |
|---|---|
| <i>Affi-Blue™</i> | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D |
| Benzamidine Sepharose® 6B | Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S |
| <i>Fraktogel EMD-DEAE-650(M)</i> | Merck, Darmstadt, D |
| <i>Fraktogel EMD-SO³-650(M)</i> | Merck, Darmstadt, D |
| Nickel-Chelating-Agarose | Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri 63103, USA |
| <i>Superdex™ 75</i> | GE Healthcare Bio-Sciences AB, SE-751 84 Uppsala, S |
| <i>Vydac® 208TP C8 Reversed-Phase-Säule</i> (250 mm x 4,6 mm, 5 µM, 300 Å) | Grace, Deerfield, IL 60015, USA |

2.4 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und wässrige Lösungen wurden mit entionisiertem H₂O hergestellt.

Tabelle 2 Verwendete Zellkulturmedien, Puffer, Stamm- und Reaktionslösungen

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|---|---|
| Agarnährmedium | 5 g/l Hefextrakt; 10 g/l Pepton; 10 g/l NaCl; 20 g/l Agar; autoklaviert |
| Ampicillin-Stammlösung | 100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz; steril filtriert |
| Blockierpuffer (Western Blot) | 5 % (w/v) BSA; TBT |
| Coomassie-Entfärbelösung | 45 % (v/v) Ethanol; 10 % Essigsäure (96%) |
| Coomassielösung | 2,4 mM Coomassie-Brillant-Blau R-250; 0,59 mM Coomassie-Brillant-Blau G-250; 10 % (v/v) Essigsäure (96 %); 30 % (v/v) Methanol; 17,5 % (v/v) Ethanol |
| Kanamycin | 100 mg/ml Kanamycin-Sulfat, steril filtriert |
| LB-Medium | 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Pepton; 10 g/l NaCl; autoklaviert |
| Lysepuffer | 20 mM Tris; pH 8,0 (HCl); 1 Tablette Proteaseinhibitor complete EDTA free TM auf 100 ml |
| Messpuffer für ITC, ThT-Fluoreszenz- und PPIase-Assay | 35 mM HEPES pH 7,8 (NaOH) |
| Messpuffer für NMR | 35 mM HEPES pH 7,8 (NaOH); 10 % D ₂ O |
| M9-Minimalmedium (5x) | 85 g/l Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O; 15 g/l KH ₂ PO ₄ ; ?? g/l ¹⁵ NH ₄ Cl |
| Probenpuffer SDS-PAGE | 65 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 5 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol |
| PPIase-Assay-Puffer | 35 mM HEPES; pH 7,8 (KOH) |
| Sammelgelpuffer | 1,25 M Tris; pH 6,8 (HCl) |
| Trenngelpuffer | 1,8 M Tris; pH 8,8 (HCl) |
| Transferpuffer | 25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol; pH 8,3 (HCl) |
| Puffer A | 20 mM Tris; 0,5 M NaCl; pH 7,5 (HCl) |
| Puffer B | 10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl ₂ ; 150 mM KCl; 1 mM DTT; pH 7,8 (KOH) |
| TBT | 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,2 % (v/v) Tween 20 |
| TS-2-Lösung | 100 mg/l ZnSO ₄ *7H ₂ O; 30 mg/l MnCl ₂ *4H ₂ O; 300 mg/l H ₃ BO ₃ ; 200 mg/l CoCl ₂ *6H ₂ O; 20 mg/l NiCl ₂ *6H ₂ O; 10 mg/l CuCl ₂ *2H ₂ O; 900 mg/l Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O; 20 mg/l Na ₂ SeO ₃ ; steril filtriert |

2.5 Expressionsvektoren

Tabelle 3 Verwendete Vektoren für die heterologe Expression der untersuchten Proteine

| Vektor | Resistenz | Insert | kodiertes Protein | Herkunft |
|--------|------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| pet28a | Kanamycin | <i>PPIF</i> | CypD (30-207) | Interne Stammsammlung |
| pQE70 | Ampicillin | <i>PPIA</i> | CypA | Interne Stammsammlung |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 PCR und Sequenzierung

DNA wurde mit *Pfu*-Polymerase nach Herstellerangaben in einem Eppendorf Mastercycler amplifiziert. Alle PCR-Reaktionen erfolgten mit dem folgenden Programm: Denaturierung bei 95 °C über 1 min, gefolgt von *primer annealing* bei 60 °C für 1 min und der Elongation der DNA bei 68 °C für 2 min. Die PCR-Schritte wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Der Erfolg von Mutagenesen wurde durch DNA-Sequenzierung (Eurofins, Ebersberg, D) überprüft.

3.1.2 Ortsspezifische Mutagenese von CypD

Die Varianten von CypD wurden mittels ortsspezifischer (*Quick change*) Mutagenese nach Protokoll des Herstellers des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) generiert. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 4 für alle Varianten aufgeführt. Das mutierte Codon ist hervorgehoben. Der Erfolg der Mutagenesen wurde durch DNA-Sequenzierung (Eurofins, Ebersberg, D) überprüft.

Tabelle 4 Übersicht aller Primer zur Generierung der verwendeten CypD-Varianten

| Variante | Sequenz der <i>forward primer</i> (5´-3´) ^a | Sequenz der <i>reverse primer</i> (5´-3´) ^a |
|----------|--|--|
| T94A | AAAGGCTCC <u>GC</u> CTTCCACAGG | CCTGTGGAAG <u>GC</u> GGAGCCTTT |
| R97A | CTCCACCTTCCAC <u>GC</u> GGTGATCCCTTCC | GGAAGGGATCAC <u>GC</u> CGTGGAAGGTGGAG |
| F102A | GTGATCCCTTCC <u>GC</u> GATGTGCCAGGCG | CGCCTGGCACAT <u>CG</u> CGGAAGGGATCAC |
| Q105T | CTTCCTTCATGTGC <u>ACC</u> GCGGGCGACTTCAC | GTGAAGTCGCCCG <u>CG</u> GTGCACATGAAGGAAG |
| G114A | AACCACAAT <u>GCC</u> CACAGGCGGG | CCCGCCTGT <u>GCC</u> ATTGTGGTT |
| G117A | GGCACAGG <u>CG</u> GAAGTCCATC | GATGGACTT <u>CG</u> CGCCTGTGCC |
| K133I | CTTTACTGAT <u>TTC</u> ACGTGGGGCC | GGCCCCACGTGA <u>ATC</u> AGTGTAAG |
| W163A | AAGACAGAC <u>CG</u> TTGGATGGC | GCCATCCAAC <u>CG</u> CTGTCTT |

^aDas mutierte Codon ist unterstrichen

3.2 Proteinpräparation und Analytik

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen zur Expression rekombinanter Proteine

Zur Anzucht der Expressionsklone wurden Schüttelkolben mit 1 l LB-Medium mit 50 ml einer BL21 *E. coli*-Übernachtskultur inokuliert und 1 ml der Ampicillin- bzw. der Kanamycin-Stammlösung zugegeben. Das Wachstum der Zellen (37 °C, geschüttelt 180 U/min) wurde stündlich über die

optische Dichte (OD) der Zellsuspension bei 600 nm mit einem Spektrophotometer geprüft. Bei einem OD-Wert größer 0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml einer 1 M IPTG-Stammlösung zu 1 l LB-Medium. Nach 4 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 3000 g, 4 °C) geerntet.

3.2.2 Kultivierung von *E. coli*-Zellen zur Expression von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem CypD

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertes CypD wurde in M9-Minimalmedium mit 0,2 % TS2-Lösung und 2 % Glucose exprimiert. Um einen Liter einfaches M9-Minimalmedium/TS2 herzustellen, wurden zu 200 ml von fünffachen M9-Minimalmedium zusätzlich 2 ml TS2-Lösung, 20 ml einer 20 % (w/v) ^{13}C -Glucoselösung (steril filtriert), 1 % 10 mM Fe(III)-citrat, 1 % 0,1 M CaCl_2 gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C bei 200 U/min kultiviert. Die 1 l Schüttelkolben wurden mit 50 ml Vorkultur inokuliert. Die Vorkultur wurde in einem Volumen von 50 ml über Nacht bei 37 °C und 200 U/min kultiviert.

3.2.3 Aufschluss der Zellen zur Proteinreinigung

Das Pellet der *E. coli*-Zellen wurde in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und anschließend mit einem Hochdruckaufschlusssystem aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zelllysate zentrifugiert (45 min, 15000 g, 4 °C) und der lösliche Überstand weiterverwendet.

3.2.4 Reinigung von CypA

Der lösliche Überstand des Zelllysates von *E. coli*-Zellen, die CypA rekombinant exprimiert haben, wurde durch eine Peristaltikpumpe auf eine *Fraktogel EMD-DEAE-650(M)*-Säule (Merck, D), an welche eine *AffiBlue*TM-Säule (Bio-Rad Laboratories, D) gekoppelt war, gegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Sowohl die DEAE- als auch die *AffiBlue*TM-Säule waren mit 20 mM Tricine pH 8,0 äquilibriert. Nach Proteinauftrag wurden die Säulen entkoppelt. Mit einem Kaliumchloridgradienten (0-3 M in 20 mM Tricine pH 8,0) wurde CypA von der *AffiBlue*TM-Säule eluiert und fraktioniert aufgefangen (RediFrac, Pharmacia Biotech). Die Fraktionen, die CypA enthielten, wurden zusammengeführt und auf eine *Fraktogel EMD-SO³-650(M)*-Säule (Merck, D) aufgetragen, die mit 10 mM HEPES pH 7,5 äquilibriert war. Am Säulenmaterial gebundenes CypA wurde mit einem Natriumchloridgradienten (0-1 M in 10 mM HEPES pH 7,5) eluiert und fraktioniert aufgefangen. Die Fraktionen, die CypA enthielten, wurden zusammengeführt und mit einer *Spin Column (Amicon® Ultra-15, Ultracel®-10K)* bei 3000 g in einer Zentrifuge (*Multifuge 3 S-R*, Heraeus) mit Ausschwenkrotor eingeeengt. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie mit einer *Superdex 75*-Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, S) an einem *ÄKTAprime*-System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, S) mit Puffer B. Der Durchlauf wurde fraktioniert aufgefangen und die CypA enthaltenden Fraktionen zusammengeführt.

3.2.5 Reinigung von His₆-CypD und seiner Varianten

Der lösliche Überstand des Zelllysates von *E. coli*-Zellen, die His₆-CypD rekombinant exprimiert haben, wurde durch eine Peristaltikpumpe auf eine DEAE-Säule, an welche eine *AffiBlue*TM-Säule

gekoppelt war, gegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Sowohl die DEAE- als auch die *AffiBlue*[™] - Säule waren mit 20 mM Tris pH 7,5 äquilibriert. Nach Proteinauftrag wurden die Säulen entkoppelt. Mit einem Kaliumchloridgradienten (0-2 M in 20 mM Tris pH 7,5) wurde (His)₆-CypD von der *AffiBlue*[™]-Säule eluiert und fraktioniert aufgefangen (*RediFrac*, Pharmacia Biotech). Die Fraktionen, die His₆-CypD enthielten, wurden zusammengeführt und auf eine Nickel-Chelating-Agarose-Säule aufgetragen. An Säulenmaterial gebundenes (His)₆-CypD wurde mit einem Imidazolgradienten (0-200 mM, Puffer A) eluiert und fraktioniert aufgefangen. Die Fraktionen, die His₆-CypD enthielten, wurden zusammengeführt und mit einem Konzentrationsröhrchen (*Amicon*[®] *Ultra-15*, *Ultracel*[®]-10K) bei 3000 g in einer Zentrifuge (*Multifuge 3 S-R*, Heraeus) mit Ausschwenkrotor eingengt. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie (*ÄKTAprime*, *Superdex 75*) mit Puffer B. Der Durchlauf wurde fraktioniert aufgefangen und die His₆-CypD enthaltenden Fraktionen zusammengeführt.

Die vereinigten Fraktionen wurden mit einem Konzentrationsröhrchen (*Amicon Ultra-15* Zentrifugen-Filtereinheiten, Merck Millipore) bis zu einer Konzentration von 700 µM (His)₆-CypD konzentriert. Anschließend wurde der (His)₆-Tag proteolytisch mit 0,5 u/ml Thrombin für 4 h bei Raumtemperatur abgespalten. Das Thrombin-CypD-Gemisch wurde mit 100 µl Benzamidin-Sepharose 6B-Suspension bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die Benzamidin-Sepharose 6B-Suspension wurde mit einer Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand mit CypD entnommen und weiterverwendet.

3.2.6 Expression oder Synthese der verwendeten Peptide

Das für alle Experimente verwendete humane Aβ(1-40) wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Marcus Fändrich (Institut für Proteinbiochemie der Universität Ulm) heterolog exprimiert und gereinigt und anschließend in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Es wurde bis zu einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst.

Das Peptid Aβ(16-20) wurde von Herrn Dr. Christian W. Beyer (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) synthetisiert und bereitgestellt.

Das CsA-Derivat MM258 wurde von Herrn Dr. Dr. Miroslav Malešević (Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) synthetisiert und bereitgestellt.

3.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von Laemmli durchgeführt [145]. Es wurden 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung des Trenngels bzw. des Sammelgels ist in Tabelle 4 bzw. Tabelle 5 dargestellt. Alle mittels SDS-PAGE untersuchten Proben wurden zuvor 5 min bei 95 °C in Probenpuffer denaturiert. Es wurde 20 µl Probenvolumen auf das Sammelgel aufgetragen. Die Proben wurden nach dem Erreichen des Trenngels mit einer Stromstärke von 30 mA für 60 min getrennt.

Tabelle 5 Pipettierschema für ein SDS-PAGE-Trenngel (10 cm · 10 cm · 1,5 mm)

| Reagenz/% | 12,5 % | 15 % |
|--------------------|----------|----------|
| Rotiphorese Gel 30 | 3,125 ml | 3,725 ml |
| H ₂ O | 2,625 ml | 2 ml |
| Trenngelpuffer | 1,5 ml | 1,5 ml |
| SDS | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 4 µl | 4 µl |
| APS | 25 µl | 25 µl |

Tabelle 6 Pipettierschema für ein SDS-PAGE-Sammelgel

| Reagenz | Rotiphorese Gel 30 | H ₂ O | Sammelgelpuffer | SDS | TEMED | APS |
|---------|-----------------------|------------------|-----------------|-------|--------|-------|
| Volumen | 0,8 ml | 3,6 ml | 0,5 ml | 50 µl | 2,5 µl | 20 µl |

3.2.8 Coomassiefärbung von SDS-PAGE-Gelen

SDS-Polyacrylamidgele wurden für ca. 60 min mit einer Coomassielösung auf einem Schwenkinkubator gefärbt und anschließend mehrfach mit Entfärberlösung entfärbt bis klar erkennbare Proteinbanden auf einem Lichttisch zu sehen waren.

3.2.9 Western Blot

Proteine in SDS-PAGE-Gelen wurden im *Semi Dry*-Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die verwendete Stromdichte für den Elektrotransfer betrug 1,5 mA/cm². Nach dem Transfer wurde die Blotmembran für mindestens 4 h mit Blockierlösung bedeckt und anschließend mit primärem Antikörper aus einer Stammlösung (1:1000) für 2 h bei RT auf einem Plattformschüttler unter kontinuierlichem doppelorbitalen Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Blotmembran fünfmal für 5 min mit TBT gewaschen und anschließend mit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch fünffaches Waschen mit TBT für jeweils 5 min bei RT entfernt. Die Detektion von gebundenem Antikörper erfolgte durch Chemilumineszenz mit *ECL Western Blot*-Detektionsreagenz an einer *charge coupled detector*-Kamera (*ChemiSmart 5000*, PeqLab Biotechnologie GmbH, D).

3.2.10 HPLC

Die gereinigten Peptide und Proteine wurden für massenspektrometrische Untersuchungen mittels HPLC-Säulenchromatographie gereinigt. Die verwendeten Laufmittel waren Wasser (0,1 % TFA) und Acetonitril (0,1 % TFA). Es wurde ein Wasser-Acetonitril-Gradient von 5 % bis 100 % Acetonitril in

30 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt. Alle Läufe wurden mit einer *Grace Vydac® 208TP C8 Reversed Phase*-Säule durchgeführt.

3.2.11 Bestimmung der PPIase-Aktivität von CypA, CypD und CypD-Varianten

Die Aktivität der gereinigten Enzyme wurde durch isomerspezifische Proteolyse (ISP) bestimmt [146], [147]. Alle Messungen wurden an einem Diodenarray-Spektrophotometer *HP 8452A* (Hewlett Packard, USA) durchgeführt. Als Substrat wurde *Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid* verwendet, welches als 30 mM Stammlösung in 0,5 M LiCl/TFE gelöst wurde. In den Messansatz wurde das Substrat im Verhältnis zum Messvolumen 1:1000 zugegeben. Für die ISP-Reaktion wurde bovines α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) in einer Konzentration von 17 μ M verwendet. Es wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 10 °C und unter ständigem Rühren gemessen. Die aufgezeichneten Kinetiken wurden mit dem Programm *H89531A UV/VIS Operating Software* für MS-DOS 5.0 ausgewertet. Die Inhibition der CypD-Aktivität durch von A β abgeleiteten Peptiden wurde mit einem proteasefreien Fluoreszenzassay bestimmt [148], [149]. Als Substrat wurde *Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* in einer 30 mM Stammlösung verwendet. Alle Inhibitionsmessungen wurden mit einem *FluoroMax-2* Spektralfluorimeter aufgezeichnet und anschließend mit der Software *SigmaPlot™* 11.0 ausgewertet. Die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion ergibt sich aus Formel 1. Die katalytische Effizienz wurde mit Hilfe des ermittelten k_{enz} (siehe Formel 1) als k_{cat}/K_M -Wert angegeben und unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nach Formel 2 berechnet.

Formel 1

$$k_{enz} = k_{obs} - k_0$$

Formel 2

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{enz}}{[E]}$$

k_{enz} : Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion

k_{obs} : apparente Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion

k_0 : Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion

k_{cat} : Wechselzahl

K_M : Michaelis-Menten-Konstante

$[E]$: Enzymkonzentration

3.2.12 Inhibierung der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen durch CsA und CsA-Derivate

Um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von CsA und der verwendeten CsA-Derivate zu bestimmen, wurden ISP-Messungen (siehe 3.2.11) mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. Zur Bestimmung des charakteristischen IC_{50} -Wertes wurden die gemessenen k_{enz} -Werte gegen die Inhibitorkonzentration grafisch aufgetragen. Zur Berechnung des IC_{50} -Wertes wurde *SigmaPlot™* Version 12.3 verwendet (siehe Formel 3).

Formel 3

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{n_H}}$$

n_H : Hill-Koeffizient (=1)

IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration

y_{max} : maximaler k_{enz} -Wert

y_{min} : minimaler k_{enz} -Wert

3.2.13 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) durchgeführt.

Zur Analyse der molekularen Masse der verwendeten Peptide und Proteine wurden die Massenspektren mit einem ESI-Q-TOF2 Massenspektrometer (Waters, Manchester, Großbritannien) aufgezeichnet. Das Gerät ist mit einer *Nanospray*TM-Quelle ausgestattet. Die Proben wurden über einen Picotip (New Objective, Cambridge, MA, USA) mit einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, MA, USA) injiziert. Die Flussrate betrug 300 nl/min. Die Dekonvolution der mehrfachgeladenen Ionen zum einfach geladenen Zustand erfolgte mit dem Software-Algorithmus MaxEnt1 (Waters, Manchester, Großbritannien).

3.2.14 Peptide SPOT Arrays der Interaktionsstelle von CypD/A β (1-40)

Um die Bindestelle von CypD in A β (1-40) zu bestimmen, wurden Peptidarrays verwendet, die mittels Spot-Synthese nach Frank [150] erzeugt wurden. Es wurden Peptidfragmente von humanem A β (1-40) mit einer Länge von 13, 12, 11, 10, usw. bis 6 Aminosäuren auf einer Zellulosemembran (Whatman 540 Zellulosemembran) über einen β -Alanin-Dimer-Anker C-terminal kovalent gekoppelt synthetisiert. Die Peptide überlappten in der A β (1-40)-Sequenz jeweils um eine Position. So wurde die gesamte Sequenz von humanem A β (1-40) abgebildet. Die Synthese erfolgte mit einem Pipettierroboter (Abimed GmbH, DE). In jedem Syntheseschritt wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren verwendet. Die Aminosäuren lagen als voraktivierte Pentafluorphenylester für die Kopplungsreaktion vor. Nach jedem Kopplungsschritt wurden die Aminosäuren mit Acetanhydrid blockiert und anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % (v/v) Piperidin in Dimethylformamid entfernt. Die Seitengruppen waren jeweils mit Pbf (Arginin), Trt (Asparagin, Glutamin, Histidin, Cystein), tBu (Threonin, Tyrosin, Serin), OtBu (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und Boc (Lysin, Tryptophan) geschützt. Diese Schutzgruppen wurden am Schluss der Peptidsynthese mit 50 % (v/v) TFA in Dichlormethan entfernt. Die Zellulosemembran wurde getrocknet und konnte gelagert werden.

Vor der Inkubation mit Protein wurde die Zellulosemembran gründlich mit Wasser und TBT gewaschen. Anschließend wurde sie mit 1 μ M CypD in TBT für 4 h bei RT auf einem Plattformschüttler inkubiert. Nicht gebundenes CypD wurde durch Waschen mit TBT (3 mal je 5 min, RT) entfernt. Die Membran wurde mit einem *Trans-Blot*[®] *SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories GmbH, D) auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (0,85 mA/cm², 90 min).

Die Nitrozellulosemembran wurde mit 3 % Milchpulver (m/v) in TBT blockiert (2 h, RT). Anschließend wurde sie mit einem polyklonalen Anti-CypA-Antikörper in 3 % Milchpulver (1:1000, 2 h, RT) inkubiert und danach 3 mal 10 min mit TBT gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der primäre Antikörper wurde mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert. Der ungebundene sekundäre Antikörper wurde wie oben beschrieben entfernt. Die Detektion von gebundenem Antikörper erfolgte durch Chemilumineszenz mit *ECL Western-Blot*-Detektionsreagenz an einer *charged coupled device*-Kamera (*ChemisSmart 5000*, PeqLab Biotechnologie GmbH, D).

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Peptiden und Proteinen

Die Konzentration der eingesetzten Proteine bzw. Peptide wurde an einem Absorptionsspektrometer (*JASCO V-660* oder *NanoDrop™*) bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgte nach Gill und von Hippel [151].

Die Protein- und Peptidkonzentration in Lösung wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet (Formel 4).

Formel 4

$$E_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot d$$

$E_{(\lambda)}$: Absorbanz des Materials für Licht der Wellenlänge λ

$\varepsilon_{(\lambda)}$: Extinktionskoeffizient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c : Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

d : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Eingesetzte Extinktionskoeffizienten:

$$\varepsilon_{(280)\text{CypA}} = 8480 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{(280)\text{CypD}} = 9970 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{(257)\text{KLVFF}} = 394 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{(257)\text{A}\beta(1-40)} = 1490 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Für NMR-Messungen wurde das lyophilisierte Pentapeptid A β (16-20) eingewogen, in Messpuffer gelöst und die Konzentration über Integration eines 1D H-NMR Spektrum abgeschätzt.

Für ITC-Messungen wurden die verwendeten Peptide A β (1-40) und A β (16-20), welche als Lyophilisat vorlagen, unmittelbar vor Versuchsbeginn per Einwaage in der berechneten Menge in einem entsprechenden Volumen Messpuffer gelöst. Die Lösung wurde für 20 min entgast und anschließend mit einer *Heraeus Fresco 21* Kühlzentrifuge (ThermoScientific Inc., USA) für 15 min mit 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, um Aggregate zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit einem Photospektrometer die Absorption von

Phenylalanin bei 257 nm bestimmt. Mit Formel 4 wurde die Konzentration des gelösten Peptids berechnet.

3.3.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Experimente wurden von Dr. Rolf Sachs und Monika Baumann in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jochen Balbach (Institut für Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Alle Messungen wurden in NMR-Messpuffer mit einem *Bruker AVANCE III* 800 Mhz Spektrometer aufgenommen, welches über eine Kryosonde verfügt. Alle erhaltenen Spektren wurden mit dem Programm *NMRPipe* verarbeitet [152]. Die Zuordnungen der spezifischen Resonanzsignale der Aminosäuren wurden mit dem Programm *NMRView J 8.0* (One Moon Scientific Inc., West Field, NJ, USA) durchgeführt. Die Berechnung der Bindekonstante wurde mit *Origin 7.5* (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, U.S.A.) durchgeführt.

Die Resonanzzuordnung für CypD wurde durch Übertragung der Zuordnungen des Eintrags #7310 der *Biological Magnetic Resonance Data Bank* auf die experimentellen Bedingungen der Tripelresonanzmessung erhalten [153]: ^{15}N -TOCSY-HSQC, ^{15}N -NOESY-HSQC, trHNCA, trHNCACB, trHNCOCACB [152], [154]–[157] mit $260\ \mu\text{M}$ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -CypD. Die Resonanzzuordnung für A β (1-40) wurde durch ^{15}N -TOCSY-HSQC und ^{15}N -NOESY-HSQC-Messungen erhalten.

Die Interaktion von CypD und A β (1-40) wurde durch schrittweises Titrieren des Liganden in den Versuchsansatz bei 25 °C gemessen. Die Startkonzentrationen waren $50\ \mu\text{M}$ ^{15}N -markiertes A β (1-40) und $100\ \mu\text{M}$ CypD. Der Titrationsendpunkt lag bei 1,5-fachem molaren Überschuss an CypD zu A β (1-40) ($70,3\ \mu\text{M} : 105,6\ \mu\text{M}$ [A β (1-40):CypD]) bzw. fünffachem molaren Überschuss an A β (1-40) zu CypD ($295\ \mu\text{M} : 59\ \mu\text{M}$ [A β (1-40):CypD]). Nach jedem Titrationschritt wurde ein ^1H - ^{15}N -fastHSQC-Spektrum aufgenommen. Die Mittelwerte der Veränderungen in den chemischen Verschiebungen wurden nach Formel 5 berechnet:

Formel 5

$$\Delta\delta\ (\text{ppm}) = \sqrt{\frac{\Delta\delta(^1\text{H})^2 + \frac{1}{25}\Delta\delta(^{15}\text{N})^2}{2}}$$

$\Delta\delta$: relative Änderung der chemischen Verschiebung in ppm

H : chemisches Symbol für Wasserstoff (=Protonen)

N : chemisches Symbol für Stickstoff

3.3.2.1 Messung des Amidprotonenaustauschs

Der schnelle Austausch von Amidprotonen von A β (1-40) mit dem wässrigen Lösungsmittel wurde mittels NewMEXICO-Messungen [158]–[160] ermittelt ($50\ \mu\text{M}$ A β (1-40), $50\ \mu\text{M}$ CypD). Die Austauschraten für die einzelnen Reste wurden durch Anpassen von Formel 6 errechnet [161]:

Formel 6

$$I = \frac{k_{ex}}{R_{1NH} + k_{ex} - R_{1W}} \cdot [e^{-R_{1W}t} - e^{-(R_{1NH} + k_{ex})t}]$$

k_{ex} : Amidprotonen-Austauschrate

R_{1NH} : longitudinale Relaxationsrate der Amidprotonen

R_{1W} : longitudinale Relaxationsrate von Wasser

t : Austauschzeit

e : Elementarladung

Die Interaktion von A β (16-20) mit CypD wurde ebenfalls durch Titrationsmessungen unter den oben genannten Bedingungen untersucht. Die Startkonzentrationen für A β (16-20) und CypD waren je 50 μ M. Es wurde bis zu einem 150-fachen molaren Überschuss an A β (16-20) titriert. Die Endkonzentrationen lagen bei 7,6 mM : 50 μ M [A β (16-20) : CypD]. Für jeden Titrationschritt wurde ein ^1H - ^{15}N -fastHSQC-Spektrum aufgezeichnet. Die Auswertung wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

3.3.3 Circulardichroismus-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturmerkmale der CypD-Varianten wurden mit Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen CD-Spektren wurden mit denen des Wildtypenzym verglichen, um Aussagen über die Faltung der Varianten im Vergleich zum Wildtypenzym zu erhalten. Alle CD-Messungen wurden an einem *Jasco J710 Spectropolarimeter* (Jasco GmbH, D) durchgeführt. Die Temperatur der Probenlösung wurde in der Messküvette mit einem *Neslab RTE 111 Refrigerated Bath/Circulators Digital Controller* auf 20 °C reguliert. Es wurde in einer Quarzglas-Küvette (Hellma 110-QS) mit einer Schichtdicke von 1 mm gemessen. Alle Spektren der analysierten Proteine wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen. Der Wellenlängenbereich von 190 bis 240 nm wurde mit einer Scangeschwindigkeit von 1 nm/s gemessen. Es wurden jeweils 50 Spektren akkumuliert. Als Referenz diente das CD-Spektrum von 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4. Die gemessenen Spektren wurden als mittlere molare Elliptizität aufgetragen, welche sich mit Formel 7 berechnen lässt.

Formel 7

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\left(\frac{142,5}{5610051} \cdot 3300 \right) \cdot [MRW]}{c \cdot d}$$

MRW : *mean residue weight*

c : Konzentration des Proteins in mg/ml

d : Schichtdicke in cm

Die Anteile der Sekundärstrukturmerkmale wurden mit dem Programm K2D2² berechnet.

²k2d2.ogic.ca

3.3.4 Isotherme Titrationskalorimetrie von CypD mit A β (16-20)

Alle ITC-Messungen wurden mit einem *VP-ITC-Microcalorimeter* bei 20 °C durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden filtriert und entgast. Die zu untersuchenden Proteine CypA und CypD wurden in dem verwendeten Messpuffer 35 mM HEPES pH 7,8 auf die verwendete Messkonzentration von 100 μ M verdünnt und anschließend noch mindestens 2 h gegen Messpuffer dialysiert. Für die Dialyse wurden *Xpress Micro Dialyzer Cartridges 6-8 kDa* (Scienova™, D) verwendet. Eine Lösung mit einer Konzentration von 100 μ M CypA bzw. CypD wurde zu 240 μ M A β (16-20) titriert. Nach einer initialen Injektion mit einem Volumen von 2 μ l wurden 19 weitere Injektionen mit einem Volumen von je 20 μ l in die Messkammer injiziert. Das Intervall zwischen den Injektionen betrug 300 s, die Rührgeschwindigkeit der Injektionsspritze betrug 310 U/min. Die Datenanalyse der Titrationskurven erfolgte mit der ITC-Origin Software die zu dem System geliefert wurde.

Den Wert für die freie Reaktionsenthalpie G° erhält man durch Einsetzen der entsprechenden Parameter in Formel 8.

Formel 8

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K$$

ΔG° : freie Gibbs-Energie

R : universelle Gaskonstante (8,134 J · mol⁻¹ · K⁻¹)

T : Temperatur (in K)

$\ln K$: natürlicher Logarithmus der Bindungskonstante

3.3.5 Thioflavin T-Fluoreszenzassay der A β (1-40)-Aggregationskinetiken

Die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) wurde mit Thioflavin T (ThT: 4-(3,6-Dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylanilinchlorid), einem fluoreszierenden Benzothiazol, gemessen. ThT interkaliert in assemblierende Fibrillen und zeigt nach Bindung an β -Faltblatt-reiche Strukturen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und eine Rotverschiebung der Fluoreszenzemission von 445 nm zu 487 nm [103]. Alle Reaktionsansätze wurden in 96-Well-Platten untersucht. Die Messungen erfolgten in einem *BMG FluoStar Multi Mode Plate Reader* (BMG Labtech GmbH, D). Die Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten erfolgte mit der zum System gelieferten Software. Für ein Experiment wurden, wenn nicht anders beschrieben, je acht Ansätze mit einem Volumen von je 100 μ l pipettiert. Die Proben wurden bei 37 °C in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 20 μ M ThT, 1 % DMSO, 50 μ M A β (1-40) und 10 mM Natriumazid inkubiert. Die Platten wurden alle 30 min für 10 Sekunden doppelorbital geschüttelt. Die Fluoreszenz von ThT wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 482 nm gemessen.

3.3.6 Bestimmung des K_D -Wertes durch Messung der intrinsischen Fluoreszenz von CypD

Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz von CypD wurde durch Anregung der Proben bei 295 nm (Spaltbreite 2,5 nm) und Bestimmung der Emission bei 340 nm (Spaltbreite 5 nm) gemessen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 10 °C. Die Bestimmung der

Bindekonstanten erfolgte durch Titration von CypD mit steigenden Mengen des Peptides A β (16-20) unter Analyse der Erhöhung der Intensität der intrinsischen Fluoreszenz des CypD. Die Daten wurden in *SigmaPlot*[™] 12 durch nicht-lineare Regression analysiert. Die Berechnung des K_D -Wertes erfolgte nach Formel 9.

Formel 9

$$f = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x-x_0}{K_D}\right)}}$$

K_D : Dissoziationskonstante

e : Eulersche Zahl

y_0 : Achsenversetzung

a : Amplitude

3.3.7 Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)

Um den oligomeren Status von A β (1-40) während der fibrillären Aggregation in Gegenwart bzw. Abwesenheit von CypD zu charakterisieren, wurde die Methode des *Photo-induced cross-linking of unmodified proteins* (PICUP) verwendet [162], [163].

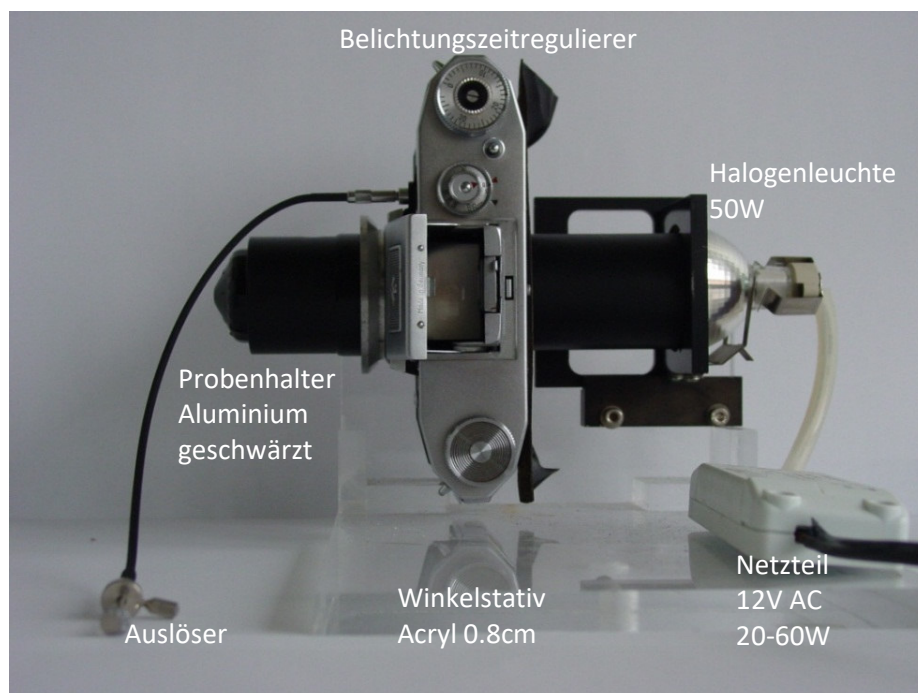


Abbildung 4 **Darstellung der Belichtungsapparatur für die PICUP-Experimente.** Als Gehäuse diente eine Spiegelreflexkamera vom Typ Praktiflex FX (Pentacon, DDR). Der Auslöser der Kamera wurde so modifiziert, dass ein Öffnen des Verschlusses ohne direkten Kontakt mit der Kamera möglich war. In dem schwarz gefärbten Probenhalter aus Aluminium wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß für die Belichtung gestellt. Vor dem Probenhalter sitzt der Verschluss, welcher durch Betätigen des Auslösers geöffnet wurde. Über den Belichtungszeitregulierer wurde seine Öffnungszeit modifiziert.

Bei PICUP wird durch Photoneintrag eine kovalente Konjunktion von Peptiden bzw. Proteinen durch das photoaktivierbare Reagens Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)-Hexahydrat (Ru(Bpy))

induziert. So kann unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE die Interaktion zwischen zwei Protein- bzw. Peptidliganden beobachtet werden. Der verwendete Rutheniumkomplex hat eine maximale Absorption bei $\lambda_{\max} = 452 \text{ nm}$, d.h. im sichtbaren Bereich. Zur Initiation der Photolysereaktion wurde eine handelsübliche Glühlampe (Halogenleuchte *DecoStar* 50 W, Osram, D) verwendet. Der Rutheniumkomplex oxidiert bei Lichteintrag [162]. Der Komplex $\text{Ru}(\text{Bpy})_3^3$ oxidiert daraufhin ein Tyrosin. Der aktivierte Phenolrest des Tyrosins kann einen nucleophilen Angriff an der Peptidbindung eines zweiten Proteins bzw. Peptids initiieren und mit Ammoniumpersulfat eine stabile kovalente Bindung zwischen zwei Aminosäuren bilden (Abbildung 5).

Dazu wurden Reaktionsansätze zur fibrillären Aggregation von $\text{A}\beta(1-40)$ in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 5 % DMSO, 50 μM $\text{A}\beta(1-40)$ und 5 μM CypD angesetzt. Sie wurden in einem *comfort*TM-Thermomixer (Eppendorf GmbH, D) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde alle 30 min für 10 s bei 300 U/min doppelorbital geschüttelt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben aus den Reaktionsgefäßen entnommen.

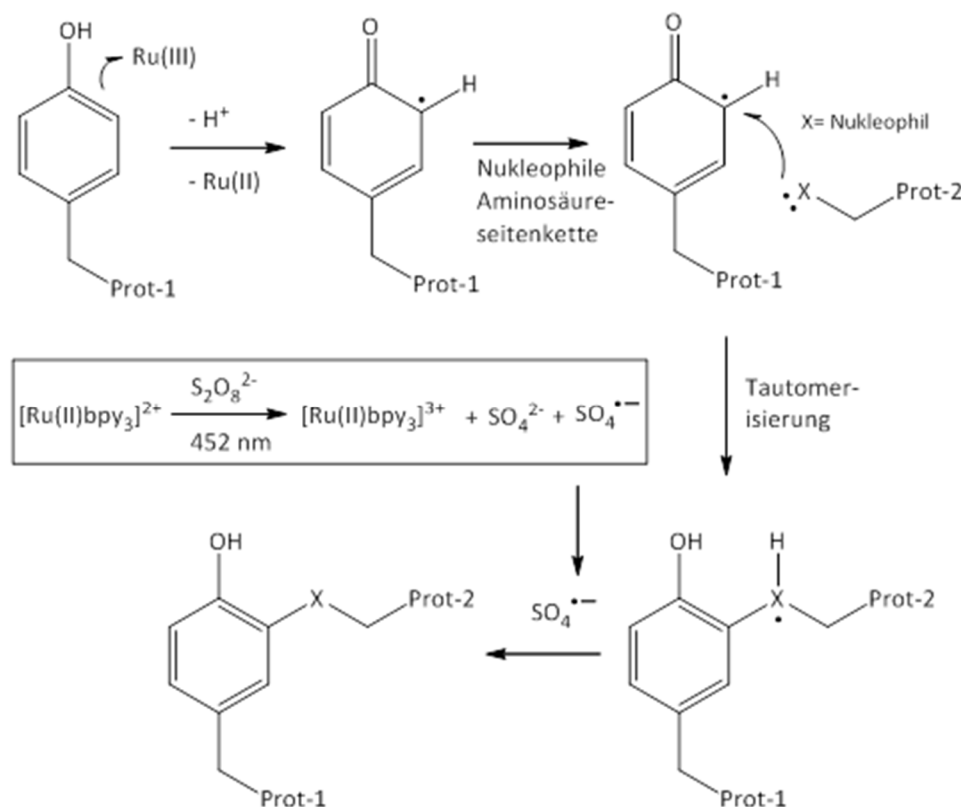


Abbildung 5 **Schematische Darstellung der PICUP-Reaktion mit Rutheniumkomplex und einem Nucleophil.** Darstellung erstellt nach [162] mit *ChemBioDraw Version 12.0*. In dem Kästchen (Bildmitte) sind die photoinduzierte Oxidation des Rutheniumkomplexes und die Reduktion von APS dargestellt. Der Rutheniumkomplex hat eine maximale Absorption bei 452 nm. Der oxidierte Rutheniumkomplex reagiert mit dem aromatischen Bestandteil von z.B. Tyrosin (links oben). Der aktivierte Phenolrest des Tyrosins kann einen nucleophilen Angriff an der Peptidbindung eines zweiten Proteins bzw. Peptids initiieren und mit Ammoniumpersulfat eine stabile kovalente Bindung zwischen zwei Aminosäuren bilden (rechts oben, Mitte und unten in der Abbildung dargestellt).

Zu je 18 μl des Reaktionsansatzes wurde 1 μl einer 4 mM $\text{Ru}(\text{Bpy})_3$ - und 1 μl einer 80 mM APS-Lösung gegeben. Danach wurde das Reaktionsgefäß in eine Vorrichtung zur Bestrahlung der Proben für eine

definierte Zeit (Abbildung 4) gestellt und für 200 ms mit sichtbarem Licht bestrahlt. Diese Vorrichtung wurde von Herrn Harald Bahn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) gebaut. Sie bestand aus einem Winkelstativ aus Acryl, welches als Ständer und Aufhängung des Gehäuses diente. Als Gehäusekörper diente eine Spiegelreflexkamera vom Typ *Praktiflex FX* (VEB Pentacon, DDR). An der Seite der Filmrolleneinlage wurde die Halogenleuchte angebracht. Auf der Seite des Objektivs ein Probenhalter. Durch Öffnung des Verschlusses wurde die Probe der Lichtbestrahlung ausgesetzt, die Öffnung des Verschlusses wurde durch betätigen des modifizierten Auslösers initiiert. Durch den Belichtungszeitregulierer der Kamera konnte die genaue Expositionszeit gesteuert werden. Die Versorgung der Glühlampe mit elektrischem Strom erfolgte über ein 12 V AC 20-20 W Netzteil. Die Reaktion wurde sofort nach dem Belichten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen in einem Thermoblock (95 °C, 5 min) gestoppt. Die Versuche wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt, um die Proben zu einer einzigen Lichtquelle und einer definierten Zeit zu exponieren.

3.3.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Für den Nachweis fibrillärer Strukturen wurden die entsprechenden Proben auf *Formvar/Carbon 200 mesh*, *Copper Grids* (Firma Ted Pella Inc., USA) adsorbiert. Die zur Präparation der Netze nötigen Lösungen wurden auf *Parafilm*[®] als 50 µl Tropfen vorgelegt. Zuerst wurden die Grids mit einer Pinzette durch einen Tropfen frischer 10 %iger Essigsäure gezogen. Dann wurden sie zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend für 30 s an der Luft getrocknet, nachdem überflüssiges Wasser mit etwas Filterpapier vorsichtig abgesaugt wurde. Anschließend wurden 5 µl der Probenlösung auf das trockene Grid pipettiert. Das Netz wurde mindestens 30 s mit dem Tropfen der Probenlösung inkubiert, um ein Anhaften des Probenmaterials an die Oberfläche des Netzes zu gewährleisten. Der Tropfen wurde danach vorsichtig mit etwas Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde das Netz einmal mit 100 mM und einmal mit 10 mM Ammoniumacetat gewaschen. Zum Kontrastieren der Probe wurde das Netz zweimal in einem Tropfen einer 10 %igen Ammoniummolybdat-Lösung geschwenkt. Die Netze wurden nach dem Trocknen weiterverwendet.

Die Bilder der Proben wurden mit dem *Zeiss EM 900 Transmissionselektronenmikroskop* (Carl Zeiss SMT) mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV bis 50 kV generiert, mit einer slow scan Variospeed SSCCD Kamera SM-1 k-120 aufgenommen und mit dem Programm *siViewer*[™] ausgewertet.

3.4 Zellkultur der humanen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y

3.4.1 Zellkulturbedingungen

Für die Zellexperimente wurden immortalisierte humane Neuroblastomazellen der SH-SY5Y-Linie verwendet. Sie wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 8,5 % CO₂-Atmosphärensättigung in 75 cm²-Kulturflaschen in DMEM kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die SH-SY5Y-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach für ca. 2 min mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche

der Kulturflasche proteolytisch abgelöst und subkultiviert. Die gelösten Zellen wurden in 5 ml DMEM/FBS aufgenommen und anschließend auf $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt.

3.4.2 Untersuchung zur Zytotoxizität von A β (1-40) und A β (16-20)

Für die Vitalitätsexperimente wurden die SH-SY5Y-Zellen in Kavitäten von 96-Well-Platten mit je 20000 Zellen pro Kavität in einem Volumen von 100 μ l ausgesät. Die SH-SY5Y-Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert. A β (1-40) und A β (16-20) wurden aus einer 5 mM DMSO-Stammlösung in DMEM gegeben und zu den SH-SY5Y-Zellen gegeben. Als Positivkontrolle für Zelltoxizität wurde 50 μ M Wasserstoffperoxid in DMEM verwendet. Das Wasserstoffperoxid wurde in einer wässrigen Stammlösung frisch aus 32 %igem Wasserstoffperoxid verdünnt und 1:100 zu DMEM gegeben. Die SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit den Substanzen inkubiert.

3.4.3 Cell Titer Blue™-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität

Nach Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit A β (1-40) bzw. A β (16-20) erfolgte die Analyse der Zellvitalität mit *CellTiterBlue™* (Promega, D) nach Herstellerangaben. Dazu wurde die Fluoreszenz des verwendeten Farbstoffes mit einem *BMG FluoStar Multi Mode Plate Reader* gemessen und mit der zum System gelieferten Software aufgezeichnet und ausgewertet.

3.5 Statistik

Es wurde, wenn nicht anders beschrieben, das statistische Mittel und die Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Reinigung von humanen Cyclophilinen

4.1.1 Expression und Reinigung von humanen CypA und CypD

Die rekombinante Expression von CypA erfolgte von einem pQE70-Derivat in *E. coli*. Die Reinigung von CypA erfolgte durch säulenchromatographische Trennung unter Einbeziehung einer Anionenaustauschchromatographie mittels einer DEAE-Säule, einer Kationenaustauschchromatographie mittels einer SO^3 -Säule und einer Gelfiltration. Die Reinheit der Präparation wurde mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung geprüft (Abbildung 6A).

CypD wurde ohne mitochondriale Signalsequenz als CypD(30-207) mit einem N-terminalen $(\text{His})_6$ -Tag exprimiert, der über die Peptidsequenz einer Schnittstelle für Thrombin mit dem Protein verbunden war. Der $(\text{His})_6$ -Tag wurde mit Thrombin proteolytisch abgespalten. Aufgrund der Erkennungssequenz von Thrombin blieb N-terminal die Sequenz GSHM als Rest erhalten, welcher nicht von CypD(30-207) abgespalten wurde. Die proteolytische Spaltung von $(\text{His})_6$ -CypD(30-207) erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 bei Raumtemperatur. Die Vollständigkeit der Proteolyse wurde durch SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung des Gels geprüft (Abbildung 6B). Nach Proteolysezeiten von länger als 4 h war die Bande des $(\text{His})_6$ -CypD(30-207) bei 20 kDa nahezu vollständig umgesetzt und es erschien eine Bande bei ca. 17 kDa (Abbildung 6B). Diese Bande zeigt CypD(30-207) mit der zusätzlichen N-terminalen Aminosäuresequenz GSHM nach der enzymatischen Hydrolyse des $(\text{His})_6$ -Tags durch Thrombin. Dieses Protein wird im Folgenden CypD genannt.

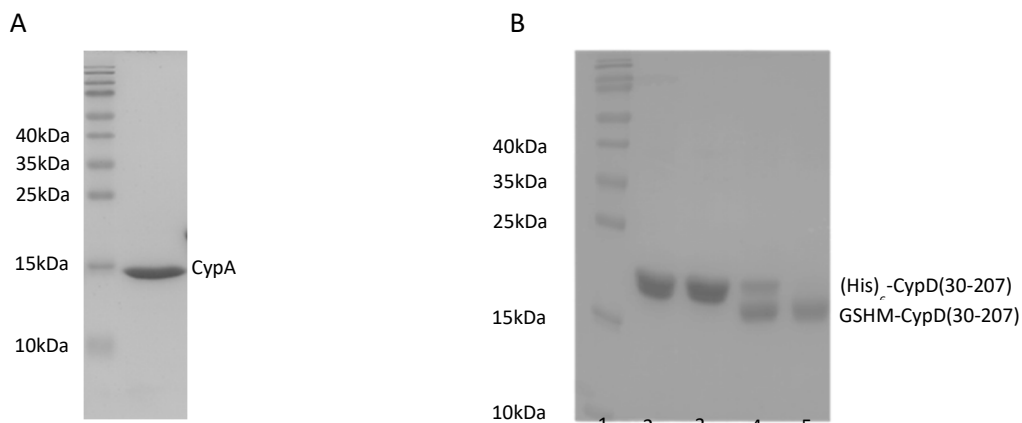


Abbildung 6 **Überprüfung der Reinheit der Proteinpräparation mittels SDS-PAGE.** Nach der Präparation der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung die Reinheit der Proteinlösung von Reinigung von CypA (Bild A) und CypD (Bild B) geprüft. CypD wurde mit einem N-terminalen $(\text{His})_6$ -Tag exprimiert. Dieser wurde proteolytisch mit Thrombin abgespalten. Zu sehen ist in Abbildung B die erfolgreiche Proteolyse: Bahn 1 = Proteinmarker, Bahn 2 = 0 min, Bahn 3 = 15 min, Bahn 4 = 2 h, Bahn 5 = 4 h. Die Proteolyse erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 bei RT.

Zusätzlich wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese Varianten von CypD erzeugt, bei denen bestimmte funktionale Aminosäurereste ausgetauscht waren. Sie wurden wie das Wildtypenzym

gereinigt. Durch massenspektrometrische Analysen wurden die molekularen Massen der gereinigten Proteine durch ESI-MS bestimmt (Tabelle 7).

4.1.2 Expression und Reinigung von ^{15}N - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Cyclophilin D

Für NMR-Experimente wurde $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - und ^{15}N -Isotopenmarkiertes $(\text{His})_6$ -CypD(30-207) exprimiert und gereinigt. Isotopenmarkiertes $(\text{His})_6$ -CypD wurde analog zu nicht markiertem $(\text{His})_6$ -CypD gereinigt und der $(\text{His})_6$ -Tag wurde mit Thrombin proteolytisch entfernt.

Tabelle 7 Theoretische und experimentell bestimmte Masse der verwendeten Proteine

| Protein | Theoretische Masse (Da) | Bestimmte Masse (Da) |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------|
| CypA | 18012,4 | 18012,0 |
| $(\text{His})_6$ -CypD(30-207) | 21060,9 | 21062,0 |
| CypD R97A | 19224,7 | 19224,9 |
| CypD Q105T | 19282,8 | 19282,0 |
| CypD K133I | 19294,8 | 19294,0 |
| CypD R97A/F102A | 19148,6 | 19148,0 |
| CypD R97A/H168Q | 19215,7 | 19216,0 |
| CypD N144A | 19266,8 | 19268,8 |
| CypD W163A | 19194,7 | 19216,1 |

4.2 Charakterisierung der PPIase-Aktivität der Cyclophiline

4.2.1 Die PPIase-Aktivität von CypA und CypD

Nach Expression und Reinigung der Cyclophiline CypA und CypD wurde ihre PPIase-Aktivität durch isomerspezifische Proteolyse (ISP) bestimmt [147]. Dazu wurde die Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Isomerisierung (k_{enz}) der Ala-Pro-Bindung des Substrates Suc-AAPF-pNA in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Cyclophilins ermittelt (Abbildung 7).

Die ermittelten Werte sind als Spezifitätskonstante ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert) und als prozentuale Aktivität im Vergleich zu wtCypD in Tabelle 8 und Abbildung 8 dargestellt. Der ermittelte $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von CypA beträgt $1,68 (\pm 0,10) \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Der für CypD ermittelte $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert beträgt $1,09 (\pm 0,02) \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abbildung 7). Beide Werte entsprechen den in der Literatur genannten Aktivitäten [29]. Die Aktivität des isotopenmarkierten CypD wurde ebenfalls mit ISP charakterisiert. Das isotopenmarkierte CypD hatte mit einer Aktivität von $1,70 (\pm 0,07) \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ einen geringfügig höheren $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert als das nicht isotopenmarkierte Protein.

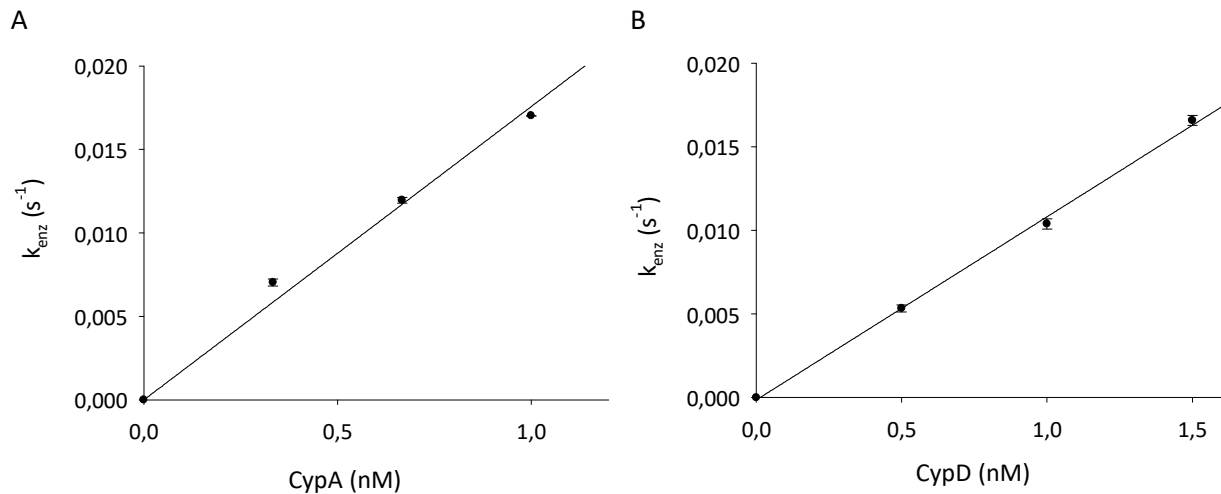


Abbildung 7 **Bestimmung der PPlase-Aktivität von CypA (Bild A) und CypD (Bild B)**. Die mittels ISP bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der PPlase-katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung sind in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration dargestellt. Ein Messpunkt repräsentiert das statistische Mittel aus 3 Messungen. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 17 μ M Chymotrypsin und 30 μ M Suc-AAPF-pNA als Peptidsubstrat bei 10 °C. Der ermittelte k_{cat}/K_M -Wert für CypA betrug $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für CypD $1,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabelle 8 Übersicht der PPlase-Aktivität von CypA, CypD und CypA- sowie CypD-Varianten im ISP-PPlase-Aktivitätsassay. Es ist immer die Standardabweichung angegeben.

| CypD | | CypA | |
|-----------------|---|------------|---------------|
| Variante | Aktivität | Variante | Aktivität (%) |
| | $k_{cat}/K_M \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$ | | |
| CypD | $1,1 (\pm 0,07) \cdot 10^7$ | CypA | 100 |
| CypD T94A | $1,9 (\pm 0,06) \cdot 10^7$ | n. b. | n. b. |
| CypD R97A | $9,2 (\pm 0,2) \cdot 10^3$ | CypA R55A | 0,06 [164] |
| CypD Q105T | $4,0 (\pm 0,04) \cdot 10^4$ | CypA Q62T | 0,06 [164] |
| CypD K133I | $2,7 (\pm 0,15) \cdot 10^7$ | n. b. | n. b. |
| CypD N144A | $2,5 (\pm 0,08) \cdot 10^5$ | n. b. | n. b. |
| CypD W163A | $2,8 (\pm 0,03) \cdot 10^6$ | CypA W121F | 8,7 [165] |
| CypD R97A/F102A | $6,0 (\pm 0,07) \cdot 10^3$ | n. b. | n. b. |
| CypD R97A/Q105T | $3,3 (\pm 0,06) \cdot 10^4$ | n. b. | n. b. |
| CypD R97A/H168Q | $6,0 (\pm 0,05) \cdot 10^4$ | n. b. | n. b. |
| | | CypA H126F | 8,8 [166] |
| | | CypA F133A | 3 [165] |

n. b., nicht beschrieben

Die PPlase-Aktivität verschiedener Varianten von CypD mit Aminosäuresubstitutionen im aktiven Zentrum des Enzyms wurde nach Expression und Reinigung ebenfalls durch ISP bestimmt. Die Substitution von Arg97 in CypD, welches dem katalytisch wichtigen Aminosäurerest Arg55 in CypA

entspricht, gegen einen Alanylrest führt zu einer nahezu vollständig inaktiven CypD-Variante. Die PPIase-Aktivität betrug 0,08 % der Aktivität des Wildtypenzym. Dies entspricht der Variante CypA R55A, deren Aktivität in der Literatur mit 0,1 % angegeben ist [26]. Die Doppelvariante CypD R97A/F102A hatte einen k_{cat}/K_M -Wert von $6,0 (\pm 0,05) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und so eine geringere Aktivität als CypD R97A, während die Doppelvarianten CypD R97A/Q105T und CypD R97A/H168Q eine etwas höhere Aktivität als die Einfachvariante aufwiesen (Abbildung 8, Tabelle 8). Die enzymatischen Aktivitäten der beiden Doppelvarianten waren ungefähr um den Faktor 1,5 höher als die Aktivität von CypD R97A. Diese höhere Aktivität kann durch eine Kontamination der Proteinpräparation mit PPIasen aus *E. coli* wie PPIA, PPIB oder SlyD verursacht worden sein. Eine entsprechende Kontamination wurde bereits bei Präparationen von CypA R55A gefunden [166]. Ohne die Verunreinigungen betrug die Aktivität von CypA R55A nur noch $< 0,02 \%$ verglichen mit dem Wildtypenzym [166].

Die Variante CypD Q105T hatte analog zu der entsprechenden Substitution von Q62T in CypA eine reduzierte PPIase-Aktivität mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $4,0 (\pm 0,04) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Im Gegensatz dazu besaßen die Substitutionen von W163, K133 und T94 durch Alanin einen geringeren Einfluss auf die PPIase-Aktivität von CypD (Abbildung 8, Tabelle 8). Die bereits in der Literatur beschriebenen PPIase-Aktivitäten der verwendeten CypA-Varianten sind in Tabelle 8 im Vergleich zu den CypD-Varianten dargestellt.

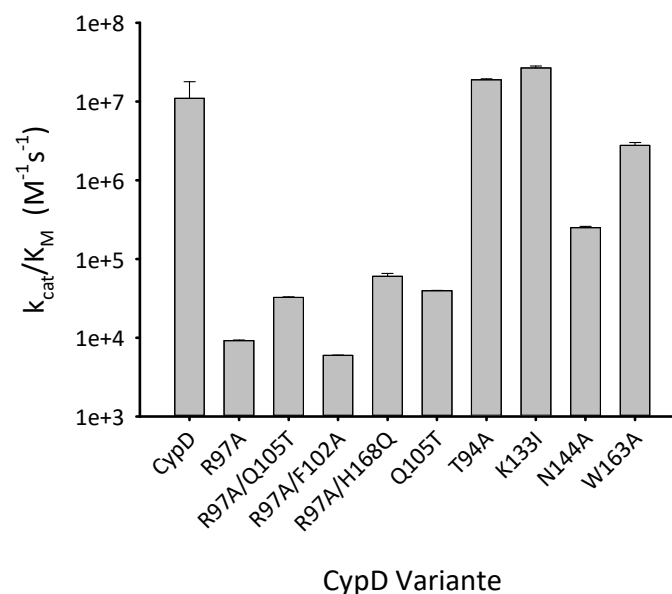


Abbildung 8 **Darstellung der enzymatischen Aktivitäten der verwendeten CypD-Varianten.** Die hier grafisch dargestellten k_{cat}/K_M -Werte sind in Tabelle 8 numerisch dargestellt. Die Substitution von T94 und K133 hat wenig Einfluss auf die PPIase-Aktivität verglichen zum Wildtypenzym. Der Austausch von R97 und Q105 führte, analog zu R55 und Q62 in CypA, zu einer starken Reduzierung der PPIase-Aktivität von CypD. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit $17 \mu\text{M}$ Chymotrypsin und $30 \mu\text{M}$ Suc-AAPF-pNA als Peptidsubstrat bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Darstellung der Werte mit Standardabweichung.

4.2.2 Inhibition von CypD durch das Cyclosporin A-Derivat MM258

Reaktionsansätze mit A β (1-40) sind anfällig für das Auftreten von Aggregationskeimen. Um die Inhibition von CypD in Reaktionsansätzen mit A β (1-40) untersuchen zu können musste deshalb ein CsA-Derivat mit einer höheren Wasserlöslichkeit als CsA verwendet werden, da die Möglichkeit besteht, dass bei höheren Konzentrationen in Puffer ungelöstes CsA als Aggregationskeim die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) beeinflusst.

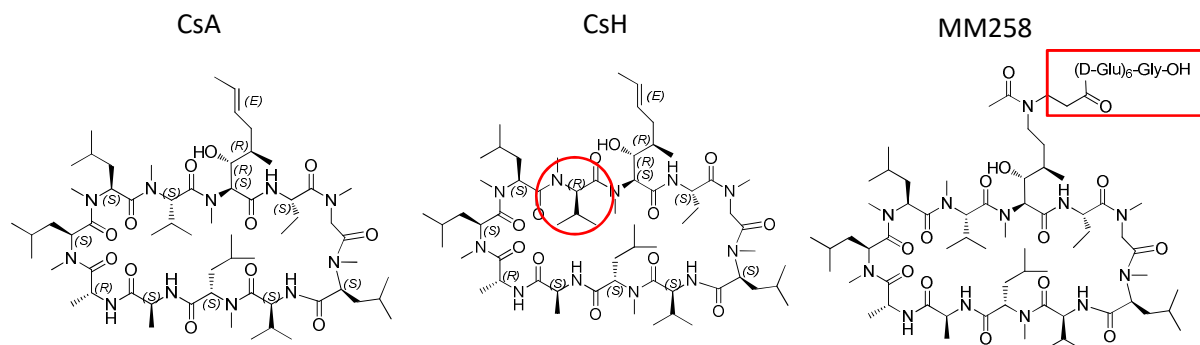


Abbildung 9 Darstellung der chemischen Strukturen von CsA, CsH und MM258. Das CsA-Derivat CsH ist ein nicht inhibierendes Derivat von CsA und unterscheidet sich an einer Bindung von CsA (in der Abbildung durch einen roten Kreis hervorgehoben). MM258 besitzt im Gegensatz zu CsA am C1-Atom eine (Glu)₆-Gly-Kette (in der Abbildung mit einem roten Kästchen hervorgehoben). Diese strukturelle Veränderung scheint die bessere Wasserlöslichkeit zu vermitteln. Cyclosporin H hat die Summenformel C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂, die Summenformel von Cyclosporin A ist C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂.

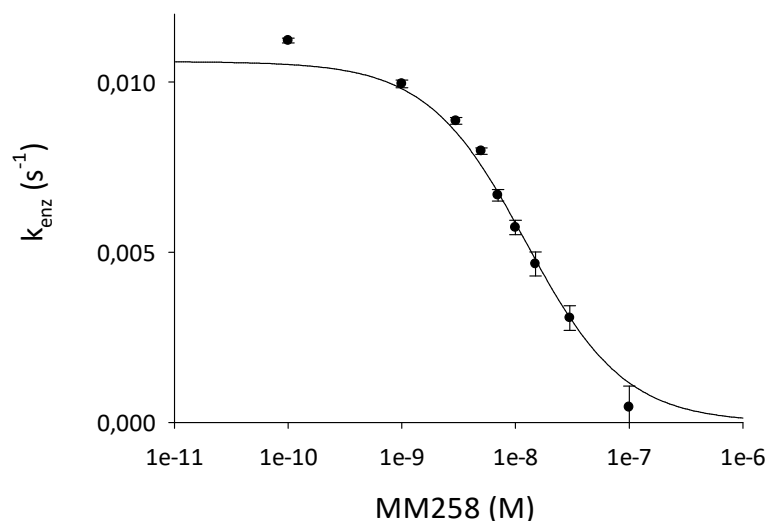


Abbildung 10 Inhibition der CypD-Aktivität durch das CsA-Derivat MM258. Der IC₅₀-Wert für den Inhibitor-Ligand-Komplex CypD/MM258 beträgt 11 nM ± 0,5 nM. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem IC₅₀-Wert für die Inhibition von CypA mit CsA [167]. Der berechnete IC₅₀-Wert ist auch vergleichbar mit dem K_i-Wert für CypD/CsA von 6,7 nM [168]. Die Inhibition der PPIase-Aktivität von CypD durch MM258 wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 10 °C gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt 1 nM CypD, 30 μM Suc-AAPF-pNA, 17 μM Chymotrypsin. Jeder Messpunkt repräsentiert das statistische Mittel aus drei Messungen. Angegeben ist die Standardabweichung.

Das CsA-Derivat MM258 hat eine sehr gute Wasserlöslichkeit verglichen mit CsA (persönliche Mitteilung von Dr. Miroslav Malešević, Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der

Proteinfaltung). Es wurde die Inhibition von CypD durch dieses CsA-Derivat mittels ISP-PPIase-Assay untersucht. Der ermittelte IC_{50} -Wert für die Inhibierung von CypD durch MM258 betrug 10,6 nM (Abbildung 10) und lag im Bereich des K_I -Werts von 6,7 nM für die Inhibierung von CypD durch CsA [168].

4.2.3 Analyse der Sekundärstrukturen von CypD und seiner Varianten

Um die korrekte Faltung von CypD und seiner Varianten zu untersuchen, wurden Fern-UV-CD-Spektren der Proteine gemessen und miteinander verglichen. Aus den erhaltenen Fern-UV-CD-Spektren der Proteine wurde die molare Elliptizität der gemittelten Masse der Aminosäuren nach Formel 7 berechnet. Aus der Elliptizität wurde mit Hilfe des evidenzbasierten Programms K2D2³ der Gehalt an Sekundärstrukturen berechnet. K2D2 nutzt 3D-Strukturen von ausgesuchten Proteinen aus der Proteindatenbank⁴ (PDB) als Referenz für seine Approximationen [169], [170]. Die PDB-Strukturen wurden mit dem online zugänglichen Programm DichroCalc⁵ in CD-Spektren umgewandelt und daraus die putativen Anteile von α -Helix- und β -Faltblattsekundärstrukturelementen berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

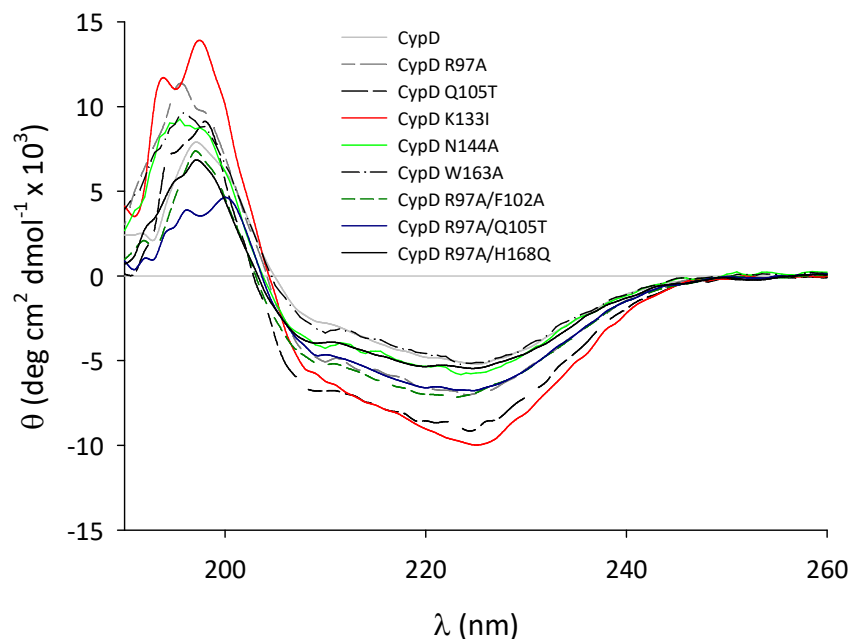


Abbildung 11 **CD-Spektren von CypD und der Varianten von CypD**. Die Spektren wurden in 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,4 bei 20 °C aufgezeichnet. Die Scangeschwindigkeit betrug 1 nm/s. Für jedes Spektrum wurden 50 Messungen akkumuliert. Die Spektren sind alle sehr ähnlich und zeigen eine geordnete und identische Faltung aller verwendeten Proteine. Die Anteile der Sekundärstrukturbestandteile in Prozent der Gesamtstruktur der CypD-Varianten sind in Tabelle 9 angegeben.

Die Spektren der CypD-Varianten sind dem des Wildtypenzym von CypD ähnlich. Sie sind durch lokale Minima der molaren Elliptizität bei 225 nm und 208 nm gekennzeichnet (Abbildung 11). Die Ähnlichkeit der Spektren wird durch eine Auswertung der Spektren mit K2D2 bestätigt, welche α -

³ <http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d2/>

⁴ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

⁵ <http://comp.chem.nottingham.ac.uk/dichrocalc/>

Helix-Anteile zwischen 8 und 19 % und β -Faltblatt-Anteile zwischen 28 und 40 % für CypD und seine Varianten ergaben. Eine Ausnahme bildet die CypD-Variante CypD N144A, welche einen berechneten α -Helix-Anteil von ca. 44 % besitzt.

Tabelle 9 Abschätzung der Sekundärstrukturmerkmale für CypD und seine Varianten für den Wellenlängenbereich von 200 bis 240 nm mit K2D2.

| CypD Variante | α-Helix (%) | β-Faltblatt (%) |
|----------------------|--------------------------------------|---|
| CypD | 8,36 | 40,42 |
| CypD R97A | 9,65 | 38,75 |
| CypD Q105T | 9,65 | 38,75 |
| CypD K133I | 13,82 | 34,61 |
| CypD N144A | 44,11 | 28,93 |
| CypD W163A | 11,03 | 37,31 |
| CypD R97A/F102A | 18,79 | 32,22 |
| CypD R97A/Q105T | 8,25 | 40,45 |
| CypD R97A/H168Q | 8,25 | 40,45 |

4.3 Einfluss von Cyclophilinen auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)

4.3.1 Einfluss von CypA und CypD auf die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen

Um einen möglichen Einfluss von CypA bzw. CypD auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) zu untersuchen, wurde die fibrilläre Aggregation des Peptides sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit der beiden Cyclophiline untersucht. Um die fibrilläre Aggregation messen bzw. beobachten zu können, wurde der ThT-Fluoreszenzassay verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff ThT lagert sich in neu assemblierende A β -Fibrillen ein. Dabei nimmt seine Fluoreszenzintensität bei 482 nm nach Anregung bei 450 nm zu. Diese Zunahme der ThT-Fluoreszenzsignalintensität kann somit direkt als Bildung fibrillärer Aggregate interpretiert werden [103].

Unter den verwendeten Bedingungen war der Start einer Aggregation von initial monomerem A β (1-40) nach 20 bis 40 Stunden zu beobachten. Bei zusätzlicher Zugabe von CypA oder CypD in den Reaktionsansatz wurde mit steigender Enzymkonzentration eine sinkende Fluoreszenzsignalzunahme im Vergleich zu Messungen ohne zusätzliches Enzym beobachtet (Abbildung 12). Beide Cyclophiline wurden in einer 50 μ M A β (1-40)-Lösung in substöchiometrischen Verhältnissen eingesetzt. CypA verringerte bei einer Konzentration von 2 μ M die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen (Abbildung 12A). Ab einer Konzentration von 5 μ M inhibierte CypA die Fibrillenbildung vollständig unter den verwendeten Bedingungen. CypD unterdrückte bereits ab einer Konzentration von 2 μ M die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) vollständig (Abbildung 12B). Da CypD die Aggregation von A β (1-40) effektiver

unterdrückte als CypA und die Signifikanz der CypD/A β (1-40)-Interaktion in der Literatur beschrieben ist, wurden die nachfolgenden Untersuchungen nur mit CypD durchgeführt.

Während der Aggregation von A β (1-40) werden verschiedene A β (1-40)-Spezies mit unterschiedlichem Gehalt an A β (1-40), zum Beispiel Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen, zu verschiedenen Zeiten innerhalb des Zeitverlaufes der Aggregation ausgebildet. Um zu untersuchen, in welchem Zeitrahmen die Cyclophiline ihre Wirksamkeit entfalten und damit Hinweise zu erhalten, welche A β -Spezies mit Cyclophilinen interagieren, wurde CypD mit zeitlicher Verzögerung zu Aggregationsansätzen hinzugegeben. Dazu wurden dem Aggregationsansatz nach 0, 4, 8, 12, 16, 20 oder 24 Stunden nach Start der Reaktion jeweils 5 μ M CypD zugefügt. Einen Einfluss auf die fibrilläre Aggregation wies CypD nur auf, wenn es innerhalb der ersten 16 Stunden der Reaktion, d.h. während der *Lag*-Phase, in den Reaktionsansatz gegeben wurde (Abbildung 13). Wurde CypD nach 20 oder 24 Stunden, also bereits nach Einsetzen des exponentiellen Fibrillenwachstums, zum Reaktionsansatz gegeben, wurde kein inhibierender Einfluss auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) beobachtet.

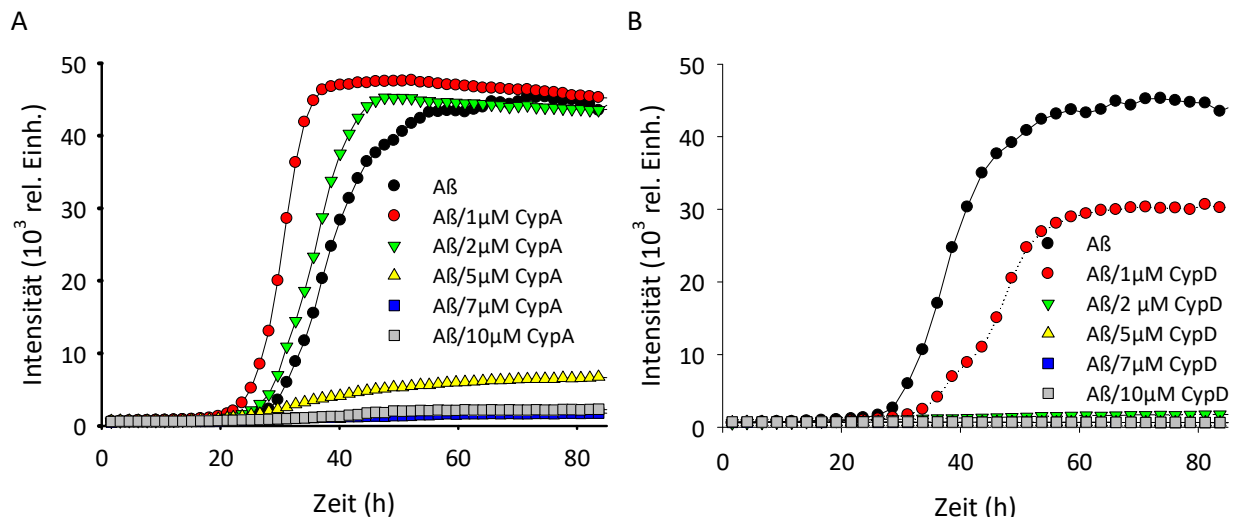


Abbildung 12 **Einfluss von CypA und CypD auf die fibrilläre Aggregation von humanem A β (1-40)**. Abgebildet sind Fluoreszenzsignale bzw. Kinetiken von entstehenden fibrillären A β -Aggregaten. Sowohl CypA (Bild A) als auch CypD (Bild B) inhibieren konzentrationsabhängig die fibrilläre Aggregation von A β (1-40).

Der Reaktionsansatz erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT und 50 μ M monomeren A β (1-40) bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden jeweils alle 30 min für je 10 s doppelorbital bei 100 U/min geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit λ_{EX} =450 nm und λ_{EM} =482 nm. Jede Kurve stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar. Abbildungen mit einzelnen Messansätzen siehe Anhang (Abbildung 40; Abbildung 41).

Parallel zu diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass unter den eingesetzten Bedingungen die PPIase-Aktivität von CypD über 80 h stabil war (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des beschriebenen Experimentes weisen darauf hin, dass CypD in der initialen Phase der Aggregation funktional mit Monomeren oder löslichen Intermediaten bzw. Oligomeren von A β (1-40) interagiert, die in den Anfangsstadien der Reaktion vorhanden sind, deren Anteil aber während der exponentiellen Phase der Aggregation deutlich abnimmt [161].

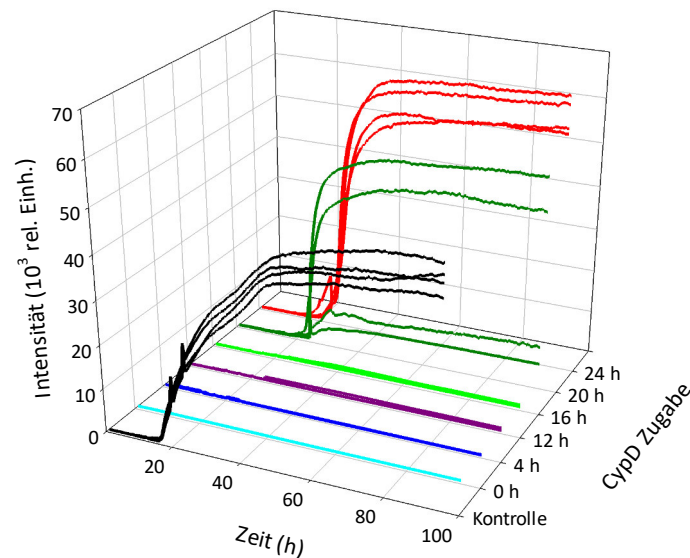


Abbildung 13 **Zeitversetzte Gabe von CypD zu Reaktionsansätzen der fibrillären Aggregation von A β (1-40)**. Die Zugabe von CypD nach dem zeitlichen Einsetzen des exponentiellen Fibrillenwachstums kann die fibrilläre Aggregation nicht unterdrücken. Die Zugabe von CypD während der *Lag*-Phase inhibiert eine einsetzende fibrilläre Aggregation bis 16 h nach Reaktionsansatz. Jede Reaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 20 μ M ThT und 50 μ M A β (1-40) bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm. .

4.3.2 Einfluß von Cyclophilinhibitoren auf die Cyclophilin/A β (1-40)-Interaktion

Ziel der Studie war es, die Rolle des aktiven Zentrums der Cyclophiline bei der Inhibition der fibrillären Aggregation von A β (1-40) zu untersuchen. Eine Möglichkeit ist es, das aktive Zentrum mit einem spezifischen Inhibitor zu blockieren und dessen Einfluss auf die fibrilläre Aggregation zu untersuchen. Für solche Studien wurde der an das aktive Zentrum von Cyclophilinen bindende hochaffine Inhibitor CsA eingesetzt. Die durch CypD inhibierte Fibrillenbildung von A β (1-40) konnte durch die Zugabe von 5 μ M CsA wiederhergestellt werden. In den Messungen mit Inhibitor war eine Zunahme der ThT-Fluoreszenzintensität nach dem Ende der *Lag*-Phase beobachtbar (Abbildung 14). In einem Kontrollexperiment wurde CsH, ein dem CsA ähnliches Cyclopeptid, das nicht an Cyclophiline bindet und deren Aktivität nicht inhibiert, in den Reaktionsansatz gegeben [16]. Die Zugabe von 5 μ M CsH hatte keinen Einfluss auf die inhibierende Wirkung von CypD auf die fibrilläre Aggregation (Abbildung 14A). In diesen Ansätzen war kein Anstieg der ThT-Fluoreszenzintensität beobachtbar. Die Gegenwart von CsA allein beeinflusste die Bildung der Fibrillen nicht. Die Dauer der *Lag*-Phase im Vergleich zur *Lag*-Phase der Reaktion ohne CsA war jedoch im Kontrollexperiment mit CsA in der A β (1-40)-Lösung verkürzt.

Um einen Einfluss von CsA, der auf der hydrophoben Natur des Undecapeptides beruhen könnte, selbst ausschließen zu können, wurde das besser in Wasser lösliche CsA-Derivat MM258 für weitere Untersuchungen verwendet. MM258 selbst besaß keinen Einfluss auf die Kinetik der Fibrillenbildung von A β (1-40). Sowohl die Dauer der *Lag*-Phase als auch die Amplitude des ThT-Fluoreszenzsignals der fibrillären Aggregation waren durch MM258 unverändert (Abbildung 14A). Im Reaktionsansatz mit

3 μM CypD konnten 30 μM MM258 die inhibierte Ausbildung von A β -Fibrillen vollständig wiederherstellen (Abbildung 14B). Die Zunahme der Amplitude des ThT-Fluoreszenzsignals ist dabei von der eingesetzten MM258-Konzentration abhängig (Abbildung 15). Damit zeigt MM258 eine für Inhibitoren typische Dosis-Wirkung-Abhängigkeit. Eine steigende Konzentration von MM258 im Reaktionsansatz verkürzt die Dauer der *Lag*-Phase (Abbildung 15).

Um zu untersuchen, ob Intermediate der A β -Aggregationsreaktion während der Inkubation mit CypD akkumulieren, wurde CypD zeitversetzt im Reaktionsansatz inhibiert. Dafür wurde MM258 zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 0 h, 20 h und 50 h) in den A β (1-40)/CypD-Reaktionsansatz gegeben und das Einsetzen der fibrillären Aggregation bei Bildung des CypD/MM258-Inhibitor-Ligand-Komplexes untersucht. Die Gabe von MM258 nach 0, 20 oder 50 Stunden zum Reaktionsansatz ermöglichte eine fibrilläre Aggregation, aber der Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors verkürzte die Dauer der *Lag*-Phase nach der Zugabe des Inhibitors nicht (Abbildung 16). Diese Daten zeigen, dass eine Akkumulation von zur Aggregation neigenden A β (1-40)-Spezies durch CypD unwahrscheinlich ist.

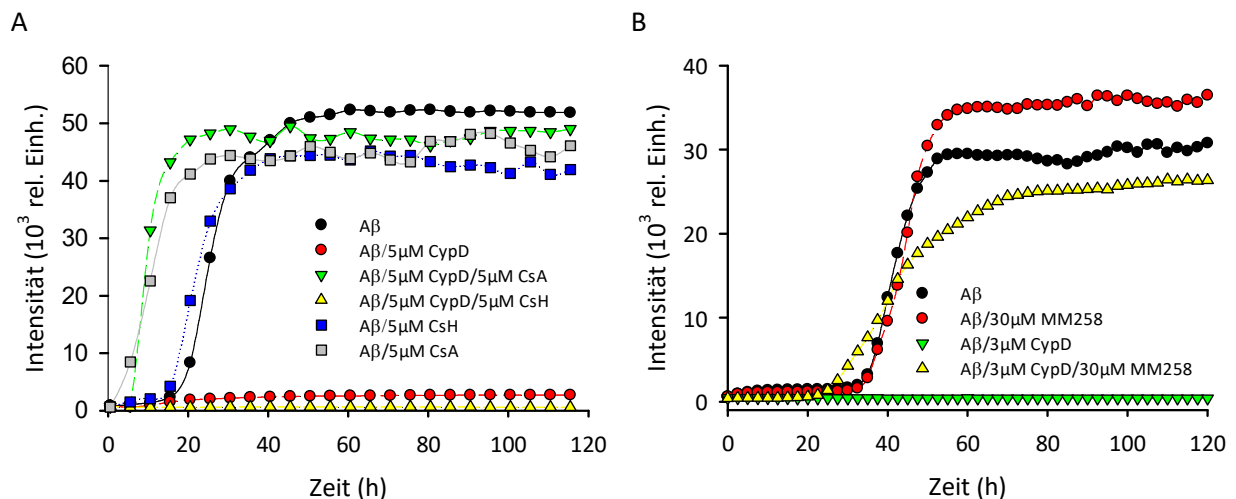


Abbildung 14 Der **Einfluss von Cyclophilininhibitoren auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)**. Der Cyclophilininhibitor CsA ermöglicht die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) bei Anwesenheit von CypD. Das nicht inhibierende CsA-Derivat CsH tut dies nicht (Bild A). CsA beschleunigt in der Kontrolle die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Aufgrund dieses Einflusses auf die fibrilläre Aggregation ist es ungeeignet für Experimente mit hohen Inhibitorkonzentrationen. Das CsA-Derivat MM258 inhibiert CypD und beschleunigt in Kontrollexperimenten mit hohen Konzentrationen nicht die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) (Bild B). Es ist daher besser für den Einsatz in Aggregationsassays geeignet. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μM ThT, 50 μM A β (1-40) und 3 μM CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 4 Messreplikaten dar.

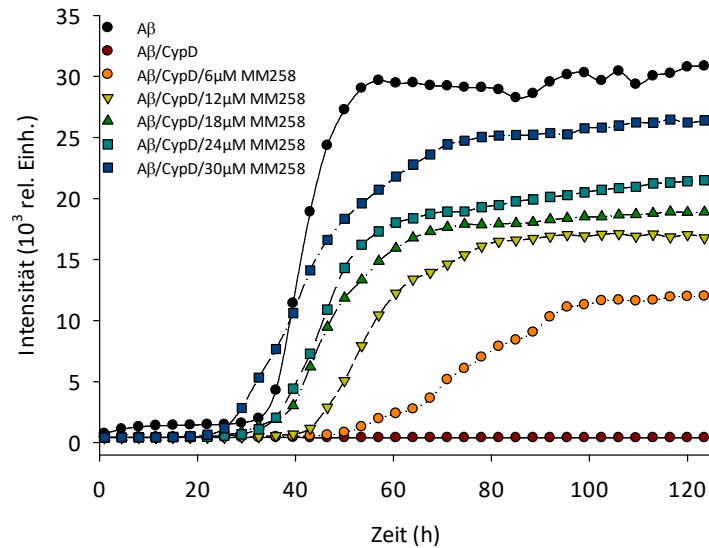


Abbildung 15 **MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von A β (1-40) konzentrationsabhängig wieder her.** Die Lag-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen von MM258 im Reaktionsansatz kürzer. Auch die Amplitude des gemessenen Fluoreszenzsignals wurde mit steigender Konzentration an MM258 höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1% DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 3 μ M CypD bei 37 $^{\circ}$ C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar. Die einzelnen Messreplikate sind im Anhang gezeigt (Kapitel 9.2).

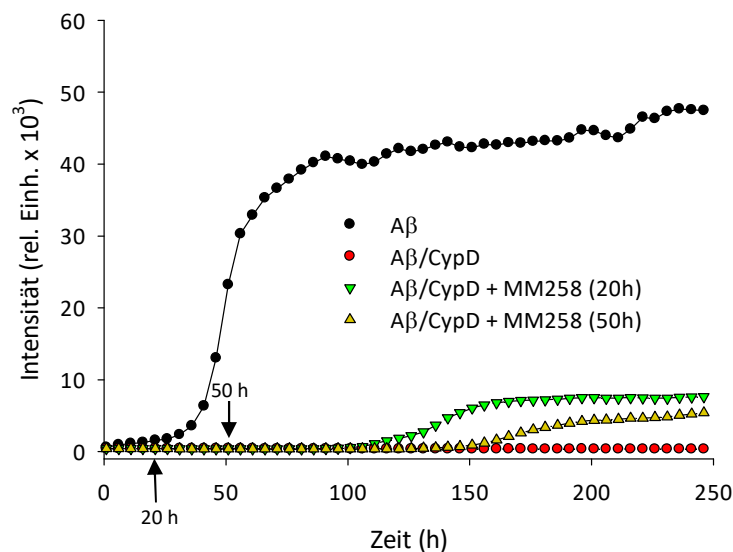


Abbildung 16 **Die zeitverzögerte Gabe von MM258 zu einem Reaktionsansatz von A β (1-40) mit CypD ermöglichte die fibrilläre Aggregation.** Die Lag-Zeit der fibrillären Aggregation ist nach der Zugabe von MM258 in den Reaktionsansatz nicht signifikant verkürzt. Ein akkumulieren von aggregationsfördernden A β -Spezies unter Anwesenheit von CypD scheint nicht stattzufinden. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1% DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40), 3 μ M CypD und 12 μ M MM258 bei 37 $^{\circ}$ C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar. Abbildung mit einzelnen Messansätzen siehe Anhang (Abschnitt 9.2, Abbildung 47).

4.3.3 Der Einfluss von Cyclophilin-Varianten auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)

Es wurden mehrere Varianten von CypA und CypD mit stark verminderter PPIase-Aktivität verwendet, um die Rolle der PPIase-Aktivität der Cyclophiline bei der Inhibierung der fibrillären Aggregation von A β (1-40) zu untersuchen. Es wurden ThT-Fluoreszenzexperimente zur fibrillären Aggregation von A β (1-40) mit verschiedenen Konzentrationen der CypA- und CypD-Varianten durchgeführt.

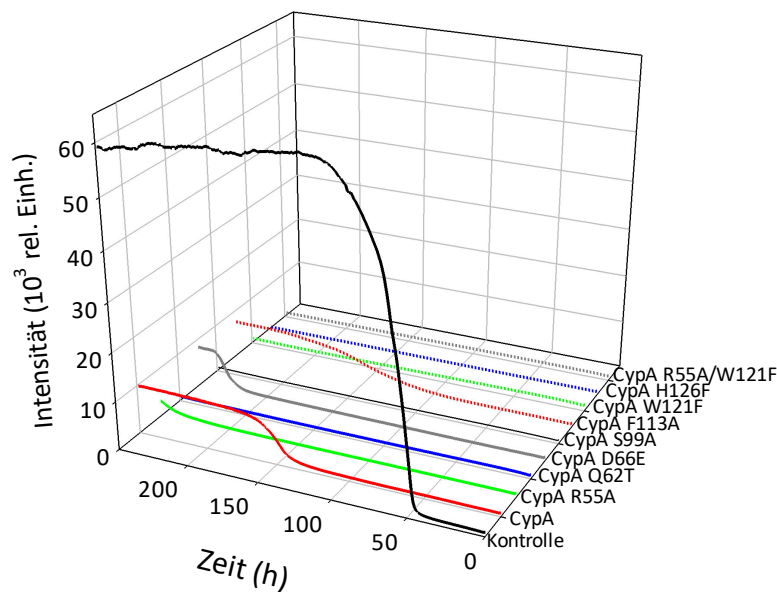


Abbildung 17 **Einfluss verschiedener CypA-Varianten auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)**. Einfluss der Einfachvarianten CypA R55A, CypA Q62T, CypA D66E, CypA S99A, CypA F113A, CypA W121F, CypA H126F und der Doppelvariante CypA R55A/W121F auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Alle verwendeten Varianten von CypA unterdrückten die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) unter den gewählten Bedingungen und zeigten so gleiche Eigenschaften im ThT-Fluoreszenzassay wie das Wildtypenzym. Jede Reaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 5 μ M der CypA Varianten bei 37 °C. Jeder Reaktionsansatz wurde alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit λ_{Ex} =450 nm und λ_{Em} =482 nm. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar.

Untersucht wurde das Verhalten der CypA-Varianten CypA R55A, CypA Q62T, CypA D66E, CypA F99A, CypA F113A, CypA W121F, CypA H126F und der Doppelvariante CypA R55A/W121F. Bei einer Konzentration von 5 μ M der verwendeten Varianten wurde im beobachteten Zeitraum, wie in Gegenwart von wtCypA, keine Zunahme der ThT-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 17). Außerdem wurden die CypD-Varianten CypD T94A, CypD R97A, CypD Q105T, CypD K133I, CypD N144A, CypD W163A und die Dopplevarianten CypD T94A/G117A, CypD R97A/Q105T, CypD R97A/F102A und CypD R97A/H168Q im ThT-Fluoreszenzassay untersucht. Auch hier wurde kein Unterschied in der Beeinflussung der Aggregation von A β (1-40) im Vergleich zum wtCypD gefunden (Abbildung 18).

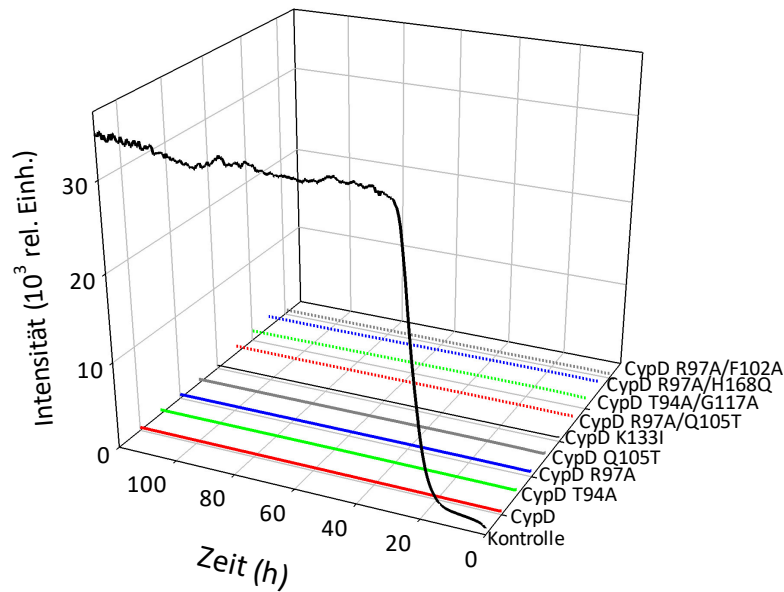


Abbildung 18 **Einfluss verschiedener CypD-Varianten auf die Aggregation von A β (1-40)**. Einfluss der CypD-Varianten CypD T94A, CypD R97A, CypD Q105T, CypD K133I, CypD T94A/G117A, CypD R97A/Q105T, CypD R97A/F102A und CypD R97A/H168Q auf die Fibrillierung von A β (1-40). Alle verwendeten Varianten von CypD unterdrückten die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) unter den gewählten Bedingungen und zeigten so gleiche Eigenschaften im ThT-Fluoreszenzassay wie das Wildtypenzym. Jede Reaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 5 μ M der entsprechenden CypD-Variante bei 37 °C. Jeder Reaktionsansatz wurde alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten mit einem *Multimode Microplate Reader BMG FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar.

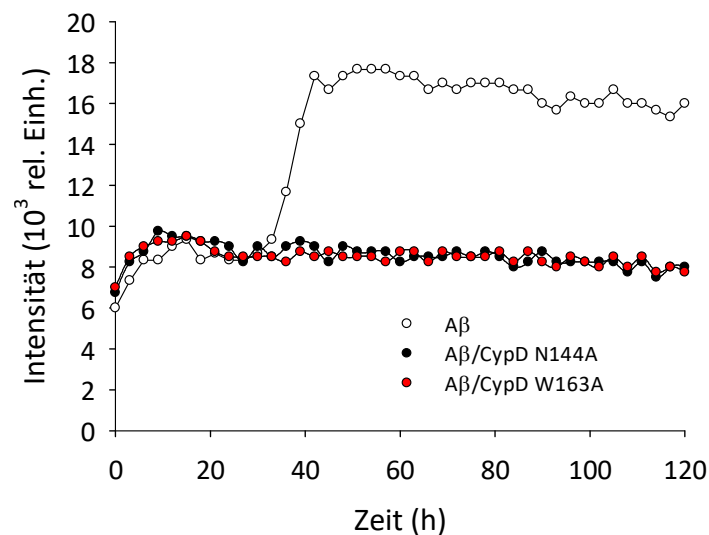


Abbildung 19 **Einfluss der zwei CypD-Varianten N144A und W163A auf die Fibrillierung von A β (1-40)**. Beide Varianten inhibieren die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Jede Reaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 5 μ M der entsprechenden CypD-Variante bei 37 °C. Jeder Reaktionsansatz wurde alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgte mit einem *Multimode Microplate Reader BioTek Synergy™ HT*. Jeder Graph stellt das repräsentative Mittel aus 8 Messreplikaten dar.

4.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der fibrillären Aggregation von A β (1-40)

Ob die beobachtete ThT-Fluoreszenzzunahme kausal mit der fibrillären Aggregation von initial monomerem A β (1-40) zusammenhängt, wurde mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Diese Methode wurde auch zur Untersuchung der Morphologie der entstehenden Aggregate verwendet, um Fibrillen von weniger geordneten Aggregaten zu unterscheiden.

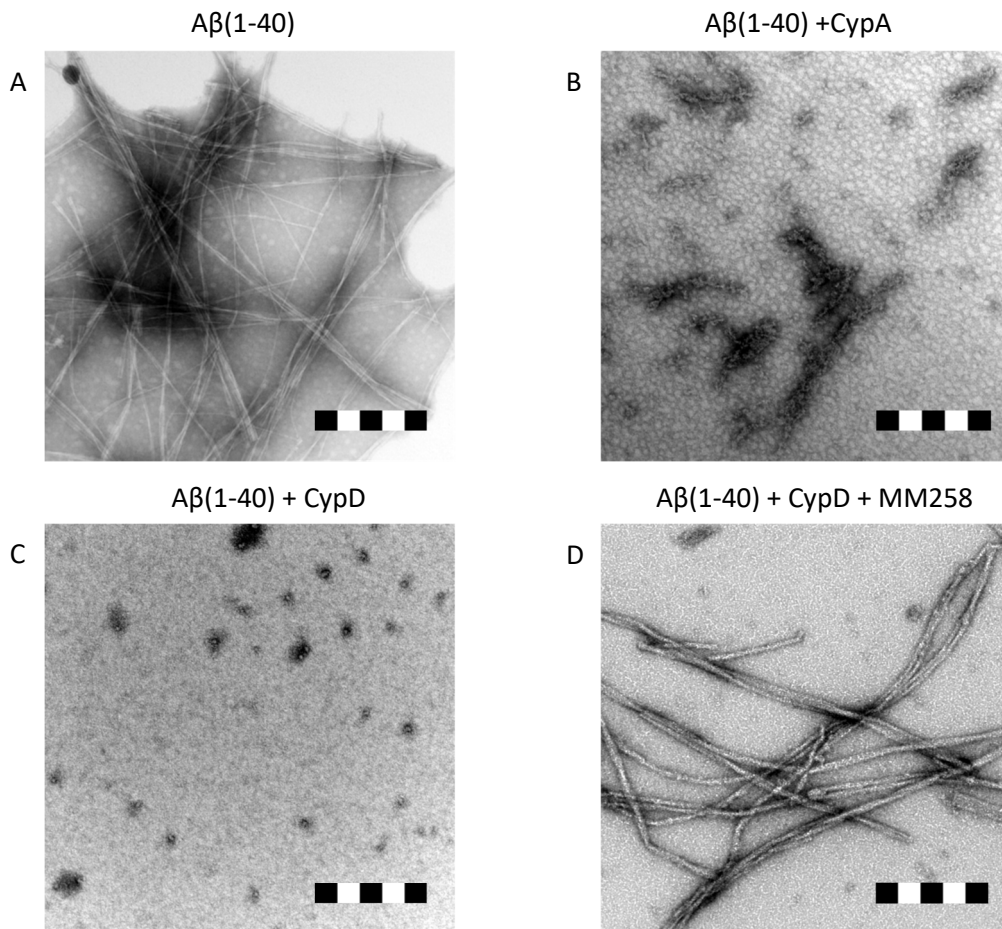


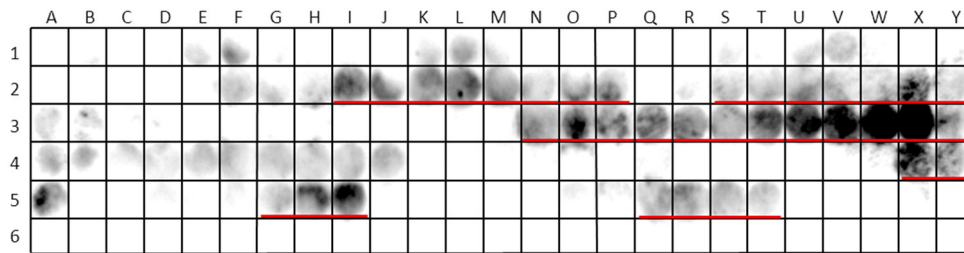
Abbildung 20 **Elektronenmikroskopische Untersuchung von diversen A β (1-40)-Aggregationsansätzen.** TEM-Aufnahmen von Proben der A β (1-40)-Aggregation bei 50000-facher Vergrößerung (50 kV). Der Maßstabsbalken am rechten unteren Bildrand entspricht 200 nm. Bild A zeigt Fibrillen aus einem Aggregationsansatz von A β (1-40). In Bild B dargestellt ist ein Präparat aus einem Reaktionsansatz von A β (1-40) mit CypA. Es sind keine ausgebildeten Fibrillen in diesem Reaktionsansatz zu beobachten. Das gleiche ist in Reaktionsansätzen von A β (1-40) mit CypD zu beobachten, wie in Bild C der Abbildung dargestellt. In Abbildung D sieht man, dass die Zugabe eines Cyclophilin-inhibitors wie MM258 in den Reaktionsansatz die Ausbildung von A β (1-40)-Fibrillen trotz Anwesenheit eines Cyclophilins ermöglicht. Jede Probe wurde aus einem Reaktionsansatz in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 5 μ M CypA oder CypD entnommen und auf einem Kupfer-Grid für die TEM-Messung präpariert. Um den Einfluss von MM258 auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) bei Anwesenheit von CypD zu messen, wurden 15 μ M MM258 in einen Reaktionsansatz mit 3 μ M CypD gegeben. Alle Reaktionsansätze wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für die Präparation von *Grids* verwendet. Die Reaktionsansätze wurden für die Dauer der Inkubation alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt.

Die Proben wurden einem A β (1-40)-Aggregationsansatz entnommen, auf ein Kupfer-*Grid* adsorbiert und mit Ammoniummolybdat kontrastgefärbt. Präparate einer A β (1-40)-Lösung, welche im ThT-Fluoreszenzassay eine typische Reaktionskurve aufwiesen, zeigten in der TEM-Aufnahme Strukturen, die typisch für Amyloid-Fibrillen sind (Abbildung 20A) [171]. Im Gegensatz dazu wurden in Präparaten aus einem Aggregationsansatz, der A β (1-40) und CypA enthielt, keine fibrillären Strukturen gefunden (Abbildung 20B). Auch bei Reaktionsansätzen mit CypD waren mit TEM keine fibrillären Strukturen nachzuweisen (Abbildung 20C). Dass in den TEM-Studien keine beobachtbaren Fibrillen vorhanden waren, korreliert mit der fehlenden Fluoreszenzzunahme bei 482 nm im ThT-Fluoreszenzassay in Gegenwart von CypA und CypD. Cyclophilin-spezifische Inhibitoren wie CsA und das CsA-Derivat MM258 scheinen, wie im ThT-Fluoreszenz-Assay beobachtet, die Fibrillierung von A β (1-40) unter Anwesenheit von CypA und CypD zu ermöglichen. Abbildung 20D zeigt eine Probe einer Lösung von A β (1-40) mit CypD und dem CsA-Derivat MM258. Es sind typische fibrilläre Strukturen sichtbar.

4.5 Identifizierung der CypD-Interaktionsstelle in A β (1-40) durch *Peptide SPOT Array*

Um den Sequenzbereich in A β (1-40), der mit CypD interagiert, zu identifizieren, wurden Peptidarrays verwendet, die durch Spot-Synthese erzeugt wurden [150]. Dazu wurden überlappende tridecamere bis hexamere Peptide, die die komplette Sequenz von A β (1-40) überspannten, über einen Linker an eine Nitrocellulosemembran synthetisiert. Die Peptidarrays wurden mit 1 μ M CypD inkubiert. Anschließend wurde gebundenes CypD durch Immundetektion nach Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran nachgewiesen. So konnten Regionen von A β (1-40) identifiziert werden, welche an der Bindung an CypD beteiligt sind. Die deutlichsten Sequenzmotive für die Bindung von CypD waren die Bereiche A β (3-6), A β (11-14) und A β (19-21). Für weitere Untersuchungen wurde der Bereich A β (16-25) mit der Aminosäuresequenz KLVFFAEDVG verwendet. Diese Sequenz enthält die für die Interaktion mit CypD wichtigen Abschnitt A β (19-21). Die Sequenz beinhaltet auch den hydrophoben Kernbereich A β (16-22), der als essentiell für die fibrilläre Aggregation in der Literatur beschrieben wurde [172]–[174]. Mit Peptidarray-Permutationsanalyse wurde untersucht, welche Aminosäuren in A β (16-25) für die Interaktion mit CypD wichtig sind. An den Positionen 2-9 dieses Peptids wurde eine Substitution der Reste gegen alle kanonischen Aminosäuren durchgeführt und die Veränderung des Bindungsverhaltens von CypD an das Peptid analysiert (Abbildung 22). Eine Substitution gegen Lysin und Arginin, unabhängig von der Position im Peptid, führte zu einer geringeren Bindung von CypD an das Peptid. Eine Substitution an beliebiger Stelle des Peptids gegen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin verstärkte die Bindung, wie auch eine Substitution gegen Asparaginsäure zu einer stärkeren Bindung von CypD an das zellulosegebundene Peptid führte. Essentiell für die Bindung von CypD an das Peptid sind Phe19, Phe20 und Glu22 sowie Asp23. Die Substitution von Phe19 und Phe20 gegen nicht hydrophobe Reste, mit Ausnahme von Aspartat, war mit einer Abnahme der CypD-Bindung verbunden.

A



B

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSKNGA IIGLMVGGVV IA

Abbildung 21 **Kartierung der Bindesequenzen von CypD an A β (1-40) mittels eines Peptidarrays.** Es wurden überlappende tridecamere bis hexamere Peptide, die die komplette Sequenz von A β (1-40) überspannen und die über einen Linker mit einer Zellulosemembran verbunden waren, synthetisiert. Die Membran mit A β (1-40)-Peptidfragmenten wurde mit 1 μ M CypD inkubiert. Gebundenes CypD wurde mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend die CypD-Bindestellen mittels eines anti-CypA-Antikörpers detektiert. Der Blot ist in Bild A zu sehen. Die A β (1-40)-Peptidfragmentgröße nimmt von Reihe 1 zu Reihe 6 ab. Reihe 1 beginnt mit Tridecameren, die Peptidlänge nimmt sukzessive um eine Aminosäure bis Reihe 6 ab. Auf der letzten Reihe wurden Hexamere synthetisiert. Die gefundenen putativen Bindungsstellen von CypD an A β (1-40) sind rot unterstrichen. In Bild B sind die identifizierten Bindungsbereiche von CypA in der A β (1-40)-Sequenz rot hervorgehoben. Es sind die Bereiche A β (3-6), A β (11-14) und A β (20-22).

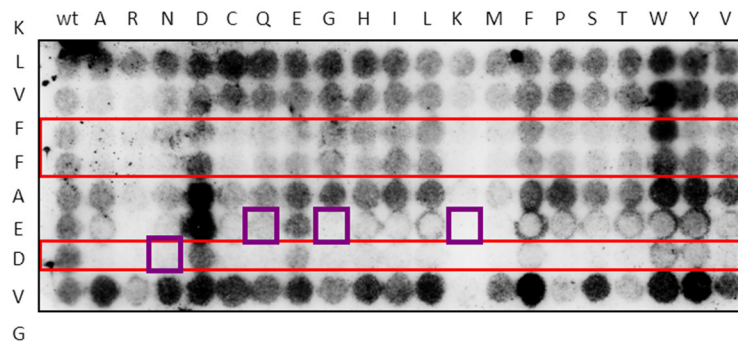


Abbildung 22 **Untersuchung der CypD/A β -Interaktion durch Permutation von A β (16-25).** Die Positionen 2-9 der untersuchten Aminosäuresequenz (Reihe) wurde gegen alle 20 kanonischen Aminosäuren (Spalte) substituiert. Die Spot-Membran wurde mit 1 μ M CypD inkubiert und anschließend gebundenes Protein mit Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von gebundenem CypD an A β (1-40) erfolgte durch einen anti-CypA-Antikörper. Der Austausch der hydrophoben Reste Phe19 und Phe20 (mit einem roten Rechteck eingefasst und markiert) gegen eine beliebige andere Aminosäure hat immer eine schwächere Bindung von CypD an das Peptid A β (16-25) zur Folge. Die Substitution von Phe19 oder Phe20 gegen das hydrophobe Tryptophan verstärkt die Bindung. Auch der Austausch von Asp23 führt zu einem fast vollständigen Verlust des Bindevermögens von CypD an A β (16-25). Die Kästchen (lila) markieren variierte Aminosäuren, welche in der Literatur als Auslöser für früh einsetzende erbliche Alzheimer-Erkrankungen (*early onset FAD*) diskutiert werden. Die Substitutionen E22Q („Dutch“), E22G („Arctic“), E22K („Italian“) und D23N („Iowa“) haben eine schwächere (E22Q) oder keine (E22K, E22G, D23N) nachweisbare CypD-Bindung.

Eine Bindung von CypD an das Peptid war nach Substitution von Glu22 und Asp23 gegen Aminosäuren, welche keine negativen Ladungen an ihrer Seitenkette tragen, kaum oder nicht mehr nachweisbar. Eine Substitution gegen Tryptophan verstärkte in allen Positionen die Bindung von CypD an die A β -Peptidfragmente. Interessanterweise wiesen Substitutionen, welche in der Literatur im Zusammenhang mit dem Auftreten der früh einsetzenden erblichen Alzheimer-Erkrankungen

(*early onset FAD*) diskutiert werden, eine stark verringerte Bindung an CypD auf. Die Substitutionen E22Q („Dutch“), E22G („Arctic“), E22K („Italian“) und D23N („Iowa“) (Abbildung 22, lila Kästchen) haben eine schwächere (E22Q) oder keine (E22K,E22G,D23N) nachweisbare CypD-Bindung im Peptidarray.

4.6 NMR-spektroskopische Untersuchung der Interaktionsstellen von CypD und A β (1-40)

Weil die NH-Signale (*cross-peaks*) des Peptidrückgrates im zwei-dimensionalen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum sensitiv gegenüber der Änderung der chemischen Umgebung sind, ändert die Bindung eines anderen Proteins die Signalintensität oder die chemische Verschiebung von Resten an der Bindungsstelle. Um die putative Interaktionsstelle der Bindung von CypD an A β (1-40) zu kartieren, wurden 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von 50 μM ^{15}N -A β (1-40) aufgenommen. Die Spektren reflektieren eine lösliche, unstrukturierte und monomere Form von A β (1-40). Anschließend wurde zu ^{15}N -isotopenmarkiertem A β (1-40) unmarkiertes CypD in 2,5-fachem Überschuss gegeben und die Spektren in Gegenwart und Abwesenheit von CypD verglichen (Abbildung 23). Die schwarzen Spots zeigen das A β (1-40)-Spektrum in Abwesenheit von CypD. Die roten Spots zeigen das A β (1-40)-Spektrum in Gegenwart eines 2,5-fachen Überschusses an CypD.

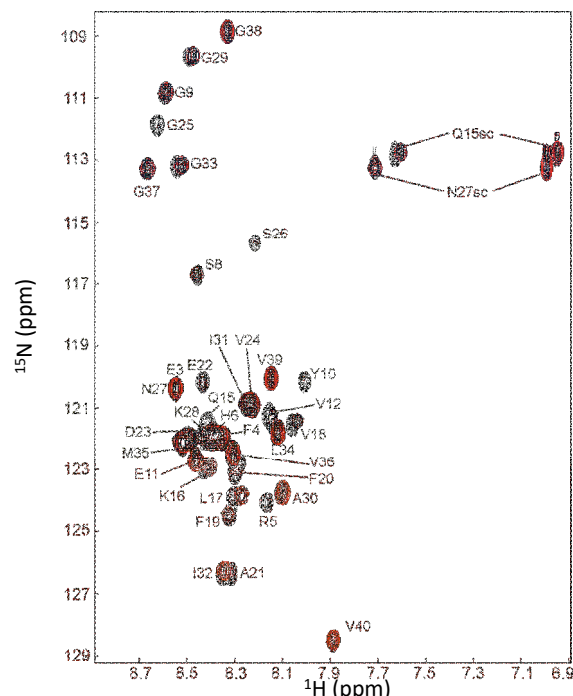


Abbildung 23 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von freiem A β (1-40) (schwarz) und A β (1-40)/CypD (Verhältnis 1:2,5, rot). Die Intensität der *cross-peaks* ändert sich vorwiegend im hydrophoben Bereich von Lys16 bis Glu22. Das Spektrum wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10 % D $_2$ O bei 25 °C aufgenommen. Im Reaktionsansatz waren 40 μM ^{15}N -markiertes A β (1-40) und 100 μM CypD.

Signifikante Veränderungen der chemischen Verschiebung ($>0,015$ ppm) wurden für die Aminosäurereste Tyr10, Lys16, Leu17, Val18, Ala21, Ile32 und Gly33 von ^{15}N -A β (1-40) in Gegenwart von CypD gefunden (Abbildung 24A). Außerdem wurden nach Zugabe von CypD einige NH-Signale im zwei-dimensionalen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -A β (1-40) schwächer. Reste mit einer Reduktion der Intensität unter 25 % wurden für die zentrale A β (1-40)-Sequenz Leu17-Glu22 gefunden (Abbildung 24B). Die Abnahme der Signalintensität der NH-Signale im zwei-dimensionalen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -A β (1-40) war von der CypD-Konzentration abhängig (Abbildung 25).

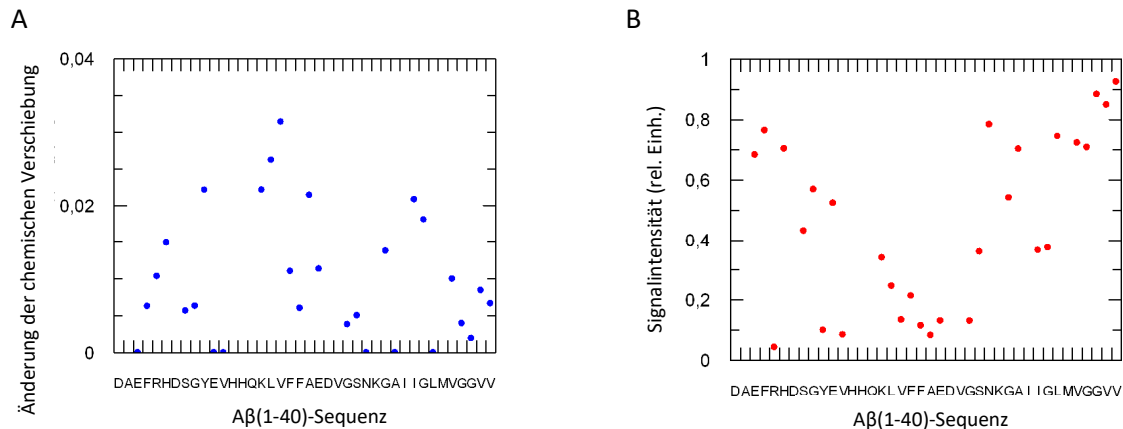


Abbildung 24 **NMR-Studien zur Identifizierung der Bindungsstelle von CypD an A β (1-40)**. A) Veränderungen der chemischen Verschiebung von A β (1-40) bei 2,5-fachem Überschuss an CypD. Es ist gut eine Veränderung des Spektrums zu sehen, wobei die größten Änderungen unter anderem im Bereich A β (16-20) liegen. B) Auftrag der Veränderungen der relativen Signalintensität gegen die A β (1-40)-Sequenz. Die gemessenen Intensitäten der einzelnen Aminosäuren wurden in relativer Größe zum Spektrum von A β (1-40) aufgetragen. Auch hier sind die größten Veränderungen, das heißt die Abnahme der Signalintensität, im Bereich A β (16-20) zu beobachten. CypD wurde in 2,5-fachem Überschuss zu A β (1-40) in den Versuchsansatz gegeben. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10 % D $_2$ O, 40 μM ^{15}N -A β (1-40) und 100 μM CypD bei 25 $^\circ\text{C}$.

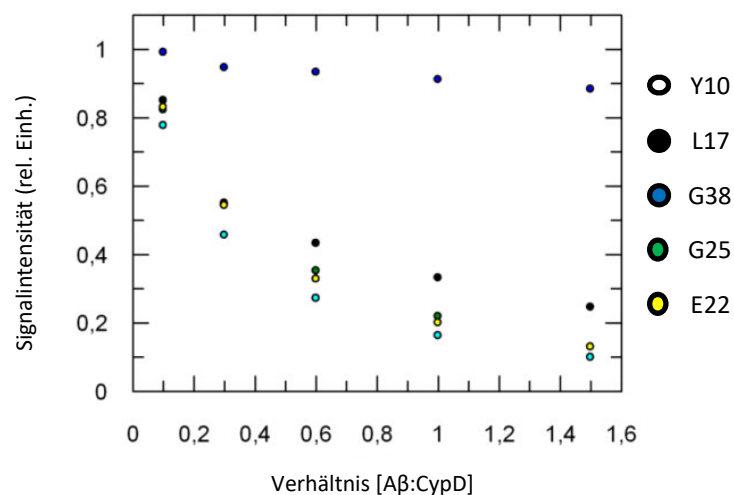


Abbildung 25 **Abnahme der Intensität von ^1H - ^{15}N -Korrelationsignalen von ausgewählten A β (1-40)-Resten**. Bei steigender Konzentration von CypD im Aggregationsansatz (angegeben als Verhältnis [CypD:A β (1-40)]) nimmt die Signalintensität der gezeigten A β (1-40)-Aminosäuren im HSQC-Spektrum ab. Keine Änderung zeigt Gly38 am C-Terminus. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10 % D $_2$ O, 40 μM ^{15}N -A β (1-40) und 100 μM CypD bei 25 $^\circ\text{C}$.

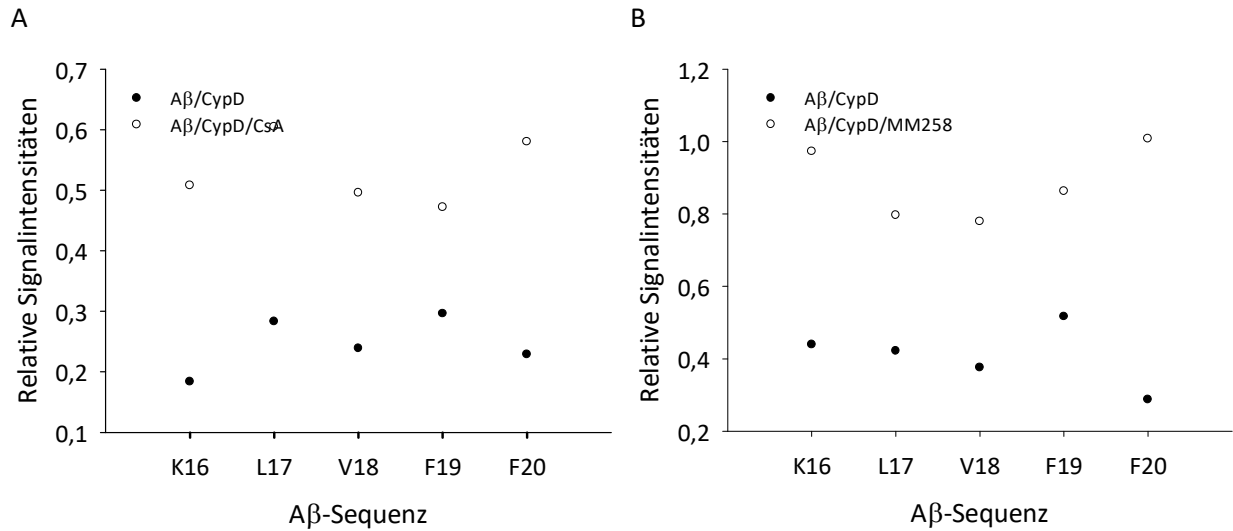


Abbildung 26 **Veränderungen der relativen Signalintensität von Resten innerhalb der von an CypD bindenden Aβ(1-40)-Region.** A) Relative Signalintensität der ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale von Aβ(1-40)/CypD und Aβ(1-40)/CypD/CsA. B) Relative Signalintensität der ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale von Aβ(1-40)/CypD und Aβ(1-40)/CypD/MM258. Beide Cyclophilininhibitoren nähern die Signalintensitäten des Aβ(1-40)/CypD-Spektrums wieder an das Aβ(1-40)-Spektrum an. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10% D_2O , 40 μM ^{15}N -Aβ(1-40) und 100 μM CypD bei 25 °C. Eine relative Signalstärke von 1 entspricht dem Spektrum von Aβ(1-40).

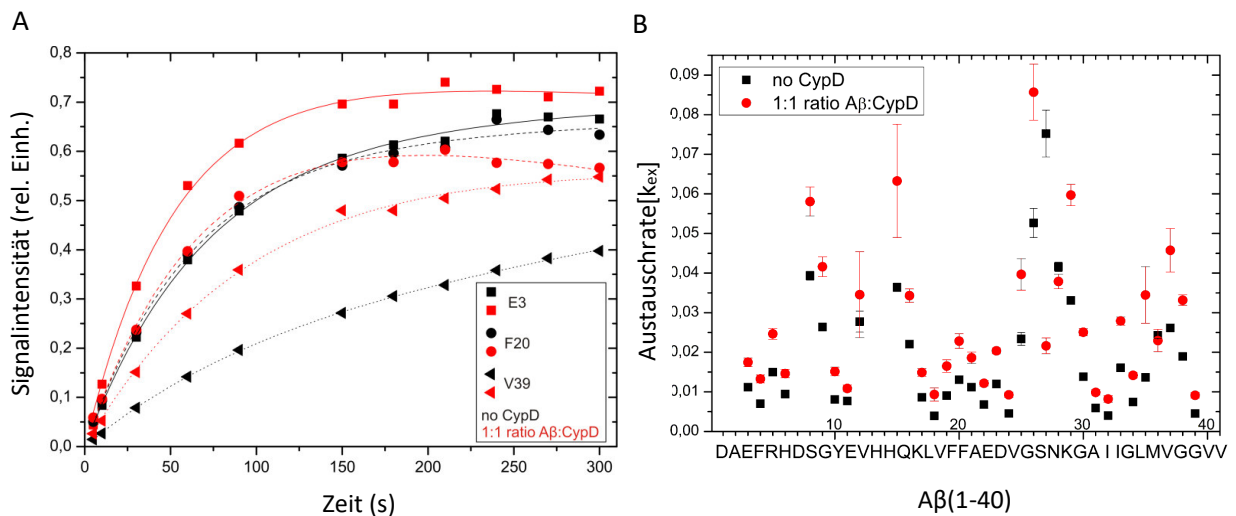


Abbildung 27 **Untersuchung der Veränderung Amidprotonenaustausches von Aβ(1-40)-Resten.** CypD beschleunigt den Amidprotonenaustausch mit dem umgebenden Lösungsmittel Wasser. A) Amidprotonenaustausch von Aβ(1-40)-Rückgratprotonen in Anwesenheit von CypD (rot) und in Abwesenheit von CypD (schwarz). Die Austauschrate ist bei Anwesenheit von CypD erhöht bzw. beschleunigt. Dies kann an einer offeneren und flexibleren Struktur von Aβ(1-40) liegen. B) Relative Austauschraten k_{ex} mit und ohne CypD (Farbgebung analog Abb. A). Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10 % D_2O , 40 μM ^{15}N -Aβ(1-40) und 100 μM CypD bei 25 °C.

Die Abnahme der Signalintensitäten des Aβ(1-40)-Spektrums war reversibel. Wurde der Cyclophilininhibitor MM258 in den Messansatz gegeben der Aβ(1-40) und CypD enthielt, glichen sich die Intensitäten denen von Aβ(1-40) allein an (Abbildung 26). Dies ist ein Indiz für eine direkte Beteiligung des aktiven Zentrums von CypD an der Interaktion mit Aβ(1-40). Der K_D -Wert des Aβ(1-

40)/CypD-Komplexes wurde auf ca. 30 μM geschätzt (persönliche Mitteilung von Dr. Rolf Sachs, AG Prof. Dr. Jochen Balbach, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Physik).

New-MEXICO-Experimente wurden durchgeführt, um den Austausch der Amidprotonen der Peptidbindungen des Rückgrates mit dem wässrigen Puffer zu messen (Abbildung 27A). In diesem Experiment findet man für exponierte Teile des Peptidrückgrates einen schnellen Anstieg der NMR-Intensitäten, während geschütztere Teile verzögert austauschen. Interessanterweise war der beobachtete Protonenaustausch in Anwesenheit von 2,5-fachem CypD-Überschuss im Vergleich zur Probe ohne CypD-Zusatz gleichmäßig erhöht (Abbildung 27B). Das weist darauf hin, dass CypD die Lösungsmittelzugänglichkeit für alle Bereiche von $\text{A}\beta(1-40)$ erhöht. Dies lässt auf eine offenere Struktur des $\text{A}\beta(1-40)$ -Peptids in Gegenwart von CypD schließen [175], z. B. wenn sich kein β -Faltblatt bilden kann und das Peptid unstrukturiert vorliegt.

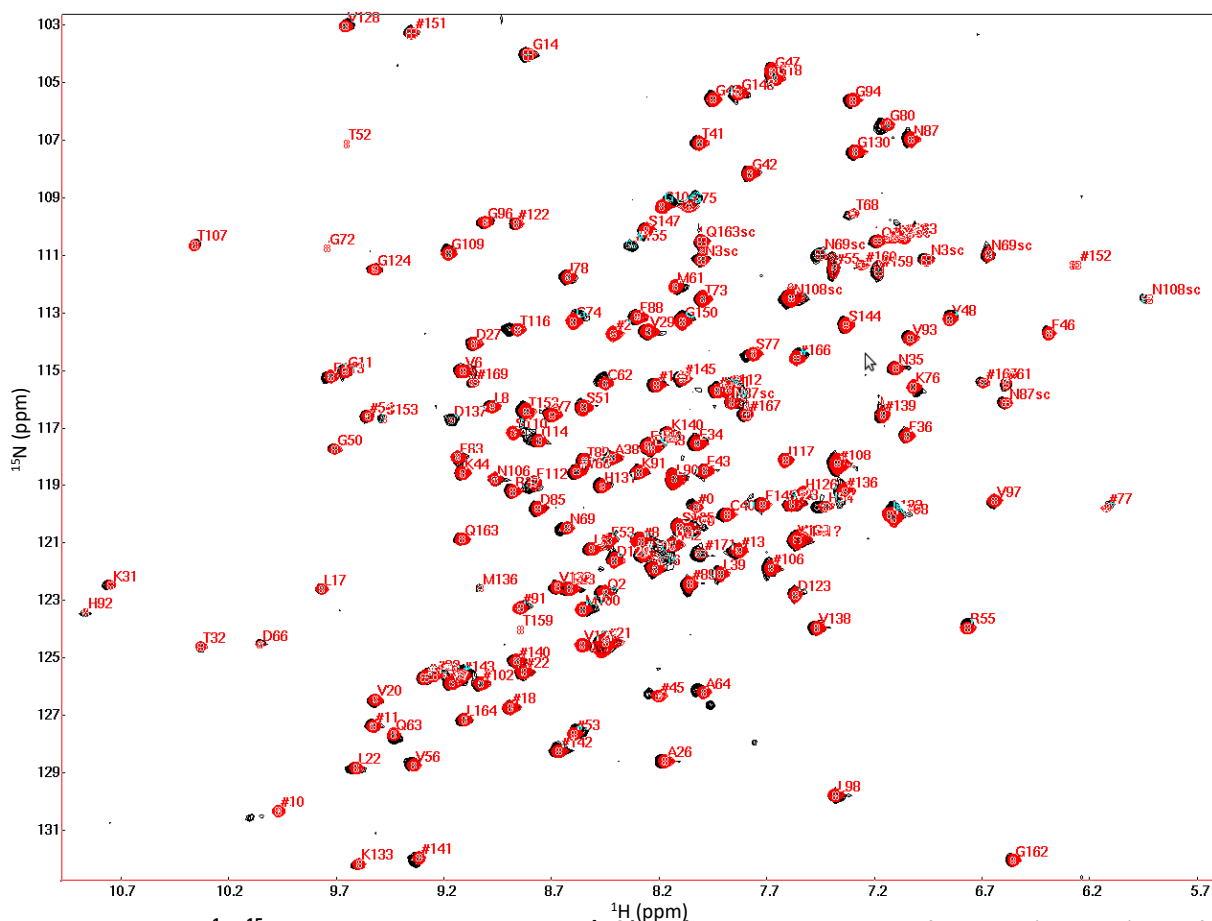


Abbildung 28 **2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von CypD/ $\text{A}\beta(1-40)$** . Es sind die Signale für CypD (schwarz) und für den CypD/ $\text{A}\beta(1-40)$ -Komplex (rot) bei 1,5-fachem $\text{A}\beta(1-40)$ -Überschuss gezeigt. Veränderungen des Spektrums wurden an Resten des aktiven Zentrums von CypD gemessen. Es wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 10% D_2O , 80 μM CypD und 120 μM $\text{A}\beta(1-40)$ bei 25 $^\circ\text{C}$ gemessen. Es sind einige Verschiebungen im CypD-Spektrum bei Anwesenheit von $\text{A}\beta(1-40)$ zu beobachten.

Zur Kartierung der putativen Interaktionsstelle von $\text{A}\beta(1-40)$ in CypD wurden zwei-dimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von ^1H - ^{15}N -isotopenmarkiertem CypD in Abwesenheit und Anwesenheit von unmarkiertem $\text{A}\beta(1-40)$ gemessen (Abbildung 28). Die schwarzen Spots zeigen das CypD-

Spektrum in Abwesenheit von A β (1-40). Die roten Spots zeigen das CypD-Spektrum in Gegenwart eines 1,5-fachen Überschusses an A β (1-40).

In Abbildung 29 werden im Detail die Reste mit den größten Veränderungen des Spektrums gezeigt. Die meisten dieser Veränderungen finden an Resten des aktiven Zentrums von CypD statt. Änderungen der chemischen Verschiebung der CypD-Signale waren vor allem an Aminosäuren im aktiven Zentrum von CypD zu finden. Aminosäuren mit größerer Veränderung der chemischen Verschiebung, d. h. $\delta\Delta > 0,01$ ppm, sind in Abbildung 29 dargestellt. Der an A β (1-40) bindende Bereich umfasst Thr52 bis Ser77 und Leu98 bis Val128. In diesem Bereich enthaltene Aminosäuren binden auch CsA und sind an der Ausbildung des aktiven Zentrums von CypD beteiligt [56]. Die Bindestelle von A β (1-40) in CypD ist in Abbildung 39 innerhalb der Kristallstruktur des CypD/CsA-Komplexes (RCSB PDB⁶: 2BIU) dargestellt. A β (1-40) bindet in ähnlicher Weise an das aktive Zentrum von CypD wie CsA ([176].

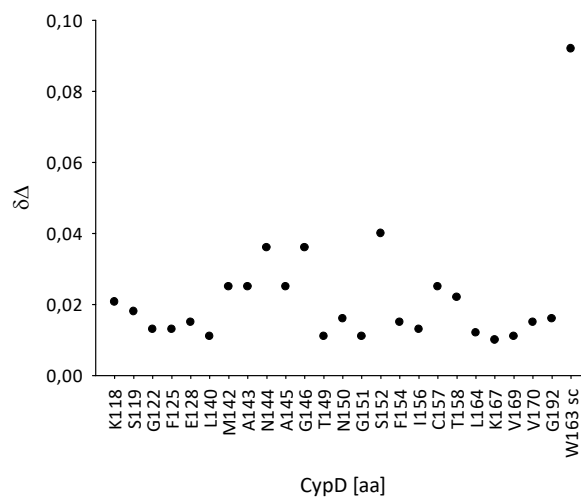


Abbildung 29 **Veränderung der chemischen Verschiebung von Cyp-Resten im aktiven Zentrum.** Darstellung der Aminosäuren mit der größten chemischen Verschiebung der ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale in CypD ($\delta\Delta > 0,01$ ppm). Alle Aminosäuren sind im aktiven Zentrum von CypD lokalisiert [50], [51]. Die stärkste Verschiebung zeigte W163, allerdings zeigt eine Substitution dieses Restes gegen Alanin keinen Einfluss im ThT-Fluoreszenzassay auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40).

4.7 Charakterisierung der Interaktion von A β (16-20) mit Cyclophilinen

4.7.1 Inhibition der PPIase-Aktivität von CypA und CypD durch A β (16-20)

Nach Identifizierung der Bindungsstelle von CypD in der Sequenz von A β (1-40) wurde das Pentapeptid A β (16-20), das diesen Bereich von A β repräsentiert, synthetisiert und seine Interaktion mit CypA und CypD charakterisiert. Um seine Affinität zu den aktiven Zentren der Cyclophiline zu bestimmen, wurde seine Fähigkeit untersucht, die PPIase-Aktivität zu inhibieren. Die Inhibitionsmessungen wurden mit einem proteasefreien fluoreszenzbasierten PPIase-Assay

⁶ <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2BIU>

durchgeführt [148]. Die Aktivitätsmessungen von CypA und CypD ergaben eine konzentrationsabhängige Geschwindigkeitsabnahme der katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung des Peptides Abz-AAPF-pNA bei Zugabe von A β (16-20) in den Reaktionsansatz (Abbildung 30). A β (16-20) ist ein Inhibitor der PPIase-Aktivität von CypA und CypD. Durch Auftragung der PPIase-Aktivität gegen die Konzentration von A β (16-20) war eine Berechnung der IC₅₀-Werte durch Anpassung an eine sigmoidale Funktion möglich (Abbildung 30). Dabei war die Affinität des Peptides zu CypA mit einem IC₅₀-Wert von 136 nM \pm 14 nM höher als zu CypD mit einem IC₅₀-Wert von 497 nM \pm 70 nM.

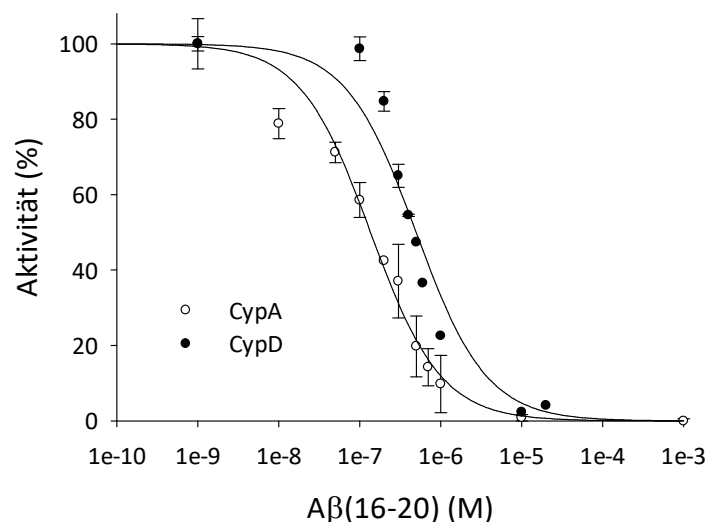


Abbildung 30 **Inhibition der PPIase-Aktivität der Cyclophiline A und D durch das Pentapeptid A β (16-20)**. Der berechnete IC₅₀-Wert für CypA/A β (16-20) beträgt 136 nM \pm 14 nM, der IC₅₀-Wert für CypD/A β (16-20) beträgt 497 nM \pm 70 nM. Die Messungen erfolgten im proteasefreien Fluoreszenzassay mit dem Substrat Abz-AAPF-pNA in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO und 5 nM CypA bzw. CypD bei 10 °C. Jeder Messpunkt repräsentiert das statistische Mittel aus drei Messungen. Es ist die Standardabweichung angegeben.

Anschließend wurde untersucht, ob die Inhibierung von CypA und CypD durch A β (16-20) reversibel ist. Dazu wurden Rückverdünnungsexperimente durchgeführt, für diese wurde exemplarisch CypA genutzt, da es die höhere Affinität zu A β (16-20) besaß. CypA (50 nM) wurde mit 1 μ M A β (16-20) im Messpuffer präinkubiert und anschließend im Verhältnis 1:50 mit Messpuffer verdünnt. Daraufhin wurde die PPIase-Aktivität der verdünnten Probe gemessen. Nach der Verdünnung, das heißt in Gegenwart von 20 nM A β (16-20), erreichte die Aktivität von CypA nahezu das Niveau der nicht inhibierten Kontrolle (Abbildung 31). Das Rückverdünnungsexperiment weist darauf hin, dass die Inhibierung von CypA durch A β (16-20) das Resultat einer reversiblen und transienten Bindung des Peptids im aktiven Zentrum von CypA war und nicht durch Aggregation des Inhibitor/Enzym-Komplexes hervorgerufen wurde. Das Experiment wurde für CypD nicht durchgeführt, da CypD und CypA ein sehr ähnliches Verhalten zeigten.

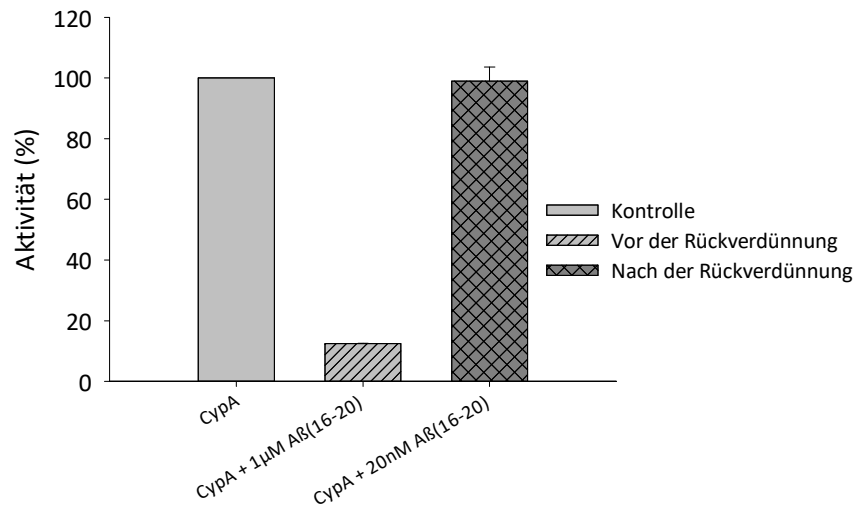


Abbildung 31 **Rückverdünnungsexperiment zur Untersuchung der Reversibilität der Inhibition der PPlase-Aktivität von CypA durch Aβ(16-20)**. Nach Verdünnung einer Lösung von 50 nM CypA/ 1 µM Aβ(16-20) wurde die Aktivität von CypA wie in der nicht inhibierten Kontrollmessung erreicht. Es wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 10 °C gemessen. Es wurde je 1 nM CypA und 1 µM Aβ(16-20) zugesetzt. Für die Rückverdünnung wurden 50 nM CypA mit 1 µM Aβ(16-20) prä-inkubiert und dann der Reaktionsansatz mit Messpuffer 1:50 verdünnt. Es ist die Standardabweichung angegeben.

4.7.2 Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Interaktion durch isotherme Titrationskalorimetrie

Um die thermodynamischen Parameter der CypA bzw. CypD/Aβ(1-40)-Interaktion zu bestimmen, wurde diese mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert. Da Aβ(1-40) unter den in der ITC verwendeten Bedingungen, die hohe Konzentrationen der Interaktionspartner voraussetzt, zu schnell aggregierte, wurde stattdessen Aβ(16-20) genutzt. Die Versuchsbedingungen mussten an die Bedingungen des untersuchten Systems, wie die relativ schnelle Aggregation von Aβ(16-20) bei hohen Konzentrationen, angepasst werden. Daher wurde Aβ(16-20) in die Messzelle vorgelegt und CypA bzw. CypD dazu titriert. Dabei wurde eine Lösung mit 100 µM CypA (Abbildung 32) bzw. CypD (Abbildung 33) in eine Lösung mit 240 µM Aβ(16-20) titriert. Als Kontrolle wurden Titrations mit 100 µM CypA bzw. CypD in Messpuffer verwendet. Die Titration von Messpuffer in 240 µM Aβ(16-20) als Kontrolle war aufgrund der auftretenden Aggregation von Aβ(16-20) nicht auswertbar.

Die Titrationsprofile zeigten, dass bei Injektion von CypA- bzw. CypD-Aliquots in eine Aβ(16-20)-Lösung Bindungswärme frei wurde. Die entstehenden exothermen Peaks nahmen im Laufe der Titration an Amplitude ab und zeigten ein Sättigungsverhalten. Die Datenpunkte der integrierten Wärmekurve konnten an ein Einseitenbindungsmodell angepasst werden. So konnten die Assoziationskonstante (K_A), die Bindungsstöchiometrie (N) und die thermodynamischen Parameter bestimmt werden (Tabelle 10).

Die Titration von CypA ergab einen ΔG_{ITC} -Wert von $7,69 \text{ kcal mol}^{-1}$, die Titration von CypD wies einen ΔG_{ITC} -Wert von $7,44 \text{ kcal mol}^{-1}$ auf. Diese Werte reflektieren die Assoziationskonstanten $K_{ACypA} = 5,48 \pm 1,32 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ und $K_{ACypD} = 3,58 \pm 0,93 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Tabelle 10).

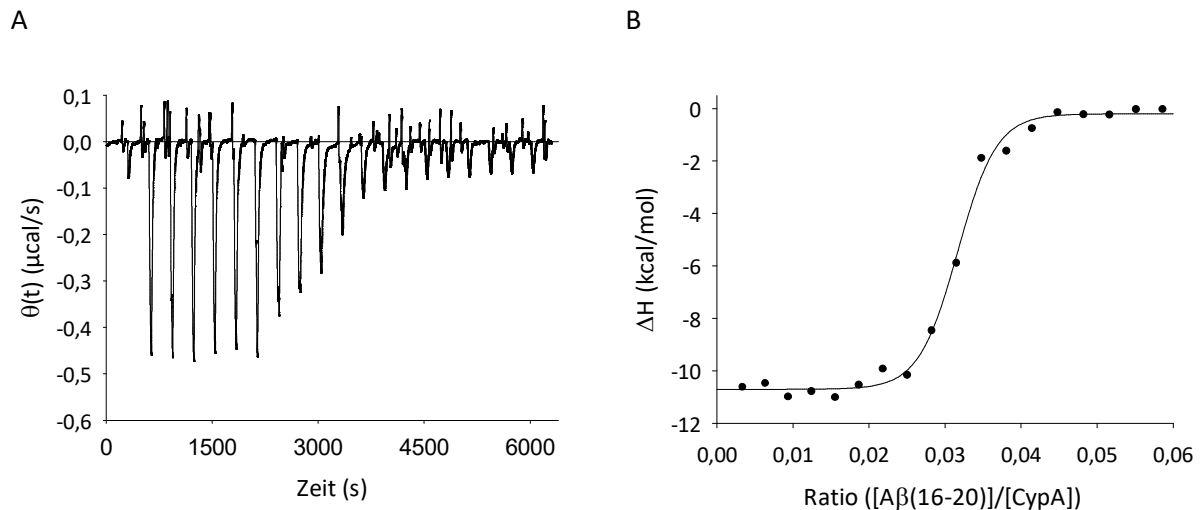


Abbildung 32 **Bestimmung der thermodynamischen Parameter der A β (16-20)/CypA-Interaktion durch ITC.** A β (16-20) wurde in die Messzelle vorgelegt und CypA dazu titriert. Es wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 20 °C gemessen. Es wurden 20 Injektionen mit einem Volumen von 15 μl im Abstand von 300 Sekunden in die Messkammer titriert. Die Rührgeschwindigkeit der Injektionsspritze betrug 310 U/min. Bild A zeigt die Titrationskurve der Interaktion. Die durch die Interaktion hervorgerufenen Wärmeänderungen wurden integriert und gegen das stöchiometrische Verhältnis der Bindepartner aufgetragen (Bild B). Die ermittelten stöchiometrischen und thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 10 dargestellt.

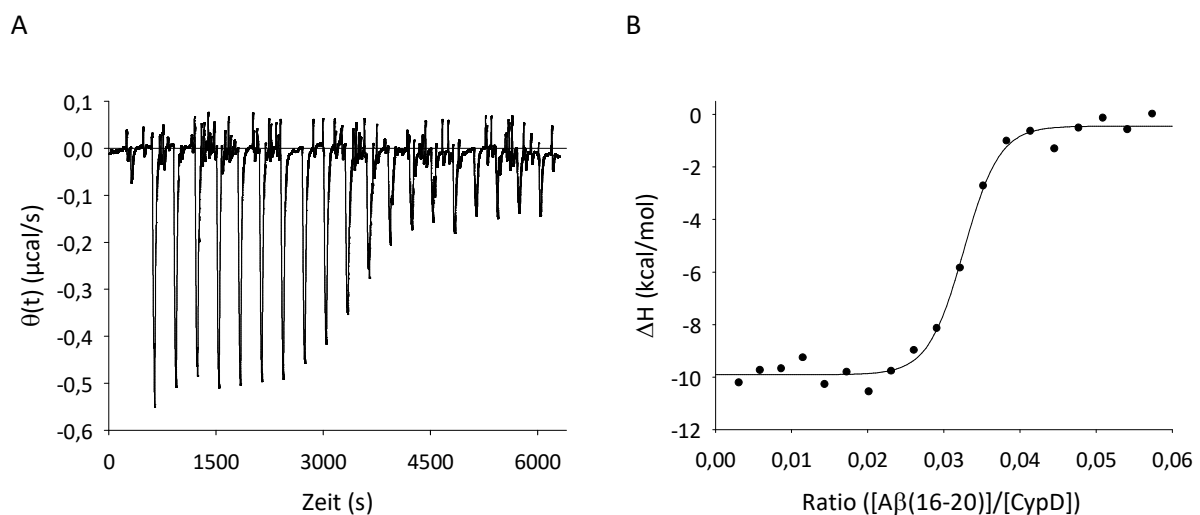


Abbildung 33 **Bestimmung der thermodynamischen Parameter der A β (16-20)/CypD-Interaktion durch ITC.** A β (16-20) wurde in die Messzelle vorgelegt und CypD dazu titriert. Es wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 bei 20 °C gemessen. Es wurden 20 Injektionen mit einem Volumen von 15 μl im Abstand von 300 Sekunden in die Messkammer titriert. Die Rührgeschwindigkeit der Injektionsspritze betrug 310 U/min. Bild A zeigt die Titrationskurve der Interaktion. Die durch die Interaktion hervorgerufenen Wärmeänderungen wurden integriert und gegen das stöchiometrische Verhältnis der Bindepartner aufgetragen (Bild B). Die ermittelten stöchiometrischen und thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 10 dargestellt.

Für beide Cyclophiline zeigte der positive ΔS -Wert, dass die Assoziation entropisch getrieben ist. Interessanterweise hatte die Bindung von CypA bzw. CypD an A β (16-20) ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:32. Möglicherweise werden Oligomere von A β (16-20) an die Cyclophiline gebunden. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, dass eine nur in geringen Konzentrationen vorliegende Spezies von A β (16-20) an die Cyclophiline bindet.

Tabelle 10 Übersicht der bestimmten thermodynamischen Parameter der Interaktion von CypA und CypD mit A β (16-20).

| Parameter/Interaktionspartner | Cyclophilin A | Cyclophilin D |
|-------------------------------|---|---|
| N | 32 | 32 |
| K _A | $(5,48 \pm 1,32) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ | $(3,58 \pm 0,93) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ |
| K _D | 1,82 μM | 2,79 μM |
| ΔH | $(-0,354 \pm 0,006) \text{ kcal mol}^{-1}$ | $(-0,325 \pm 0,006) \text{ kcal mol}^{-1}$ |
| ΔS | $25,05 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ | $24,3 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ |
| ΔG | $-7,69 \text{ kcal mol}^{-1}$ | $-7,44 \text{ kcal mol}^{-1}$ |

4.7.3 Analyse der Bindung von A β (16-20) mittels der intrinsischen Fluoreszenz von CypD

CypA und CypD besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Tryptophanrest (Trp121 in CypA, Trp163 in CypD). Die Bindung des Peptides A β (16-20) an das aktive Zentrum von CypD konnte unter Verwendung der intrinsischen Fluoreszenz des Tryptophanrestes analysiert werden. Durch die Bindung eines Liganden an das aktive Zentrum von CypD werden die Fluoreszenzeigenschaften des Tryptophanrestes verändert [177], [178].

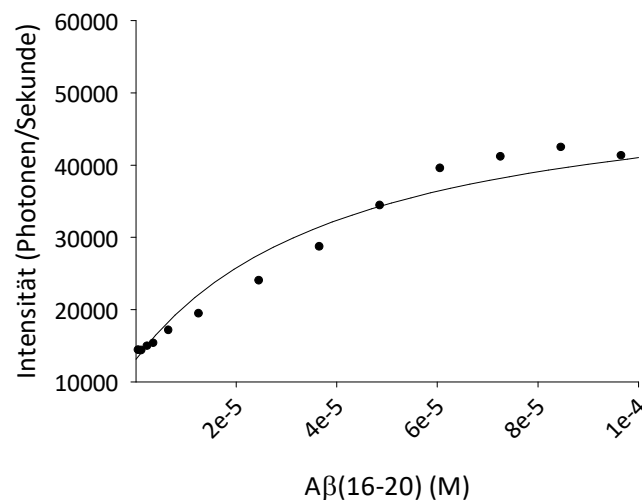


Abbildung 34 **Untersuchung der CypD/A β (16-20)-Interaktion durch Fluoreszenz-Spektroskopie.** Titration von CypD mit A β (16-20). Signalzunahme der Fluoreszenz bei 340 nm von Trp163 nach Anregung bei 295 nm. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 340 nm gemessen. Der K_D-Wert beträgt $43 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$. Die Untersuchung erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit $3 \mu\text{M}$ CypD und 0-120 μM A β (16-20).

Durch Bindung des Peptides A β (16-20) an CypD nahm die Fluoreszenzintensität von Trp163 bei 340 nm nach Anregung bei 295 nm in Abhängigkeit von der Konzentration des Peptides zu. Da das Peptid selbst unter den benutzten Bedingungen keine intrinsische Fluoreszenz in einem Kontrollexperiment aufwies, kann ein Beitrag des Peptides selbst zum sich verändernden Fluoreszenzsignal ausgeschlossen werden. Aus den erhaltenen Daten der Titration von A β (16-20) an das aktive Zentrum von CypD konnte der K_D-Wert der Bindung durch Anpassung der Fluoreszenzsignale an eine hyperbole Bindungskurve bestimmt werden.

Der K_D -Wert des CypD/A β (16-20)-Komplexes wurde mit $43 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$ bestimmt. Dieser Wert ist in der gleichen Größenordnung wie der aus NMR-Messungen abgeschätzte K_D -Wert von $30 \mu\text{M}$ (persönliche Mitteilung von Dr. Rolf Sachs, siehe 4.6).

4.8 Analyse von A β (1-40)-Oligomeren durch photochemisches *cross-linking*

CypD inhibiert die Fibrillierung von humanem A β (1-40) in substöchiometrischen Verhältnissen. Es stellte sich daher die Frage, mit welcher A β (1-40)-Spezies CypD interagiert. *Photo-induced cross-linking of unmodified proteins* (PICUP) ist eine Methode, mit der verschiedene Populationen von A β (1-40)-Oligomeren durch kovalentes Quervernetzen stabilisiert und so potentiell nachweisbar werden [162]. Die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen miteinander interagierenden Proteinen und Peptiden wird durch das photoaktivierbare Reagens Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)-Hexahydrat (Ru(Bpy)) induziert. Nach Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich entstehen Ru(III)-Ionen, die die Entstehung von Kohlenstoffradikalen in Polypeptiden induzieren. Die entstehenden Radikale reagieren unter Ausbildung neuer C-C-Bindungen, wenn sich geeignete Reaktionspartner in der unmittelbaren Nachbarschaft befinden.

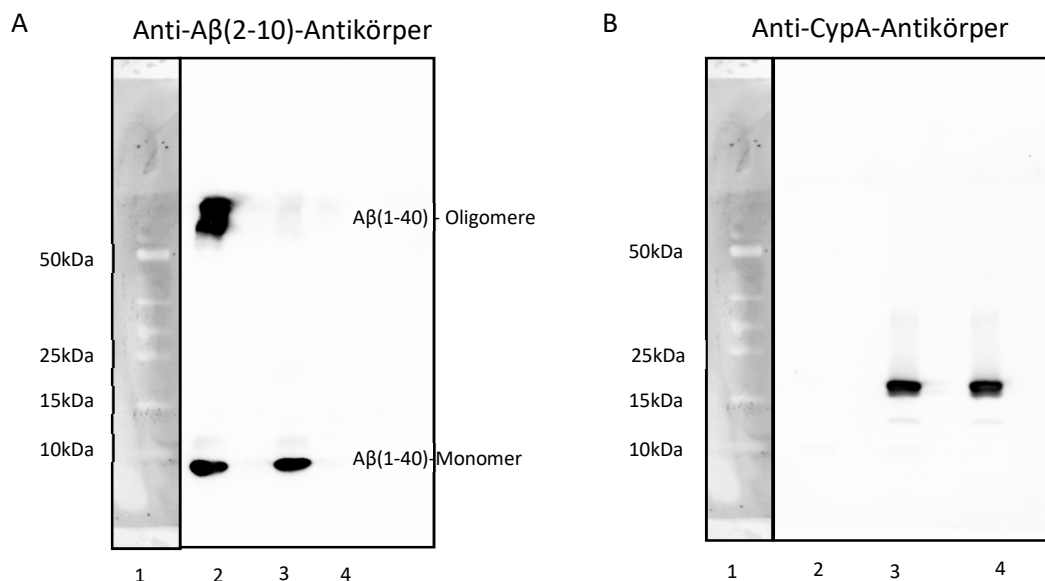


Abbildung 35 **Analyse von A β (1-40)-Oligomeren durch photochemisches *cross linking*.** Aggregationsansätze von A β (1-40) jeweils mit bzw. ohne CypA. Mit Anti-A β (2-10)-Antikörper wurden die über den Zeitraum entstehenden A β (1-40)-Spezies identifiziert. Auf den beiden Blots ist jeweils Marker (Bahn 1), A β (1-40) (Bahn 2), A β (1-40)+ CypA (Bahn 3) und nur CypA (Bahn 4) aufgetragen. In Anwesenheit von CypA liegt A β (1-40) als Monomer vor (Bild A, Bahn 3), während es ohne CypA nach 4 h bereits große Oligomere bzw. Protofibrillen bildet (Bild A, Bahn 2). Bild B zeigt die Kontrolle mit Anti-CypA-Antikörper. Die Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 2 % DMSO, 100 μM A β (1-40) und 10 μM CypA bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s mit 300 U/min doppelorbital geschüttelt. Eine Probe aus dem Reaktionsansatz wurde mit 200 μM Ru(Bpy) und 4 mM APS versetzt und dann für 200 ms bestrahlt.

Unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE können in unbehandelten Proben kaum bzw. schwer intermediäre A β (1-40)-Oligomere beobachtet werden. Durch PICUP sind Dimere, Trimere, größere Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen der A β -Peptide unter denaturierenden Bedingungen stabil und nachweisbar [163].

Nach Inkubation von A β (1-40) für 48 Stunden in Lösung waren nach vier Stunden bereits große Oligomere mit dem sequenzspezifischen Antikörper anti-A β (2-10) nachweisbar, während bei gleichzeitiger Inkubation von A β (1-40) mit CypA nach vier Stunden keine Oligomere entstanden (Abbildung 35A). Auch in Gegenwart von CypD waren nur geringfügige Mengen an A β (1-40)-Oligomeren nachweisbar (Abbildung 36).

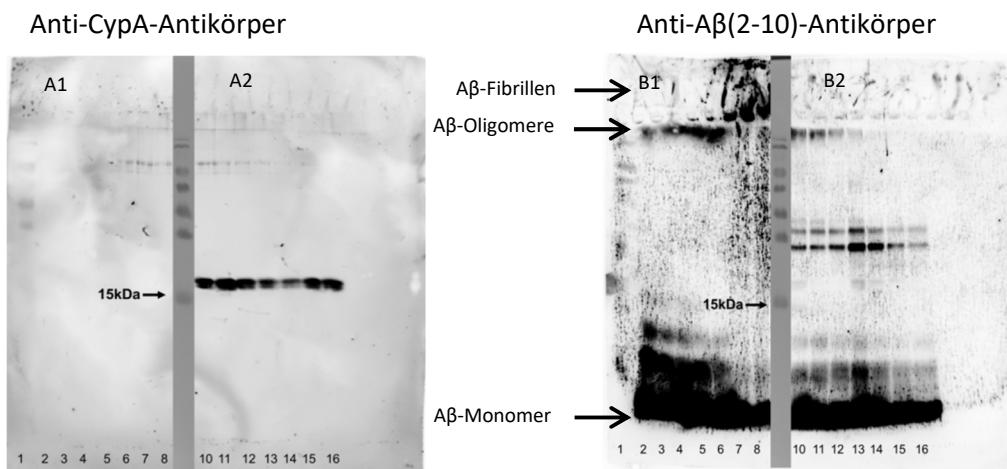


Abbildung 36 **Detektion der mit CypD interagierenden A β (1-40)-Spezies mittels PICUP.** Auf den Bahnen 1 und 9 ist jeweils Proteinmarker (Fermentas™ ThermoScientific Fisher, USA) aufgetragen, die Bahnen 2-8 enthalten Proben mit 50 μ M A β (1-40). In den Bahnen 10-16 wurden Proben mit 50 μ M A β (1-40) und 5 μ M CypD (Reaktionsansatz) aufgetragen. Die Proben wurden nach 0, 2, 6, 21, 29, 48 und 72 h (chronologisch sortiert von links nach rechts aufgetragen) aus dem Reaktionsansatz entnommen. Mit Pfeilen markiert sind jeweils A β (1-40)-Monomere, Oligomere oder Protofibrillen und putative Fibrillen, welche aus dem Sammelgel nicht mehr ins Trenngel laufen. Die Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 2 % DMSO, 100 μ M A β (1-40) und 10 μ M CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s mit 300 U/min doppelorbital geschüttelt. Eine Probe aus dem Reaktionsansatz wurde mit 200 μ M Ru(Bpy) und 4 mM APS versetzt und dann für 200 ms bestrahlt.

Um den Einfluss von CypD genauer zu klären, wurde die Bildung von Oligomeren im Verlauf des Aggregationsprozesses von A β (1-40) untersucht. Dazu wurden Reaktionsansätze mit 50 μ M A β (1-40) in An- und Abwesenheit von CypD zu verschiedenen Zeitpunkten der Aggregationsreaktion mit einem Überschuss an Ru(Bpy) und APS versetzt und anschließend für 200 ms mit sichtbarem Licht beblitzt. Die Oligomere in den Proben wurden mit SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse untersucht. Analysen mit Anti-A β (2-10)-Antikörper zeigten, dass in der initialen Phase des Aggregationsprozesses von A β (1-40) neben monomerem auch dimeres und trimeres A β (1-40) detektierbar war. Im Verlauf der Aggregationsreaktion bildeten sich A β -Spezies mit hohem Molekulargewicht, während die Menge an Oligomeren abnahm (Abbildung 36A). Die Gegenwart von CypD im Reaktionsansatz verursachte eine Reduktion der dimeren und trimeren A β (1-40)-Spezies in der initialen Phase der Reaktion. Im weiteren zeitlichen Verlauf war keine Bildung von A β -Spezies mit hohem Molekulargewichten beobachtbar. Überraschend bildete ein geringer Anteil von A β (1-40) in

Gegenwart von CypD distinkte oligomere Spezies von 25-30 kDa (Abbildung 36B). Diese Spezies enthielten kein CypD, wie durch Western Blot-Analyse mit Anti-CypA-Antikörper, der mit CypD kreuzreagiert, nachgewiesen wurde (Abbildung 36A1). Diese Oligomerspezies wurde jedoch durch den oligomer-spezifischen Antikörper A11 erkannt, der spezifisch präfibrilläre Oligomerspezies von A β (1-40) detektiert (Abbildung 36 B2).

4.9 Einfluss von A β (1-40) und A β (16-20) auf die Vitalität einer Neuroblastomazelllinie (SH-SY5Y)

In der Literatur wurde mehrfach die zytotoxische Wirkung von extrazellulär appliziertem A β (1-40) bzw. A β (1-42) auf Zellkulturen beschrieben, für die oligomere A β -Spezies verantwortlich gemacht werden [179], [180]. Andere Beobachtungen sprechen hingegen gegen die Zytotoxizität von A β [181].

Daher sollte untersucht werden, ob und inwieweit A β (1-40) und das für die Interaktion mit CypD besonders relevante A β (16-20) als zytotoxisch im Zellsystem nachweisbar sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob CypD die Zytotoxizität von A β beeinflussen kann. Um die Zytotoxizität von A β (1-40) und A β (16-20) zu untersuchen, wurden immortalisierte Neuroblastomazellen der humanen Zelllinie SH-SY5Y verwendet. SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 Stunden sowohl mit A β (16-20) (Abbildung 37) als auch mit A β (1-40) (Abbildung 38) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht und mit unbehandelten Zellen verglichen. Hierfür wurde der kommerziell erhältliche Vitalitätsassay *CellTiterBlue™* (CTB™) verwendet. Als Positivkontrolle für die Mortalität der Zellen wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Eine Verringerung der Zellvitalität auf ungefähr 20 % der Kontrollzellen konnte bei Verwendung von Wasserstoffperoxid beobachtet werden (Abbildung 38). A β (1-40) wurde in DMSO gelöst zum Zellmedium gegeben, so dass es initial monomer vorlag [182]. Um einen Einfluss von DMSO auszuschließen, wurde die Toxizität von DMSO auf Zellen in Kultur gemessen. Als Kontrollsubstanz zeigte DMSO allein, in entsprechenden Mengen, kaum einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass sowohl A β (16-20) als auch A β (1-40) bis zu einer Konzentration von 50 μ M keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der SH-SY5Y-Zellen hatten.

Um zu untersuchen, ob die Gegenwart von CypD die zytotoxische Wirkung von A β (1-40) beeinflusst, die dann möglicherweise die Lebensfähigkeit der SH-SY5Y-Zellen verringert, wurden A β (1-40) und CypD gleichzeitig in den Überstand der SH-SY5Y-Zellkultur gegeben. Die zusätzliche Gegenwart von CypD neben A β (1-40) hatte jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von A β (1-40) (Abbildung 37).

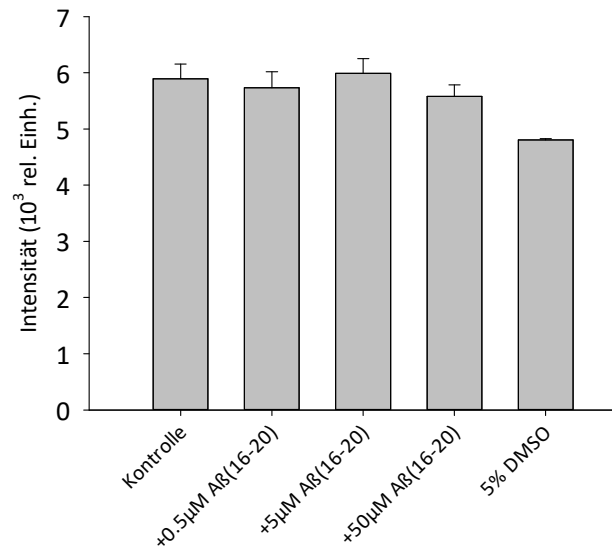


Abbildung 37 **Untersuchung der Vitalität von SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit Aβ(16-20)**. SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h lang mit verschiedenen Aβ(16-20)-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit dem kommerziellen Vitalitätsassay *CellTiterBlue*[™] untersucht. Als Maß der Vitalität diente das CTB-Fluoreszenzsignal. Als Kontrolle für den Einfluss von DMSO auf die Zellvitalität wurden Zellen mit 5 % DMSO im Medium inkubiert. Um einen Einfluss von DMSO auf die Zellvitalität auszuschließen, wurden im letzten Ansatz 5% DMSO in die Zellkultur gegeben. Der Einfluss war statistisch nicht signifikant. Auch verschiedene Konzentrationen an Aβ(16-20) veränderten die Vitalität der Zellen nicht signifikant. Jeder Versuchsansatz enthielt 1% DMSO. Jeder Messbalken ist das Mittel aus 8 parallelen Messansätzen. Als Fehler ist die Standardabweichung angegeben.

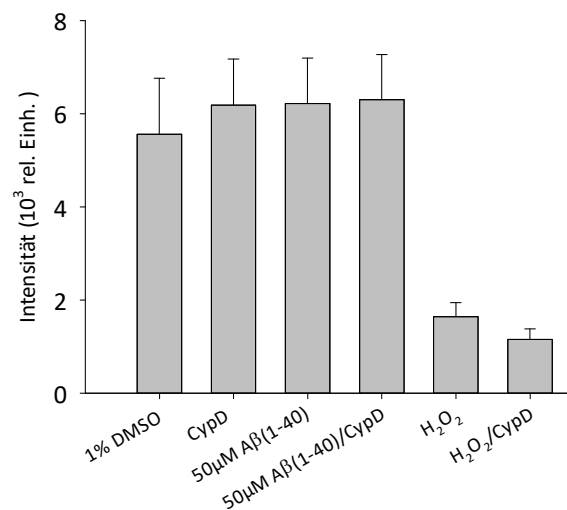


Abbildung 38 **Untersuchung des Einflusses von Aβ(1-40) auf Vitalität von SH-SY5Y-Zellen**. SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit 50 μM Aβ(1-40) (1 % DMSO im Medium) in An- und Abwesenheit von CypD inkubiert und anschließend die Vitalität mit dem kommerziellen Vitalitätsassay *CellTiterBlue*[™] untersucht. Als Maß für die Vitalität diente das CTB-Fluoreszenzsignal. Als Kontrolle für die Zellletalität wurden Zellen mit 50 μM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden auch nur mit CypD inkubiert um einen negativen Einfluss des Proteins auf die Zellen auszuschließen. Es wurde kein signifikanter Einfluss auf die Vitalität der Zellen gefunden. Jeder Versuchsansatz enthielt 1% DMSO. Jeder Messbalken ist das Mittel aus 8 parallelen Messansätzen. Als Fehler ist die Standardabweichung angegeben.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Der Einfluss von Cyclophilinen auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40)

Ziel der hier durchgeführten Studien war es, die Interaktion von humanen Cyclophilinen mit A β (1-40) zu charakterisieren. Es ist bereits bekannt, dass das mitochondriale Cyclophilin CypD mit den amyloidogenen Peptiden A β (1-40) und A β (1-42) interagiert [92]. Das humane prototypische zytoplasmatische Cyclophilin CypA besitzt 76 % Identität zur Cyclophilindomäne von humanem CypD. Daher sollte neben der detaillierten Untersuchung der CypD/A β (1-40)-Interaktion auch untersucht werden, ob CypA ebenfalls die Fähigkeit zur Interaktion mit A β -Peptiden besitzt oder ob die Interaktion mit A β -Peptiden eine spezifische Eigenschaft von CypD ist.

Für die Experimente im Rahmen dieser Studie wurden die verwendeten Cyclophiline CypA und CypD heterolog in *E. coli* löslich exprimiert und anschließend gereinigt (Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2). Analysen mittels SDS-PAGE und HPLC zeigten einen hohen Reinheitsgrad nach der säulenchromatographischen Präparation der Proteine (Abbildung 6, Abschnitt 4.1.1). Mittels Massenspektrometrie wurde die theoretische Masse der Cyclophiline experimentell bestätigt (Tabelle 7, Abschnitt 4.1.1). Parallel zu den Wildtypenzymen wurden auch Enzymvarianten rekombinant exprimiert und gereinigt. Bei den Varianten wurden einzelne Aminosäuren, die für die PPlase-Aktivität oder für Protein-Interaktionen relevant sind, substituiert.

Zunächst wurde die katalytische Effizienz der verwendeten Cyclophiline und ihrer Varianten untersucht. CypA und CypD besaßen im verwendeten isomerspezifischen proteolytischen PPlase-Assay gegenüber dem Modellpeptid Suc-AAPF-pNA enzymatische Aktivität (Abschnitt 4.2.1) mit k_{cat}/K_M -Werten für CypA von $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für CypD von $1,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Diese katalytischen Effizienzen waren mit den in der Literatur für diese Enzyme angegebenen k_{cat}/K_M -Werten vergleichbar [166]. Zur Erzeugung von Varianten von CypA und CypD mit reduzierter PPlase-Aktivität wurden in beiden Enzymen Aminosäuren des aktiven Zentrums substituiert, deren Bedeutung für die enzymatische Aktivität in CypA bereits beschrieben war [2]. Die Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen auf die katalytische Effizienz von CypD waren vergleichbar mit den bereits bekannten Auswirkungen der entsprechenden Substitutionen in CypA [26]. Die Verringerung der PPlase-Aktivität von CypD nach Austausch des Argininrestes in Position 97, der dem Aminosäurerest Arg55 des CypA entspricht, entsprach den bekannten Daten von ca. 0,06 % Restaktivität gegenüber dem Wildtypprotein [26]. Es wurden weitere Aminosäuresubstitutionen in CypD analog zu bekannten CypA-Varianten mit verringerter PPlase-Aktivität durchgeführt. So wurden die CypD-Varianten CypD F102A analog zu CypA F60A, CypD W163A analog zu CypA W121A und CypD H168Q analog zu CypA H126Q erzeugt [26]. Die verschiedenen Aminosäuresubstitutionen haben verschiedene Auswirkungen auf die Katalyse der Cyclophiline. So ist die Aktivität von CypA R55A im Vergleich zum Wildtypenzym geringer, auch die Substratbindung im aktiven Zentrum kann beeinträchtigt sein [26],

[183]. Für die CypA-Variante H126Q wurde eine geringere Affinität des Substrates zum katalytischen Zentrum gezeigt (Abbildung 8, Tabelle 8). Wie His126 gehört Phe60 zur hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum von CypA, auch die Substitution dieses Restes senkt den k_{cat}/K_M -Wert des Enzyms. CypA mit substituiertem Trp121 besitzt neben einer verringerten PPlase-Aktivität auch eine deutlich verringerte Affinität zum *tight-binding*-Cyclophilininhibitor CsA [165].

Die Variante CypD K133I, die ähnlich der CypD-Variante T94A eine höhere katalytische Effizienz als das Wildtypenzym aufwies, wurde aufgrund der Fähigkeit, für die Kristallstrukturanalyse nutzbare Kristalle zu bilden, etabliert [57]. Es gelang jedoch nicht, vermessbare Kokristalle von CypD K133I mit A β (1-40) bzw. davon abgeleiteten Peptiden zu erzeugen.

Kristallstrukturanalysen zeigen für beide Cyclophiline, CypA und CypD, eine ähnliche Raumstruktur und ähnliche Sekundärstrukturmerkmale. Die PPlase-Domäne beider Cyclophiline besteht aus acht β -Faltblattsträngen, welche ein β -barrel bilden, zwei α -Helizes und einer 3_{10} -Helix [184].

Das aufgenommene CD-Spektrum von CypD war mit bereits publizierten CD-Spektren von CypA vergleichbar [185]. Aufgrund der Kristallstrukturanalysen und der CD-Spektren kann deshalb davon ausgegangen werden, dass beide rekombinant produzierten Proteine sehr ähnliche Anteile an Sekundärstrukturelementen besitzen. Mit Hilfe des internetbasierten Softwarewerkzeugs *STRIDE-Service*⁷, welchem der STRIDE-Algorithmus zugrunde liegt, kann aus Kristallstrukturen der Proteindatenbank PDB der Anteil von Sekundärstrukturelementen von Proteinen berechnet werden [186]. Die *in silico*-Auswertung der Sekundärstrukturelemente der Kristallstrukturen von CypA und CypD ergab einen ähnlichen Anteil an α -Helizes und β -Faltblättern für beide Proteine. Für CypA (PDB-Referenz: 4YUO) wurde ein Anteil von 14 % α -Helix und 33 % β -Faltblatt ermittelt. Für CypD (PDB-Referenz: 2Z6W) wurde ein Anteil von 15 % α -Helix und 36 % β -Faltblatt berechnet. Diese Werte liegen in der Größenordnung der mit der Software K2D2 anhand der CypD-CD-Spektren errechneten Werte.

Die verwendeten Varianten von CypA sind bereits gut charakterisiert. Für sie wurden keine Veränderungen der Sekundärstruktur gegenüber dem Wildtypenzym beschrieben [166]. Für CypD wurde mittels Fern-UV-CD-Spektrometrie untersucht, ob die eingeführten Aminosäuresubstitutionen einen Einfluss auf die Ausbildung der charakteristischen Sekundärstrukturelemente der Cyclophiline zeigten (Abschnitt 4.2.3). Die mittels K2D2 anhand der CD-Spektren der CypD-Varianten berechneten Sekundärstrukturelementanteile waren ähnlich dem Wildtypenzym. Eine Ausnahme bildete die Variante CypD K133I, welche ein wesentlich stärker ausgeprägtes lokales Minimum der molaren Elliptizität bei 222 nm aufwies als CypD.

Die Fern-UV-CD-Spektren zeigten, dass die PPlase-inaktiven CypD-Varianten ähnliche Sekundärstrukturmerkmale aufwiesen wie das Wildtypenzym und somit eine korrekte Faltung besaßen. Die Veränderungen in der katalytischen Aktivität der CypD-Varianten beruhten somit auf der Substitution eines für die Katalyse wichtigen Restes im aktiven Zentrum und nicht auf einer inkorrekten Faltung des Proteins.

⁷ <http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/>

Für eine Charakterisierung der CypA/A β (1-40)- bzw. der CypD/A β (1-40)-Interaktion wurde der Einfluss der Cyclophiline auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) untersucht. Zur Beobachtung der fibrillären Aggregation von A β (1-40) wurde der ThT-Fluoreszenzassay verwendet. Dieser nutzt die Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT), an entstehende β -Faltblatt-reiche Aggregate und Fibrillen zu binden und dabei sein Emissionsspektrum zu ändern. Die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) in Abwesenheit von Cyclophilin besaß eine für die Bildung von Amyloidfibrillen typische Verlaufsform, bei der zeitabhängig eine *Lag*-Phase, eine exponentielle Phase und eine finale Plateauphase zu beobachten waren (siehe Abbildung 12). In der *Lag*-Phase findet die Bildung von Aggregationskeimen statt. Der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz im Anschluss an die *Lag*-Phase repräsentiert die Bildung von größeren Aggregaten aus den Aggregationskeimen [97], [103]. Es ist bekannt, dass ThT die Aggregation von monomerem A β (1-40) zu komplexeren Oligomeren beschleunigt bzw. induziert [185]. ThT führt durch hydrophobe Anlagerung an A β (1-40) zur Bildung eines β -Faltblatts im Sequenzbereich 28 bis 38, welches die Assemblierung größerer Oligomere positiv beeinflusst [186]. Um einen möglichen Einfluss von ThT auf die Fibrillierungsreaktion und somit die Resultate so klein wie möglich zu halten, wurden in den vorgestellten Untersuchungen die Versuchsbedingungen für alle Aggregationreaktionen gleich gewählt. Die beobachteten Effekte waren so nur von den eingesetzten Substanzen wie Cyclophilinen und Inhibitoren abhängig.

In Gegenwart von substöchiometrischen Konzentrationen an CypA bzw. CypD wurde die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen konzentrationsabhängig unterdrückt. CypD besaß ab einem molaren Verhältnis von 1:25 zu A β (1-40) eine komplett inhibierende Wirkung auf die fibrilläre Aggregation. CypA zeigte eine etwas geringere inhibierende Wirkung als CypD. Es unterdrückte die fibrilläre Aggregation erst ab einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:10 zu A β (1-40) vollständig (Abschnitt 4.3.1, Abbildung 12). Die Inhibition der fibrillären Aggregation von A β (1-40) wurde über das aktive Zentrum des jeweiligen Cyclophilins vermittelt. Der *tight binding*-Cyclophilininhibitor CsA bindet im aktiven Zentrum von CypA und CypD und kann Substrate kompetitiv reversibel aus dem aktiven Zentrum der Cyclophiline verdrängen [56], [189], [190] (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 14). Die Gegenwart von CsA zusätzlich zu CypA bzw. CypD im A β (1-40)-Fibrillierungsassay hatte die Wiederherstellung der fibrillären Aggregation von A β (1-40) zur Folge. CsA allein verkürzte jedoch die *Lag*-Phase der fibrillären Aggregation. Die Ursache hierfür könnte die hydrophobe Natur dieses zyklischen Undecapeptids sein. Daher wurde mit MM258 ein CsA-Derivat in die Untersuchungen einbezogen, das wesentlich besser in Wasser löslich ist als CsA. MM258 allein verkürzte die *Lag*-Phase der fibrillären Aggregation von A β (1-40) nicht in so starkem Maße wie CsA, konnte aber ebenso wie CsA die Inhibition der fibrillären Aggregation von A β (1-40) in Anwesenheit von CypA und CypD verhindern. Durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen konnten die Ergebnisse des ThT-Assay bestätigt werden. Wenn CsA bzw. MM258 in die Reaktionsansätze gegeben wurde, waren Fibrillen mikroskopisch (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 14) beobachtbar. Im Gegensatz dazu waren bei Versuchen in Gegenwart von CypA oder CypD ohne Inhibitor keine Fibrillen mikroskopisch nachweisbar (Abschnitt 4.4, Abbildung 20). Die zusätzliche Gegenwart von CsH, einem nicht an Cyclophiline bindenden CsA-Derivat, im Aggregationsansatz hatte keinen Einfluss auf die Inhibition der

fibrillären Aggregation. Bei der zeitversetzten Zugabe von Cyclophilinhibitoren in den Assay der fibrillären Aggregation, der sowohl CypD als auch A β (1-40) enthielt, ließ sich die bis zur Zugabe des Inhibitors durch CypD unterdrückte fibrilläre Aggregation wieder beobachten (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 16). Das zeigt, dass die CypD/A β (1-40)-Interaktion reversibel und transient ist.

Es ist bereits bekannt, dass PPlasen die fibrilläre Aggregation von amyloidogenen Proteinen und Peptiden beeinflussen können. Bei der fibrillären Aggregation von Stefin B wurde gezeigt, dass die Isomerisierung der Leu73-Pro74-Bindung in Stefin B entscheidend ist [119]. Die Stefin-B-Variante P74S aggregierte nicht oder erst nach einer stark verlängerten *Lag*-Phase. CypA verlängerte die *Lag*-Phase der fibrillären Aggregation von Stefin B. Die PPlase-inaktive Variante CypA R55A verlängerte die *Lag*-Phase im Fibrillierungsassay jedoch wie das Wildtypenzym.

In Untersuchungen mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie zeigte sich, dass sowohl SlyD aus *E. coli* als auch die murinen FKBP12 und FKBP52 beschleunigend auf die fibrilläre Aggregation von α -Synuclein wirken [110]. Die Inhibition der beteiligten FKBP's durch FK506 verringerte die Geschwindigkeit der fibrillären Aggregation von α -Synuclein [117] [116]. Im Gegensatz dazu wirkte FKBP12 inhibierend auf die fibrilläre Aggregation von τ -Protein (Abschnitt 1.3.2). Die *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolylbindung besitzt entscheidenden Einfluss auf die Aggregation des τ -Proteins. Es wird vermutet, dass eine Spezies des τ -Proteins mit einer *cis*-Prolylbindung im Sequenzbereich 306-336 zum Fibrillieren neigt. Durch die PPlase-Aktivität von FKBP12 wird diese Spezies möglicherweise aus dem Reaktionsgleichgewicht für die spontane Aggregation bzw. Fibrillierung entzogen, so dass eine Verringerung der fibrillären Aggregation resultiert [109].

In diesen Fällen wurden jeweils Prolylbindungen als mögliche Interaktionsstellen für PPlasen zur Beeinflussung von Aggregation und Fibrillierung diverser Proteine diskutiert. In dem in dieser Arbeit untersuchten Fall ist jedoch keine Prolylbindung als Target für CypA oder CypD vorhanden, da in der Aminosäuresequenz von A β (1-40) kein Prolin enthalten ist.

Die konformationelle Heterogenität einer Peptidbindung und die damit verbundene langsame konformationelle Umwandlung sind nicht nur auf Peptidyl-Prolyl-Bindungen beschränkt. Kleine Anteile an *cis*-Isomeren von Nicht-Prolyl-Bindungen sind in konformationellen Gleichgewichten von Polypeptiden bereits detektiert worden. Die *cis/trans*-Isomerisierung solcher Peptidbindungen kann langsam ablaufen, ein bestimmter Anteil an *cis*-Isomer kann für jede Peptidbindung in ungefalteten Polypeptidketten erwartet werden [191] [192]. Für das Hitzeschockprotein DnaK aus *E. coli* wurde eine APlase-Aktivität gezeigt. Es beschleunigt die *cis/trans*-Isomerisierung von Nicht-Prolyl-Bindungen im Modellsubstrat AAYAA [3]. Bisher wurde angenommen, dass PPlasen nicht die Isomerisierung von Nicht-Prolyl-Bindungen katalysieren. Bei Faltungsexperimenten mit der RNase T1 P39A wurde beobachtet, dass Faltungsintermediate nicht mehr die typische Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung durch PPlasen zeigen [193]. Es wäre jedoch denkbar, dass Cyclophiline bei bestimmten Substraten mit spezifischen Aminosäuresequenzen auch die *cis/trans*-Isomerisierung von Nicht-Prolyl-Bindungen katalysieren können.

Die Wirksamkeit von substöchiometrischen Konzentrationen an Cyclophilinen bei der Unterdrückung der fibrillären Aggregation von A β (1-40) und die Beteiligung des aktiven Zentrums der Enzyme an diesem Prozess ist ein Hinweis für eine mögliche Bedeutung der katalytischen Aktivität der

Cyclophiline für die Inhibierung der fibrillären Aggregation. Um einen möglichen Einfluss der PPlase-Aktivität der Cyclophiline auf A β (1-40) zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten von CypA und CypD genutzt, in welchen an der Katalyse beteiligte Aminosäurereste substituiert worden waren, so dass sie eine wesentlich geringere PPlase-Aktivität als das Wildtypenzym besaßen (Tabelle 1).

Diese im PPlase-Assay katalytisch nahezu inaktiven CypA- und CypD-Varianten wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) zu inhibieren. Eine bereits gut untersuchte CypA-Variante ist CypA R55A, welche in NMR-spektroskopischen Untersuchungen sowohl eine schwächere Bindung an das verwendete native Substrat, einem HIV-1-Kapsidprotein, als auch eine geringere katalytische Aktivität zeigte [183]. Die korrespondierende CypD-Variante zu CypA R55A, CypD R97A, zeigte auch eine wesentlich geringere Aktivität im PPlase-Assay verglichen zum Wildtypenzym. Allerdings unterdrückten sowohl CypA R55A als auch CypD R97A die Fibrillierung von A β (1-40) ähnlich wie die entsprechenden Wildtypenzyme in substöchiometrischen Verhältnissen.

Auch die Substitutionen weiterer verschiedener im aktiven Zentrum der Cyclophiline vorhandener funktionaler Aminosäurereste wie Trp121, His126, und Gln62 in CypA bzw. die entsprechenden eingeführten Aminosäuresubstitutionen von Trp163, His168 und Gln105 in CypD verringerten die PPlase-Aktivität der Cyclophilin-Varianten [194] (Abschnitt 4.2.1, Tabelle 8).

Die entsprechenden Cyclophilin-Varianten mit verringerter PPlase-Aktivität zeigten einen gleichen Einfluss auf die fibrilläre Aggregation auf A β (1-40) wie die jeweiligen Wildtypenzyme. Wahrscheinlich sind durch die Substitutionen die für die Unterdrückung der fibrillären Aggregation notwendigen Eigenschaften der aktiven Zentren der Cyclophiline nicht oder nicht in ausreichendem Maße verändert worden. Möglich ist aber auch, dass A β (1-40) als ein sehr hydrophobes Peptid immer noch sehr effektiv an das aktive Zentrum der CypA- und CypD-Varianten binden kann.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass die PPlase-Aktivität für die Unterdrückung der Fibrillierung nicht essentiell ist oder dass die verbliebene PPlase-Restaktivität der jeweiligen Cyclophilin-Variante noch ausreichend für die Unterdrückung der Fibrillierung ist.

Neben PPlasen besitzen auch einige andere Proteine und kleine, nicht proteinöse Moleküle die Fähigkeit, die Aggregation von A β (1-40) bzw. A β (1-42) zu beeinflussen. So inhibieren Makromoleküle wie Fullerene [195] oder Benzofuran-Derivate [196] sowie das von A β abgeleitete Pentapeptid KLVFF (entspricht der Sequenz A β (16-20)) die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) und A β (1-42). Zu den Proteinen, die die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) und A β (1-42) unterdrücken, gehören zum Beispiel Chaperone wie Hsp70 und Hsp90 [120], [128]. In einer primären Zellkultur mit Neuronen konnte die Überexpression von Hsp70 die zytotoxischen Effekte von überexprimiertem A β (1-42) unterbinden [121]. *In vitro*-Studien belegten die inhibierende Wirkung von Hsp70 im Komplex mit seinem Co-Chaperon Hsp40 auf die Aggregation von A β (1-42) [120]. Hsp70 unterdrückte die Aggregation von A β (1-42) in substöchiometrischen Verhältnissen von 1:50. Auch Hsp90 unterdrückte die Aggregation von A β (1-42) in substöchiometrischen Verhältnissen. Hsp70 und Hsp90 interagierten dabei vor allem mit Monomeren, schlecht mit Oligomeren und überhaupt nicht mit Fibrillen von

A β (1-42). Da dieser Prozess nur teilweise abhängig von der Verfügbarkeit von ATP war, wird ein nicht katalysierter *holding*-Mechanismus für die Unterdrückung der Aggregation durch Chaperone angenommen [120]. Das vorgeschlagene Modell geht von einer Bindung der monomeren Form von A β (1-42) in der Bindungstasche des Chaperons aus. Dadurch sollen dem A β (1-42)-Pool aggregationskompetente Monomere entzogen und so eine Assemblierung zu Oligomeren verhindert werden [120]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit geht davon aus, dass A β (1-42) in einer zur Aggregation neigenden Konformation, z. B. mit einer starken Exposition hydrophober Bereiche zum Lösungsmittel, an Hsp70 bindet und anschließend in einer aggregationsinkompetenten Konformation wieder vom Chaperon entlassen wird (*entropic pulling*) [120].

In Gewebeproben aus Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurde eine Überexpression von *small heat shock proteins* (sHsps) gefunden [129], [130]. Mitglieder dieser Chaperonfamilie sind zum Beispiel α B-Crystallin, Hsp20, Hsp27, HspB2 und HspB8. Diese Proteine traten co-lokalisiert mit fibrillären Plaques in den Gewebeproben auf. Es wurden *in vitro*-Studien durchgeführt, welche diese Interaktionen näher charakterisierten. Bereits 1997 wurde gezeigt, dass Hsp27 die Aggregation von A β (1-42) im ThT-Fluoreszenzassay in substöchiometrischen Verhältnissen inhibiert [197]. Das Protein α B-Crystallin konnte ebenfalls in *in vitro*-Studien die Aggregation von A β (1-40) und A β (1-42) im ThT-Fluoreszenzassay inhibieren. Das Studium von Fern-UV-CD-Spektren von A β (1-40) zeigte, dass die Interkonversion von initial unstrukturiertem (*random coil*) A β (1-40)-Monomer zu einer ein β -Faltblatt enthaltenden Spezies durch α B-Crystallin verhindert wird. Sedimentationsstudien mittels Ultrazentrifugation zeigten zwei unterschiedlich schnell sedimentierende Spezies aus einem A β (1-40)/ α B-Crystallin-Ansatz, deren Sedimentationskoeffizient den einzelnen Molekülen und keinem Komplex aus A β (1-40) und α B-Crystallin entsprachen. Das deutet darauf hin, dass kein stabiler A β (1-40)/ α B-Crystallin-Komplex entstand, sondern dass die Interaktion zwischen A β (1-40) und α B-Crystallin einen transienten und reversiblen Charakter hatte [198]. Das Hitzeschockprotein HspB8 vermochte ebenfalls, A β (1-40) und A β (1-42) zu binden. HspB8 inhibierte die Interkonversion einer unstrukturierten Spezies in ein β -Faltblatt-haltiges A β (1-40)-Monomer, wie durch Fern-UV-CD-Studien gezeigt wurde [130].

Auch für die Chaperon-Domäne BRICHOS ist beschrieben, dass sie mit A β (1-40) und A β (1-42) interagiert und die Aggregation in substöchiometrischen Verhältnissen verzögert. NMR- und Fern-UV-CD-Studien wiesen nach, dass initial unstrukturierte Spezies von A β (1-40) durch die Anwesenheit von BRICHOS konserviert und so eine Aggregation des Peptids verhindert wurde [199].

Prinzipiell entfalten molekulare Chaperone ihre aggregationsinhibierende Wirkung durch die Bindung an hydrophobe Sequenzen in ungefalteten aggregationsanfälligen Proteinen [200]. Ein solcher Modus der Interaktion scheint auch bei der Unterdrückung der fibrillären Aggregation von A β durch molekulare Chaperone vorzuliegen, wobei häufig Interaktionen mit früh im Aggregationsprozess vorkommenden A β -Spezies auftreten. Die Rolle von Chaperonen bei der Unterdrückung der fibrillären Aggregation von A β erweist sich jedoch nicht ausschließlich als auf die Sequestrierung initialer Spezies von A β in ungefalteten Konformationen beschränkt. Chaperone können auch an Interaktionen mit bereits aggregierten A β -Spezies teilnehmen. So wurde für DNAJB6, einem Mitglied der DnaJ-Familie der molekularen Chaperone, gezeigt, dass es durch eine starke Interaktion mit

aggregierten A β (1-42)-Spezies ihr Wachstum zu längeren Fibrillen und die Ausbildung weiterer Nukleationskeime bzw. von Fibrillen verhindert. Dabei inhibierte DNAJB6 die Fibrillierung von A β (1-42) in substöchiometrischen Verhältnissen.

Interessant ist die Beobachtung, dass auch Proteine, die nicht an der Assistenz von Proteinfaltungsvorgängen beteiligt sind, wie zum Beispiel das Transportprotein Transthyretin (TTR)[201], Katalase, Pyruvatkinase [202] oder Clusterin (ApoJ), die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) und A β (1-42) inhibieren [203]. Bovine Katalase und humane Pyruvatkinase inhibierten die Aggregation von A β (1-40) in einem substöchiometrischen Verhältnis von 1:100. Die Proteine verringerten die Zytotoxizität von A β (1-40) in Zellkultur und unterdrückten die Bildung von Fibrillen im ThT-Fluoreszenzassay. Studien mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANS zeigten, dass durch die Interaktion mit den untersuchten Proteinen die Hydrophobizität von A β (1-40) reduziert wurde. Auch hier stabilisierten die Proteine die initiale *random coil*-Struktur von monomerem A β (1-40) und inhibierten die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen. Ähnliche Effekte wurden auch für α -Lactalbumin, Albumin, β -Lactoglobulin und Lysozym berichtet. Die Bindung von A β (1-40) an die Interaktionspartner wurde durch ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Studien als unspezifisch hydrophob interpretiert. Es wird vermutet, dass die untersuchten Proteine mit Bereichen ihrer Oberfläche unspezifisch hydrophobe monomere A β (1-40)-Spezies binden und weniger hydrophobe Spezies entlassen [202].

Bereits 1994 wurde gezeigt, dass humanes TTR, ein Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Wirbeltiereserum, *in vivo* mit A β (1-40) interagiert und im ThT-Fluoreszenzassay die Aggregation von A β (1-40) in substöchiometrischen Verhältnissen inhibiert [201], [204]. TTR zeigte neuroprotektive Effekte in einem Mausmodell der A β -Überexpression [205]. NMR-Untersuchungen zum Bindemechanismus zeigten, dass A β (1-40) in der hydrophoben Thyroxin-Bindungstasche von TTR bindet. Die Bindestelle in A β (1-40) umfasste den hydrophoben Bereich A β (18-22), der essentiell für die A β (1-40)-Selbstassemblierung ist. TTR band A β (1-40)-Spezies, die ihren hydrophoben Bereich A β (16-22) zum Lösungsmittel exponieren. Von besonderer Bedeutung dafür wurden elektrostatische und hydrophobe Interaktionen im Sequenzbereich A β (16-20) beschrieben [195]. Durch diese Bindung wurde die Ausbildung von aggregationsanfälligen A β (1-40)-Monomerspezies mit parallelen β -Faltblattstrukturen unterbunden, die als entscheidend für die fibrilläre Aggregation angesehen werden [95]. In der Folge wurden die A β (1-40)-Spezies, die nicht zur Aggregation neigten, aus der Bindungstasche des TTR entlassen.

Dass A β (1-40) und A β (1-42) ein promiskuitives Bindungsverhalten zu einer Vielzahl verschiedener Proteine zeigen, ist wohl ursächlich mit dem Vorhandensein sehr hydrophober Bereiche in der Aminosäuresequenz der Peptide zu erklären. Viele Protein/A β (1-40)-Interaktionen sind unspezifisch und *in vivo* ohne physiologische Funktion.

Allerdings können solche Interaktionen pathophysiologisch eine Bedeutung erlangen. Einige Studien zeigen, dass die Interaktion von A β (1-40) bzw. A β (1-42) mit diversen Proteinen des Zellstoffwechsels die Letalität von mit A β (1-40) bzw. A β (1-42) co-inkubierten Zellen erhöht [141], [181].

Die Proteine TTR, Melatonin, Katalase, Pyruvatkinase, Hsp70, Hsp90 und sHsps zeigten zytoprotektive Effekte. In unseren Untersuchungen konnten wir weder einen protektiven noch einen zytotoxischen Effekt von CypD in einer mit A β (1-40) behandelten neuronalen Zellkultur der Linie SH-SY5Y finden. Die Gründe könnten in der zu kurzen Inkubationszeit liegen. In einigen Studien wurden die Zellen bis zu sechs Tage lang inkubiert. Unsere Studien beschränkten sich auf einen Zeitraum von maximal drei Tagen (Abschnitt 4.9, Abbildung 38).

Im Fall der CypD/A β (1-40)-Interaktion wurde jedoch bereits beschrieben, dass CypD *in vivo* für die Ausprägung der pathologischen Effekte der A β -Peptide erforderlich ist. Mäuse eines *Ppif*^{-/-}-APP-Überexpressionsmodells zeigten normale neurologische und kognitive Eigenschaften verglichen zu Wildtyptieren. Im Gegensatz dazu waren Tiere mit einer APP-Überexpression ohne Deletion des für CypD kodierenden *Ppif*-Gens kognitiv stark beeinträchtigt, was sich in einem beeinträchtigten Lernvermögen zeigte [92], [206]. Murine Neuronen, welche einen *Ppif*^{-/-}-Genotyp besaßen, waren toleranter gegenüber Ca²⁺-induziertem osmotischen Stress und auch gegenüber durch A β verursachtem oxidativen Stress [92]. Mit CsA inkubierte Wildtypzellen waren sehr tolerant gegenüber A β -induzierter Apoptose.

Eine Gemeinsamkeit der verschiedenen Interaktionen von A β (1-40) bzw. A β (1-42) mit Vertretern der sehr heterogenen Gruppe ihrer Interaktionspartner besteht in hydrophoben bzw. elektrostatischen Effekten, die die Grundlage für die Wechselwirkungen zwischen A β und seinen Bindungspartnern bilden. In der Folge dieser Interaktionen wird die Ausbildung einer zur Aggregation neigenden A β -Spezies verhindert und das Peptid in seiner nativen unstrukturierten Konformation in Lösung gehalten. Möglicherweise sind die beschriebenen Bindungspartner von A β (1-40) bzw. A β (1-42) in der Lage, zur Aggregation neigende A β -Spezies aus dem A β -Speziespool zu entfernen.

Ein solcher Mechanismus ist auch für die untersuchte Interaktion von CypA und CypD mit A β (1-40) möglich. So zeigten die von uns durchgeführten NMR-Studien zum Amidprotonenaustausch des A β (1-40)-Rückgrats, dass bei Anwesenheit von CypD der Austausch von Amidprotonen beschleunigt wird. (Abschnitt 4.6, Abbildung 27). Der während der NMR-Experimente beobachtete schnelle Protonenaustausch bei Anwesenheit von CypD deutet auf eine bessere Lösungsmittelzugänglichkeit der A β (1-40)-Rückgratprotonen und somit auf eine höhere strukturelle Flexibilität von A β (1-40) hin.

Die zwei am häufigsten auftretenden A β -Spezies sind A β (1-40) und A β (1-42). Das am C-Terminus längere A β (1-42) hat andere physikochemische Eigenschaften als das kürzere A β (1-40). Die fibrilläre Aggregation von A β (1-42) hat eine schnellere Kinetik und ist schon bei kleineren Konzentrationen zu beobachten [90]. Beide Peptide interagieren mit CypD sowohl *in vivo* als auch *in vitro* [92].

In der vorliegenden Studie wurde sich in den Untersuchungen auf A β (1-40) konzentriert. Eine längere *Lag*-Phase während der fibrillären Aggregation führt zu besseren Reaktionsbedingungen zum Beispiel beim zeitversetzten Zusatz von Cyclophilinhibitoren. Aggregationskeime bilden sich erst bei höheren Konzentrationen in Lösung, dies ermöglicht NMR- und ITC-Messungen ohne Beeinflussung der Reaktion durch die einsetzende fibrilläre Aggregation.

5.2 Identifizierung der interagierenden A β -Spezies und der Bindungsstellen

CypA und CypD zeigten in unseren Studien eine inhibierende Wirkung auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Das für die Untersuchungen eingesetzte A β (1-40) wurde in DMSO gelöst und lag so initial als unstrukturiertes monomeres Peptid in Lösung vor. Es konnte mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie und dynamischer Lichtstreuung gezeigt werden, dass A β in DMSO unstrukturierte Monomere ausbildet [207]. In DMSO gelöstes A β ist in der Lage, über einen langen Zeitraum und über eine große Konzentrationsspanne diese Konformation beizubehalten. Auch NMR-Untersuchungen zeigten in DMSO gelöstes A β über einen weiten Konzentrationsbereich als Monomer [208].

Die Ausbildung der CypD/A β (1-40)-Interaktion lässt sich auf eine frühe Phase der fibrillären Aggregation eingrenzen, da die fibrilläre Aggregation von A β (1-40) durch ausreichende Konzentrationen an CypD in der *Lag*-Phase arretiert wurde und da bei der zeitversetzten Gabe von CypD in den Aggregationsansatz nur innerhalb der *Lag*-Phase die Fibrillierung von A β (1-40) inhibiert werden konnte. Nach Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase konnte die fibrilläre Aggregation durch Zugabe von CypD nicht inhibiert werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob CypD während der initialen Phase des Aggregationsprozesses das Auftreten verschiedener A β (1-40)-Spezies beeinflusste. In der *Lag*-Phase treten Monomere, Dimere, Trimere und verschiedene Oligomere von A β (1-40) auf. Um zu prüfen, ob instabile oder transiente A β -Oligomerspezies der fibrillären Aggregation in Abhängigkeit von CypD auftraten, mit CypD interagierten oder möglicherweise durch eine Interaktion stabilisiert wurden, wurden mittels PICUP-Technik die im Aggregationsansatz mit bzw. ohne CypD auftretenden A β (1-40)-Spezies für Untersuchungen unter denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE optochemisch kovalent vernetzt. Die Untersuchung zeigte, dass CypD die beobachtbare Menge an Di- und Trimeren verringerte und die Menge an A β -Monomeren in der initialen Phase der fibrillären Aggregation erhöhte (Abschnitt 4.8, Abbildung 36). Das zusätzliche Auftreten signifikanter Mengen anderer A β (1-40)-Spezies in Abhängigkeit von CypD wurde nicht beobachtet. Ob CypD mit den di- bzw. trimeren A β (1-40)-Spezies interagiert und in monomere Spezies zurück überführt oder die Aggregation der initial monomeren Spezies in Di- und Trimere verhindert, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Die Tatsache, dass nach dem Start einer durch CypD arretierten Aggregationsreaktion durch Zugabe eines Cyclophilininhibitors die *Lag*-Phase nicht verkürzt auftrat, lässt die Schlussfolgerung zu, dass während der Co-Inkubation von CypD und A β (1-40) keine aggregationskompetenten Oligomerspezies akkumulierten (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 16). Insgesamt legen die Daten der PICUP-, der NMR- und der zeitversetzten Zugabe-Experimente nahe, dass CypD A β (1-40) in einer niedermolekularen z. B. monomeren, dimeren oder trimeren Form bindet [209].

Um die Interaktionsstellen von A β (1-40) und CypD zu identifizieren, wurden NMR-Studien mit ^{15}N , ^{13}C -markiertem CypD und ^{15}N -markiertem A β (1-40) sowie Peptid-Spot-Arrays mit A β (1-40)-Sequenzen durchgeführt. Bei der Untersuchung der Bindungsstelle von A β (1-40) in CypD wurden in

den HSQC-NMR-Studien eine Veränderung der Signalintensitäten für chemische Verschiebungen für Reste der Substratbindungstasche von CypD gefunden (Abschnitt 4.6, Abbildung 29). Der an A β (1-40) bindende Bereich von CypD beinhaltet die Aminosäuren Thr52 bis Ser77 und Leu98 bis Val128. Dieser Bereich umfasst das aktive Zentrum von CypD, in dem auch die Bindung des Inhibitors CsA erfolgt [56]. Dieses Ergebnis macht verständlich, dass die Wirkung von CypD auf A β (1-40) durch CsA verhindert werden konnte, weil beide Moleküle um die gleiche Bindungsstelle in CypD konkurrieren.

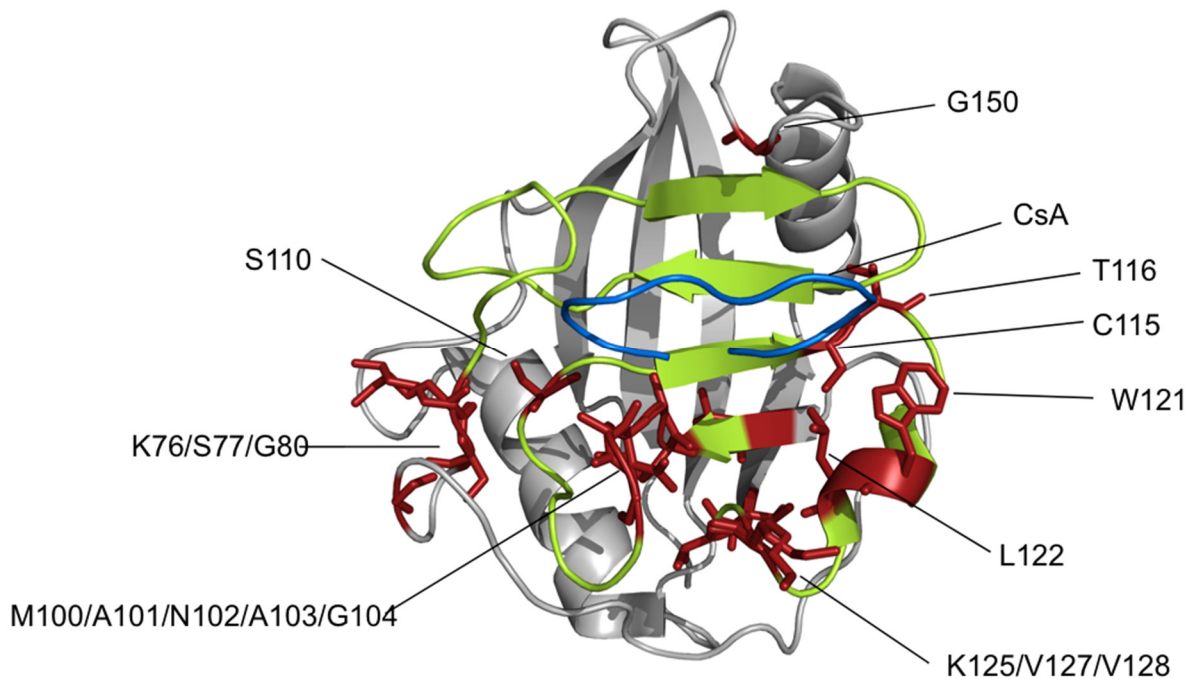


Abbildung 39 **Darstellung von CypD mit gebundenem CsA (blau) in der Bindungstasche.** PDB-Nr. 2Z6W Die Sequenzbereiche Thr52 bis Ser77 und Leu98 bis Val128 von CypD binden A β (1-40). Diese Bereiche sind in der Abbildung gelb markiert. Bereiche bzw. Reste, welche in 2D-HSQC-NMR-Messungen eine besonders große chemische Verschiebung zeigten ($> 0,2$ ppm) sind rot gezeichnet und entsprechend beschriftet. Der A β (1-40) bindende Bereich von CypD liegt in der gleichen Region, in der auch CsA bindet. Die Darstellung wurde mit PyMOL Version 1.7 nach dem PDB-Eintrag für CypD erstellt (PDB-ID: 2Z6W) [210].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindungstasche von CypA einen relativ großen Bereich des Peptid- bzw. Proteinsubstrates aufnehmen kann. In der Kristallstruktur von CypA mit einem 25-meren Peptid wiesen 14 Aminosäurereste des aktiven Zentrums von CypA Interaktionen mit neun Resten des Substrates auf, acht der Reste waren hierbei kein Prolin [211].

Durch das Fehlen von Prolin in der A β (1-40)-Sequenz war die Identifizierung der Bindungsstelle des aktiven Zentrums von CypD an einer bestimmten Position innerhalb der Peptidkette von A β (1-40) erschwert. Daher wurden zur Identifizierung von Binderegionen von CypD innerhalb der A β (1-40)-Sequenz sowohl ein Peptid-Spot-Array als auch NMR-Untersuchungen durchgeführt. Durch 2D-HSQC-NMR-Messungen konnten mehrere Stellen in der gesamten A β (1-40)-Sequenz identifiziert werden, welche mit dem aktiven Zentrum von CypD interagieren, wobei ein klar umrissener Schwerpunkt der Interaktion in der Region A β (16-22) auftrat (siehe Abbildung 29). Signifikante Veränderungen der chemischen Verschiebung ($> 0,15$ ppm) in A β (1-40) bei Bindung von A β (1-40) an CypD wurden für die Reste Tyr10, Lys16, Leu17, Val18 und Ala21 gefunden. Eine Verringerung der Signalintensitäten um

mehr als 25 % wurde im Bereich von Leu17 bis Glu22 gefunden. Die Signalintensitäten normalisierten sich bei Zugabe von MM258 in den Versuchsansatz mit A β (1-40) und CypD. Die Abnahme der Signalintensitäten war konzentrationsabhängig und reversibel.

Die hydrophobe Region A β (16-22) wurde auch bei Untersuchungen der Wechselwirkung von CypD mit von A β (1-40) abgeleiteten Peptiden in einem *Peptid-Spot Array* als wichtig für die CypD/ A β (1-40)-Bindung identifiziert [95], [212]. Der A β (1-40)-Bereich mit der Aminosäuresequenz KLVFF (A β (16-20)) zeigte die stärkste Wechselwirkung mit CypD. Das von dieser Sequenz abgeleitete Pentapeptid KLVFF inhibierte die PPIase-Aktivität von CypA und CypD, was verdeutlicht, dass dieses Peptid in der Lage ist, im aktiven Zentrum der beiden Cyclophiline zu binden. Der Peptidbereich mit der Aminosäuresequenz KLVFF umfasst die gut charakterisierte und bekannte Schlüsselregion für die Autoassemblierung bei der Aggregation von A β (1-40) [213]. Es ist bekannt, dass das von dieser Sequenz abgeleitete Pentapeptid auch die Ausbildung von Fibrillen in einem A β (1-40)-Aggregationsassay inhibiert [212], [214]. Außerdem ist die Sequenz an der Interaktion mit vielen beschriebenen Bindungspartnern von A β (1-40) oder A β (1-42) beteiligt, wie z. B. mit Curcumin [215], Transthyretin [216] oder nicht biologischen Makromolekülen wie Fullerenen [195] (Abschnitt 4.7.1, Abbildung 30).

Um Aussagen über die thermodynamischen Parameter der Interaktion der Cyclophiline mit einem Sequenzbereich von A β (1-40) zu treffen, wurde das Pentapeptid A β (16-20) für Untersuchungen mittels isothermer Titrationskalorimetrie genutzt. A β (1-40) selbst aggregierte unter den verwendeten Bedingungen zu schnell, um Titrationsexperimente mit Cyclophilinen durchzuführen. Der K_D -Wert für die CypD/A β (16-20)-Interaktion wurde mit 2,79 μ M bestimmt. Der Wert lag damit in einem ähnlichen Bereich wie der durch Inhibitionsmessungen von CypD mit KLVFF im PPIase-Assay bestimmte IC_{50} -Wert von 0,43 μ M. Der K_D -Wert für die CypA/A β (16-20)-Interaktion wurde mit 1,82 μ M bestimmt und lag in derselben Größenordnung wie der K_D -Wert der CypD/A β (16-20)-Interaktion. Diese Werte waren ähnlich zu dem bereits bekannten K_D -Wert aus Untersuchungen zur Stabilität von A β (1-40)/CypD-Komplexen mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie von 1,7 μ M [92]. Die Interaktion des Pentapeptids A β (16-20) mit CypA bzw. CypD war entropisch favorisiert, was für eine Abdeckung lösungsmittelzugänglicher Oberfläche bei der Interaktion spricht. Das molare Verhältnis von 1:32 für die Interaktion zwischen CypD bzw. CypA und dem Pentapeptid ist ein Hinweis, dass das Pentapeptid A β (16-20) Oligomere bilden kann und CypD bzw. CypA solche oligomeren Spezies bindet (Abschnitt 4.3.1, Abbildung 13).

Allerdings lassen sich aus den ITC-Daten der CypA/A β (16-20)- bzw. der CypD/ A β (16-20)-Interaktion keine direkten Schlüsse auf eine Interaktion der Cyclophiline mit oligomeren A β (1-40)-Spezies ziehen, da das Pentapeptid A β (16-20) möglicherweise oligomere Spezies bildet, die nicht den entstehenden oligomeren Strukturen im Verlauf der Aggregation von A β (1-40) entsprechen. Wir konnten in keiner unserer Studien eine entsprechende oligomere Spezies von A β (1-40) im Zusammenhang mit CypA oder CypD nachweisen, allerdings kann die Bildung einer solchen Spezies nicht komplett ausgeschlossen werden.

Mittels NMR wurde ein K_D -Wert für die CypD/A β (1-40)-Interaktion von ca. 30 μ M abgeschätzt. Dieser Wert liegt näher an dem mittels der intrinsischen Fluoreszenz gemessenen K_D -Wert von 43 ± 6 μ M für die Interaktion von CypD/A β (16-20) (Abschnitt 4.7.3).

Das Ermitteln des K_D -wertes für die Interaktion von A β (16/20) bzw. A β (1-40) mit CypD führt zu keinem eindeutigen Ergebnis. Einfluss auf die ermittelten Werte können die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel die Reaktionstemperatur die bei der ISP-Messung 10 °C und zum Beispiel bei der ITC-Messung 25 °C betrug oder unterschiedliche Konzentrationsbereiche, haben.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die erhöhte Flexibilität des A β -Peptids bei Anwesenheit von CypD, wie es sich in den NMR-Untersuchungen durch einen erhöhten Amidprotonenaustausch mit dem umgebenden Lösungsmittel zeigt. Es ist bekannt, dass eine Protein/Protein- bzw. eine Protein/Ligand-Interaktion in der Regel zu einer Stabilisierung und einer eingeschränkten Beweglichkeit des Interaktionspartners führt [217] [218]. In dem vorliegenden Fall ist die Zunahme des schnellen Amidprotonenaustauschs bei Anwesenheit von CypD ein Argument für die Annahme, dass die Bildung strukturell rigider zur Aggregation neigender A β -Spezies verringert war. Es gibt Hinweise darauf, dass die intrinsische Dynamik von Substratpeptidketten der Rückgratdynamik von CypA ohne gebundenen Liganden ähnelt und diese für die Katalyse wichtige Dynamik geschwindigkeitslimitierend für die von CypA katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung ist [219]. Es ist daher zu erwarten, dass es eine starke Kopplung der Atombewegungen im aktiven Zentrum gibt, wenn ein Substrat, z. B. ein ungefaltetes Peptid, dort bindet. Diese das gesamte Peptid umfassende Flexibilisierung von A β (1-40) durch CypD scheint, zusammen mit dem Verschieben von initialen di- und trimeren Spezies zu Monomeren durch CypD, damit eine Ursache für die Inhibierung der Aggregation von A β (1-40) durch CypD zu bilden.

Die Interaktion von A β mit CypD ist im Prinzip mit der Interaktion von CsA mit CypD vergleichbar. In beiden Fällen bindet der Ligand reversibel im aktiven Zentrum des Enzyms. Allerdings haben die beiden Interaktionen *in vivo* unterschiedliche Auswirkungen. Die A β /CypD-Interaktion wird mit pathophysiologischen Prozessen, wie der Störung des axonalen Transports von Mitochondrien in Neuronen, der herabgesetzten Toleranz von Neuronen gegenüber Ca^{2+} -Ionen oder der induzierten Schwellung von Mitochondrien, in Verbindung gebracht [92], [143], [206]. CsA inhibiert das Anschwellen von Mitochondrien und schützt Zellen vor A β -induziertem oxidativen Stress sowie der Akkumulation von ROS im Mitochondrium [143]. Daher scheinen die pathophysiologischen Effekte der A β /CypD-Interaktion nicht kausal mit der Inhibition der PPLase-Aktivität zusammenzuhängen, sondern eher mit einer durch CypD erhöhten Toxizität von A β . Potentiell toxische A β -Oligomere könnten durch die Interaktion mit CypD stabilisiert werden.

Die hier beschriebene Interaktion zwischen CypA bzw. CypD mit A β (1-40) bzw. seinem Derivat A β (16-20) hat Einfluss auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Es konnte gezeigt werden, dass das aktive Zentrum von CypA bzw. CypD und für die Aggregation wichtige Sequenzbereiche von A β (1-40) an dieser Interaktion direkt beteiligt sind.

Die gefundene inhibierende Wirkung auf diese Aggregation bietet interessante Möglichkeiten für weitere Studien. Die in der Literatur beschriebene pathophysiologische Interaktion von A β (1-40) und CypD im Mitochondrium, die zum nekrotischen Absterben des Neurons führt, ist ein putativ interessanter Ansatz für eine therapeutische Intervention.

Bisher noch nicht untersucht sind physiologische Folgen der Interaktion von extrazellulär vorliegendem CypA und dem A β -Peptid. Eine biologische bzw. physiologische Bedeutung ist im Rahmen dieser Untersuchungen schwer zu diskutieren. Die Ablagerung von amyloiden Plaques ist bisher nur extrazellulär beschrieben, daher könnte die Interaktion dort auch eine physiologische Konsequenz haben. Die physiologische Funktion von A β (1-40) im Mitochondrium eines Neurons ist noch zu untersuchen und zu diskutieren. Auch der Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Inhibierung der Aggregation *in vivo* sollte Gegenstand weiterer eingehender Studien sein.

6 Zusammenfassung der vorgelegten Dissertation

In der Literatur wurde eine mögliche *in vivo* Interaktion von mitochondrial lokalisiertem A β (1-40) mit CypD als putativ neurodegenerativ in Mäusen beschrieben [92].

Aufgabenstellung dieser Untersuchung war es deshalb, die Interaktion zwischen CypA bzw. CypD und A β (1-40) zu charakterisieren und, wenn möglich, den zugrunde liegenden molekularen Interaktionsmechanismus aufzuklären.

CypA und CypD inhibierten in substöchiometrischen Verhältnissen die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). Die inhibierende Wirkung war nicht mehr zu beobachten, wenn Cyclophilinhibitoren, wie CsA oder das CsA-Derivat MM258, in den Reaktionsansatz gegeben wurden. Da CsA am aktiven Zentrum von CypA bindet und dort seine inhibitorische Wirkung entfaltet [32], wurde untersucht ob A β (1-40) auch am aktiven Zentrum eines Cyclophilins bindet.

NMR-Untersuchungen zeigten deutliche chemische Verschiebungen von Amidprotonen von Aminosäurereste im aktiven Zentrum von CypD bei Anwesenheit von A β (1-40). Diese Aminosäurereste wurden bereits in der Literatur als Bindestellen von CsA im aktiven Zentrum von CypD gezeigt und auch als an der CsA/CypA-Interaktion beteiligt beschrieben [44], [189].

Als Bindungsstelle von CypD an A β (1-40) wurde mittels *Peptide Spot Array* der hydrophobe Kernbereich von A β (16-23) identifiziert. NMR-Messungen bestätigten diesen Bereich als putative Bindestelle von CypD an A β (1-40).

Messungen der Protonaustauschrate von A β (1-40) mit dem umgebenden Medium zeigten bei Anwesenheit von CypD eine generelle Beschleunigung des Amidprotonenaustauschs. Dies lässt sich mit einer offenen und flexiblen Struktur von A β (1-40) erklären [175]. CypD verhindert in diesem Erklärungsmodell die Ausbildung einer steiferen, unflexibleren β -Faltblattstruktur. Die Ausbildung der rigideren Sekundärstruktur inhibiert den Austausch von Amidprotonen zwischen den Resten und dem umgebenden wässrigen Medium.

Das Pentapeptid A β (16-20) mit der Sequenz KLVFF inhibierte die enzymatische Aktivität von CypD im nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Bindung des Peptids an das aktive Zentrum von CypD war reversibel, wie Rückverdünnungsexperimente zeigten.

Mittels ITC-Messungen wurde die Dissoziationskonstante für CypA mit 1,82 μ M und für CypD mit 2,79 μ M bestimmt. Diese K_D -Werte liegen in der Größenordnung, welche in der Literatur für die Interaktion von A β (1-40) mit CypD von 1,7 μ M angegeben wird [92].

Mittels PICUP-Experimenten konnte monomeres A β (1-40) als wahrscheinlicher Interaktionspartner von CypD identifiziert werden. Im zeitlichen Verlauf der fibrillären Aggregation war keine Akkumulation von größeren A β (1-40)-Spezies in Gegenwart von CypD nachweisbar, was ein Verharren des Peptids im monomeren Zustand durch den Einfluss von CypD belegt.

Diese Ergebnisse unterstützen die These einer reversiblen Bindung von monomeren A β (1-40) im aktiven Zentrum von CypA und CypD. Diese Interaktion verhindert die fibrilläre Aggregation von monomeren A β (1-40) in wässrigen Puffern.

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Darstellung der <i>cis/trans</i> -Isomerisierung einer Prolylbindung. | 1 |
| Abbildung 2 Alignment der Aminosäuresequenzen von humanem CypA, CypB und CypD. | 5 |
| Abbildung 3 Modell der Entstehung von Amyloidfibrillen | 10 |
| Abbildung 4 Darstellung der Beblitzungsvorrichtung für die PICUP-Experimente. | 31 |
| Abbildung 5 Schematische Darstellung der PICUP-Reaktion mit Rutheniumkomplex und einem Nukleophil. | 32 |
| Abbildung 6 Überprüfung der Reinheit der Proteinpräparation mittels SDS-PAGE. | 35 |
| Abbildung 7 Bestimmung der PPIase-Aktivität von CypA (Bild A) und CypD (Bild B). | 37 |
| Abbildung 8 Darstellung der enzymatischen Aktivitäten der verwendeten CypD-Varianten. | 38 |
| Abbildung 9 Darstellung der chemischen Strukturen von CsA, CsH und MM258. | 39 |
| Abbildung 10 Inhibition der CypD-Aktivität durch das CsA-Derivat MM258..... | 39 |
| Abbildung 11 CD-Spektren von CypD und der Varianten von CypD. | 40 |
| Abbildung 12 Einfluss von CypA und CypD auf die fibrilläre Aggregation von humanem A β (1-40). 42 | |
| Abbildung 13 Zeitversetzte Gabe von CypD zu Reaktionsansätzen der fibrillären Aggregation von A β (1-40). | 43 |
| Abbildung 14 Der Einfluss von Cyclophilininhibitoren auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40). 44 | |
| Abbildung 15 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von A β (1-40) konzentrationsabhängig wieder her..... | 45 |
| Abbildung 16 Die zeitverzögerte Gabe von MM258 zu einem Reaktionsansatz von A β (1-40) mit CypD ermöglichte die fibrilläre Aggregation. | 45 |
| Abbildung 17 Einfluss verschiedener CypA-Varianten auf die fibrilläre Aggregation von A β (1-40).. 46 | |
| Abbildung 18 Einfluss verschiedener CypD-Varianten auf die Aggregation von A β (1-40)..... | 47 |
| Abbildung 19 Einfluss der zwei CypD-Varianten N144A und W163A auf die Fibrillierung von A β (1-40). | 47 |
| Abbildung 20 Elektronenmikroskopische Untersuchung von diversen A β (1-40)-Aggregationsansätzen. | 48 |
| Abbildung 21 Kartierung der Bindesequenzen von CypD an A β (1-40) mittels eines Peptidarrays. .. | 50 |
| Abbildung 22 Untersuchung der CypD/A β -Interaktion durch Permutation von A β (16-25). | 50 |
| Abbildung 23 2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von freiem A β (1-40) (schwarz) und A β (1-40)/CypD (Verhältnis 1:2,5, rot). | 51 |
| Abbildung 24 NMR-Studien zur Identifizierung der Bindungsstelle von CypD an A β (1-40). | 52 |
| Abbildung 25 Abnahme der Intensität von ¹ H- ¹⁵ N-Korrelationssignalen von ausgewählten A β (1-40)-Resten. | 52 |
| Abbildung 26 Veränderungen der relativen Signalintensivität von Resten innerhalb der von an CypD bindenden A β (1-40)-Region. | 53 |
| Abbildung 27 Untersuchung der Veränderung Amidprotonenaustausches von A β (1-40)-Resten bei Interaktion mit CypD. | 53 |
| Abbildung 28 2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von CypD/A β (1-40). | 54 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 29 Veränderung der chemischen Verschiebung von Cyp-Resten im aktiven Zentrum. ... | 55 |
| Abbildung 30 Inhibition der PPIase-Aktivität der Cyclophiline A und D durch das Pentapeptid Aβ(16-20). | 56 |
| Abbildung 31 Rückverdünnungsexperiment zur Untersuchung der Reversibilität der Inhibition der PPIase-Aktivität von CypA durch Aβ(16-20). | 57 |
| Abbildung 32 Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Aβ(16-20)/CypA-Interaktion durch ITC. | 58 |
| Abbildung 33 Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Aβ(16-20)/CypD-Interaktion durch ITC. | 58 |
| Abbildung 34 Untersuchung der CypD/Aβ(16-20)-Interaktion durch Fluoreszenz-Spektroskopie. ... | 59 |
| Abbildung 35 Analyse von Aβ(1-40)-Oligomeren durch photochemisches <i>cross linking</i>. | 60 |
| Abbildung 36 Detektion der mit CypD interagierenden Aβ(1-40)-Spezies mittels PICUP. | 61 |
| Abbildung 37 Untersuchung der Vitalität von SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit Aβ(16-20). | 63 |
| Abbildung 38 Untersuchung des Einflusses von Aβ(1-40) auf Vitalität von SH-SY5Y-Zellen. | 63 |
| Abbildung 39 Darstellung von CypD mit gebundenem CsA (blau) in der Bindungstasche. | 73 |

8 Referenzen

- [1] C. Schiene-Fischer, T. Aumüller, and G. Fischer, "Peptide bond cis/trans isomerases: a biocatalysis perspective of conformational dynamics in proteins.," *Top. Curr. Chem.*, vol. 328, pp. 35–67, Jan. 2013.
- [2] G. Fischer, H. Bang, and C. Mech, "Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden," 1984.
- [3] C. Schiene-Fischer, J. Habazettl, F. X. Schmid, and G. Fischer, "The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 419–24, Jun. 2002.
- [4] C. Schiene-Fischer, J. Habazettl, T. Tradler, and G. Fischer, "Evaluation of Similarities in the cis/transomerase Function of Trigger Factor and DnaK," *Biol. Chem.*, vol. 383, no. 12, pp. 1865–1873, Dec. 2002.
- [5] L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson, "The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 37, no. 4, pp. 205–211, Apr. 1951.
- [6] M. W. MacArthur and J. M. Thornton, "Influence of proline residues on protein conformation.," *J. Mol. Biol.*, vol. 218, no. 2, pp. 397–412, Mar. 1991.
- [7] D. E. Stewart, A. Sarkar, and J. E. Wampler, "Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures.," *J. Mol. Biol.*, vol. 214, no. 1, pp. 253–60, Jul. 1990.
- [8] A. E. Tonelli, "An estimate of the barriers hindering rotation about the C-alpha-C' bond between the cis' and trans' conformations in an isolated L-proline residue.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 18, pp. 5946–8, Sep. 1973.
- [9] R. Golbik, G. Fischer, and A. R. Fersht, "Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18).," *Protein Sci.*, vol. 8, no. 7, pp. 1505–14, Jul. 1999.
- [10] K. Lang, F. X. Schmid, and G. Fischer, "Catalysis of protein folding by prolyl isomerase," *Nature*, vol. 329, no. 6136, pp. 268–270, Sep. 1987.
- [11] G. Fischer and H. Bang, "The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 828, no. 1, pp. 39–42, Mar. 1985.
- [12] T. Aumüller, G. Jahreis, G. Fischer, and C. Schiene-Fischer, "Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation.," *Biochemistry*, vol. 49, no. 5, pp. 1042–52, Feb. 2010.
- [13] V. Yurchenko, M. O'Connor, W. W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky, "CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 288, no. 4, pp. 786–8, Nov. 2001.
- [14] L. J. Kanyenda, G. Verdile, R. Martins, B. P. Meloni, J. Chieng, F. Mastaglia, S. M. Laws, R. S. Anderton, and S. Boulos, "Is Cholesterol and Amyloid- β Stress Induced CD147 Expression a Protective Response? Evidence that Extracellular Cyclophilin A Mediated Neuroprotection is Reliant on CD147.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 39, no. 3, pp. 545–56, Jan. 2014.
- [15] G. Baumann, G. Zenke, R. Wenger, P. Hiestand, V. Quesniaux, E. Andersen, and M. H. Schreier, "Molecular mechanisms of immunosuppression.," *J. Autoimmun.*, vol. 5 Suppl A, pp. 67–72, Apr. 1992.
- [16] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, and D. W. Speicher, "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A.," *Science*, vol. 226, no. 4674, pp. 544–7,

- Nov. 1984.
- [17] J. J. Siekierka, S. H. Hung, M. Poe, C. S. Lin, and N. H. Sigal, "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin.," *Nature*, vol. 341, no. 6244, pp. 755–7, Oct. 1989.
- [18] M. K. Rosen, R. F. Standaert, A. Galat, M. Nakatsuka, and S. L. Schreiber, "Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate.," *Science*, vol. 248, no. 4957, pp. 863–6, May 1990.
- [19] B. E. Bierer, "Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: binding to immunophilins and biological action.," *Chem. Immunol.*, vol. 59, pp. 128–55, Jan. 1994.
- [20] S. O. Marx, S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt, and A. R. Marks, "PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor)," *Cell*, vol. 101, no. 4, pp. 365–376, May 2000.
- [21] D. MacMillan, "FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 700, no. 1–3, pp. 181–93, Jan. 2013.
- [22] J. H. Collins, "Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 178, no. 3, pp. 1288–90, Aug. 1991.
- [23] T. Jayaraman, A. M. Brillantes, A. P. Timerman, S. Fleischer, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and A. R. Marks, "FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor).," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 14, pp. 9474–7, May 1992.
- [24] P. Zacchi, M. Gostissa, T. Uchida, C. Salvagno, F. Avolio, S. Volinia, Z. Ronai, G. Blandino, C. Schneider, and G. Del Sal, "The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults.," *Nature*, vol. 419, no. 6909, pp. 853–7, Oct. 2002.
- [25] L. Pastorino, A. Sun, P.-J. Lu, X. Z. Zhou, M. Balastik, G. Finn, G. Wulf, J. Lim, S.-H. Li, X. Li, W. Xia, L. K. Nicholson, and K. P. Lu, "The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production.," *Nature*, vol. 440, no. 7083, pp. 528–34, Mar. 2006.
- [26] L. D. Zydowsky, F. A. Etzkorn, H. Y. Chang, S. B. Ferguson, L. A. Stolz, S. I. Ho, and C. T. Walsh, "Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition.," *Protein Sci.*, vol. 1, no. 9, pp. 1092–9, Sep. 1992.
- [27] R. K. Harrison and R. L. Stein, "Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion.," *Biochemistry*, vol. 29, no. 7, pp. 1684–9, Feb. 1990.
- [28] H. Ke, D. Mayrose, and W. Cao, "Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 8, pp. 3324–8, Apr. 1993.
- [29] G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, and F. X. Schmid, "Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins.," *Nature*, vol. 337, no. 6206, pp. 476–8, Feb. 1989.
- [30] J. Liu, M. W. Albers, C. M. Chen, S. L. Schreiber, and C. T. Walsh, "Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 6, pp. 2304–8, Mar. 1990.
- [31] B. HAENDLER and E. HOFER, "Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes," *Eur. J. Biochem.*, vol. 190, no. 3, pp. 477–482, Jun. 1990.
- [32] J. Kallen, C. Spitzfaden, M. G. Zurini, G. Wider, H. Widmer, K. Wüthrich, and M. D.

- Walkinshaw, "Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy.," *Nature*, vol. 353, no. 6341, pp. 276–9, Sep. 1991.
- [33] B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, and A. Cerami, "Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 8, pp. 3511–3515, Apr. 1992.
- [34] N. Takahashi, T. Hayano, and M. Suzuki, "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin.," *Nature*, vol. 337, no. 6206, pp. 473–5, Feb. 1989.
- [35] B. M. Hall, K. E. Gurley, N. W. Pearce, and S. E. Dorsch, "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. II. Sequential changes in alloreactivity of T cell subsets.," *Transplantation*, vol. 47, no. 6, pp. 1030–3, Jun. 1989.
- [36] T. E. Starzl, G. B. Klintmalm, K. A. Porter, S. Iwatsuki, and G. P. Schröter, "Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 305, no. 5, pp. 266–9, Jul. 1981.
- [37] N. A. Clipstone and G. R. Crabtree, "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation.," *Nature*, vol. 357, no. 6380, pp. 695–7, Jun. 1992.
- [38] Q. Huai, H.-Y. Kim, Y. Liu, Y. Zhao, A. Mondragon, J. O. Liu, and H. Ke, "Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 19, pp. 12037–42, Sep. 2002.
- [39] R. D. Bell, E. A. Winkler, I. Singh, A. P. Sagare, R. Deane, Z. Wu, D. M. Holtzman, C. Betsholtz, A. Armulik, J. Sallstrom, B. C. Berk, and B. V. Zlokovic, "Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A.," *Nature*, vol. 485, no. 7399, pp. 512–6, May 2012.
- [40] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, and M. A. Pericak-Vance, "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.," *Science*, vol. 261, no. 5123, pp. 921–3, Aug. 1993.
- [41] J. Li, L. Han, Y. Wen, Y. Yang, S. Li, X. Li, C. Zhao, T. Wang, H. Chen, Y. Liu, C. Qi, X. He, Q. Gu, Y. Ye, Y. Zhang, R. Huang, Y. Wu, R. He, H. Kurihara, X. Song, L. Cao, and L. Wang, "Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 43, no. 2, pp. 535–48, Jan. 2015.
- [42] Y.-S. Ge, W.-Y. Teng, and C.-D. Zhang, "Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells.," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 122, no. 6, pp. 716–24, Mar. 2009.
- [43] Y. Seko, T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Murayama, and R. Nagai, "Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 317, no. 1, pp. 162–8, Apr. 2004.
- [44] G. M. Pflügl, J. Kallen, J. N. Jansonius, and M. D. Walkinshaw, "The Molecular Replacement Solution and X-ray Refinement to 2.8 Å of a Decameric Complex of Human Cyclophilin A with the Immunosuppressive Drug Cyclosporin A," *J. Mol. Biol.*, vol. 244, no. 4, pp. 385–409, 1994.
- [45] K. Arora, W. M. Gwinn, M. A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H. R. MacDonald, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant, "Extracellular Cyclophilins Contribute to the Regulation of Inflammatory Responses," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 1, pp. 517–522, Jun. 2005.
- [46] V. Yurchenko, G. Zybarth, M. O'Connor, W. W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.-C. Hung, B. Toole, P. Gally, B. Sherry, and M. Bukrinsky, "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 25, pp. 22959–65, Jun. 2002.
- [47] M. Malesevic, D. Gutknecht, E. Prell, C. Klein, M. Schumann, R. A. Nowak, J. C. Simon, C. Schiene-Fischer, and A. Saalbach, "Anti-inflammatory effects of extracellular cyclosporins are

- exclusively mediated by CD147.," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 18, pp. 7302–11, Sep. 2013.
- [48] E. R. Price, L. D. Zydowsky, M. J. Jin, C. H. Baker, F. D. McKeon, and C. T. Walsh, "Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 5, pp. 1903–7, Mar. 1991.
- [49] VINCENT, MIKOL, J6RG, KALLEN, AND, MALCOLM, D., and WALKINSHAW, "X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: Comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 91*, pp. 5183-5186, 1994. [Online]. Available: <http://www.pnas.org/content/91/11/5183.full.pdf>. [Accessed: 23-Nov-2014].
- [50] M. I. Bukrinsky, "Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications," *Trends Immunol.*, vol. 23, no. 7, pp. 323–325, Jul. 2002.
- [51] E. J. Stemmy, A. S. Benton, J. Lerner, S. Alcala, S. L. Constant, and R. J. Freishtat, "Extracellular cyclophilin levels associate with parameters of asthma in phenotypic clusters.," *J. Asthma*, vol. 48, no. 10, pp. 986–93, Dec. 2011.
- [52] C. P. Connern and A. P. Halestrap, "Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin.," *Biochem. J.*, vol. 284 (Pt 2, pp. 381–5, Jun. 1992.
- [53] D. J. Bergsma, C. Eder, M. Gross, H. Kersten, D. Sylvester, E. Appelbaum, D. Cusimano, G. P. Livi, M. M. McLaughlin, and K. Kasyan, "The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 34, pp. 23204–14, Dec. 1991.
- [54] K. R. Bowles, C. Zintz, S. E. Abraham, L. Brandon, N. E. Bowles, and J. A. Towbin, "Genomic characterization of the human peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase, mitochondrial precursor gene: assessment of its role in familial dilated cardiomyopathy," *Hum. Genet.*, vol. 105, no. 6, pp. 582–586, Dec. 1999.
- [55] A. Chacinska, N. Pfanner, and C. Meisinger, "How mitochondria import hydrophilic and hydrophobic proteins," *Trends Cell Biol.*, vol. 12, no. 7, pp. 299–303, Jul. 2002.
- [56] K. Kajitani, M. Fujihashi, Y. Kobayashi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, and K. Miki, "Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-A resolution.," *Proteins*, vol. 70, no. 4, pp. 1635–9, Mar. 2008.
- [57] D. Schlatter, R. Thoma, E. Küng, M. Stihle, F. Müller, E. Borroni, A. Cesura, and M. Hennig, "Crystal engineering yields crystals of cyclophilin D diffracting to 1.7 Å resolution.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 61, no. Pt 5, pp. 513–9, May 2005.
- [58] J. W. Elrod, R. Wong, S. Mishra, R. J. Vagnozzi, B. Sakthivel, S. A. Goonasekera, J. Karch, S. Gabel, J. Farber, T. Force, J. H. Brown, E. Murphy, and J. D. Molkentin, "Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice.," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 10, pp. 3680–7, Oct. 2010.
- [59] S. Menazza, R. Wong, T. Nguyen, G. Wang, M. Gucek, and E. Murphy, "CypD(-/-) hearts have altered levels of proteins involved in Krebs cycle, branch chain amino acid degradation and pyruvate metabolism.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 56, pp. 81–90, Mar. 2013.
- [60] T. T. M. Nguyen, R. Wong, S. Menazza, J. Sun, Y. Chen, G. Wang, M. Gucek, C. Steenbergen, M. N. Sack, and E. Murphy, "Cyclophilin D modulates mitochondrial acetylome.," *Circ. Res.*, vol. 113, no. 12, pp. 1308–19, Dec. 2013.
- [61] D. R. Hunter, R. A. Haworth, and J. H. Southard, "Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria," *J. Biol. Chem.*, vol. 251, no. 16, pp. 5069–5077, Aug. 1976.
- [62] F. Di Lisa, R. Menabò, M. Canton, M. Barile, and P. Bernardi, "Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD+ and is a

- causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 4, pp. 2571–5, Jan. 2001.
- [63] I. Szabo and M. Zoratti, "The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 6, pp. 3376–3379, Feb. 1991.
- [64] L. Leanza, L. Biasutto, A. Managò, E. Gulbins, M. Zoratti, and I. Szabò, "Intracellular ion channels and cancer.," *Front. Physiol.*, vol. 4, p. 227, Jan. 2013.
- [65] P. Bernardi, "The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?," *Front. Physiol.*, vol. 4, p. 95, Jan. 2013.
- [66] M. Crompton, H. Ellinger, and A. Costi, "Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress.," *Biochem. J.*, vol. 255, no. 1, pp. 357–60, Oct. 1988.
- [67] C. P. Connern and A. P. Halestrap, "Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel.," *Biochem. J.*, vol. 302 (Pt 2, pp. 321–4, Sep. 1994.
- [68] F. Ricchelli, J. Sileikytė, and P. Bernardi, "Shedding light on the mitochondrial permeability transition.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1807, no. 5, pp. 482–90, May 2011.
- [69] V. Giorgio, E. Bisetto, M. E. Soriano, F. Dabbeni-Sala, E. Basso, V. Petronilli, M. A. Forte, P. Bernardi, and G. Lippe, "Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 49, pp. 33982–8, Dec. 2009.
- [70] A. Rasola, M. Sciacovelli, F. Chiara, B. Pantic, W. S. Brusilow, and P. Bernardi, "Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 2, pp. 726–31, Jan. 2010.
- [71] T. T. Nguyen, M. V Stevens, M. Kohr, C. Steenbergen, M. N. Sack, and E. Murphy, "Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 46, pp. 40184–92, Nov. 2011.
- [72] J. E. Kokoszka, K. G. Waymire, S. E. Levy, J. E. Sligh, J. Cai, D. P. Jones, G. R. MacGregor, and D. C. Wallace, "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore.," *Nature*, vol. 427, no. 6973, pp. 461–5, Jan. 2004.
- [73] A. Krauskopf, O. Eriksson, W. J. Craigen, M. A. Forte, and P. Bernardi, "Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1757, no. 5–6, pp. 590–5.
- [74] V. Giorgio, S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G. D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabó, G. Lippe, and P. Bernardi, "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 15, pp. 5887–92, Apr. 2013.
- [75] K. G. Norman, J. A. Canter, M. Shi, G. L. Milne, J. D. Morrow, and J. E. Sligh, "Cyclosporine A suppresses keratinocyte cell death through MPTP inhibition in a model for skin cancer in organ transplant recipients.," *Mitochondrion*, vol. 10, no. 2, pp. 94–101, Mar. 2010.
- [76] A. P. Halestrap, S. J. Clarke, and S. A. Javadov, "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 372–85, Feb. 2004.
- [77] B. Li, C. Chauvin, D. De Paulis, F. De Oliveira, A. Gharib, G. Vial, S. Lablanche, X. Lerverve, P. Bernardi, M. Ovize, and E. Fontaine, "Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1817, no. 9, pp. 1628–34, Sep. 2012.

- [78] A. Burns and S. Iliffe, "Alzheimer's disease.," *BMJ*, vol. 338, no. feb05_1, p. b158, Jan. 2009.
- [79] Alois Alzheimer, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde," *Allg. Zeitschrift für Psychiatr.*, no. Band 64, p. S. 146–148, 1907.
- [80] P. (1860-189.). Blocq, "Séméiologie et diagnostic des maladies nerveuses / par Paul Blocq,... et ,...," 1892.
- [81] C. L. Masters, G. Multhaup, G. Simms, J. Pottgiesser, R. N. Martins, and K. Beyreuther, "Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels.," *EMBO J.*, vol. 4, no. 11, pp. 2757–63, Nov. 1985.
- [82] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Müller-Hill, "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.," *Nature*, vol. 325, no. 6106, pp. 733–6, Jan. 1987.
- [83] S. Claeysen, M. Cochet, R. Donneger, A. Dumuis, J. Bockaert, and P. Giannoni, "Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay.," *Cell. Signal.*, vol. 24, no. 9, pp. 1831–40, Sep. 2012.
- [84] M. C. Chartier-Harlin, F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, A. Goate, M. Rossor, P. Roques, and J. Hardy, "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene.," *Nature*, vol. 353, no. 6347, pp. 844–6, Oct. 1991.
- [85] D. A. Snowdon, "Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study.," *Gerontologist*, vol. 37, no. 2, pp. 150–6, Apr. 1997.
- [86] T. Oda, G. M. Pasinetti, H. H. Osterburg, C. Anderson, S. A. Johnson, and C. E. Finch, "Purification and characterization of brain clusterin.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 204, no. 3, pp. 1131–6, Nov. 1994.
- [87] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein, "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 6448–6453, May 1998.
- [88] V. W. Chow, M. P. Mattson, P. C. Wong, and M. Gleichmann, "An overview of APP processing enzymes and products.," *Neuromolecular Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2010.
- [89] G. G. Glenner and C. W. Wong, "Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 122, no. 3, pp. 1131–1135, Aug. 1984.
- [90] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and P. T. Lansbury, "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.," *Biochemistry*, vol. 32, no. 18, pp. 4693–7, May 1993.
- [91] K. N. Dahlgren, A. M. Manelli, W. B. Stine, L. K. Baker, G. A. Krafft, and M. J. LaDu, "Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-beta Peptides Differentially Affect Neuronal Viability," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 35, pp. 32046–32053, Aug. 2002.
- [92] H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. a Sosunov, G. M. McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkentin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen, and S. Du Yan, "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease.," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 10, pp. 1097–105, Oct. 2008.
- [93] J. W. Lustbader, M. Cirilli, C. Lin, H. W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L.-F. Lue, D. G. Walker, P. Kuppusamy, Z. L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S. S. Yan, and H. Wu, "ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease.," *Science*, vol. 304, no. 5669, pp. 448–52, Apr.

2004.

- [94] I. Kuperstein, K. Broersen, I. Benilova, J. Rozenski, W. Jonckheere, M. Debulpaep, A. Vandersteen, I. Segers-Nolten, K. Van Der Werf, V. Subramaniam, D. Braeken, G. Callewaert, C. Bartic, R. D’Hooge, I. C. Martins, F. Rousseau, J. Schymkowitz, B. De Strooper, H. Aizenstein, R. Nebes, J. Saxton, J. Price, C. Mathis, N. Tsopelas, S. Ziolk, J. James, B. Snitz, P. Houck, W. Bi, A. Cohen, B. Lopresti, S. DeKosky, E. Halligan, W. Klunk, M. Aksenov, M. Aksenova, D. Butterfield, K. Hensley, C. Vigo-Pelfrey, J. Carney, W. Annaert, B. De Strooper, M. Bentahir, O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horre, J. Wiltfang, H. Esselmann, B. De Strooper, B. Calabrese, G. Shaked, I. Tabarean, J. Braga, E. Koo, S. Halpain, A. Chamberlain, C. MacPhee, J. Zurdo, L. Morozova-Roche, H. Hill, C. Dobson, J. Davis, Y. Chirgadze, N. Nevskaya, M. Citron, 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, J. Cleary, D. Walsh, J. Hofmeister, G. Shankar, M. Kuskowski, D. Selkoe, K. Ashe, B. De Strooper, B. De Strooper, K. Duff, C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, S. Younkin, D. Frost, P. Gorman, C. Yip, A. Chakrabartty, Y. Gong, L. Chang, K. Viola, P. Lacor, M. Lambert, C. Finch, G. Krafft, W. Klein, E. Goormaghtigh, V. Cabiliaux, J. Ruysschaert, C. Haass, D. Selkoe, J. Hardy, D. Selkoe, J. Harper, P. Lansbury, D. Hartley, D. Walsh, C. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. Vassilev, D. Teplow, D. Selkoe, R. Hepler, K. Grimm, D. Nahas, R. Breese, E. Dodson, P. Acton, P. Keller, M. Yeager, H. Wang, P. Shughrue, G. Kinney, J. Joyce, X. Hu, S. Crick, G. Bu, C. Frieden, R. Pappu, J. Lee, A. Jan, O. Gokce, R. Luthi-Carter, H. Lashuel, J. Jarrett, P. Lansbury, N. Kakuda, S. Funamoto, S. Yagishita, M. Takami, S. Osawa, N. Dohmae, Y. Ihara, R. Kayed, E. Head, J. Thompson, T. McIntire, S. Milton, C. Cotman, C. Glabe, J. Kim, L. Onstead, S. Randle, R. Price, L. Smithson, C. Zwizinski, D. Dickson, T. Golde, E. McGowan, I. Klyubin, V. Betts, A. Welzel, K. Blennow, H. Zetterberg, A. Wallin, C. Lemere, W. Cullen, Y. Peng, T. Wisniewski, D. Selkoe, R. Anwyl, D. Walsh, M. Rowan, P. Lacor, M. Buniel, P. Furlow, A. Clemente, P. Velasco, M. Wood, K. Viola, W. Klein, M. Lambert, A. Barlow, B. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. Finch, G. Krafft, W. Klein, H. Lashuel, D. Hartley, B. Petre, T. Walz, P. Lansbury, J. Lauren, D. Gimbel, H. Nygaard, J. Gilbert, S. Strittmatter, S. Lesne, M. Koh, L. Kotilinek, R. Kayed, C. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. Ashe, D. Mann, T. Iwatsubo, N. Cairns, P. Lantos, D. Nochlin, S. Sumi, T. Bird, P. Poorkaj, J. Hardy, M. Hutton, G. Prihar, R. Crook, M. Rossor, M. Haltia, I. Martins, I. Kuperstein, H. Wilkinson, E. Maes, M. Vanbrabant, W. Jonckheere, P. Van Gelder, D. Hartmann, R. D’Hooge, B. De Strooper, J. Schymkowitz, F. Rousseau, K. Ono, M. Condrón, D. Teplow, C. Pike, M. Overman, C. Cotman, J. Pine, S. Potter, T. DeMarse, J. Price, J. Morris, Y. Qi-Takahara, M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirokuni, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T. Saido, R. Wang, Y. Ihara, E. Reiman, K. Chen, X. Liu, D. Bandy, M. Yu, W. Lee, N. Ayutyanont, J. Keppler, S. Reeder, J. Langbaum, G. Alexander, W. Klunk, C. Mathis, J. Price, H. Aizenstein, S. DeKosky, R. Caselli, T. Saido, W. Yamao-Harigaya, T. Iwatsubo, S. Kawashima, T. Sato, N. Dohmae, Y. Qi, N. Kakuda, H. Misonou, R. Mitsumori, H. Maruyama, E. Koo, C. Haass, K. Takio, M. Morishima-Kawashima, S. Ishiura, Y. Ihara, D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. 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, S. Schilling, U. Zeitschel, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Francke, A. Kehlen, M. Holzer, B. Hutter-Paier, M. Prokesh, M. Windisch, W. Jagla, D. Schlenzig, C. Lindner, T. Rudolph, G. Reuter, H. Cynis, D. Montag, H. Demuth, S. Rossner, G. Shankar, S. Li, T. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. Shepardson, I. Smith, F. Brett, M. Farrell, M. Rowan, C. Lemere, C. Regan, D. Walsh, B. Sabatini, D. Selkoe, S. Snyder, U. Lador, W. Wade, G. Wang, L. Barrett, E. Matayoshi, H. Huffaker, G. Krafft, T. Holzman, A. Stett, U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch, H. Haemmerle, N. Suzuki, T. Cheung, X. Cai, A. Odaka, L. Otvos, C. Eckman, T. Golde, S. Younkin, R. Terry, E. Masliah, D. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L. Hansen, R. Katzman, D. Tew, S. Bottomley, D. Smith, G.

- Ciccotosto, J. Babon, M. Hinds, C. Masters, R. Cappai, K. Barnham, D. Walsh, I. Klyubin, J. Fadeeva, W. Cullen, R. Anwyl, M. Wolfe, M. Rowan, D. Selkoe, R. Wang, B. Wang, W. He, H. Zheng, M. Wogulis, S. Wright, D. Cunningham, T. Chilcote, K. Powell, R. Rydel, Y. Yan, C. Wang, Y. Yoshiike, D. Chui, T. Akagi, N. Tanaka, and A. Takashima, "Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio," *EMBO J.*, vol. 29, no. 19, pp. 3408–3420, Oct. 2010.
- [95] L. O. Tjernberg, D. J. E. Callaway, A. Tjernberg, S. Hahne, C. Lilliehook, L. Terenius, J. Thyberg, and C. Nordstedt, "A Molecular Model of Alzheimer Amyloid {beta}-Peptide Fibril Formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 18, pp. 12619–12625, Apr. 1999.
- [96] K. Ono, R. Takahashi, T. Ikeda, M. Mizuguchi, T. Hamaguchi, and M. Yamada, "Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, no. 4, pp. 646–53, Apr. 2014.
- [97] M. Garvey, K. Tepper, C. Haupt, U. Knüpfer, K. Klement, J. Meinhardt, U. Horn, J. Balbach, and M. Fändrich, "Phosphate and HEPES buffers potently affect the fibrillation and oligomerization mechanism of Alzheimer's A β peptide," 2011.
- [98] Y. Bin, X. Li, Y. He, S. Chen, and J. Xiang, "Amyloid- β peptide (1-42) aggregation induced by copper ions under acidic conditions.," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 45, no. 7, pp. 570–7, Jul. 2013.
- [99] B. Liu, A. Moloney, S. Meehan, K. Morris, S. E. Thomas, L. C. Serpell, R. Hider, S. J. Marciniak, D. A. Lomas, and D. C. Crowther, "Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4248–56, Feb. 2011.
- [100] G. Merlini and V. Bellotti, "Molecular mechanisms of amyloidosis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 6, pp. 583–96, Aug. 2003.
- [101] M. Fändrich, M. Schmidt, and N. Grigorieff, "Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 6, pp. 338–345, 2011.
- [102] C. Sachse, C. Xu, K. Wieligmann, S. Diekmann, N. Grigorieff, and M. Fändrich, "Quaternary structure of a mature amyloid fibril from Alzheimer's A β (1-40) peptide.," *J. Mol. Biol.*, vol. 362, no. 2, pp. 347–54, Sep. 2006.
- [103] H. LeVine, "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution.," *Protein Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 404–10, Mar. 1993.
- [104] L. C. Serpell and J. M. Smith, "Direct visualisation of the beta-sheet structure of synthetic Alzheimer's amyloid.," *J. Mol. Biol.*, vol. 299, no. 1, pp. 225–31, May 2000.
- [105] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. Ø. Madsen, C. Riek, R. Grothe, and D. Eisenberg, "Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils.," *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 773–778, Jun. 2005.
- [106] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, and R. Riek, "3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 48, pp. 17342–7, Nov. 2005.
- [107] J.-X. Lu, W. Qiang, W.-M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, and R. Tycko, "Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue.," *Cell*, vol. 154, no. 6, pp. 1257–68, Sep. 2013.
- [108] J. Q. Trojanowski, M. L. Schmidt, L. Otvos, R. C. Gur, R. E. Gur, H. Hurtig, and V. M. Lee, "Selective expression of epitopes in multiphosphorylation repeats of the high and middle molecular weight neurofilament proteins in Alzheimer neurofibrillary tangles.," *Ann. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 113–6, Jan. 1989.
- [109] T. Ikura and N. Ito, "Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents

- tau peptide from aggregating.," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 26, no. 9, pp. 539–46, Sep. 2013.
- [110] M. Gerard, Z. Debyser, L. Desender, P. J. Kahle, J. Baert, V. Baekelandt, and Y. Engelborghs, "The aggregation of alpha-synuclein is stimulated by FK506 binding proteins as shown by fluorescence correlation spectroscopy.," *FASEB J.*, vol. 20, no. 3, pp. 524–6, Mar. 2006.
- [111] L. J. Blair, B. A. Nordhues, S. E. Hill, K. M. Scaglione, J. C. O'Leary, S. N. Fontaine, L. Breydo, B. Zhang, P. Li, L. Wang, C. Cotman, H. L. Paulson, M. Muschol, V. N. Uversky, T. Klengel, E. B. Binder, R. Kaye, T. E. Golde, N. Berchtold, and C. A. Dickey, "Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau.," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4158–69, Oct. 2013.
- [112] P. J. Lu, G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies, and K. P. Lu, "The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein.," *Nature*, vol. 399, no. 6738, pp. 784–8, Jun. 1999.
- [113] A. Ryo, T. Togo, T. Nakai, A. Hirai, M. Nishi, A. Yamaguchi, K. Suzuki, Y. Hirayasu, H. Kobayashi, K. Perrem, Y.-C. Liou, and I. Aoki, "Prolyl-isomerase Pin1 accumulates in lewy bodies of parkinson disease and facilitates formation of alpha-synuclein inclusions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 7, pp. 4117–25, Feb. 2006.
- [114] K. R. Patterson, S. M. Ward, B. Combs, K. Voss, N. M. Kanaan, G. Morfini, S. T. Brady, T. C. Gamblin, and L. I. Binder, "Heat shock protein 70 prevents both tau aggregation and the inhibitory effects of preexisting tau aggregates on fast axonal transport.," *Biochemistry*, vol. 50, no. 47, pp. 10300–10, Nov. 2011.
- [115] W. Wang, I. Perovic, J. Chittuluru, A. Kaganovich, L. T. T. Nguyen, J. Liao, J. R. Auclair, D. Johnson, A. Landeru, A. K. Simorellis, S. Ju, M. R. Cookson, F. J. Asturias, J. N. Agar, B. N. Webb, C. Kang, D. Ringe, G. A. Petsko, T. C. Pochapsky, and Q. Q. Hoang, "A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 43, pp. 17797–802, Oct. 2011.
- [116] A. Deleersnijder, A.-S. Van Rompuy, L. Desender, H. Pottel, L. Buée, Z. Debyser, V. Baekelandt, and M. Gerard, "Comparative analysis of different peptidyl-prolyl isomerases reveals FK506-binding protein 12 as the most potent enhancer of alpha-synuclein aggregation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 30, pp. 26687–701, Jul. 2011.
- [117] M. Gerard, A. Deleersnijder, V. Daniëls, S. Schreurs, S. Munck, V. Reumers, H. Pottel, Y. Engelborghs, C. Van den Haute, J.-M. Taymans, Z. Debyser, and V. Baekelandt, "Inhibition of FK506 binding proteins reduces alpha-synuclein aggregation and Parkinson's disease-like pathology.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 7, pp. 2454–63, Feb. 2010.
- [118] S. F. Falsone, A. J. Kungl, A. Reik, R. Cappai, and K. Zangger, "The molecular chaperone Hsp90 modulates intermediate steps of amyloid assembly of the Parkinson-related protein alpha-synuclein.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 45, pp. 31190–9, Nov. 2009.
- [119] A. Smajlović, S. Berbić, C. Schiene-Fischer, M. Tušek-Žnidarič, A. Taler, S. Jenko-Kokalj, D. Turk, and E. Žerovnik, "Essential role of Pro 74 in stefin B amyloid-fibril formation: Dual action of cyclophilin A on the process," 2009.
- [120] C. G. Evans, S. Wisén, and J. E. Gestwicki, "Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 44, pp. 33182–91, Nov. 2006.
- [121] J. Magrané, R. C. Smith, K. Walsh, and H. W. Querfurth, "Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 7, pp. 1700–6, Feb. 2004.
- [122] N. V. Bobkova, D. G. Garbuz, I. Nesterova, N. Medvinskaya, A. Samokhin, I. Alexandrova, V. Yashin, V. Karpov, M. S. Kukharsky, N. N. Ninkina, A. A. Smirnov, E. Nudler, and M. Evgen'ev,

- “Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer’s disease.,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 38, no. 2, pp. 425–35, Jan. 2014.
- [123] S. Ansar, J. A. Burlison, M. K. Hadden, X. M. Yu, K. E. Desino, J. Bean, L. Neckers, K. L. Audus, M. L. Michaelis, and B. S. J. Blagg, “A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from A β -induced toxicity,” 2007.
- [124] H. Sugata, K. Matsuo, T. Nakagawa, M. Takahashi, H. Mukai, Y. Ono, K. Maeda, H. Akiyama, and T. Kawamata, “A peptidyl-prolyl isomerase, FKBP12, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 459, no. 2, pp. 96–9, Aug. 2009.
- [125] P. J. Muchowski, G. Schaffar, A. Sittler, E. E. Wanker, M. K. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl, “Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 14, pp. 7841–6, Jul. 2000.
- [126] S. Daturpalli, C. A. Waudby, S. Meehan, and S. E. Jackson, “Hsp90 inhibits α -synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 22, pp. 4614–28, Nov. 2013.
- [127] K. Takata, Y. Kitamura, D. Tsuchiya, T. Kawasaki, T. Taniguchi, and S. Shimohama, “Heat shock protein-90-induced microglial clearance of exogenous amyloid- β 1–42 in rat hippocampus in vivo,” 2003.
- [128] M. M. M. Wilhelmus, W. C. Boelens, I. Otte-Höller, B. Kamps, R. M. W. de Waal, and M. M. Verbeek, “Small heat shock proteins inhibit amyloid- β protein aggregation and cerebrovascular amyloid- β protein toxicity,” *Brain Res.*, vol. 1089, no. 1, pp. 67–78, May 2006.
- [129] M. M. M. Wilhelmus, I. Otte-Höller, P. Wesseling, R. M. W. de Waal, W. C. Boelens, and M. M. Verbeek, “Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer’s disease brains.,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 32, no. 2, pp. 119–30, Apr. 2006.
- [130] M. M. M. Wilhelmus, W. C. Boelens, I. Otte-Höller, B. Kamps, B. Kusters, M. L. C. Maat-Schieman, R. M. W. de Waal, and M. M. Verbeek, “Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer’s disease brains and its inhibition of amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta toxicity.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 111, no. 2, pp. 139–49, Feb. 2006.
- [131] R. X. Santos, S. C. Correia, X. Zhu, M. A. Smith, P. I. Moreira, R. J. Castellani, A. Nunomura, and G. Perry, “Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer’s disease.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 18, pp. 2444–57, Jun. 2013.
- [132] J. P. Sheehan, R. H. Swerdlow, S. W. Miller, R. E. Davis, J. K. Parks, W. D. Parker, and J. B. Tuttle, “Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer’s disease.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 12, pp. 4612–22, Jun. 1997.
- [133] I. Maurer, “A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients,” *Neurobiol. Aging*, vol. 21, no. 3, pp. 455–462, Jun. 2000.
- [134] D.-F. Dai, Y. A. Chiao, D. J. Marcinek, H. H. Szeto, and P. S. Rabinovitch, “Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan.,” *Longev. Heal.*, vol. 3, p. 6, Jan. 2014.
- [135] C. M. Pinho, P. F. Teixeira, and E. Glaser, “Mitochondrial import and degradation of amyloid- β peptide.,” *Biochim. Biophys. Acta*, Feb. 2014.
- [136] C. Schmidt, E. Lepsverdze, S. L. Chi, A. M. Das, S. V Pizzo, A. Dityatev, and M. Schachner, “Amyloid precursor protein and amyloid β -peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells,” *Mol. Psychiatry*, vol. 13, no. 10, pp. 953–969, Oct. 2008.
- [137] M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson, B. S. Park, J. Quinn, and P. H. Reddy, “Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer’s disease neurons: implications for free

- radical generation and oxidative damage in disease progression.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 9, pp. 1437–49, May 2006.
- [138] M. T. Lin and M. F. Beal, "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 787–95, Oct. 2006.
- [139] M. T. Lin and M. F. Beal, "Alzheimer's APP mangles mitochondria.," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 11, pp. 1241–3, Nov. 2006.
- [140] U. Keil, A. Bonert, C. A. Marques, I. Scherping, J. Weyermann, J. B. Strosznajder, F. Müller-Spahn, C. Haass, C. Czech, L. Pradier, W. E. Müller, and A. Eckert, "Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 48, pp. 50310–20, Nov. 2004.
- [141] K. Takuma, J. Yao, J. Huang, H. Xu, X. Chen, J. Luddy, A.-C. Trillat, D. M. Stern, O. Arancio, and S. S. Yan, "ABAD enhances A β -induced cell stress via mitochondrial dysfunction.," *FASEB J.*, vol. 19, no. 6, pp. 597–8, Apr. 2005.
- [142] S. Millecamps and J.-P. Julien, "Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 161–76, Mar. 2013.
- [143] L. Guo, H. Du, S. Yan, X. Wu, G. M. McKhann, J. X. Chen, and S. S. Yan, "Cyclophilin D deficiency rescues axonal mitochondrial transport in Alzheimer's neurons.," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e54914, Jan. 2013.
- [144] H. Du, L. Guo, X. Wu, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, J. X. Chen, and S. S. Yan, "Cyclophilin D deficiency rescues A β -impaired PKA/CREB signaling and alleviates synaptic degeneration.," *Biochim. Biophys. Acta*, Mar. 2013.
- [145] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–5, Aug. 1970.
- [146] G. Fischer, H. Bang, and C. Mech, "[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides].," *Biomed. Biochim. Acta*, vol. 43, no. 10, pp. 1101–11, Jan. 1984.
- [147] J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, E. Colon-Bonilla, and D. H. Rich, "Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay," *Biochemistry*, vol. 30, no. 25, pp. 6127–6134, Jun. 1991.
- [148] B. Janowski, S. Wöllner, M. Schutkowski, and G. Fischer, "A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates.," *Anal. Biochem.*, vol. 252, no. 2, pp. 299–307, Oct. 1997.
- [149] C. Garcia-Echeverria, J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, and D. H. Rich, "Continuous fluorimetric direct (uncoupled) assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 7, pp. 2758–2759, Mar. 1992.
- [150] R. Frank, "Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support," *Tetrahedron*, vol. 48, no. 42, pp. 9217–9232, Jan. 1992.
- [151] S. C. Gill and P. H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.," *Anal. Biochem.*, vol. 182, no. 2, pp. 319–26, Nov. 1989.
- [152] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, "NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes," *J. Biomol. NMR*, vol. 6, no. 3, Nov. 1995.
- [153] A. Schedlbauer, B. Hoffmann, G. Kontaxis, S. Rüdiger, U. Hommel, and R. Konrat, "Automated backbone and side-chain assignment of mitochondrial matrix cyclophilin D," *J. Biomol. NMR*, vol. 38, no. 3, pp. 267–267, May 2007.
- [154] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax, "Three-dimensional triple-resonance NMR

- spectroscopy of isotopically enriched proteins," *J. Magn. Reson.*, vol. 89, no. 3, pp. 496–514, Oct. 1990.
- [155] G. M. Clore and A. M. Gronenborn, "NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20 kDa," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 564–570, Jan. 1998.
- [156] M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn, and K. Wüthrich, "TROSY-type Triple-Resonance Experiments for Sequential NMR Assignments of Large Proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 4, pp. 844–848, Feb. 1999.
- [157] J. Weigelt, "Single Scan, Sensitivity- and Gradient-Enhanced TROSY for Multidimensional NMR Experiments," *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 10778-10779, 1998. [Online]. Available: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja982649y>. [Accessed: 14-Apr-2014].
- [158] G. Gemmecker, W. Jahnke, and H. Kessler, "Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, no. 24, pp. 11620–11621, Dec. 1993.
- [159] S. Koide, W. Jahnke, and P. Wright, "Measurement of intrinsic exchange rates of amide protons in a ¹⁵N-labeled peptide," *J. Biomol. NMR*, vol. 6, no. 3, Nov. 1995.
- [160] S. Mori, C. Abeygunawardana, J. M. Berg, and P. C. M. van Zijl, "NMR Study of Rapidly Exchanging Backbone Amide Protons in Staphylococcal Nuclease and the Correlation with Structural and Dynamic Properties," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 29, pp. 6844–6852, Jul. 1997.
- [161] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst, "Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy," *J. Chem. Phys.*, vol. 71, no. 11, p. 4546, 1979.
- [162] D. A. Fancy and T. Kodadek, "Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 11, pp. 6020–6024, May 1999.
- [163] G. Bitan, A. Lomakin, and D. B. Teplow, "Amyloid β -Protein Oligomerization: PRENUCLEATION INTERACTIONS REVEALED BY PHOTO-INDUCED CROSS-LINKING OF UNMODIFIED PROTEINS," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 37, pp. 35176–35184, Sep. 2001.
- [164] M. Herzog, "Charakterisierung der humanen prototypischen Cyclophiline COAS2 und Cyp18.2a. D," Charakterisierung der huMartin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010.
- [165] J. Fanghänel and G. Fischer, "Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases," *Front. Biosci. a J. ...*, pp. 3453–3478, 2004.
- [166] J. Fanghänel, "Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen," *Dissertation*, 2005. [Online]. Available: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H185/prom.pdf>. [Accessed: 29-Dec-2014].
- [167] J. Fanghänel and G. Fischer, "Thermodynamic characterization of the interaction of human cyclophilin 18 with cyclosporin A," *Biophys. Chem.*, vol. 100, no. 1, pp. 351–366, 2003.
- [168] S. Daum, M. Schumann, S. Mathea, T. Aumüller, M. A. Balsley, S. L. Constant, B. F. de Lacroix, F. Kruska, M. Braun, and C. Schiene-Fischer, "Isoform-specific inhibition of cyclophilins," *Biochemistry*, vol. 48, no. 26, pp. 6268–77, Jul. 2009.
- [169] C. Louis-Jeune, M. A. Andrade-Navarro, and C. Perez-Iratxeta, "Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra," *Proteins*, Sep. 2011.
- [170] C. Perez-Iratxeta and M. A. Andrade-Navarro, "K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra," *BMC Struct. Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 25, Jan. 2008.
- [171] S. M. Usmani, O. Zirafi, J. A. Müller, N. L. Sandi-Monroy, J. K. Yadav, C. Meier, T. Weil, N. R. Roan, W. C. Greene, P. Walther, K. P. R. Nilsson, P. Hammarström, R. Wetzel, C. D. Pilcher, F.

- Gagsteiger, M. Fändrich, F. Kirchhoff, and J. Münch, "Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen," *Nat Commun*, vol. 5, Apr. 2014.
- [172] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, and K. Beyreuther, "Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease β A4 peptides," *J. Mol. Biol.*, vol. 228, no. 2, pp. 460–473, Nov. 1992.
- [173] A. P. Pawar, K. F. Dubay, J. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo, and C. M. Dobson, "Prediction of 'aggregation-prone' and 'aggregation-susceptible' regions in proteins associated with neurodegenerative diseases.," *J. Mol. Biol.*, vol. 350, no. 2, pp. 379–92, Jul. 2005.
- [174] J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, and R. Tycko, "Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR.," *Biochemistry*, vol. 39, no. 45, pp. 13748–59, Dec. 2000.
- [175] G. Wagner and K. Wüthrich, "Structural interpretation of the amide proton exchange in the basic pancreatic trypsin inhibitor and related proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 134, no. 1, pp. 75–94, Oct. 1979.
- [176] V. Mikol, J. Kallen, and M. D. Walkinshaw, "X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 11, pp. 5183–6, May 1994.
- [177] M. Möller and A. Denicola, "Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 30, no. 3, pp. 175–178, May 2002.
- [178] J. T. Vivian and P. R. Callis, "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins.," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 5, pp. 2093–109, May 2001.
- [179] H. Sudo, Y. Hashimoto, T. Niikura, Z. Shao, T. Yasukawa, Y. Ito, M. Yamada, M. Hata, T. Hiraki, M. Kawasumi, K. Kouyama, and I. Nishimoto, "Secreted Abeta does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 282, no. 2, pp. 548–56, Mar. 2001.
- [180] K. Ditaranto, T. L. Tekirian, and A. J. Yang, "Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 8, no. 1, pp. 19–31, Feb. 2001.
- [181] Y. Zhang, R. McLaughlin, C. Goodyer, and A. LeBlanc, "Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons.," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 3, pp. 519–29, Feb. 2002.
- [182] W. Garzon-Rodriguez, M. Sepulveda-Becerra, S. Milton, and C. G. Glabe, "Soluble Amyloid A - (1-40) Exists as a Stable Dimer at Low Concentrations," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 34, pp. 21037–21044, Aug. 1997.
- [183] D. A. Bosco, E. Z. Eisenmesser, S. Pochapsky, W. I. Sundquist, and D. Kern, "Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 8, pp. 5247–52, Apr. 2002.
- [184] T. L. Davis, J. R. Walker, V. Campagna-Slater, P. J. Finerty, R. Paramanathan, G. Bernstein, F. MacKenzie, W. Tempel, H. Ouyang, W. H. Lee, E. Z. Eisenmesser, and S. Dhe-Paganon, "Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases," *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 7, p. e1000439, Jul. 2010.
- [185] Y.-H. Shi, D.-H. Lin, J.-Y. Huang, and X. Shen, "Study of Structural Stability of Cyclophilin A by NMR and Circular Dichroism Spectra," *Chinese J. Chem.*, vol. 24, no. 7, pp. 973–979, Jul. 2006.
- [186] M. Heinig and D. Frishman, "STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. Web Server issue, pp. W500-2, Jul. 2004.

- [187] M. G. Di Carlo, V. Minicozzi, V. Foderà, V. Militello, V. Vetri, S. Morante, and M. Leone, "Thioflavin T templates amyloid $\beta(1-40)$ conformation and aggregation pathway.," *Biophys. Chem.*, vol. 206, pp. 1–11, Nov. 2015.
- [188] M. D'Amico, M. G. Di Carlo, M. Groenning, V. Militello, V. Vetri, and M. Leone, "Thioflavin T Promotes A $\beta(1-40)$ Amyloid Fibrils Formation.," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 12, pp. 1596–601, Jun. 2012.
- [189] G. Pflügl, J. Kallen, T. Schirmer, J. N. Jansonius, M. G. Zurini, and M. D. Walkinshaw, "X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex.," *Nature*, vol. 361, no. 6407, pp. 91–4, Jan. 1993.
- [190] P. Neri, G. Gemmecker, L. D. Zydowsky, C. T. Walsh, and S. W. Fesik, "NMR studies of [U-13C]cyclosporin A bound to human cyclophilin B," *FEBS Lett.*, vol. 290, no. 1–2, pp. 195–199, Sep. 1991.
- [191] U. Reimer, G. Scherer, M. Drewello, S. Kruber, M. Schutkowski, and G. Fischer, "Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation.," *J. Mol. Biol.*, vol. 279, no. 2, pp. 449–60, Jun. 1998.
- [192] G. Pappenberger, H. Aygün, J. W. Engels, U. Reimer, G. Fischer, and T. Kiefhaber, "Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 452–8, May 2001.
- [193] C. Scholz, G. Scherer, L. M. Mayr, T. Schindler, G. Fischer, and F. X. Schmid, "Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds.," *Biol. Chem.*, vol. 379, no. 3, pp. 361–5, Mar. 1998.
- [194] V. Leone, G. Lattanzi, C. Molteni, and P. Carloni, "Mechanism of action of cyclophilin a explored by metadynamics simulations.," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 3, p. e1000309, Mar. 2009.
- [195] J. E. Kim and M. Lee, "Fullerene inhibits β -amyloid peptide aggregation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 303, no. 2, pp. 576–579, Apr. 2003.
- [196] D. R. HOWLETT, A. E. PERRY, F. GODFREY, J. E. SWATTON, K. H. JENNINGS, C. SPITZFADEN, H. WADSWORTH, S. J. WOOD, and R. E. MARKWELL, "Inhibition of fibril formation in β -amyloid peptide by a novel series of benzofurans," *Biochem. J.*, vol. 340, no. 1, pp. 283–289, May 1999.
- [197] Y. C. Kudva, H. J. Hiddinga, P. C. Butler, C. S. Mueske, and N. L. Eberhardt, "Small heat shock proteins inhibit in vitro A β 1-42 amyloidogenesis," *FEBS Lett.*, vol. 416, no. 1, pp. 117–121, Oct. 1997.
- [198] B. Raman, T. Ban, M. Sakai, S. Y. Pasta, T. Ramakrishna, H. Naiki, Y. Goto, and C. M. Rao, "AlphaB-crystallin, a small heat-shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid beta-peptide and beta2-microglobulin.," *Biochem. J.*, vol. 392, no. Pt 3, pp. 573–81, Dec. 2005.
- [199] H. Willander, J. Presto, G. Askarieh, H. Biverstål, B. Frohm, S. D. Knight, J. Johansson, and S. Linse, "BRICHOS domains efficiently delay fibrillation of amyloid β -peptide.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 37, pp. 31608–17, Oct. 2012.
- [200] J. M. Barral, S. a Broadley, G. Schaffar, and F. U. Hartl, "Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 17–29, Feb. 2004.
- [201] A. L. Schwarzman, L. Gregori, M. P. Vitek, S. Lyubski, W. J. Strittmatter, J. J. Enghilde, R. Bhasin, J. Silverman, K. H. Weisgraber, and P. K. Coyle, "Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 18, pp. 8368–8372, Aug. 1994.
- [202] J. Luo, S. K. T. S. Wärmländer, A. Gräslund, and J. P. Abrahams, "Non-chaperone proteins can

- inhibit aggregation and cytotoxicity of Alzheimer amyloid β peptide.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 40, pp. 27766–75, Oct. 2014.
- [203] T. Oda, P. Wals, H. H. Osterburg, S. A. Johnson, G. M. Pasinetti, T. E. Morgan, I. Rozovsky, W. B. Stine, S. W. Snyder, and T. F. Holzman, "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress.," *Exp. Neurol.*, vol. 136, no. 1, pp. 22–31, Nov. 1995.
- [204] L. Liu and R. M. Murphy, "Kinetics of inhibition of beta-amyloid aggregation by transthyretin.," *Biochemistry*, vol. 45, no. 51, pp. 15702–9, Dec. 2006.
- [205] J. N. Buxbaum, Z. Ye, N. Reixach, L. Friske, C. Levy, P. Das, T. Golde, E. Masliah, A. R. Roberts, and T. Bartfai, "Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of A β toxicity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 7, pp. 2681–6, Mar. 2008.
- [206] H. Du, L. Guo, W. Zhang, M. Rydzewska, and S. Yan, "Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model.," *Neurobiol. Aging*, vol. 32, no. 3, pp. 398–406, Mar. 2011.
- [207] C. L. Shen and R. M. Murphy, "Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide.," *Biophys. J.*, vol. 69, no. 2, pp. 640–51, Aug. 1995.
- [208] S. W. Snyder, U. S. Lador, W. S. Wade, G. T. Wang, L. W. Barrett, E. D. Matayoshi, H. J. Huffaker, G. A. Krafft, and T. F. Holzman, "Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths.," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 1216–28, Sep. 1994.
- [209] M. Villmow, M. Baumann, M. Malesevic, R. Sachs, G. Hause, M. Fändrich, J. Balbach, and C. Schiene-Fischer, "Inhibition of A β (1-40) Fibril Formation by Cyclophilins.," *Biochem. J.*, Mar. 2016.
- [210] L. Schrödinger, "The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.3r1," 2010.
- [211] Y. Zhao, Y. Chen, M. Schutkowski, G. Fischer, and H. Ke, "Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity.," *Structure*, vol. 5, no. 1, pp. 139–46, Jan. 1997.
- [212] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius, and C. Nordstedt, "Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 15, pp. 8545–8548, Apr. 1996.
- [213] K. Watanabe, T. Segawa, K. Nakamura, M. Kodaka, H. Okuno, and T. Konakahara, "Identification of the molecular interaction site of amyloid beta peptide by using a fluorescence assay," *J. Pept. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 342–346, Oct. 2001.
- [214] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, and R. M. Murphy, "Structure–Function Relationships for Inhibitors of β -Amyloid Toxicity Containing the Recognition Sequence KLVFF \dagger ," *Biochemistry*, vol. 40, no. 26, pp. 7882–7889, Jul. 2001.
- [215] P. Kumaraswamy, S. Sethuraman, and U. M. Krishnan, "Mechanistic insights of curcumin interactions with the core-recognition motif of β -amyloid peptide.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 13, pp. 3278–85, Apr. 2013.
- [216] X. Li, X. Zhang, A. R. A. Ladiwala, D. Du, J. K. Yadav, P. M. Tessier, P. E. Wright, J. W. Kelly, and J. N. Buxbaum, "Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro.," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 50, pp. 19423–33, Dec. 2013.
- [217] L. E. Jørgensen, M. Ubbink, and E. Danielsen, "Amicyanin metal-site structure and interaction with MADH: PAC and NMR spectroscopy of Ag-, Cd-, and Cu-amicyanin.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 27–38, Jan. 2004.

- [218] D. Wildes and S. Marqusee, "Hydrogen exchange and ligand binding: ligand-dependent and ligand-independent protection in the Src SH3 domain.," *Protein Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 81–8, Jan. 2005.
- [219] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, and D. Kern, "Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis.," *Nature*, vol. 438, no. 7064, pp. 117–21, Nov. 2005.

9 Anhang

9.1 Ergänzung zu 4.3.1

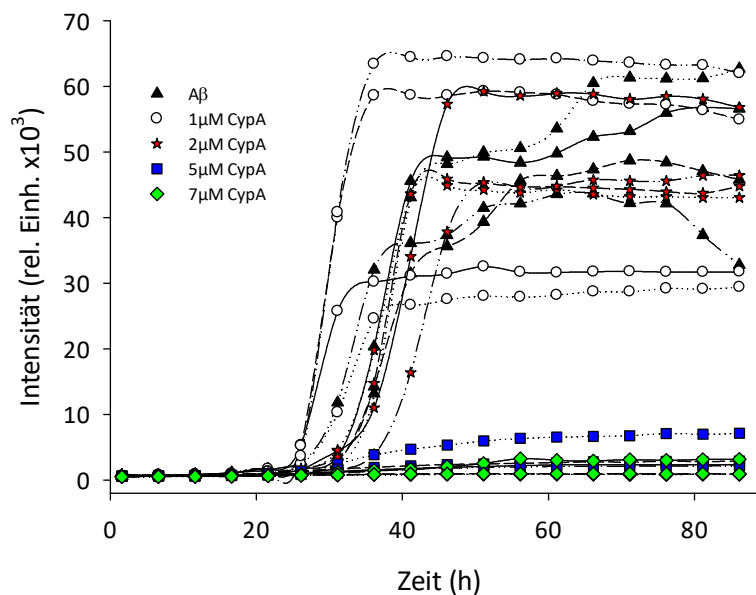


Abbildung 40 Einfluss von CypA auf die fibrilläre Aggregation von humanem A β (1-40). Abgebildet sind Wachstumskurven bzw. Kinetiken von entstehenden fibrillären Aggregaten. Ein Graph repräsentiert das Mittel von 4 Messungen. Der Reaktionsansatz erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT und 50 μ M monomerem A β (1-40) bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden jeweils alle 30 min für je 10 s doppelorbital bei 100 U/min geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm.

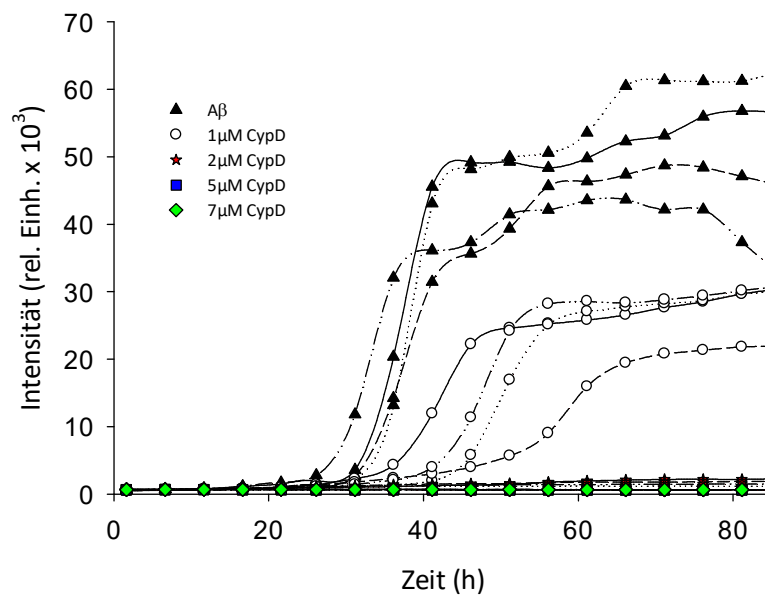


Abbildung 41 Einfluss von CypD auf die fibrilläre Aggregation von humanem A β (1-40). Abgebildet sind Wachstumskurven bzw. Kinetiken von entstehenden fibrillären Aggregaten. Der Reaktionsansatz erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1% DMSO, 20 μ M ThT und 50 μ M monomerem A β (1-40) bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden jeweils alle 30 min für je 10 s doppelorbital bei 100 U/min geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm.

9.2 Ergänzung zu 4.3.2

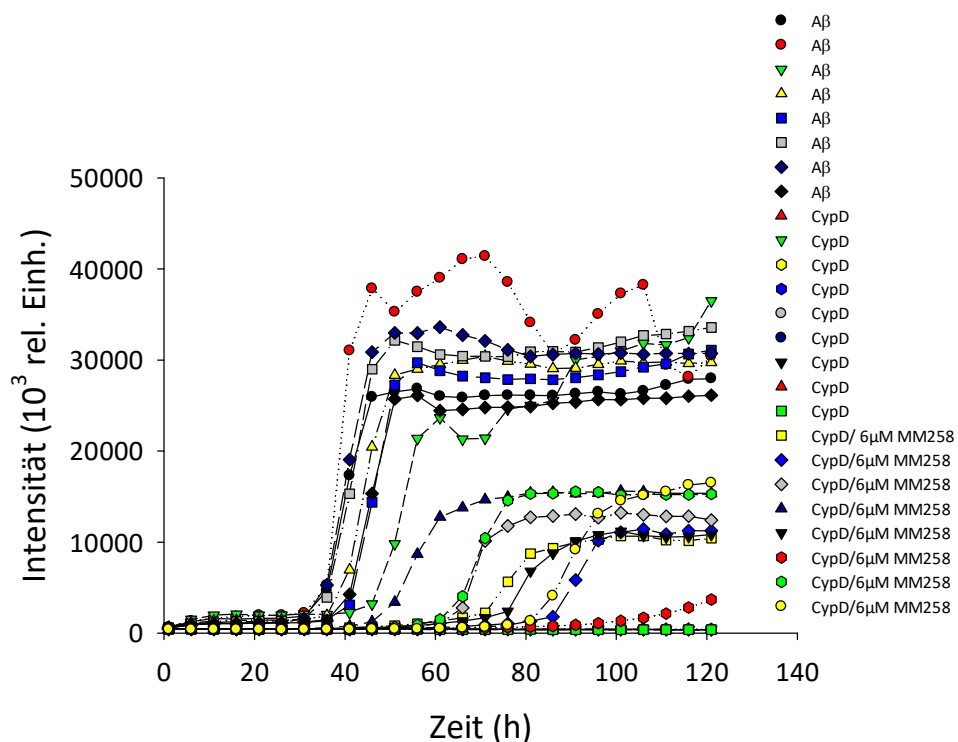


Abbildung 42 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von Aβ(1-40) konzentrationsabhängig wieder her. Die *Lag*-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen kürzer. Die Signalamplitude wurde auch mit zunehmender Konzentration höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μM ThT, 50 μM Aβ(1-40) und 3 μM CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{Ex}=450$ nm und $\lambda_{Em}=482$ nm.

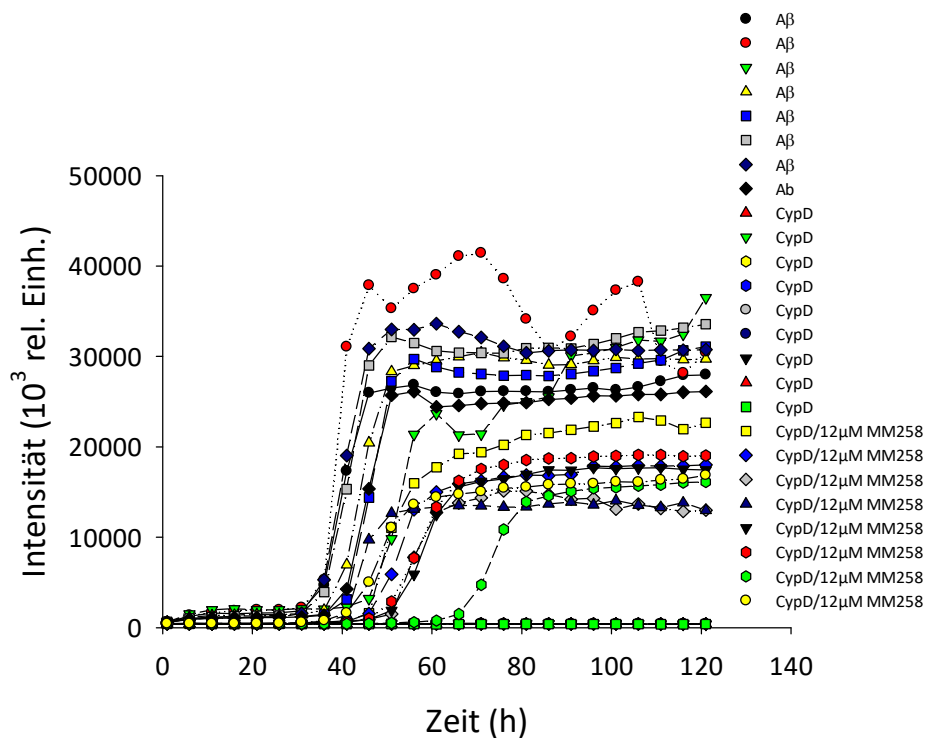


Abbildung 43 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von A β (1-40) konzentrationsabhängig wieder her. Die *Lag*-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen kürzer. Die Signalamplitude wurde auch mit zunehmender Konzentration höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40) und 3 μ M CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit λ_{Ex} =450 nm und λ_{Em} =482 nm.

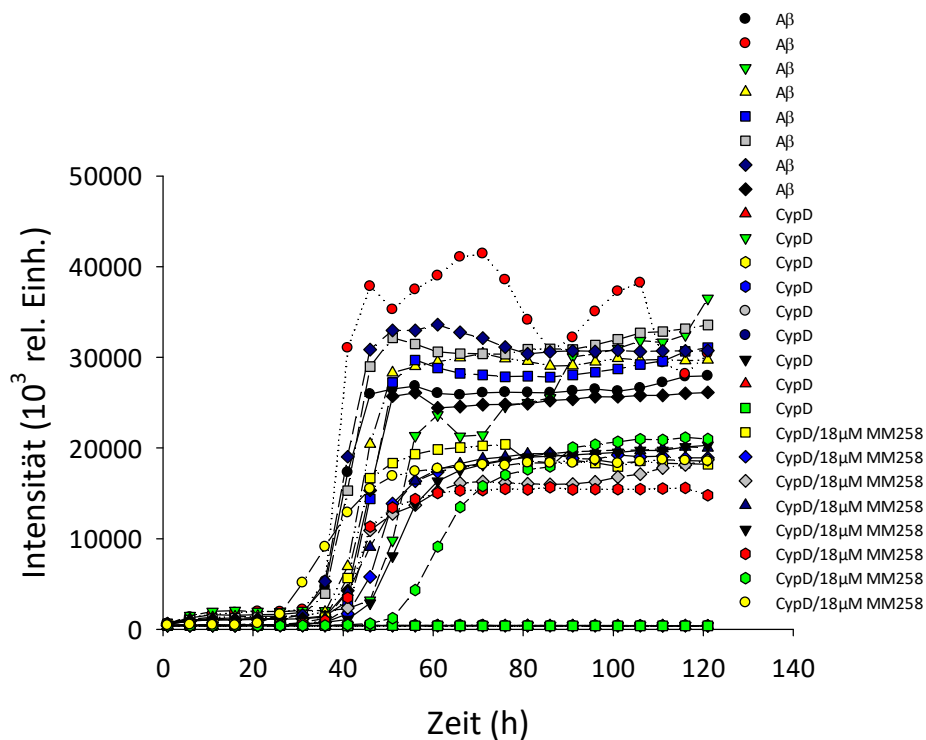


Abbildung 44 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von Aβ(1-40) konzentrationsabhängig wieder her. Die *Lag*-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen kürzer. Die Signalamplitude wurde auch mit zunehmender Konzentration höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 µM ThT, 50 µM Aβ(1-40) und 3 µM CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{\text{ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{em}}=482$ nm.

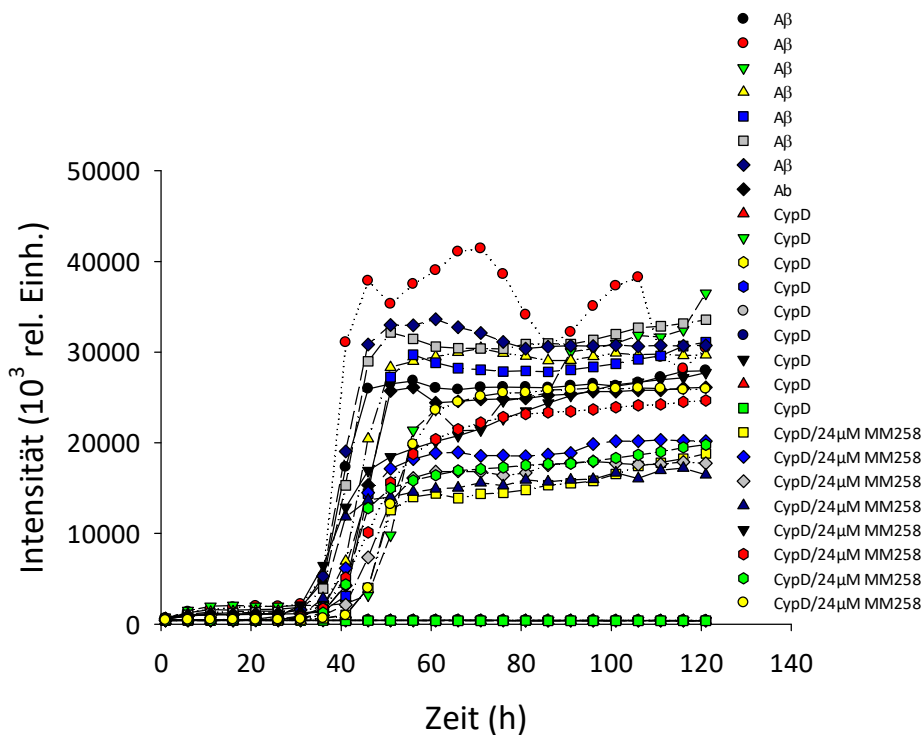


Abbildung 45 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von Aβ(1-40) konzentrationsabhängig wieder her. Die *Lag*-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen kürzer. Die Signalamplitude wurde auch mit zunehmender Konzentration höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μM ThT, 50 μM Aβ(1-40) und 3 μM CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm.

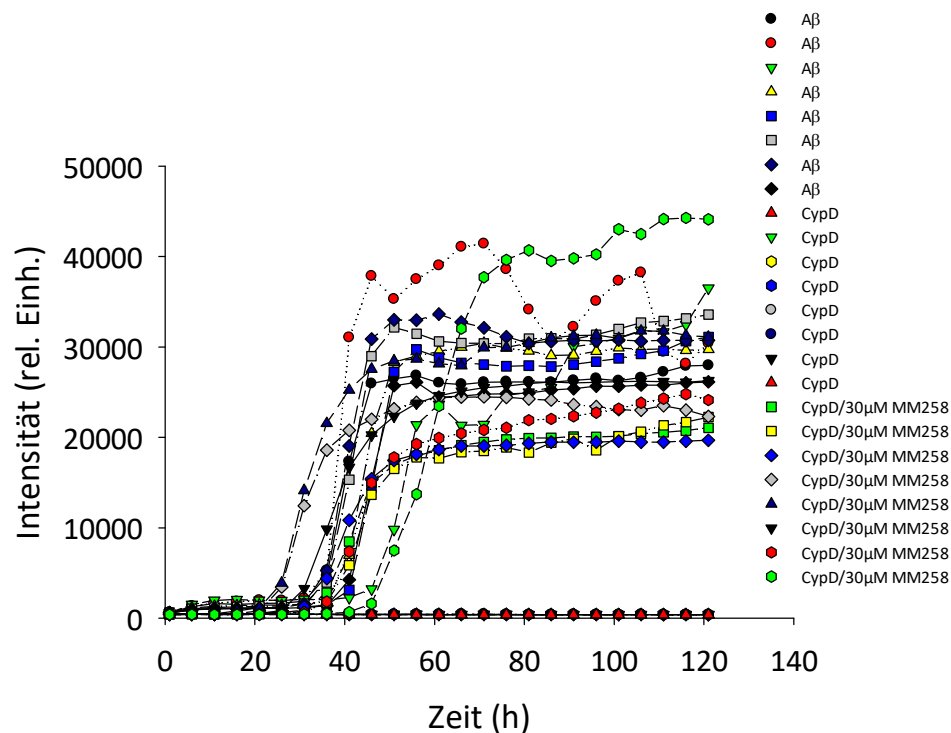


Abbildung 46 MM258 stellt die durch CypD inhibierte fibrilläre Aggregation von Aβ(1-40) konzentrationsabhängig wieder her. Die *Lag*-Zeit der fibrillären Aggregation wurde mit steigenden Konzentrationen kürzer. Die Signalamplitude wurde auch mit zunehmender Konzentration höher. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μM ThT, 50 μM Aβ(1-40) und 3 μM CypD bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit $\lambda_{\text{Ex}}=450$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=482$ nm.

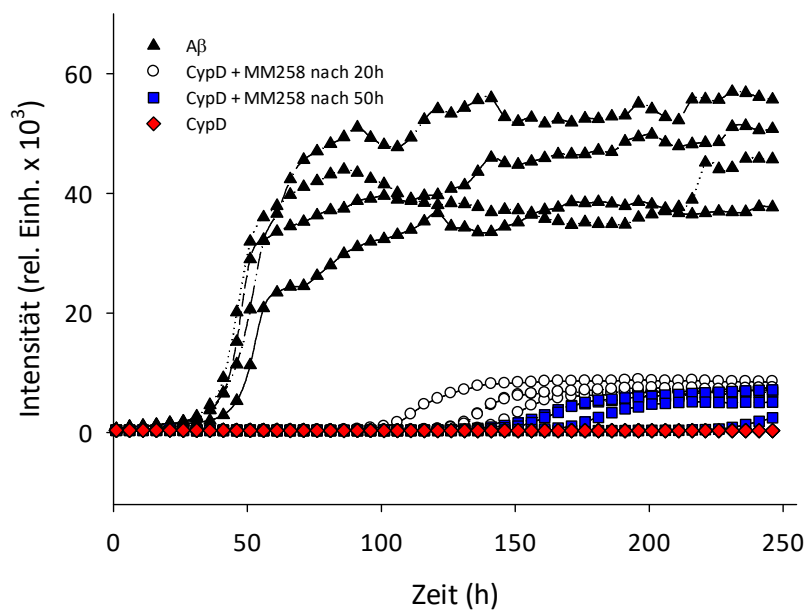


Abbildung 47 Die zeitverzögerte Gabe von MM258 zu einem Reaktionsansatz von A β (1-40) mit CypD ermöglichte die fibrilläre Aggregation. Die Reaktionskurve verläuft wie die Kontrollreaktion, bei der MM258 bereits zu Reaktionsbeginn in den Ansatz gegeben wurde. Ein Akkumulieren von aggregationsfördernden A β -Spezies unter Anwesenheit von CypD scheint nicht stattzufinden. Jede Aggregationsreaktion erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 50 μ M A β (1-40), 3 μ M CypD und 12 μ M MM258 bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden alle 30 min für 10 s doppelorbital geschüttelt. Die Messungen erfolgten an einem Multimode Microplate Reader BMG *FluoStar* mit λ_{Ex} =450 nm und λ_{Em} =482 nm.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| Name | Marten Villmow |
| Familienstand | ledig |
| Anschrift | Kranichweg 22 50829 Köln |
| Geburtstag/-ort | 27.08.1981, Lübben |

Beruflicher Werdegang

| | |
|-------------------|---|
| 03/2016-heute | Key Account Manager Infectious Diseases für Deutschland und Österreich Firma: Alere GmbH; Am Wassermann 28, 50829 Köln |
| 11/2014-02/2016 | Produktspezialist Mikrobiologie/Infektionsdiagnostik Firma: Alere GmbH, Am Wassermann 28, 50829 Köln |
| 07/2014-10/2014 | Produktmanager Kardiologie Firma: Alere GmbH, Am Wassermann 28, 50829 Köln |
| 06/2009 – 05/2014 | Doktorand Arbeitsgruppe: „Hitzeschockproteine als enzymatische Faltungskatalysatoren“, Dr. <i>rer.nat.</i> Cordelia Schiene-Fischer, Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle (Saale) Dissertation: „Einfluss der humanen Cyclophiline A und D auf die fibrilläre Aggregation von humanem Amyloid $\beta(1-40)$ “ |
| 06/2008 – 05/2009 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter Arbeitsgruppe: „Elektrophysiologie“, Juniorprofessor Dr. <i>rer.nat.</i> Uwe Rückschloß, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |

Studium

| | |
|-------------------|---|
| 10/2002 – 05/2008 | Studium der Biologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Zoologie, Immunologie, Humanphysiologie und Biotechnologie Abschluss: Diplom; Note: „Sehr gut“ (1,4) Diplomarbeit: „Bedeutung der neuronalen NO-Synthase (NOS1) für die kardiomyozytäre Dysfunktion im Alter“ (Note: 1,3) |
|-------------------|---|

Schulbildung/Wehrdienst

07/2000 – 05/2002 Wehrdienst im Transportbataillon 10, Ellwangen/Jagst (Hauptgefreiter)
 09/1988 – 06/2000 Schulbesuch mit Abschluss: Abitur am Friedrich-Schiller-Gymnasium in Eisenberg (Note: 2,4)

Publikationen

Villmow M, Baumann M, Malesevic M, Sachs R, Hause G, Fändrich M, Balbach J, Schiene-Fischer C.
 „Inhibition of A β (1-40) Fibril Formation by Cyclophilins.“
Biochem J. 2016 Mar;

Villmow M, Klöckner U, Heymes C, Gekle M, Rueckschloss U.(2015)
 „NOS1 induces NADPH oxidases and impairs contraction kinetics in aged murine ventricular myocytes.“
Basic Res Cardiol. 2015 Sep;110(5):506.

Rueckschloss U., **Villmow M.**, Klöckner U., (2010),
 “NADPH oxidase-derived superoxide impairs calcium transients and contraction in aged murine ventricular myocytes.”
ExpGerontol.;45(10):788-96.

Poster/Präsentationen

2013 *Stress and Ageing: From Molecular Biology to Clinical Perspectives*, Halle
 2011 *Prevention and Intervention: From Molecular Biology to Clinical Perspectives*, Halle
 2011 Symposium des DFG Graduiertenkolleg 1026, Halle
 2010 Konferenz des Biowissenschaftlichen Netzwerks „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“, Halle
 2009 Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen
 2008 Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln

Köln, den 14.11.2016

Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Datum / Date

14.11.2016

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant