

Proteincharakterisierung

Wie kleine Amyloid- β -Peptide zum großen Problem im Gehirn werden können

RENÉ ZANGL, NINA MORGNER
INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄT
FRANKFURT A. M.

The formation of amyloid- β oligomers plays a key role in the onset of Alzheimer's disease. We investigated the aggregation of amyloid- β oligomers by mass spectrometry and ion mobility spectrometry, revealing those structural properties, which lead to the formation of mature fibrils. We can show that the arrangement of the first oligomers is crucial for the topology of the resulting species, leading to the formation of non-toxic aggregates or fibrils.

DOI: 10.1007/s12268-021-1678-1
© Die Autorinnen und Autoren 2021

■ Aufgrund der steigenden Lebenserwartung stellen Demenzerkrankungen wie Alzheimer ein immer größer werdendes Problem unserer Gesellschaft dar. Gleichzeitig stehen für deren Behandlung keine Therapiemethoden zur Verfügung. Bei Patienten und Patientinnen mit Alzheimer wird ein Rückgang der Hirnmasse beobachtet, der auf das Absterben von Neuronen zurückzuführen ist [1]. Neben der Neurodegeneration wird das Auftreten von Proteinplaques im Gehirn beobachtet, die aus dem Amyloid- β -Protein aufgebaut sind. Diese Plaques galten lange als Auslöser der Erkrankung. Inzwischen geht man davon aus, dass es sich hierbei um ein Nebenprodukt handelt, während die kleineren, aus 42 Aminosäuren (AS) bestehenden Amyloid- β (A β ₄₂)-Oligomere als neurotoxisch gelten [2].

Amyloidbildung

Die Bildung von Fibrillen lässt sich in drei Phasen unterteilen: In der ersten Verzögerungsphase liegt das amyloidogene Peptid primär in seiner monomeren Form vor. Durch Proteinfehlfaltungen wird die anschließende Wachstumsphase initiiert, bei der die autokatalytische Anlagerung weiterer Untereinheiten erfolgt, bis diese letztendlich in der Sättigungsphase endet, bei der hochgeordnete Fibrillen vorliegen (**Abb. 1A**, [3]).

Während das monomere A β ₄₂ als unstrukturiert gilt, finden während der Aggregation Änderungen in der Sekundär-, sowie Tertiärstruktur statt, die z. B. mittels Fluoreszenzassays, NMR oder Kryo-EM beobachtet werden können [4]. Insbesondere die KLVFF-AS-Sequenz sowie K28 scheinen entscheidend für die intramolekulare Interaktion zu weiteren Untereinheiten zu sein. Während die Fibrillen durch die genannten Methoden gut charakterisiert werden konnten, liegt derzeit der Fokus der Forschung auf den erstgenannten Phasen. Gerade die Anfälligkeit zur Aggregation, die ein Hauptziel der Untersuchungen darstellt, macht ebensolche Untersuchungen schwierig, da sich der oligomere Zustand nicht beliebig genau definieren lässt. Während die genannten analytischen Methoden stets ein Ensemble aus undefinierbaren oligomeren Zuständen betrachten, können individuelle Oligomere hierüber nicht separat charakterisiert werden.

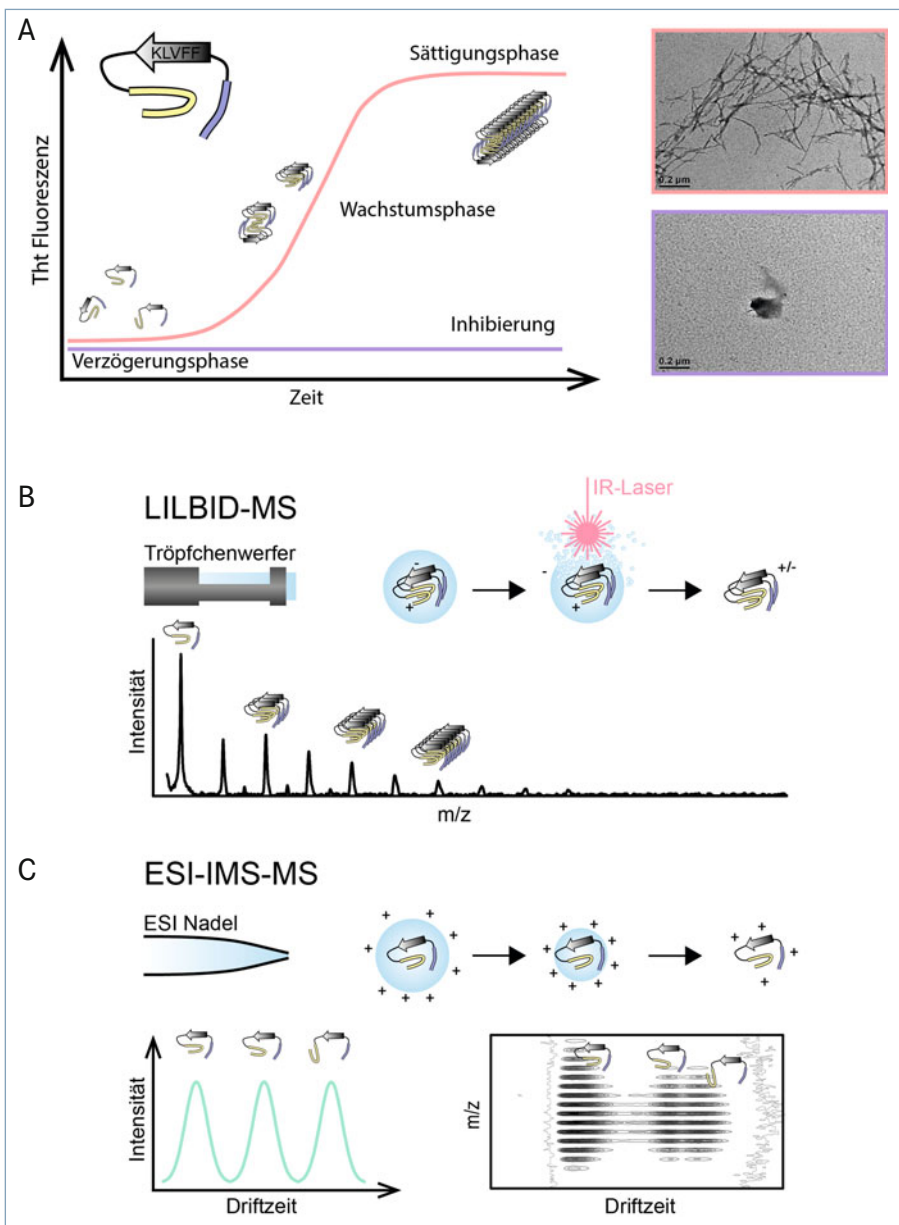
Untersuchung der Aggregation auf oligomerer Ebene

Die von uns genutzte Methode ist die native Massenspektrometrie (MS), womit sich die unterschiedlichen Oligomere anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) klar voneinander separieren lassen.

Mithilfe der *laser-induced liquid bead ion desorption* (LILBID)-MS konnte z. B. die frühe Aggregationsphase von A β ₄₂ untersucht werden [5]. Bei dieser Methode werden wässrige Analyttröpfchen mit einem Durchmesser von etwa 30 bis 50 Mikrometer bei einer Frequenz von 10 Hertz im Vakuum erzeugt, die anschließend von einem IR-Laserpuls bestrahlt werden, der zur Anregung der O-H-Streckschwingung des Solvens führt. Diese führt zur explosionsartigen Expansion des Analyttröpfchens und zur Freisetzung von niedrig geladenen Ionen, die anschließend anhand ihres m/z-Verhältnisses analysiert werden (**Abb. 1B**). Diese Ionisationstechnik gilt als besonders sanft, wodurch sich die Aggregation auf oligomerer Ebene zeitlich verfolgen lässt. Eine weitere, häufig genutzte MS-Hybridtechnik ist die Elektrospray-Ionenmobilitätsspektrometrie (ESI-IMS), worüber sich die Ionen neben ihrem m/z-Verhältnis auch anhand ihrer Größe und Form unterscheiden lassen. Nach der sanften Ionisation werden Ionenpakete in eine mit Inertgas gefüllte Kammer überführt, durch welche die Ionen unter Einfluss einer sanften Spannung geleitet werden. Ionen mit einer größeren Oberfläche und somit einem größeren Kollisionsquerschnitt Ω (*collision cross section*, CCS) erfahren mehr Stöße mit dem Inertgas, wodurch diese für das Passieren der Kammer eine längere Driftzeit (dt) benötigen. Dies eröffnet die Möglichkeit, Ionen anhand ihrer oligomeren Größe und Konformation zu unterscheiden (**Abb. 1C**). Zudem können die experimentell ermittelten Driftzeiten in CCS umgerechnet werden, was den Vergleich mit theoretischen CCS von Modellstrukturen ermöglicht, wodurch auch strukturelle Informationen gewonnen werden können.

Monomeres Grundstein als Fundament der Aggregation

Durch die Kombination eines MS-Ionenmobilitätsspektrometers mit einem IR-Spektrometer konnten in früheren Studien diverse Modellpeptide analysiert werden, die zu höheren Aggregaten mit unterschiedlichen Morphologien fibrillieren [6]. Durch die



▲ Abb. 1: Schematische Darstellung des Aggregationsverlaufs von $A\beta_{42}$ sowie der Ionisationstechniken LILBID-MS und ESI-IMS-MS. **A,** Der Aggregationsverlauf lässt sich z. B. über die Fluoreszenzintensität interkalierender Farbstoffe verfolgen. In der Verzögerungsphase liegt $A\beta_{42}$ primär im monomeren Zustand vor. Lagern sich diese über die Zeit aneinander, erfolgt die Wachstumsphase, in der es zur Bildung von Oligomeren kommt, die letztendlich zur Bildung von fibrillaren Strukturen führt, die auch über TEM detektiert werden können. Die Bildung der Fibrillen sowie der Anstieg der Fluoreszenzintensität bleiben aus, falls die Aggregation durch Zugabe eines Inhibitors unterbunden wird. **B,** Bei LILBID-MS werden kleine Analyttröpfchen erzeugt, die mithilfe eines IR-Lasers bestrahlt werden. Durch diese sanfte Ionisationstechnik lässt sich die Aggregation von $A\beta_{42}$ auf oligomerer Ebene zeitlich verfolgen. **C,** Die Ionisation mittels ESI-MS erfolgt durch das Anlegen einer hohen Spannung an einer mit dem Analyt befüllten Nadel. Durch den Evaporationsprozess wird die Ladung auf die Proteinoberfläche übertragen. Durch die IMS können die erzeugten Ionen anschließend anhand ihrer Größe und Form aufgrund der unterschiedlichen Driftzeit (dt) separiert werden, welche das Massenspektrum durch eine zusätzliche Informationsachse ergänzt.

Massenselektion von unterschiedlich großen Oligomeren und der simultanen Analyse des CCS und der Amid-I-Bande konnte generell der Trend festgestellt werden, dass jeweils mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad der β -Faltblattstrukturanteil zunimmt [6].

Diese β -Faltblattstruktur ist wiederum charakteristisch für die Ausbildung von fibrillaren Strukturen. Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahmen der verschiedenen Modellpeptide zeigten Unterschiede in der Morphologie der resultierenden Aggrega-

te, bezüglich deren Durchmesser orthogonal zur Fibrillachse.

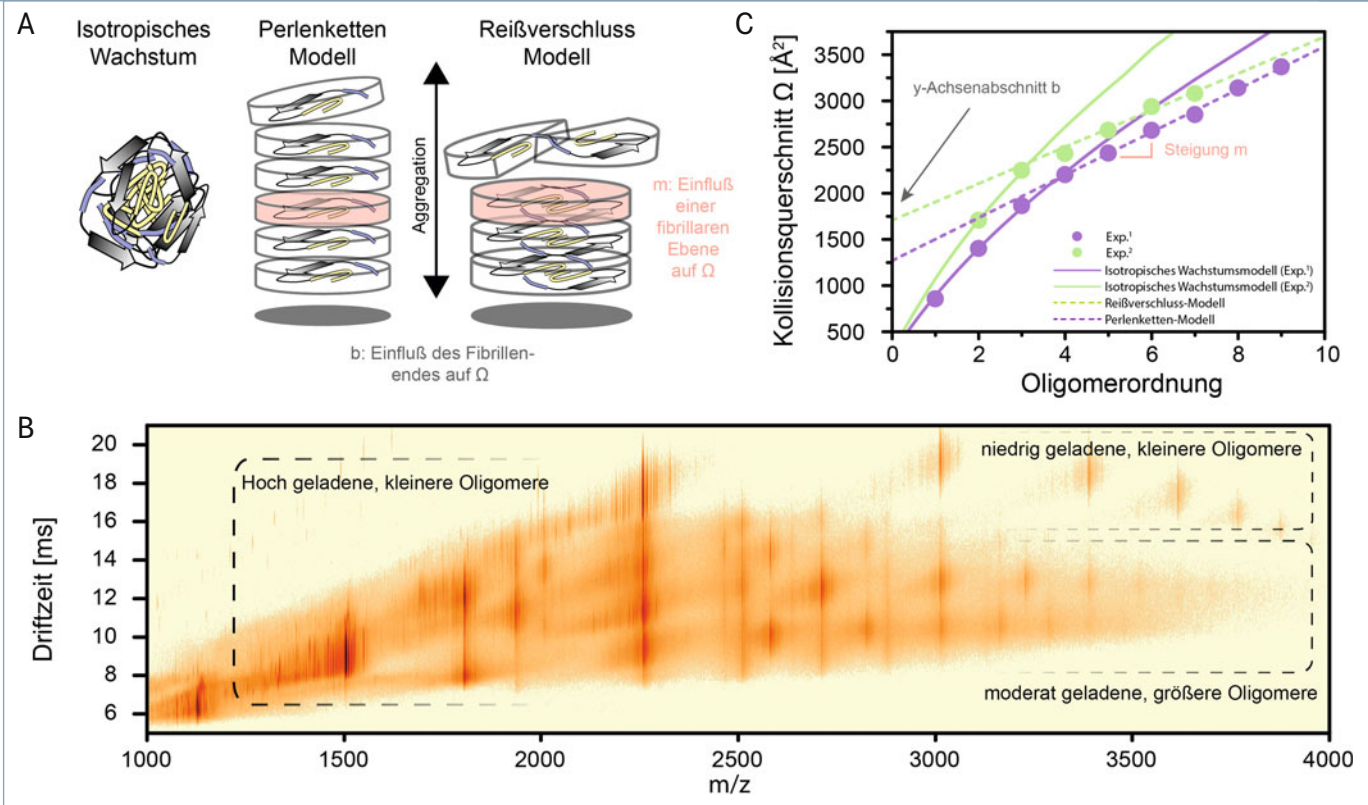
Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei der Analyse der CCS der jeweiligen Oligomere beobachtet werden, der abhängig vom untersuchten Modellpeptid, bei gleicher Peptidlänge, zu einem höheren oder niedrigeren CCS-Zuwachs bei einer Anlagerung einer zusätzlichen Monomeruntereinheit führt [7]. Bei Modellpeptiden, die einen geringen CCS-Zuwachs pro zusätzlicher Anlagerung aufweisen, war zudem die Amid-I-Bande bereits bei vergleichsweise niedrigen Oligomergrößen ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass im Laufe der Aggregation die Anlagerung von je zwei weiteren Monomeruntereinheiten pro Ebene ähnlich dem Schließen eines Reißverschlusses zu erfolgen scheint. Im Gegensatz dazu sprechen ein hoher CCS-Zuwachs und eine schwächer ausgeprägte Amid-I-Bande sowie ein geringerer Durchmesser der resultierenden Fibrillen für eine Oligomerisierung von einer Monomeruntereinheit pro Ebene, analog einer Perlenkette (**Abb. 2A**, [7]).

Ersterer Aggregationsaufbau liegt auch für $A\beta_{42}$ nahe, da die bekannten Modelle vorrangig von einer reißverschlussartigen Struktur ausgehen [4]. Die Anwendung der CCS der jeweiligen Oligomere auf die genannten Modelle zeigt, dass im Fall von $A\beta_{42}$ die Aggregation zunächst über ein isotropes Wachstum erfolgt, welches in ein geordnetes Fibrillwachstum übergeht, wobei der Grundstein für das folgende Wachstum bereits auf dimerer Ebene gelegt wird (**Abb. 2B** und **C**).

Unterschiedliche Aggregationswege für $A\beta_{42}$

Um diese Aggregation für die Alzheimer-relevanten Peptide genauer zu untersuchen, haben wir für $A\beta_{42}$ die Phase der frühen Oligomerisierung mittels LILBID-MS näher charakterisiert, wobei sich binnen 200 Minuten Oligomere bis hin zum 12-mer nachweisen lassen [8]. TEM-Aufnahmen nach 48 Stunden bestätigen, dass diese zur Bildung von definierten Fibrillen führten (**Abb. 3**).

Experimente mittels ESI-IMS-MS zeigten, dass die IM-Spektren von $A\beta_{42}$ von definierten Oligomeren stets mehrere Signale aufweisen, die zum einen auf eine mit dem Stoßgas induzierte Entfaltung (*collision induced unfolding*, CIU) und zum anderen auf unterschiedliche räumliche Strukturen zurückzuführen sind, die schon in der Lösung auftreten. Um diese näher zu charakterisieren, wurde neben $A\beta_{42}$ WT auch eine F19P-Mutante untersucht,



▲ Abb. 2: Aggregationsmodelle von Peptiden und deren Anwendung auf Ionenmobilitätsinformationen. **A**, Die Aggregation von Peptiden kann über unterschiedliche Wege erfolgen: Geschieht diese durch ungeordnete Zusammenlagerung in alle Raumrichtungen, spricht man von einem isotropischem Wachstum. Erfolgt es hingegen lediglich entlang einer Achse, kann dieses lineare Wachstum entweder vergleichsweise zu einer Perlenkette oder zu einem Reißverschluss erfolgen. Unterschiede zwischen den letzteren Modellen können anhand des Kollisionsquerschnitts Ω festgestellt werden. Aufgrund der Anlagerung einer Monomeruntereinheit an einem bestehenden Oligomer erhöht sich Ω unterschiedlich. Zudem unterscheidet sich Ω anhand der Fläche am Fibrillenende. **B**, Die Driftzeit t_d als Funktion des m/z -Verhältnisses. Die auftretenden Oligomersignale können in Ω umgerechnet werden, worauf die Aggregationsmodelle angewendet werden können. **C**, Ω der $A\beta_{42}$ Oligomersignale. $A\beta_{42}$ aggregiert auf zwei unterschiedliche Weisen. Die niederen Oligomere sind noch nicht stabil, sodass Ω einem isotropischen Wachstumsmodell entspricht, während für höhere Oligomere eine gute Übereinstimmung mit den linearen Wachstumsmodellen festgestellt werden kann.

die statt geordneter Fibrillen lediglich amorphe Aggregate ausbildet (**Abb. 3**).

Hierzu wurden CIU-Experimente durchgeführt, wobei sich die entsprechenden IM-Signale beider $A\beta_{42}$ -Varianten in der Zahl und Intensität der auftretenden Signale unterschieden. Hierüber konnte gezeigt werden, dass sich im Fall von $A\beta_{42}$ WT die IM-Signale für jeden vorliegenden oligomeren Zustand auf zwei unterschiedliche Strukturen reduzieren ließen, die sich nicht über CIU ineinander überführen lassen, wohingegen $A\beta_{42}$ F19P primär nur eine Struktur bildet (**Abb. 3**).

Dies deutet darauf hin, dass der Grundstein für die Ausbildung höherer Strukturen im Fall von $A\beta_{42}$ bereits auf niederoligomerer Ebene gelegt wird. Dabei scheinen der Mechanismus der zur Aggregation in axialer Richtung (Perlenketten-Modell) führt sowie die planaren Interaktionen, die die Reißverschlussaggregation erlauben, simultan abzufließen. Diese führen letztendlich zur Ausbildung von hochgeordneten, fibrillaren Konstrukten (**Abb. 2**). Im Fall von $A\beta_{42}$ F19P fehlt die planare Anordnung der Monomere,

wodurch statt der Reißverschlussaggregation ausschließlich die weniger stabile Perlenkettenstruktur entsteht (**Abb. 3**). Vergleiche mit *in vacuo*-Simulationen der Molaküldynamik (MD) von $A\beta_{42}$ -Strukturmodellen zeigten zudem eine hohe Übereinstimmung mit den experimentellen CCS der Aggregation analog zu einer Perlenkette sowie zu einem Reißverschluss [8]. Zudem konnte die Analyse der vorliegenden Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit von der Oligomergröße eine erhöhte Ausbildung von β -Faltblattstrukturelementen im Fall der Reißverschlussaggregation bestätigt werden.

Um die Aggregation und die postulierte Interaktion weiterer Monomeruntereinheiten zu validieren, wurden zusätzliche Experimente in Gegenwart der Aggregationsinhibitoren CLR01 sowie OR2 durchgeführt, die jeweils die Ausbildung von Fibrillen unterbinden und einen niederoligomeren Zustand gewährleisten sollen [8]. Während es sich bei CLR01 um einen Lysin- bzw. Arginin-spezifischen niedermolekularen Liganden handelt, der die Seitenkette der jeweiligen AS abschirmt, handelt es sich bei OR2 um eine

kurzkettige Peptidsequenz, die am KLVFF- $A\beta_{42}$ -Sequenzmotiv bindet, um die Anlagerung weiterer $A\beta_{42}$ -Untereinheiten zu verhindern [9, 10]. Beide Inhibitoren führten u. a. zu einem deutlich verminderten $A\beta_{42}$ -Aggregationsvermögen. Zudem resultiert die Zugabe beider Inhibitoren darin, dass sich die Morphologie der wenigen gebildeten Aggregate deutlich von der unterscheidet, die zu einem geordneten Fibrillwachstum führt. Die entsprechenden IM-Spektren der verbleibenden Oligomere zeigten zudem nur noch ein Signal pro oligomerem Zustand. Die Signale bei höheren CCS verschwinden, was die Inhibierung der hochgeordneten Reißverschlussstruktur unterstreicht (**Abb. 3**).

MS-Daten können wertvolle Informationen zur Bekämpfung von Demenzerkrankungen liefern

Die MS stellt sich als eine geeignete Methode heraus, mit deren Hilfe sich die frühe Aggregationsphase von amyloiden Peptiden charakterisieren lässt. Besonders die Kombination mit orthogonalen Methoden, wie der IMS oder der IR-Spektroskopie, erlaubt es,

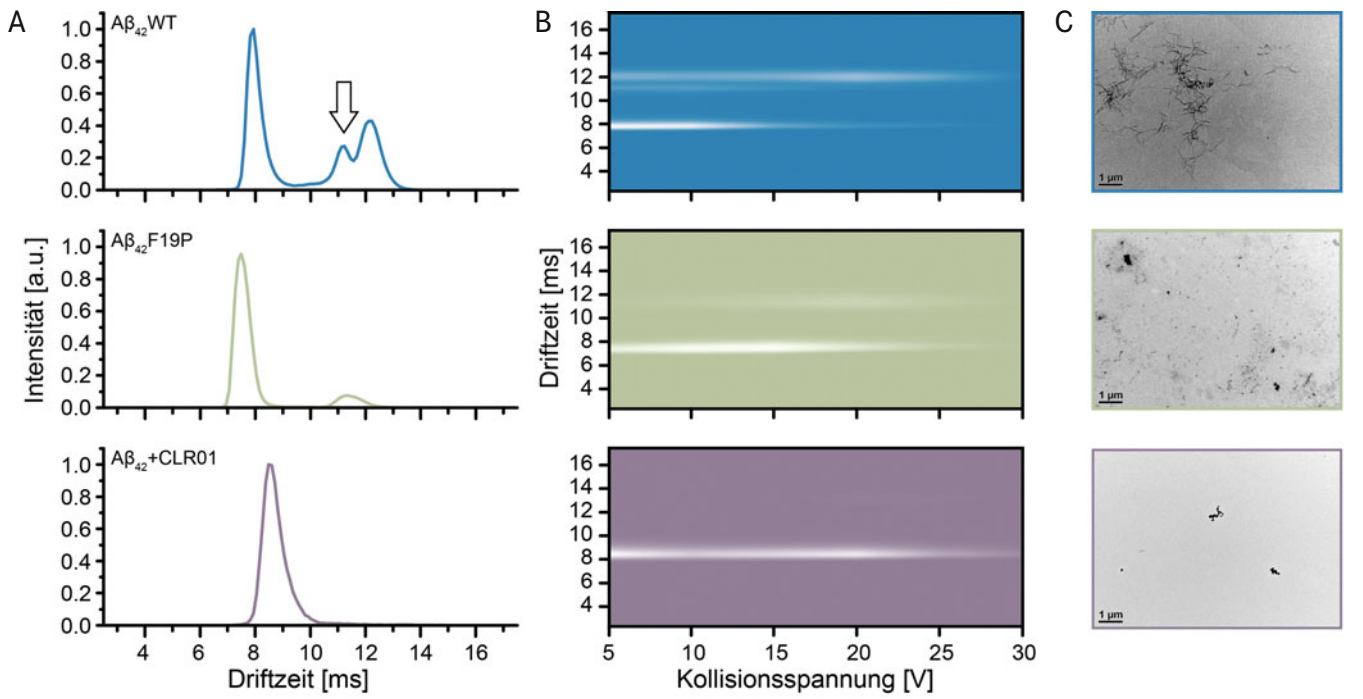


Abb. 3: CIU (*collision induced unfolding*)-Experiment von dimeren $A\beta_{42}$ -WT, $A\beta_{42}$ -F19P und $A\beta_{42}$ -CLR01. **A,** Die Driftzeit(dt)-Spektren unterscheiden sich in der Zahl der auftretenden Signale. **B,** CIU-Experimente zeigen, welche Signale durch Kollisionen über Gasphasenentfaltung entstehen. Diese Entfaltungssignale entsprechen keiner Konformation, die in Lösung zu finden ist. Lediglich im Fall von $A\beta_{42}$ -WT zeigt sich ein zweites Signal (Pfeil in A), was für eine zusätzliche Spezies spricht, die in den anderen Fällen nicht vertreten ist. Diese Spezies (Basis für die Reißverschlusskonformation) korreliert mit dem Auftreten der Fibrillen im Fall von $A\beta_{42}$ -WT, welche bei $A\beta_{42}$ -F19P und $A\beta_{42}$ -CLR01 nicht beobachtet werden können. **C,** Dazugehörige TEM-Bilder.

diskrete Oligomere detailliert zu charakterisieren. Mit den bisher erzielten Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass der Grundstein, der die Ausbildung der weiteren Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt, auf einer niederen oligomeren Stufe gelegt wird. Geeignete Aggregationsinhibitoren verhindern die Ausbildung dieser Strukturen und sind somit in der Lage, die Bildung von Fibrillen zu unterbinden. Somit kann die Wirksamkeit potenzieller Aggregationsinhibitoren mit IM-MS anhand der Ausbildung erster Oligomere überprüft werden. Im Weiteren soll untersucht werden, ob sich die bisher erzielten Beobachtungen auf weitere Systeme übertragen lassen, um das Auftreten amyloidogener Plaques besser verstehen zu können. Auch hier wäre das Ziel, deren potenziell neurotoxischen Effekt zu unterbinden und hierüber mittelfristig eine geeignete Möglichkeit zu finden, Demenzerkrankungen zu therapieren.

Literatur

- [1] Carter J, Lippa CF (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1: 733–737
- [2] Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884–890
- [3] Kumar S, Walter J (2011) Phosphorylation of amyloid beta ($A\beta$) peptides – a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging* 3: 803–812
- [4] Gremer L, Schölzel D, Schenk C et al. (2017) Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science* 358: 116–119

- [5] Cernescu M, Stark T, Kalden E et al. (2012) Laser-induced liquid bead ion desorption mass spectrometry: an approach to precisely monitor the oligomerization of the β -amyloid peptide. *Anal Chem* 84: 5276–5284
- [6] Seo J, Hoffmann W, Warnke S et al. (2017) An infrared spectroscopy approach to follow β -sheet formation in peptide amyloid assemblies. *Nat Chem* 9: 39–44
- [7] Bleiholder C, Dupuis NF, Wytenbach T et al. (2011) Ion mobility-mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to β -sheet in amyloid fibril formation. *Nat Chem* 3: 172–177
- [8] Lieblein T, Zangl R, Martin J et al. (2020) Structural rearrangement of amyloid- β upon inhibitor binding suppresses formation of Alzheimer's disease related oligomers. *eLife* 9: e59306
- [9] Stark T, Lieblein T, Pohland M et al. (2017) Peptidomimetics that inhibit and partially reverse the aggregation of $A\beta$ 1–42. *Biochemistry* 56: 4840–4849
- [10] Fokkens M, Schrader T, Klärner FG (2005) A molecular tweezer for lysine and arginine. *J Am Chem Soc* 127: 14415–14421

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Nina Morgner
 Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
 Goethe-Universität Frankfurt a. M.
 Max-von-Laue-Straße 7
 D-60438 Frankfurt a. M.
 morgner@chemie.uni-frankfurt.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



René Zangl

2010–2017 Studium der Chemie, Universität Frankfurt a. M. Seit 2017 Doktorand, Universität Frankfurt a. M..



Nina Morgner

1995–2002 Studium der Physik, Universität Freiburg. 2003–2008 Promotion in der physikalischen Chemie, Universität Frankfurt a. M. 2008–2010 Postdoc, Cambridge University, UK. 2010–2013 Postdoc, University of Oxford, UK. 2013–2019 Juniorprofessur mit ERC Starting Grant, Universität Frankfurt a. M. Seit 2019 Heisenbergprofessur, Universität Frankfurt a. M.