

Amyloidprotofibrillen

Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen an A β -Protofibrillen: Nachweis einer Umgestaltung der β -Faltblätter bei der Ausreifung von Amyloidfibrillen**

Holger A. Scheidt, Isabel Morgado, Sven Rothemund, Daniel Huster* und Marcus Fändrich*

Die Amyloidfibrillen der Alzheimer-Krankheit werden hauptsächlich von den Peptiden A β (1–40) und A β (1–42) gebildet.^[1] Während monomeres A β (1–40) größtenteils unstrukturiert ist,^[2] bedingt seine Aggregation zu Amyloidfibrillen die Bildung von β -Faltblattstrukturen. Ausgereifte Amyloidfibrillen (MAFs) sind das Endprodukt des Fibrillierungsprozesses. Diese Fibrillen haben eine lange, gerade und hoch geordnete Gestalt (Abbildung 1A). Die β -Faltblattstruktur von MAFs konnte bereits mit Festkörper(FK)-

NMR-Spektroskopie und anderen Methoden nachgewiesen werden.^[3,4] Die Bildung dieses Endzustandes der Fibrillierung verläuft über mehrere Zwischenzustände (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen),^[5–7] zu denen kaum detaillierte Strukturinformationen vorhanden sind. In der vorliegenden Studie haben wir mit FK-NMR-Spektroskopie die β -Faltblattstruktur eines solchen Zwischenprodukts der Fibrillierung – der Protofibrillen (PFs) – untersucht. Unsere Daten zeigen Strukturdetails der Amyloidogenese von A β (1–40) und veranschaulichen die mit diesem speziellen Schritt verbundenen Konformationsänderungen.

PFs sind eine zytotoxische Form von A β und damit ein möglicher Verursacher von Alzheimer.^[8] PFs wurden als früheste fibrilläre Aggregate der A β -Amyloidogenese identifiziert.^[5] Ihre gekrümmte ungleichmäßige Gestalt unterscheidet sie deutlich von den MAFs.^[5,6] PFs zeigen wenig Wechselwirkung mit den Farbstoffen Kongorot und Thioflavin T.^[6] Dennoch haben PFs signifikante Anteile an β -Faltblattstrukturen, wie mit Infrarotspektroskopie und Röntgenbeugung gezeigt werden konnte.^[9]

Die hier vorgestellte Studie wurde durch die Stabilisierung der normalerweise metastabilen PFs mit dem aus einem Antikörper abgeleiteten Protein B10AP möglich (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).^[9] Insgesamt wurden acht A β (1–40)-Peptide mit verschiedenen Isotopenmarkierungen chemisch synthetisiert. Dabei decken die ^{15}N - und ^{13}C -Markierungen insgesamt 30 Aminosäuren (AS) aus allen Strukturregionen des Peptids ab (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Mit diesen Peptiden wurden anschließend die jeweiligen Proben von B10AP-stabilisierten A β (1–40)-PFs *in vitro* hergestellt. Die Morphologie der PFs und die Probenhomogenität wurden mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) überprüft; hierbei wurden keine nichtfibrillären Aggregate oder MAFs gefunden (Abbildung 1B). In ^{13}C -CP-MAS-NMR-Spektren (CP = Kreuzpolarisation, MAS = Rotation um den magischen Winkel) und zweidimensionalen ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimenten wurden die NMR-Signale der markierten Aminosäuren in A β (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen) aufgezeichnet. Die Linienbreite der NMR-Signale betrug typischerweise zwischen 1.5 und 3.0 ppm. Alle ^{13}Ca - und $^{13}\text{C}\beta$ -Signale konnten eindeutig zugeordnet werden (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Abbildung 2 A zeigt die chemischen Verschiebungen von ^{13}Ca und $^{13}\text{C}\beta$, die besonders informativ bezüglich der Sekundärstruktur sind, als Differenz zu den Random-Coil-Werten („Sekundärverschiebungen“).^[10] In diesem Diagramm weisen alle AS (außer Gly) für eine β -Faltblattstruktur

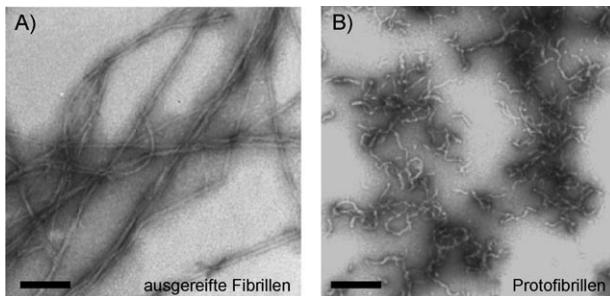


Abbildung 1. Elektronenmikroskopiebilder (Maßstabsbalken: 200 nm) von A β (1–40) in 50 mM Hepes (pH 7.4) und 50 mM NaCl, 72 h inkubiert bei 37°C A) ohne und B) mit B10AP. Molares Verhältnis 10:1 (A β /B10AP). Hepes = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure.

[*] Dr. H. A. Scheidt, Prof. Dr. D. Huster

Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Universität Leipzig
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: daniel.huster@medizin.uni-leipzig.de

Dr. S. Rothemund
Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
Universität Leipzig (Deutschland)

Dr. H. A. Scheidt, Dr. I. Morgado
Institut für Biochemie und Biotechnologie
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg (Deutschland)

Dr. M. Fändrich
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und MLU
Weinbergweg 22, 06120 Halle (Deutschland)
E-Mail: fandrich@enzyme-halle.mpg.de

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der DFG (SFB 610 (A14, N01), einem DFG-Stipendium für I.M. und dem Exzellenznetzwerk Biowissenschaften (Sachsen-Anhalt)). Wir danken der DFG und dem Institut für Experimentalphysik der Universität Leipzig für die Messzeit am Avance 750.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201007265> zu finden.

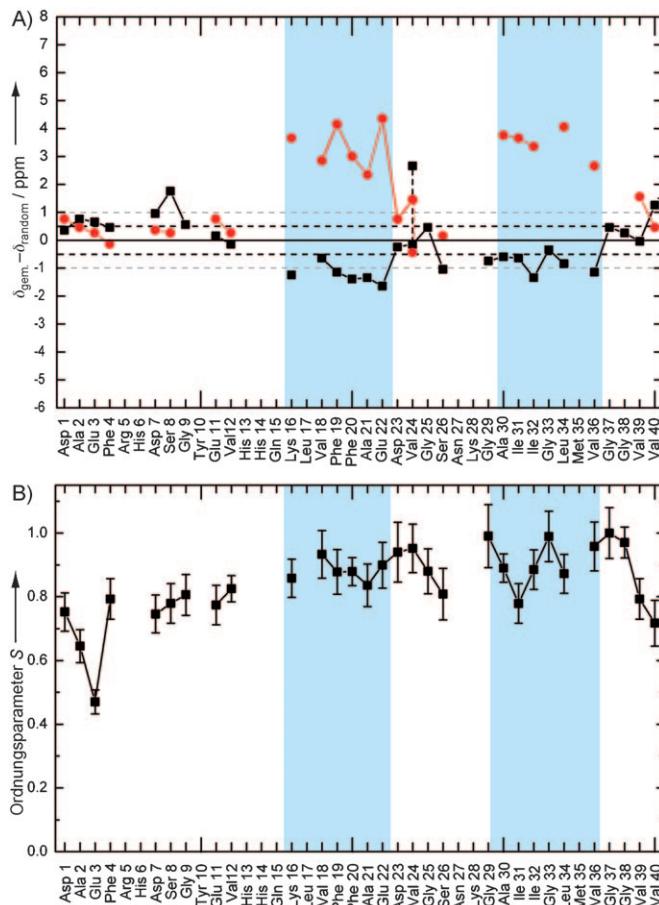


Abbildung 2. A) Sekundäre isotrope chemische ^{13}C -CP-MAS-NMR-spektroskopische Verschiebungen für $\text{C}\alpha$ (schwarze Quadrate) und $\text{C}\beta$ (rote Kreise) der B10AP-stabilisierten $\text{A}\beta(1\text{--}40)$ -PFs, dargestellt als Differenz zwischen den gemessenen chemischen Verschiebungen der jeweiligen Aminosäure und den Random-Coil-Werten aus der Literatur. Domänen mit β -Faltblattstruktur sind blau unterlegt. Die zugehörigen Linienbreiten sind in Abbildung S7 der Hintergrundinformationen dargestellt. B) Ordnungsparameter S für B10AP-stabilisierte PFs von $\text{A}\beta(1\text{--}40)$, bestimmt aus der Messung der dipolaren ^{13}Ca - ^1H -Kopplung. Die in dieser Studie bestimmten Regionen mit β -Faltblattstruktur sind blau unterlegt (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen).

tur negative $\text{C}\alpha$ - und positive $\text{C}\beta$ -Sekundärverschiebungen auf, während Verschiebungen mit entgegengesetzten Vorzeichen typisch für α -Helices sind.^[11] Werte nahe null lassen sich einer Random-Coil-Struktur zuordnen. Zusätzlich wurde die Sekundärstruktur des Peptidrückgrates mithilfe einer Datenbank für chemische Verschiebung und Sequenzanalogie (TALOS),^[12] die eine Vorhersage für die beiden Diederwinkel Ψ und Φ macht, bestimmt. Basierend auf den Sekundärverschiebungen und TALOS-Vorhersagen weisen die untersuchten $\text{A}\beta$ -PFs für die AS 16–22 und 30–36 eine β -Faltblattkonformation auf (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Die aus TALOS erhaltenen Ψ - Φ -Paare dieser beiden β -Faltblätter haben eine enge Verteilung und erscheinen im Ramachandran-Diagramm im Wesentlichen etwas rechts der Diagonalen (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Dies lässt auf eine hoch geordnete β -Faltblattstruktur mit geringer Verdrillung der β -Faltblätter schließen.

Weitere Information über die β -Faltblattregion liefert die Messung der dipolaren ^1H - ^{13}C -Kopplungen, die durch Molekülbewegungen teilweise ausgemittelt werden. Dargestellt als Ordnungsparameter S , geben diese Kopplungen Aufschluss über die Dynamik des Peptidrückgrates. Rige Strukturen weisen einen Ordnungsparameter S nahe 1 auf, während hohe Mobilität zu einem S -Wert nahe 0 führt. Daher wurden Ordnungsparameter von Fibrillen bereits zur Unterscheidung des rigid cross- β -Kerns und der hoch flexiblen Peptidketten außerhalb des Kerns herangezogen.^[13]

B10AP-stabilisierte PFs zeigen relativ hohe Werte ihrer Ordnungsparameter (>0.8) innerhalb der β -Faltblattregionen (Abbildung 2B), während die gemessenen Werte für S am N- und C-Terminus kleiner als 0.8 sind. Allerdings enthalten B10AP-stabilisierte PFs keine Domänen hoher Mobilität ($S < 0.4$), d.h., auch die AS 1–12 und 23–26 sind keine thermisch fluktuierenden Ketten, obwohl ihre chemischen Verschiebungen auf eine Random-Coil-Struktur schließen lassen (Abbildung 3A). Diese Regionen weisen also eine stabile Konformation auf, die weder einer α -Helix noch einem β -Faltblatt entspricht. Die relativ hohe Strukturstabi-

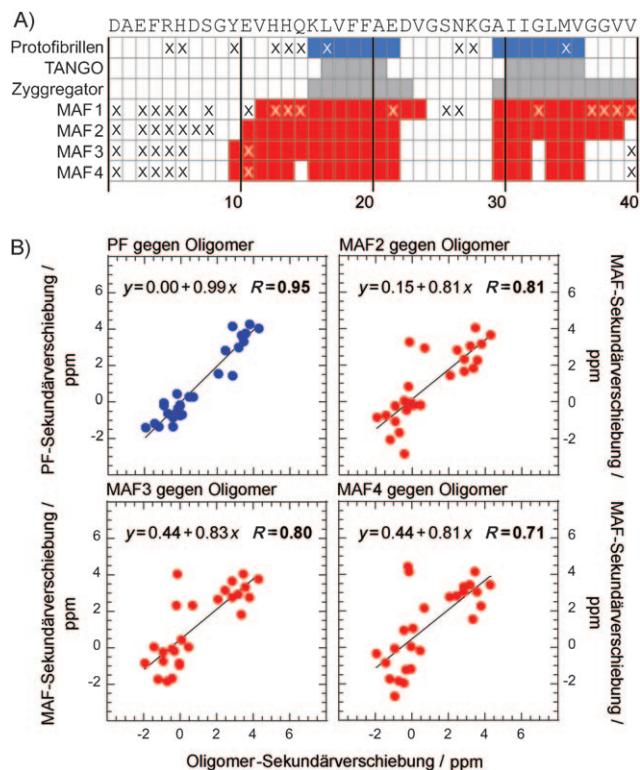


Abbildung 3. Vergleich von PFs mit MAFs, Oligomeren und theoretischen Vorhersagen. A) AS in β -Faltblättern (schattiert), bestimmt durch FK-NMR-Spektroskopie für PFs (blau, diese Studie) und verschiedenen Präparationen von MAFs (rot; 1,^[4] 2,^[16] 3 und 4^[14]) sowie den Vorhersagen durch TANGO^[17] und Zyggregator (grau).^[17,18]: diese Aminosäure wurde in der jeweiligen Studie nicht untersucht. B) Korrelation von $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Sekundärverschiebungen von $\text{A}\beta(1\text{--}40)$ -Oligomeren,^[19] mit B10AP-stabilisierten PFs sowie drei verschiedenen Präparationen von MAFs.^[14,16] Für Oligomere wurden nur 15 AS untersucht. Wenn multiple chemische Verschiebungen auftraten, wurden die näher liegenden Werte verwendet. Für die MAF4-Probe wurden die dominierenden chemischen Verschiebungen verwendet.

lität am N-Terminus (Abbildung 2B) kann von der Bindung von B10AP herrühren, womit auch der ungewöhnliche Anstieg des Ordnungsparameters für Asp1 und Ala2 gegenüber jenem für Glu3 erklärt werden kann (Abbildung 2B).

Direkte Vergleiche mit bereits gemessenen chemischen Verschiebungen anderer $\text{A}\beta(1-40)$ -Proben sind wegen unterschiedlicher Markierungsmuster und multipler Werte für die chemische Verschiebung ein und desselben ^{13}C -Kerns schwierig.^[4,14] Während die multiplen Werte für die chemischen Verschiebungen konsistent mit dem strukturellen Polymorphismus von MAF-Proben sind,^[6,15] ist diese Heterogenität für die hier untersuchten PFs weniger problematisch. Nur Val24 zeigt zwei Werte für die chemische Verschiebung (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Eine detaillierte Analyse der chemischen Verschiebungen für B10AP-stabilisierte $\text{A}\beta(1-40)$ -PFs und bereits veröffentlichten Werten für $\text{A}\beta(1-40)$ -MAFs zeigt, dass die β -Faltblattstrukturen an sehr ähnlichen Positionen der Aminosäurenssequenz auftreten (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Hierbei scheinen MAFs mehr AS in die β -Faltblätter einzubeziehen als PFs (Abbildung 3A). Dies wird für das erste β -Faltblatt, das in verschiedenen MAFs bei AS 10–12 beginnt, besonders deutlich. Im Unterschied dazu weisen bei PFs die Aminosäuren Glu11 und Val12 keine β -Faltblatt-Konformation auf (Abbildungen 2A und 3A), d.h., das erste β -Faltblatt beginnt hier nicht vor Aminosäure 13.

Die theoretischen Strukturvorhersagen durch die Programme TANGO und Zyggregator stimmen mit den gemessenen, kurzen β -Faltblättern der PFs überein (Abbildung 3A). TANGO prognostiziert ein β -Faltblatt für die AS 17–21 und 31–36,^[17] Zyggregator für die AS 15–23 und 30–40.^[18] Dieser Vergleich zeigt, dass PFs β -Faltblätter dort bilden, wo diese energetisch am vorteilhaftesten sind, womit sie durch theoretische Modelle vorhersagbar werden.

Weitere Strukturunterschiede zwischen PFs und MAFs finden sich in der Verbindungsregion AS 23–26 zwischen den beiden β -Faltblättern (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Frühere Studien schlugen für MAFs eine stabile β -Bogenkonformation in dieser Region vor.^[20] Allerdings lassen aktuelle Kryo-TEM-Studien von ausgereiften $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen bei einer Auflösung von 8 bis 10 Å Zweifel an dieser Hypothese laut werden.^[21] Unsere Studie zeigt Unterschiede auch für Gly33 im C-terminalen β -Faltblatt, das Sekundärverschiebungen von +3 bis +5 ppm für MAFs und -0.3 ppm für PFs aufweist (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Insgesamt lassen alle Daten auf eine Umgestaltung der β -Faltblattstruktur bei der Umwandlung von PFs in MAFs schließen. Dieser Fakt wird durch die verschiedenen Wechselwirkungen von PFs und MAFs mit Kongorot oder Thioflavin T und gravierenden Unterschieden in der Morphologie gestützt.^[5,6]

Die Auftragung der Ca - und $\text{C}\beta$ -Sekundärverschiebungen von PFs gegen diejenigen von Oligomeren^[19] liefert einen viel höheren Korrelationskoeffizienten ($R = 0.95$) als die Auftragung der Werte von MAFs (Abbildung 3B). Ähnliche Ergebnisse erzielt man bei der getrennten Darstellung der Ca - und $\text{C}\beta$ -Verschiebungen für Oligomere, PFs und MAFs. Besonders an den Positionen, wo PFs und MAFs signifikante Unterschiede aufweisen (Val12, Gly25 und Gly33) entspre-

chen Oligomere weit mehr den PFs als den MAFs (Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen). Diese Befunde sind insofern bemerkenswert, als PFs und MAFs gemeinsame generelle Eigenschaften, wie die lineare Gestalt und die Wechselwirkung mit dem fibrillenspezifischen Antikörperfragment B10, aufweisen.^[8] Noch bleibt offen, ob alle PFs (auch solcher, die in Abwesenheit eines stabilisierenden Agens gewachsen sind) die hier beschriebenen Eigenschaften haben. Unsere Daten zeigen, dass PFs als gestreckte Oligomere betrachtet werden müssen. Dies ist auch in Einklang mit aktuellen Rasterkraftmikroskopiedaten von $\text{A}\beta$ -Protzfibrillen und -Oligomeren.^[23] Weiterhin zeigte eine Probe von $\text{A}\beta$ -Protzfibrillen mit am aromatischen Ring ^{13}C -markierten Phe19 und uniform markierten Leu34 sowie Gly38 nur eine Wechselwirkung zwischen Phe19 und Leu34, nicht aber mit Gly38 (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Dies wurde ebenfalls für $\text{A}\beta(1-42)$ -Oligomere und -Fibrillen beobachtet.^[22]

Abbildung 4 fasst die Schlussfolgerungen für die Struktur im Hinblick auf den Fibrillierungsmechanismus von $\text{A}\beta(1-40)$ zusammen. Während der Oligomerisierung bilden die ursprünglich ungeordneten $\text{A}\beta$ -Peptide in der Primärstruktur vorgegebene β -Faltblattsegmente, wie durch Theorie und

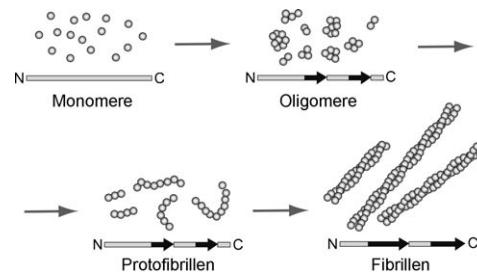


Abbildung 4. $\text{A}\beta$ -Fibrillierung und β -Faltblattstruktur der verschiedenen Stadien (schwarze Pfeile).

Experiment belegt werden konnte. Diese β -Faltblattsegmente ermöglichen das Wachstum der PFs, wie auch durch eine Mutationsanalyse von $\text{A}\beta(1-40)$ -PFs gezeigt werden konnte.^[24] Wenn die Fibrillen ausreifen, wird die β -Faltblattstruktur so umgestaltet, dass weitere AS in die β -Faltblätter inkorporiert werden (Abbildung 3A). Im Rahmen dieser Umgestaltung verändern sich die Konformation der AS 23–26 und Gly33 sowie die Werte der chemischen Verschiebungen für diese AS (Abbildung 3B). Dabei werden MAF-spezifische Wechselwirkungen ermöglicht. Im Ergebnis können sich die thermodynamisch stabileren MAFs durchsetzen.

Wegen der gemeinsamen Eigenschaften beider Peptide ist die vorliegende Studie auch von Bedeutung für die Fibrillierung von $\text{A}\beta(1-42)$. Infrarotspektroskopie, Farbstoffbindung^[25] und FK-NMR-Spektroskopie^[22] zeigen, dass auch $\text{A}\beta(1-42)$ -Oligomere während ihrer Konversion in MAFs substanziale Strukturänderungen durchlaufen müssen. Allerdings ist es nicht bekannt, ob diese Veränderungen erst bei Umwandlung von PFs in MAFs stattfinden. Weitere Studien sind notwendig, um die Strukturen aller Stadien mit atomarer Auflösung zu bestimmen und spezielle PF-Kontakte, die bei

der Umwandlung in MAFs aufgebrochen werden müssen, zu untersuchen.

Experimentelles

$\text{A}\beta(1-40)$ -Peptide mit verschiedenen Isotopenmarkierungen wurden über Standard-Festphasensynthese nach dem Fmoc-Verfahren hergestellt (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). B10AP-stabilisierte PFs wurden in 1 mL Puffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM NaCl), der 4 mg mL⁻¹ markiertes $\text{A}\beta(1-40)$ und B10AP im molaren Verhältnis von 10:1 ($\text{A}\beta/\text{B10AP}$) enthielt, gelöst. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die B10AP-stabilisierten PFs durch Ultrazentrifugation (100 krpm, 2 h, 4°C, TLA120.2-Rotor, Beckman Optima TLX) abgetrennt. Das Pellet wurde lyophilisiert, mit 50 Gew.-% H₂O resuspendiert und durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C homogenisiert. Die Morphologie der PFs wurde mit TEM kontrolliert. Dazu wurden 5 µL der Proben nach einer 1:10-Verdünnung mit reinem Wasser auf einen Kohlenstofffilm aufgetragen und nach einer Kontrastfärbung mit 2% (w/v) Uranylacetat mit einem Zeiss-900-Elektronenmikroskop bei 80 kV analysiert.

Eingegangen am 18. November 2010

Online veröffentlicht am 14. Februar 2011

Stichwörter: Alzheimer-Krankheit · Amyloide Beta-Peptide · Faserproteine · NMR-Spektroskopie · Protobibrillen

-
- [1] J. Bieschke, Q. Zhang, D. A. Bosco, R. A. Lerner, E. T. Powers, P. Wentworth, Jr., J. W. Kelly, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 611–619.
 - [2] a) E. Terzi, G. Holzemann, J. Seelig, *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 633–642; b) R. Riek, P. Guntert, H. Dobeli, B. Wipf, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5930–5936.
 - [3] O. S. Makin, L. C. Serpell, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5950–5961.
 - [4] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16742–16747.
 - [5] J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber, P. T. Lansbury, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 119–125.
 - [6] C. S. Goldsbury, S. Wirtz, S. A. Muller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aeby, P. Frey, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 217–231.
 - [7] H. Yagi, T. Ban, K. Morigaki, H. Naiki, Y. Goto, *Biochemistry* **2007**, *46*, 15009–15017.
 - [8] H. A. Lashuel, P. T. Lansbury, Jr., *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 167–201.
 - [9] G. Habicht, C. Haupt, R. P. Friedrich, P. Hortschansky, C. Sachse, J. Meinhardt, K. Wielgmann, G. P. Gellermann, M. Brodhun, J. Götz, K.-J. Halbhuber, C. Röcken, U. Horn, M. Färdrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19232–19237.
 - [10] S. Luca, D. V. Filippov, J. H. van Boom, H. Oschkinat, H. J. de Groot, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 325–331.
 - [11] S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490–5492.
 - [12] G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289–302.
 - [13] a) M. Sackewitz, H. A. Scheidt, G. Lodderstedt, A. Schierhorn, E. Schwarz, D. Huster, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7172–7173; b) J. J. Helmus, K. Surewicz, W. K. Surewicz, C. P. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2393–2403.
 - [14] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262–265.
 - [15] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorjeff, M. Färdrich, *J. Mol. Biol.* **2009**, *386*, 869–877.
 - [16] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18349–18354.
 - [17] A. M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. Serrano, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1302–1306.
 - [18] J. Meinhardt, G. G. Tartaglia, A. Pawar, T. Christopeit, P. Hortschansky, V. Schroekh, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, M. Färdrich, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1214–1222.
 - [19] S. Chimon, M. A. Shaibat, C. R. Jones, D. C. Calero, B. Aizezi, Y. Ishii, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1157–1164.
 - [20] M. Färdrich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2066–2078.
 - [21] a) M. Schmidt, C. Sachse, W. Richter, C. Xu, M. Färdrich, N. Grigorjeff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19813–19818; b) C. Sachse, M. Färdrich, N. Grigorjeff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7462–7466.
 - [22] M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand, S. O. Smith, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 561–567.
 - [23] I. A. Mastrangelo, M. Ahmed, T. Sato, W. Liu, C. Wang, P. Hough, S. O. Smith, *J. Mol. Biol.* **2006**, *358*, 106–119.
 - [24] A. D. Williams, M. Segal, M. Chen, I. Kheterpal, M. Geva, V. Berthelier, D. T. Kaleta, K. D. Cook, R. Wetzel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7115–7120.
 - [25] A. Eckert, S. Hauptmann, I. Scherping, J. Meinhardt, V. Rhein, S. Drose, U. Brandt, M. Färdrich, W. E. Müller, J. Götz, *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 1255–1267.