

# Die dynamische Struktur von Tau-Filamenten\*\*

Stefan Bibow, Marco D. Mukrasch, Subashchandrabose Chinnathambi, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow und Markus Zweckstetter\*

Ein Hauptcharakteristikum der Alzheimer-Krankheit und vieler anderer neurodegenerativer Erkrankungen sind filamentöse Aggregate des Proteins Tau.<sup>[1-3]</sup> Der Verlust von Neuronen und die Abnahme kognitiver Leistung korreliert mit der zunehmenden Verbreitung dieser Tau-Filamente in erkrankten Gehirnen.<sup>[4]</sup> Die Bildung von Tau-Filamenten – „paired helical filaments“ (PHFs) – basiert auf einer Umwandlung vom ungeordneten, monomeren Zustand in eine  $\beta$ -Struktur mit amyloidem Charakter.<sup>[5,6]</sup>

Der proteaseresistente und vom Lösungsmittel nicht zugängliche Kern der Tau-Filamente besteht hauptsächlich aus den Repeat-Sequenzen in der C-terminalen Hälfte des Proteins.<sup>[7]</sup> Der Kern der Filamente ist umgeben von N- und C-terminalen Abschnitten („ungeordneter Mantel“ oder „Fuzzy Coat“), die mehr als 200 Aminosäuren umfassen (Abbildung 1a).<sup>[7,8]</sup> Elektronen- und Kernspinspektroskopische Experimente deuten auf eine hohe Flexibilität für Reste innerhalb des Fuzzy Coat hin.<sup>[9,10]</sup> Weiterhin zeigen biochemische Studien, dass der Fuzzy Coat eine wichtige Rolle für die Aggregation und Neurotoxizität spielt.<sup>[11-13]</sup> Wir berichten hier über die NMR-spektroskopische Charakterisierung der dynamischen Struktur des Fuzzy Coat von htau40, der längsten im zentralen Nervensystem vorliegenden Isoform, welche aus 441 Resten besteht (Abbildung 1a).

Unlösliche Tau-Filamente wurden durch Aggregation von <sup>15</sup>N-markiertem htau40 hergestellt. Auf der Grundlage von 1D-NMR-Diffusionsexperimenten<sup>[14]</sup> berechneten wir für die vorliegenden Tau-Filamente ein Molekulargewicht  $> 1 \text{ MDa}$  (Abbildung 1b). Die Anwendung von 2D-Korrelationsexperimenten (HSQC) in Verbindung mit hochauflösendem

Magic-Angle-Spinning (HR-MAS) (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen)<sup>[15]</sup> resultierte in 260 beobachtbaren Signalen (Abbildung 1c sowie Abbildungen S2 und S3). 244 dieser Signale konnten sequenzspezifisch zugeordnet werden (BMRB-Zugangsnummer 17920; siehe Abbildung S2). Die zugeordneten Signale stammten von der N-terminalen Domäne bis zum Rest Thr212 und vom C-Terminus ab Rest Val399.<sup>[6,16]</sup> In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen<sup>[10]</sup> konnten wir zwischen Thr212 und Val399 keine Signale zuordnen. Dies deutet darauf hin, dass diese Reste zu rigide sind, um mit Lösung-NMR-Spektroskopie detektiert zu werden. Der Vergleich mit monomerem Tau zeigte stark abgeschwächte Signalintensitäten für viele Reste von PHF-Tau (Abbildung 1d,e). Besonders die Abschnitte His121-Lys130 und Met1-Gly37 wiesen trotz ihrer großen Entfernung vom Fibrillenkern signifikante Änderungen in der chemischen Verschiebung und starke Intensitätsverluste auf (Abbildung 1e und Abbildung S2c). In <sup>15</sup>N-Spinrelaxationsexperimenten konnten wir das Auftreten von chemischem Austausch in diesen Regionen nachweisen (Abbildung 1f und Abbildung S3), und in Übereinstimmung damit wurden zusätzliche Signale in der Nähe der Signale mit abgeschwächten Intensitäten gefunden (Abbildung 1f und Abbildung S4). Allerdings konnten diese zusätzlichen Signale aufgrund von Signalüberlappungen und geringem Signal-Rausch-Verhältnis weder mit Triple-Resonanzexperimenten noch mit Austauschexperimenten eindeutig zugeordnet werden. Daher haben wir die zusätzlichen (Neben)-Signale denjenigen Hauptsignalen zugeordnet, welche die größte Ähnlichkeit in der chemischen Verschiebung und der Signalintensität in paramagnetischen (PRE) Experimenten aufwiesen (Abbildung S5). Dagegen zeigte monomeres Tau keine Signalverdopplungen in diesen Bereichen (Abbildung S4).

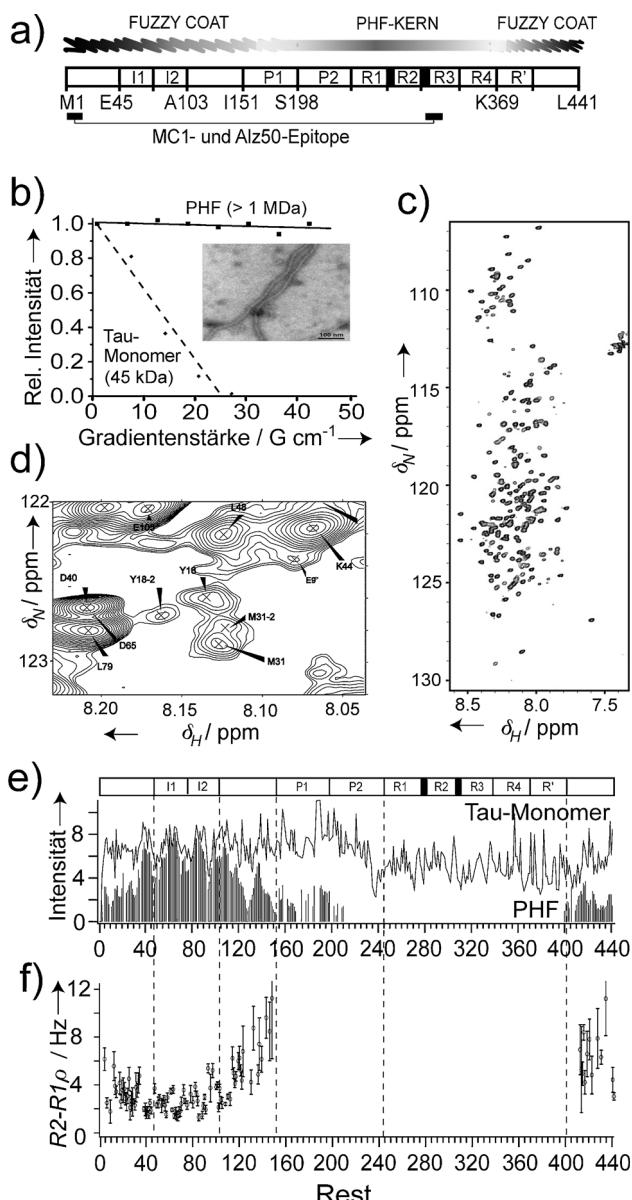
In PRE-Experimenten<sup>[17]</sup> konnte die Natur der PHF-spezifischen Konformationen aufgeklärt werden. Dafür wurden Nitroxidradikale an Cysteine angeheftet, welche sich an verschiedenen Positionen von PHF-Tau befanden. Die Verbreiterung der Amid-Resonanzen aufgrund erhöhter Relaxationsraten durch das paramagnetische Nitroxidradikal wurde quantitativ durch das Intensitätsverhältnis von paramagnetischem und diamagnetischem Zustand bestimmt (Abbildung 2). Der PRE-Effekt hat eine Distanzabhängigkeit von  $r^{-6}$  und bietet somit eine hervorragende Möglichkeit zur Bestimmung von Abständen zwischen Nitroxidradikal und NMR-Spin. <sup>15</sup>N-Relaxationsexperimente offenbarten einen sehr dynamischen Fuzzy Coat. Die kurze Korrelationszeit des Elektron-Proton-Vektors ist vergleichbar mit der eines kleinen wasserlöslichen Proteins. Zuerst wurde ein PRE-Verbreiterungsprofil mit dem Nitroxidradikal an

[\*] S. Bibow, Dr. M. D. Mukrasch, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. M. Zweckstetter  
Abteilung für NMR-basierte Strukturbioologie  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: mzwecks@gwdg.de

S. Chinnathambi, Dr. J. Biernat, Prof. Dr. E. Mandelkow  
Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie  
c/o DESY, Notkestraße 85, 22607 Hamburg (Deutschland)  
und  
DZNE, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen  
und CAESAR, Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Ilka Lindner für exzellente technische Unterstützung und der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt (H. Schwalbe) für die Leihgabe eines 900-MHz-HR-MAS-Probenkopfs. Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft (E.M. und C.G.) und durch die DFG (Heisenberg-Stipendium für M.Z. ZW 71/2-2, 3-2 und 7-1) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201105493> zu finden.



**Abbildung 1.** NMR-spektroskopische Untersuchung der Dynamik des Fuzzy Coat von Tau-Filamenten. a) Schematische Darstellung des aus 441 Resten bestehenden Tau-Proteins mit den Inserts I1 und I2, die durch alternatives Splicing entfernt werden, den prolinreichen Regionen P1 und P2 und den Pseudo-Repeats R1–R4. Oben: Ungefähre Bereiche des Fuzzy Coat und des Fibrillenkerns. Unten: Lage der Epitope (Reste 1–18 und 313–322) für die monoklonalen Antikörper Alz50 und MC1. b) NMR-Diffusionsexperimente an monomerem Tau (gestrichelte Linie) und PHF-Tau (durchgezogene Linie) mit einer Elektronenmikroskopie(EM)-Aufnahme der in dieser Studie verwendeten PHFs. c) 2D-<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum von PHF-Tau. d) Ausgewählte Regionen des HSQC von PHF-Tau für Tyr18 und Met31 zur Verdeutlichung multipler Konformationen. e) Vergleich der Signalintensitäten von PHF-Tau (Balken) und monomerem Tau (Linie). f) Relaxationsraten, die eine erhebliche Beweglichkeit im Zeitbereich  $\mu$ s bis ms für den N-Terminus von Tau-Filamenten zeigen.

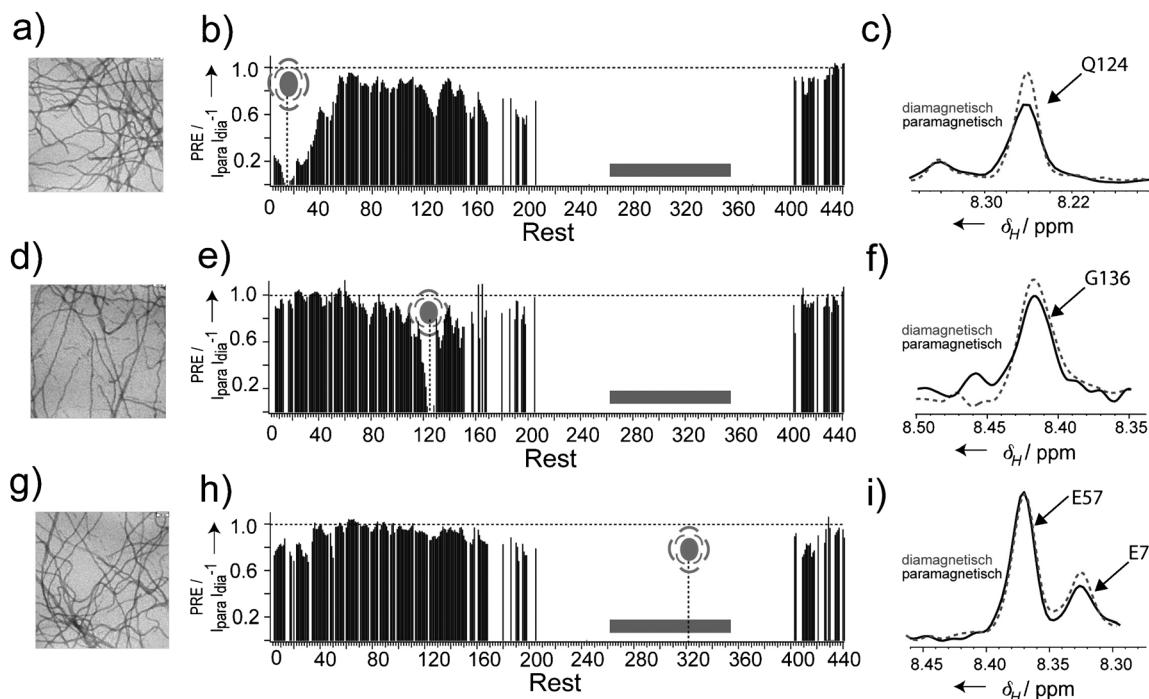
Rest 15 aufgenommen (Abbildung 2a–c): 40 Reste am N-Terminus zeigten eine Signalabschwächung von unter 0.6. Darüber hinaus zeigten die NMR-Messungen für PHF-Tau transiente Kontakte des N-Terminus zu Ala119–Asp133, zur

prolinreichen Region (Ile151–Thr212) und zum C-terminalen Fuzzy Coat (Val399–Ala429). Die Ähnlichkeit des PRE-Profs (Abbildung 2b) mit den absoluten Signalintensitäten (Abbildung 1e) lässt darauf schließen, dass PHF-spezifische Konformationen durch transiente, langreichweitige Wechselwirkungen festgelegt werden. Die Tertiärstruktur des Fuzzy Coat von PHF-Tau wurde darüber hinaus durch paramagnetische Effekte mit einem Nitroxidradikal an Rest 125 charakterisiert (Abbildung 2d–f). Kontrollexperimente zeigten, dass die beobachtbaren PRE-Effekte hauptsächlich intramolekularer Natur sind (Abbildung S6).

Um direkten Einblick in die Wechselwirkungen des Fibrillenkerns mit der N-terminalen Fuzzy Coat zu bekommen, wurde eine Nitroxidradikal an das native Cys322 von PHF-Tau angeheftet (Abbildung 2g–i). Das Radikal an Cys322 induzierte Signalverbreiterungen für die Region um Gln124, die eine transiente helicale Konformation annimmt (Abbildung S7). Des Weiteren zeigten Reste um Ala152, Asn167–Thr212 und Ser409–Ala426 eine signifikante Signalabschwächung. Folglich wechselwirken sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Fuzzy Coat mit dem Fibrillenkern bei Rest 322, in Übereinstimmung mit einem teilweisen Schutz des C-Terminus vor Proteolyse in PHF-Tau.<sup>[18]</sup> Den stärksten PRE-Effekt jedoch konnte man für die ersten 30 Reste des N-terminalen Teils des Fuzzy Coat beobachten, sowohl für die Haupt- als auch die Nebensignale (Abbildung 2h und Abbildung S5c). Unsere Messungen zeigen, dass die NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet ist, um das transiente Netzwerk von langreichweitigen Wechselwirkungen zwischen konservierten Regionen von PHF-Tau aufzuklären.

Um ein besseres Verständnis zum Mechanismus der langreichweitigen Wechselwirkungen in PHF-Tau zu erlangen, mutierten wir die hydrophoben Reste Phe8 und Val10 in PHF-Tau zu Serin. Dies führte zu keinen Veränderungen in den durch chemischen Austausch abgeschwächten Signalintensitäten (Abbildung 3a). Wurden hingegen die Ionenkonzentration erhöht, veränderte sich das Intensitätsprofil von PHF-Tau drastisch und entsprach nun dem des monomeren Tau-Proteins (Abbildung 3b). Nur für die Reste 170–212 und 399–441, die sich in direkter Nachbarschaft zum rigiden Fibrillenkern befinden, blieben die Intensitäten abgeschwächt, sehr wahrscheinlich aufgrund von eingeschränkter Beweglichkeit. Der Einfluss hoher Ionenkonzentration auf das Intensitätsprofil unterstreicht, dass die beobachteten Wechselwirkungen elektrostatischen Ursprungs sind.

Um eine verbesserte Diagnose der Alzheimer-Krankheit zu ermöglichen, wurden Antikörper entwickelt, die Konformationsänderungen von Tau aufdecken sollen.<sup>[19–21]</sup> So erkennen die monoklonalen Antikörper Alz50 und MC1 Konformationsänderungen, die bereits vor der Bildung von PHFs stattfinden, und die dann aber auch in PHFs, jedoch nicht in gesunden Gehirnen, präsent sind.<sup>[20,22]</sup> Die Spezifität von Alz50 und MC1 für pathologisches Tau basiert auf der Erkennung von zwei diskontinuierlichen Epitopen, einem am N-Terminus (Reste 1–18) und einem zweiten in der Repeat-Region (Reste 313–322).<sup>[20,22,23]</sup> Unsere paramagnetischen NMR-Messungen zeigten, dass diese beiden Epitope in PHF-Tau in transientem Kontakt stehen und Teil des langreichweitigen tertiären Netzwerks zwischen Fuzzy Coat und Fibril-



**Abbildung 2.** Transiente langreichweite Wechselwirkungen in Tau-Filamenten. a)–c) Paramagnetische NMR-Experimente an PHFs mit der Nitroxid-Spinmarkierung an Position 15. a) EM-Aufnahme, b) PRE-Profil der Amidprotonen und c) ausgesuchte Region des  ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC im paramagnetischen (schwarze Linie) und diamagnetischen Zustand (graue gestrichelte Linie). Die Intensitätsverhältnisse wurden über drei Reste gemittelt. Abgeschwächte Intensitäten von Signalen, die mehr als 10 Reste von der Spinmarkierung entfernt sind, weisen auf langreichweite Wechselwirkungen ( $< 25 \text{ \AA}$ ) hin. Der durch Festkörper-NMR-Spektroskopie identifizierte Fibrillenkern ist durch einen grauen Balken angezeigt. d)–f) Paramagnetische NMR-Experimente von PHFs mit der Nitroxid-Spinmarkierung an Position 125. g)–i) Paramagnetische NMR-Experimente von PHFs mit der Nitroxid-Spinmarkierung am nativen Cys322.

lenkern sind (Abbildung 2). Der Vergleich mit monomerem Tau zeigte darüber hinaus, dass der am N-Terminus induzierte paramagnetische Effekt in PHF-Tau stärker ist (Abbildung 3c und Abbildung S8). Dies deutet auf eine verstärkte und engere Wechselwirkung dieser beiden Epitope in PHF-Tau hin. Langreichweite, PHF-spezifische Wechselwirkungen wurden auch für die prolinreiche Region, für Reste nahe Met127 sowie den N- und C-Terminus beobachtet. Das Netzwerk langreichweiter Wechselwirkungen erklärt zudem, warum der konformationsspezifische Antikörper Tau66 die Reste 155–244 und 305–314 zur Bindung benötigt,<sup>[24]</sup> sowie die abgeschwächte Bindung von Alz50 und MC1 wenn die Reste 46–241 entfernt wurden.<sup>[25]</sup> Wie oben erwähnt, zeigten Kontrollexperimente, dass die langreichweiten Kontakte trotz der hohen lokalen Konzentration hauptsächlich intramolekularer Natur sind. Das ist in Übereinstimmung mit dem erfolglosen Versuch, intermolekulare Epitope für Alz50 und MC1 herzustellen, indem komplementäre Mutanten mit jeweils einem Epitop kombiniert wurden.<sup>[20,22]</sup>

Es erhärtet sich immer mehr die Erkenntnis, dass nicht Tau-Filamente, sondern Tau-Oligomere für die Neurotoxizität verantwortlich sind.<sup>[26]</sup> Biochemische Studien mit rekombinanten Tau offenbarten eine klare Selektivität für PHF-Tau. Die Bindungsaffinität an PHF-Tau ist mindestens hundertfach höher im Vergleich zu monomerem Tau.<sup>[25]</sup> Zudem binden Alz50 und MC1 auch lösliches abnormales Tau, wel-

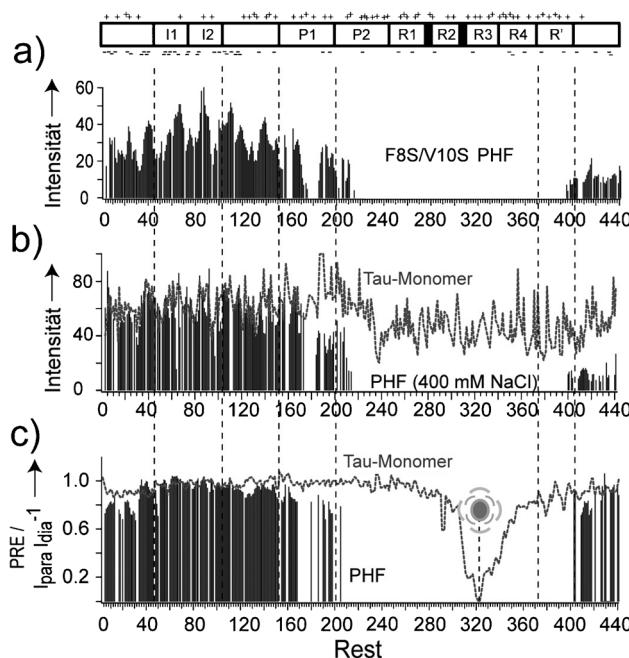
ches konzentrationsabhängig aggregieren kann.<sup>[27]</sup> Das impliziert, dass nicht nur Tau-Filamente, sondern auch Tau-Oligomere durch Alz50 und MC1 erkannt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Epitope für Alz50 und MC1 schon in monomerem Tau in transientem Kontakt stehen, diese Regionen aber in oligomerem und aggregiertem Tau noch enger und stärker wechselwirken (Abbildung 3c). Dies ermöglicht einen spezifischen Erkennungsmechanismus sowohl für Tau-Oligomere als auch PHF-Tau.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, wie der flexible Fuzzy Coat mit dem rigiden Fibrillenkern von Tau-Filamenten wechselwirkt (Abbildung 4). Darüber hinaus liefert unsere Studie Einblick in die Bindung von konformationspezifischen Antikörpern an das Tau-Protein und unterstreicht die Heterogenität der Struktur von Tau-Filamenten.

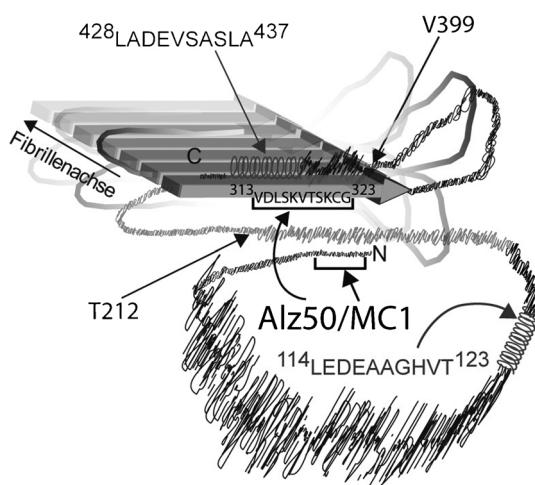
## Experimentelles

Rekombinante Herstellung von Tau. Die Expression, Aufreinigung und Isotopenmarkierung von Wildtyp- und htau40-Mutanten wurde nach etablierten Protokollen durchgeführt.<sup>[28]</sup> Die NMR-Proben enthielten  ${}^{15}\text{N}$ - oder  ${}^{13}\text{C}/{}^{15}\text{N}$ -markiertes Protein in 95 %  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$  und 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.8.

Spinmarkierung von Tau. Die Markierung des Tau-Proteins mit dem Nitroxidradikal MTSL wurde nach etablierten Protokollen durchgeführt.<sup>[28]</sup> Um potentielle intermolekulare Kontakte zu erkennen, wurde eine 1:1-Mischung von unmarkiertem C15A291/G322-htau40 und  ${}^{15}\text{N}$ -markiertem A291/G322-htau40 hergestellt. MTSL



**Abbildung 3.** Abhängigkeit der transienten Wechselwirkungen von der Ionenstärke. a) NMR-Signalintensitäten eines 2D-<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC des mutierten PHF-Tau, in welchem Phe8 und Val10 durch Serine ausgetauscht wurden. b) Vergleich der absoluten NMR-Signalintensitäten von PHF-Tau bei erhöhter Ionenstärke (400 mM NaCl; Balken) und von monomerem Tau (graue gestrichelte Linie). c) Vergleich der PRE-Intensitätsprofile von monomerem Tau (graue gestrichelte Linie) und PHF-Tau (Balken), wenn eine Nitroxid-Spinmarkierung an das native Cys322 angeheftet wurde. Abgeschwächte PRE-Signalintensitäten am N-Terminus für PHF-Tau zeigen engere transiente Kontakte an. Oben in der Abbildung: die Domänenorganisation von htau40 mit der Verteilung von positiven und negativen Ladungen.



**Abbildung 4.** Modell des Netzwerks von PHF-spezifischen, langreichweiten Wechselwirkungen. Regionen mit transienter helicaler Struktur sind eingezeichnet. Der durch Festkörper-NMR-Spektroskopie identifizierte fibrilläre Kern ist durch Balken mit Pfeilköpfen angedeutet. Höhere NMR-Signalintensitäten sind durch größere Amplituden der Proteinkette angedeutet. Die räumliche Nähe zwischen verschiedenen Teilen der Proteinkette ist entsprechend den paramagnetischen Experimenten eingezeichnet. Die zwei diskontinuierlichen Epitope für Alz50 and MC1, Reste 1–18 und 313–322, sind angezeigt.

wurde dabei an das unmarkierte C15A291/G322-htau40 vor der Mischung und Aggregation angeheftet.

Herstellung von Tau-Filamenten. Tau-Filamente von Wildtyp- und mutiertem htau40 wurden hergestellt, indem <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N- oder <sup>15</sup>N-markiertes Protein (ca. 1.5 mM) mit Heparin 5000 (Heparin/Tau 1:4) gemischt und anschließend bei 37 °C 4 Tage inkubiert wurde. Das Reaktionsprodukt wurde dann bei 160000 g 40 min pelletiert. Anschließend wurde der Proteinüberstand erneut mit Heparin 5000 (Heparin/Tau 1:4) gemischt und bei 37 °C 4 Tage inkubiert. Um verbleibendes, monomeres Tau zu entfernen, wurde das Pellet ultrazentrifugiert, mit frischem Puffer (ohne Heparin) gewaschen und wieder ultrazentrifugiert (40000 rpm, 4 °C, 40 min). Diese Schritte wurden mindestens dreimal vor der eigentlichen NMR-Messung wiederholt. In 1D-NMR-Spektren konnte kein monomeres Tau nachgewiesen werden (siehe Abbildung S1).

NMR-Spektroskopie. Die NMR-Experimente wurden an einem 900-MHz-NMR-Spektrometer (Bruker) bei 278 K durchgeführt. NMR-Proben enthielten etwa 40–80 mg htau40-Filamente in einem Volumen von 60 µL. Ein 3D-HNCA-Experiment wurde mit einer HR-MAS-Drehfrequenz von 6 kHz mit 2048 × 68 × 88 Punkten (<sup>1</sup>H × <sup>13</sup>C × <sup>15</sup>N) aufgenommen (Dauer: 4 Tage und 3 Stunden). PRE-Effekte wurden mittels der Signalintensitätsverhältnisse von zwei 2D-[<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-NMR-Spektren von PHF-Tau bestimmt. Dabei wurde ein Spektrum mit angeheftetem MTSL aufgenommen und ein zweites mit abgespaltenem MTSL (nach Zugabe von 4 mM DTT (Dithiothreitol) und anschließendem Erhitzen auf 42 °C für 30 min).

Eine vollständige Methodenbeschreibung ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 3. August 2011  
Online veröffentlicht am 11. Oktober 2011

**Stichwörter:** Aggregation · Alzheimer-Krankheit · Fuzzy Coat · Gepaarte helicale Filamente · Tau-Protein

- [1] C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 663–672.
- [2] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 101–112.
- [3] S. A. Small, K. Duff, *Neuron* **2008**, 60, 534–542.
- [4] H. Braak, E. Braak, *Acta Neuropathol.* **1991**, 82, 239–259.
- [5] J. Berriman, L. C. Serpell, K. A. Oberg, A. L. Fink, M. Goedert, R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9034–9038.
- [6] O. C. Andronesi, M. von Bergen, J. Biernat, K. Seidel, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5922–5928.
- [7] C. M. Wischik, M. Novak, P. C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, R. A. Crowther, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4884–4888.
- [8] T. A. Schoenfeld, R. A. Obar, *Int. Rev. Cytol.* **1994**, 151, 67–137.
- [9] M. Margittai, R. Langen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 10278–10283.
- [10] A. Sillen, J. M. Wieruszewski, A. Leroy, A. B. Younes, I. Landrieu, G. Lippens, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10138–10139.
- [11] Y. Wang, S. Garg, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, 38, 955–961.
- [12] N. E. LaPointe, G. Morfini, G. Pigino, I. N. Gaisina, A. P. Kozikowski, L. I. Binder, S. T. Brady, *J. Neurosci. Res.* **2009**, 87, 440–451.
- [13] P. M. Horowitz, N. LaPointe, A. L. Guillozet-Bongaarts, R. W. Berry, L. I. Binder, *Biochemistry* **2006**, 45, 12859–12866.
- [14] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288–292.
- [15] A. N. Garroway, *J. Magn. Reson.* **1982**, 49, 168–171.
- [16] Lit. [10].
- [17] J. R. Gillespie, D. Shortle, *J. Mol. Biol.* **1997**, 268, 170–184.

- [18] M. von Bergen, S. Barghorn, S. A. Muller, M. Pickhardt, J. Biernat, E. M. Mandelkow, P. Davies, U. Aebi, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6446–6457.
- [19] E. M. Sigurdsson, *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 446–450.
- [20] G. A. Jicha, R. Bowser, I. G. Kazam, P. Davies, *J. Neurosci. Res.* **1997**, *48*, 128–132.
- [21] M. Mercken, M. Vandermeeren, U. Lubke, J. Six, J. Boons, A. Van de Voorde, J. J. Martin, J. Gheuens, *Acta Neuropathol.* **1992**, *84*, 265–272.
- [22] G. Carmel, E. M. Mager, L. I. Binder, J. Kuret, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 32789–32795.
- [23] G. A. Jicha, B. Berenfeld, P. Davies, *J. Neurosci. Res.* **1999**, *55*, 713–723.
- [24] N. Ghoshal, F. Garcia-Sierra, Y. Fu, L. A. Beckett, E. J. Mufson, J. Kuret, R. W. Berry, L. I. Binder, *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 1372–1385.
- [25] G. A. Jicha, R. Bowser, I. G. Kazam, P. Davies, *J. Neurosci. Res.* **1997**, *48*, 128–132.
- [26] A. de Calignon, L. M. Fox, R. Pitstick, G. A. Carlson, B. J. Bacska, T. L. Spires-Jones, B. T. Hyman, *Nature* **2010**, *464*, 1201–1204.
- [27] C. L. Weaver, M. Espinoza, Y. Kress, P. Davies, *Neurobiol. Aging* **2000**, *21*, 719–727.
- [28] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e34.