



GM₁-Gangliosid hemmt die β -Amyloid-Oligomerisation, während Sphingomyelin diese initiiert

Mariana Amaro,* Radek Šachl, Gokcan Aydogan, Ilya I. Mikhalyov, Robert Vácha und Martin Hof*

Abstract: β -Amyloid(A β)-Oligomere sind neurotoxisch und werden mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht. Es wird davon ausgegangen, dass neuronale Plasmamembranen die Entstehung dieser A β -Oligomere im lebenden Organismus verursachen. In Studien unter extremen, unphysiologischen Bedingungen wurde gezeigt, dass die Membrankomponenten Sphingomyelin und Gangliosid-GM₁ die Aggregation von A β begünstigen. Hier zeigen wir, dass physiologischen Konzentrationen von GM₁-Molekülen, die in Nanodomänen organisiert sind, die Oligomerisation von A β_{40} -Monomeren nicht begünstigen. Wir zeigen ebenfalls, dass das Lipid Sphingomyelin die Oligomerisation von A β_{40} initiiert und dass GM₁ dem entgegenwirkt und somit der Oligomerisation vorbeugt. Die präventive Rolle von GM₁ in der Oligomerisation von A β_{40} deutet darauf hin, dass sinkende Konzentrationen von GM₁ im Gehirn, welche z. B. während des Altern festgestellt wurden, den Schutz gegen A β -Oligomerisation beeinträchtigen und zur Alzheimer-Krankheit führen könnten.

Oligomere des β -Amyloid(A β)-Peptids verursachen neuronale Dysfunktion, Zelltod und Alzheimer-Krankheit (AD).^[1] Die Oligomerisation von A β tritt spontan bei hoher Konzentration in Lösung auf.^[2] Jedoch ist es wahrscheinlich, dass Plasmamembranen die Oligomerisation von nanomolaren (nM) Konzentrationen von A β im Gehirn auslösen.

Es wurde gezeigt, dass Sphingomyelin (Sph) die durch Membranen verursachte Aggregation von mikromolaren Konzentrationen von A β begünstigt. Diese In-vitro-Studien nutzten entweder starre Lipiddoppelschichten bestehend aus

Sph und Sph/Cholesterol (Chol) (Gel- und geordnete Flüssigphasen)^[3] oder phasenseparierte ternäre Lipidmischungen.^[4a] Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Aggregation von A β bevorzugt in der makroskopischen geordneten Flüssigphase („liquid ordered phase“) auftritt.^[4] Es ist deshalb unklar, ob Sph einen spezifischen Effekt hat, oder ob die Aggregation durch den physikalischen Zustand der Membran begünstigt wird. Eine andere Komponente der neuronalen Membranen, welche die Aggregation von A β verstärken soll, ist das Monosialogangliosid GM₁. Es wurde angenommen, dass so genannte GM₁-Cluster die Bildung von Amyloid-Fibrillen initiieren und somit an der Entstehung von AD beteiligt sind.^[5] Allerdings wurden in diesen In-vitro-Studien GM₁-Konzentrationen von über 20 Mol-% eingesetzt, obwohl die gesamte Expression von Gangliosiden in den neuronalen Zellen unter 10 Mol-% der gesamten Membranlipide liegt.^[6] Nachgewiesene Konzentrationen von GM₁, dem häufigsten Gangliosid in Neuronen, liegen bei 2–4 Mol-%.^[7] Es ist von entscheidender Relevanz für diese Arbeit, dass die Gangliosid-Konzentration im Gehirn mit der Entstehung von AD abnimmt und darüber hinaus neuere Arbeiten darauf hinweisen, dass GM₁ neuroprotektiv und neurorestorativ wirkt.^[8] Während neue Forschungsergebnisse klar zeigen, dass GM₁ die Toxizität der A β -Peptide in vivo reduzieren kann, fehlt bisher eine Erklärung auf molekularer Ebene.^[8a,9]

Die in den genannten In-vitro-Studien verwendeten Modellmembranen sind sehr starr und werden gemeinhin als Modelle für zelluläre Membran-„Rafts“ genutzt. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass eine vergleichbare Starrheit wie in diesen In-vitro-„Rafts“-Systemen bisher nicht in lebenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Heutzutage wird zunehmend akzeptiert, dass zelluläre „Rafts“ nicht als starre, vollständig geordnete („liquid ordered“) Bereiche gesehen werden, sondern als dynamische nanoskopische Einheiten.^[10]

Hier wird erörtert, wie Sph und GM₁ die Oligomerisation von A β_{40} im Inneren der Membran auf molekularer Ebene beeinflussen. Durch die Verwendung kontrollierter Modellsysteme legen wir besonderen Wert auf physiologische relevante experimentelle Bedingungen, indem wir folgende Bedingungen einhalten: a) nM-Konzentrationen von fluoreszenzmarkierten A β_{40} -Monomeren (ähnlich zu den Bedingungen im Gehirn); b) GM₁-Niveaus von maximal 4 Mol-% (vergleichbar zu dem Niveau von GM₁ in Neuronen);^[7] c) Modellmembranen von hoher Komplexität, die fluide Nanoheterogenitäten und nicht makroskopische Phasentrennungen zeigen.^[10] Unsere Einzelmolekülfluoreszenzexperimente weisen eindeutig die spezifische Initiierung der A β_{40} -Oligomerisation durch Sph und deren Inhibierung durch GM₁

[*] Dr. M. Amaro, Dr. R. Šachl, G. Aydogan, Prof. M. Hof
J. Heyrovský Inst. Physical Chemistry of the A.S.C.R. v.v.i.
Prag (Tschechien)
E-Mail: amaro@jh-inst.cas.cz
hof@jh-inst.cas.cz

Dr. I. I. Mikhalyov
Shemyakin-Ovchinnikov Inst. Bioorganic Chemistry of the R.A.S.
Moskau, GSP-7 (Russland)

Dr. R. Vácha
Faculty of Science and CEITEC, Masaryk University
Brno (Tschechien)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603178> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution-NonCommercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

nach. Wir schlagen ein molekulares Modell vor, das die Mechanismen erklärt, die diesem Wechselspiel von Initiierung und Inhibierung zugrundeliegen. Dieses Modell wird von Moleküldynamiksimulationen gestützt.

Die verwendeten A β -Lösungen waren 12 nm Monomer-Dispersionen [von A β_{40} -HiLyteFluor488 (g-A β) und/oder A β_{40} -HiLyteFluor647 (r-A β)]. Der monomere Charakter konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt werden und wurde durch Messungen des 3D-Diffusionskoeffizienten von A β in Lösung gestützt (siehe die Hintergrundinformationen). Die Oligomerisation von A β wurde durch die Verfolgung des lateralen Diffusionskoeffizienten (D_{2D}) mittels Z-Scan-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Z-FCS) und Kreuzkorrelations-FCS (FCCS) nachgewiesen. Z-FCS liefert sowohl präzise als auch absolute Diffusionskoeffizienten und überwindet die Positions- und Kalibrierprobleme von FCS-Messungen in planaren Systemen. Darüber hinaus ermöglicht es Z-FCS, gleichzeitig zwei- und dreidimensionale Diffusionen zu verfolgen.^[11] FCS-Daten für A β wurden mittels eines Modells ausgewertet, das zwei- und dreidimensionale Diffusionsanteile enthielt, um den Anteil der Peptide, die ungebunden von der Lipid-Membran in Lösung verblieben, zu berücksichtigen (Note SI-1). Um FCCS-Experimente durchzuführen, wurden g- und r-A β -Monomerlösungen im Verhältnis 1:1 vermischt. Solche FCCS-Experimente weisen direkt die Codiffusion von verschieden markierten Peptiden nach. Mit dieser Methode wird somit die Bildung von Oligomeren zweifelsfrei nachgewiesen. Um zu zeigen, dass das monomere A β -Moleküle bei nM-Konzentrationen an neutrale Lipiddoppelschichten binden, wurden Z-FCS-Zweifarbexperimente an großen unilamellaren Vesikel (GUVs), hergestellt aus DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin), POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin), OSPC (1-Oleoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und DOPC/Chol-Gemischen, durchgeführt. Das g-A β band an diese Modellmembranen und diffundierte frei in der Ebene in allen untersuchten Membransystemen. Darüber hinaus, wird die laterale Diffusion des Peptids durch die Membranviskosität beeinflusst, die im gleichen Experiment mithilfe des Lipid-Fluoreszenztracers DiD (Abbildung S3) bestimmt wurde. Die laterale Diffusion von A β änderte sich nicht innerhalb von Stunden, was darauf schließen lässt, dass es bei Bindung an diese einfachen Membranmodelle zu keiner Peptid-Oligomerisation kommt (Abbildung S3). Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, in Übereinstimmung mit der Fachliteratur, dass die Fluoreszenzmarkierung nicht von alleine die Oligomerisation von A β herbeiführt.^[2b]

In unserem Bestreben, physiologische Bedingungen nachzubilden, verwendeten wir Lipiddoppelschichten, die aus den essentiellen Lipiden der neuronalen Plasmamembranen (DOPC, Chol, Sph und GM₁) zusammengesetzt wurden. Es wurde besonders darauf geachtet, die Phasentrennung zwischen geordneten (Lo) und ungeordneten (Ld) Flüssigphasen zu vermeiden, da die Lo-Phase physiologisch irrelevant erscheint.^[10] Die aus drei Lipiden bestehenden Lipiddoppelschichten [DOPC, 25 Mol-% Chol und (5, 8, 10) Mol-% Sph] sind laut dem Phasendiagramm unter dem makroskopischen Phasenseparationspunkt (Note SI-2). Trotzdem setzten wir

eine Förster-Energietransfer-Methode (FLIM-FRET) ein, welche die Bestimmung der Größe von Lipiddomänen im Nanometerbereich ermöglicht.^[12] Diese Methode könnte eine eventuelle Existenz von Phasenseparation unterhalb der optischen Auflösungsgrenze nachweisen. Bei dieser Methode bestimmt man den Fluoreszenzzerfall des Donors aus FLIM-Daten und analysiert die Daten anschließend durch Monte-Carlo-Simulation (Note SI-3).^[13] Die Messungen der Donor-Akzeptor-Paare FL- und 564/570-bodipy-„head-labeled“ GM₁-Moleküle (g- und r-GM₁) wurden wie in Lit. [12] beschrieben ausgeführt und analysiert (Note SI-3). Wichtig ist auch, dass g-/r-GM₁ nicht von alleine solche Cluster oder Domänen bilden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse der Monte-Carlo-Simulation von FLIM-FRET-Daten für das Donor-Akzeptor-Paar FL- und 564/570-bodipy-„head-labeled“ GM₁. Angaben der Lipidkomponenten in Mol-%. Alle Zusammensetzungen enthielten 2% biotinylierte Lipide zur Immobilisierung von GUVs. Der Begriff „Domäne“ bezieht sich auf die Simulationsterminologie.

DOPC [%]	Sph [%]	Chol [%]	Markiertes GM ₁ [%]	Zusätzliches unmarkiertes GM ₁ [%]	Domänenradius [nm]	Domänenfläche [%]
100	0	0	1	0	Homogen	
75	0	25	1	0	Homogen	
95, 92	5, 8	0	1	0	Homogen	
90	10	0	1	0	8 ± 1 ^[a]	37 ± 10 ^[a]
					12 ± 3 ^[a]	55 ± 5 ^[a]
70, 67, 65	5, 8, 10	25	1	0	9 ± 1	45 ± 5
100	0	0	1	1, 2, 4	6 ± 1	40 ± 10
75	0	25	1	1, 2, 4	6 ± 1	40 ± 10
70, 67, 65	5, 8, 10	25	1	1, 2, 4	26 ± 2	30 ± 5

[a] Zwei globale Minima erhalten.

Die FLIM-FRET-Daten zeigten, dass Gemische aus DOPC/Chol/Sph Heterogenitäten mit einem durchschnittlichen Radius von 9 nm aufweisen (Abbildung S5a). Die Größe dieser „Domänen“ ändert sich nicht bei Erhöhung des Sph-Gehalts (Tabelle 1). FLIM-FRET-Experimente des Donor-Akzeptor-Paares g-GM₁ und DiD zeigen, dass der klassische „Ld-marker“ DiD nicht von den Nanoheterogenitäten ausgeschlossen wird (Abbildung S6a). Das weist darauf hin, dass keine signifikante Lo/Ld-Phasenseparation DiD und g-GM₁ auseinanderzieht (die verschiedene Affinitäten hinsichtlich der Lo-Phase haben). Zudem zeigen Z-FCS-Messungen, dass die Diffusion von DiD die Erhöhung des Sph-Gehalts wahrnimmt und die Mobilitäten von sowohl DiD als auch g-GM₁ signifikant höher sind als in der Lo-Phase^[11] (Abbildung 1a). Wir schließen daraus, dass, obwohl die DOPC/Chol/Sph-Doppelschichten Nanoheterogenitäten enthalten, die FLIM-FRET und FCS-Ergebnisse für g-GM₁/DiD zeigen, dass es sich bei diesen Nanoheterogenitäten um keine Lo-Phase handelt. Vielmehr weisen die Experimente darauf hin, dass solche „Nanorafts“ als fluid angesehen werden müssen. Dieses Ergebnis ist sicher auch für die neuere Bewertung der „Raft“-Theorie relevant.

A β oligomerisierte spontan, sobald es an DOPC/Chol/Sph-GUVs bindet. Eine zeitabhängige Veränderung der

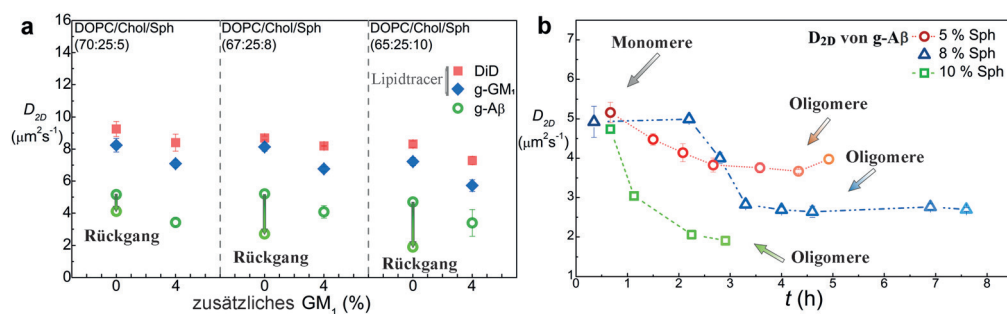


Abbildung 1. a) Laterale Diffusionskoeffizienten, D_{2D} , von membranebundenem Aβ (g-Aβ) und Lipid-Tracer (DiD und g-GM₁) in DOPC/Chol/Sph-GUVs mit 0% oder 4% GM₁. Ein 2D-Komponentenmodell beschreibt die Diffusion von Aβ und Lipid-Tracern gut. D_{2D} von Aβ sinkt mit der Zeit (Pfeilsymbole; siehe nächste Tafel) in DOPC/Chol/Sph-Doppelschichten, was auf die Oligomerisation von Aβ hinweist. Im quaternären System [(DOPC/Chol/Sph) + 4%GM₁] wird keine Veränderung der Aβ-Diffusion beobachtet. b) Zeitliche Entwicklung für D_{2D} von membranebundenem Aβ (t ; 0 h, Zugabe von Aβ-Monomeren). DOPC/Chol/Sph-Zusammensetzung: Kreise (70:25:5); Dreiecke (67:25:8); Quadrate (65:25:10). Jeder Punkt ist der gewichtete Mittelwert der D_{2D} -Ergebnisse, erlangt von mindestens 5 unabhängigen Zweifarben-Z-FCS-Messungen (jeweils zusammengesetzt aus 15–20 Scans). Fehlerbalken sind die Standardabweichung der D_{2D} -Ergebnisse, erhalten von jeder gemessenen Zusammensetzung. In den Fällen, in welchen sich D_{2D} von Aβ mit der Zeit ändert, stellen die Fehlerbalken für die Aβ-Werte die geschätzte Standardabweichung dar, die durch das Anpassen von 15 Z-FCS erhalten wurden.

Diffusion von gebundenem Aβ findet man nur in Sph enthaltenen Doppelschichten (Abbildung 1). Die zeitabhängige Veränderung der Diffusion (Abbildung 1b) kommt einem typischen Profil von Aggregationsphänomenen nahe.^[14] FCCS-Experimente wurden durchgeführt, um die Oligomerisation als Grund für die beobachtete zeitabhängige Abnahme des Diffusionskoeffizienten von Aβ zu bekräftigen. Nach der Zugabe des monomeren g-/r-Aβ-Gemisches zu den DOPC/Chol/Sph-Membranen, erhöhte sich die Amplitude der Kreuzkorrelationsgleichung (G_x) mit der Zeit (Abbil-

dung 2). Diese Daten implizieren die Entstehung von Hybrid-Oligomeren aus g-/r-Aβ und zeigen, dass sich die Wahrscheinlichkeit, Oligomere zu finden, mit der Zeit erhöht. Die Kreuzkorrelationsfunktionen sind nicht alle parallel zueinander (Abbildung 2b), was eine heterogene Menge an Oligomeren suggeriert. Gleichmaßen wurden, ebenfalls unter dem Phasenseparationspunkt (Note SI-2), FCCS-Experimente an GUVs aus DOPC und Sph (5, 8, 10 Mol-%) durchgeführt. Im binären System konnte FLIM-FRET keine Heterogenitäten von Sph unter 10 Mol-% nachweisen (Tabelle 1). Die Ergebnisse der Kreuzkorrelation zeigen, dass einzelne Aβ-Moleküle spontan in den DOPC/Chol-Doppelschichten oligomerisieren, allerdings nicht in den reinen DOPC- und DOPC/Chol-Membranen (Abbildung 2, Abbildung S3 und S4). Als eine Parallele zu dem binären DOPC/Sph-System nutzten wir eine Doppelschicht aus DOPC/DSPC (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) unter dem Phasenseparationspunkt (Note SI-2). DSPC ist ein Glycerollipid analog zu Sph (d.h., es hat dieselbe Kopfgruppe, aber die ähnlichen Fettsäuren-

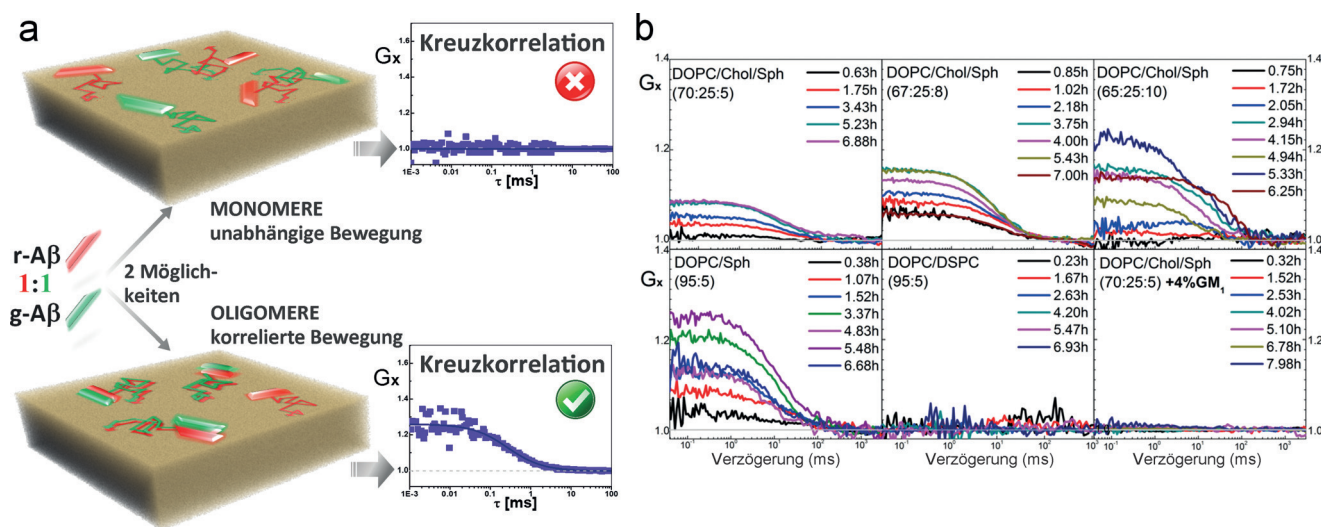


Abbildung 2. a) Illustration des Kreuzkorrelationsexperiments mit einer 1:1-Mischung aus r- und g-Aβ-Monomeren. Oben: Membranebundene r- und g-Aβ-Monomere diffundieren frei; daraus folgt, dass die Fluktuationen des roten und des grünen Signals nicht miteinander korrelieren, was in einer Null-Kreuzkorrelationsfunktion resultiert (G_x), d.h. $G_x = 1$. Unten: Die Bildung von Aβ-Oligomeren impliziert die Codiffusion der Peptide. Wenn Oligomere aus sowohl r- als auch g-Aβ gebildet werden, korrelieren rote und grüne Signalfuktuationen, und es resultiert eine positive Kreuzkorrelation, d.h. $G_x > 1$. b) Zusammenfassung der Ergebnisse. Oben: DOPC/Chol/Sph-Membranen zeigen positive Kreuzkorrelation. Unten links: DOPC/Sph-Doppelschichten zeigen positive Kreuzkorrelation, Beispiel DOPC/Sph (95:5). Unten Mitte: DOPC/DSPC-Membranen zeigen keine Kreuzkorrelation, Beispiel DOPC/DSPC (95:5). Unten rechts: DOPC/Chol/Sph + GM₁-Doppelschichten zeigen keine Kreuzkorrelation, Beispiel [DOPC/Chol/Sph (70:25:5) + 4%GM₁].

ketten sind mit einem Glycerolrest überbrückt). Die Kreuzkorrelationsexperimente mit DSPC enthaltenden Doppelschichten zeigten keine Oligomerisation von A β (Abbildung 2).

Unsere Forschungsergebnisse zeigen eine spezifische Rolle von Sph in der A β -Oligomerisation. Devanathan et al.^[4a] hatten vorgeschlagen, dass die Aggregation von an die Membran gebundenem A β durch Sph, das sich in der Gelphase, gel/Lo- oder Lo/Ld-phaseseparierten Lipiddoppelschichten befindet, begünstigt werden könnte (allerdings unter Verwendung von μ M-Konzentrationen von A β , das wahrscheinlich bereits im oligomeren Zustand vorliegt). Wir zeigen hier zum ersten Mal, dass Sph spezifisch die Oligomerisation von an Membran gebundenen A β -Monomeren (bei physiologisch relevanten Konzentrationen) initiiert. Die Modellsysteme, welche Ld-artige, fluide Nanoheterogenitäten enthalten, schließen eine vermeintliche Auswirkung der Lo-Phase aus und bekräftigen die direkten Auswirkungen von Sph auf die Oligomerisation.

In der Literatur wurde vorgeschlagen, dass so genannte Cluster von GM₁ eine Membranbindungsstelle für A β sind. Diese Bindung von A β an GM₁ sollte dann direkt die Bildung von Amyloidfibrillen initiieren.^[5] Kakio und Mitarbeiter beobachteten eine verstärkte Initiierung und schnelle Fibrillenbildung aus A β an Modellmembranen, die GM₁ enthielten.^[15] Die verwendeten Doppelschichten enthielten 20 Mol-% GM₁. Das hatte zur Folge, dass die Oberfläche der Doppelschichten von den Zucker-Kopfgruppen des Gangliosids vollständig bedeckt war.^[16] Dieses Modellsystem gibt die physiologischen Bedingungen nicht getreu wieder: Bei physiologischen GM₁-Konzentrationen (≤ 4 Mol-%) ist die Doppelschicht eine flüssige Phase mit GM₁-angereicherten „Insel-ähnlichen“ Strukturen.^[16] Wir haben bereits gezeigt,^[12] dass GM₁ (1–4 Mol-%) in freistehenden DOPC- und DOPC/Chol(70:30)-Doppelschichten Cluster mit einem Radius von 5–7 nm bildet. Solche GM₁-Cluster enthalten große Mengen an DOPC und Chol und zeigen keine Charakteristiken der Lo-Phase. Es ist deshalb entscheidend, auch in In-vitro-Studien physiologischen Mengen von GM₁ zu verwenden, um die vollständige und unphysiologische Bedeckung der Membranoberfläche mit Zucker-Kopfgruppen zu vermeiden.

In weiteren Experimenten wurden zusätzlich 4 Mol-% GM₁ in die vorher beschriebenen DOPC/Chol/Sph hinzugefügt. Die Beigabe von GM₁ führte zu einer Vergrößerung des Radius der Heterogenitäten in den Doppelschichten, von 9 bis zu 26 nm (Tabelle 1, Abbildung S5b). FLIM-FRET-Experimente mit g-GM₁ und DiD wiederum zeigen, dass DiD nicht von den GM₁ enthaltenden Heterogenitäten ausgeschlossen wird (Abbildung S6b). Die Beigabe von GM₁ verlangsamte die Diffusion von g-GM₁ und DiD (Abbildung 1). Wie bereits in den DOPC/Chol/Sph-Doppelschichten, zeigten die FLIM-FRET- und FCS-Ergebnisse keinen Hinweis auf eine nanoskopische Lo-Phase.

Die Inkubation von A β mit den quaternären Lipidmembranen führt bemerkenswerterweise zu keinem Hinweis auf A β -Oligomerisation. In den DOPC/Chol/Sph-Membranen, die zusätzlich 4 Mol-% GM₁ enthalten, ist der Diffusionskoeffizient von A β über die Dauer des Experiments (9 h) stabil (Abbildung 1). Überdies bestätigen die FCCS-Ergebnisse das

Ausbleiben der Oligomerisation von A β in den im Gangliosid enthaltenen Doppelschichten (Abbildung 2). Das Verhalten von A β wurde ebenfalls in GUVs von DOPC und DOPC/Chol (75:25) untersucht, die 4 Mol-% GM₁ in der Form von Nanoclustern (Radius ≈ 6 nm, Tabelle 1) enthielten.^[12] Diese Nanocluster haben keinen Effekt auf die laterale Diffusion von A β , und es kommt zu keiner Oligomerisation (Abbildung S4). Im Unterschied zu den Arbeiten, in denen hohe Konzentrationen von GM₁^[5,15] genutzt wurden, initiieren niedrigere und damit physiologische Mengen an Gangliosiden keine Oligomerisation von A β . Darüber hinaus verhindert die Präsenz von GM₁ de facto die spontane Oligomerisation von A β , die in den DOPC/Chol/Sph-Membranen beobachtet wurde.

Um die Mechanismen der Initiierung der Oligomerisation von A β durch Sph auf molekularer Ebene zu verstehen, führten wir Moleküldynamiksimulationen der Peptide in den Lipiddoppelschichten von DOPC und DOPC/Sph (90:10) durch (siehe Abbildung S7 bis S19). Abbildung S8 stellt die finalen Konfigurationen von A β nach 1.5 μ s in acht unabhängigen Simulationen dar. Der C-Terminus von A β scheint in Gegenwart von Sph eine höhere Tendenz zu haben, ein β -Faltblatt zu bilden (Abbildung S14). Die β -Faltblatt-Konformation von A β entfaltet ganz oder teilweise innerhalb 1 μ s, wenn diese in einer reinen DOPC-Membran positioniert wird (Abbildung S15). Diese Instabilität der β -Faltblatt-Konformation weist auf die spezifische Rolle von Sph als Induktor der Konformationsänderung hin.

Unsere Simulationen von A β in einer GM₁ enthaltenden DOPC-Doppelschicht demonstrieren eine starke Wechselwirkung zwischen A β und dem Gangliosid, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien^[17] (Abbildung S20). A β bindet spezifisch an den Zuckerrest des GM₁, wobei die Wasserstoffbrücken des Histidinrests eine wichtige Rolle spielen.^[17b] Die starke Bindung von A β zu GM₁ und die Beteiligung der β -Faltblatt-Reste an der Bindung könnten erklären, warum es A β nicht möglich ist, an den DOPC/GM₁- (und DOPC/Chol/GM₁-) Membranen zu oligomerisieren. Die Anziehung der Peptide durch GM₁ würde ebenfalls erklären, warum die Zugabe einer geringen Konzentration von GM₁ zu DOPC/Chol/Sph-Membranen effektiv die Oligomerisation von A β verhindern kann. Dagegen kann eine hohe Oberflächendichte von GM₁ (> 20 Mol-%) die Aggregation beschleunigen.^[5] Bei solchen Gangliosidkonzentrationen ist die Doppelschicht mit Zuckerköpfen von GM₁ bedeckt,^[16] wobei eine starke Wechselwirkung zwischen A β und Gangliosiden zu einer hohen Oberflächenkonzentration von Peptiden und einer beschleunigten Aggregation durch generische Oberflächeneffekte führt.^[18]

Zusammengefasst haben wir gezeigt, dass Sph ein spezifischer Auslöser für die Oligomerisation von A β_{40} ist, und dass physiologische Konzentrationen von GM₁ diesem Effekt entgegenwirken. Das Peptid oligomerisiert in DOPC/Chol/Sph- und DOPC/Sph-Doppelschichten, aber nicht in DOPC-, DOPC/Chol- oder DOPC/DSPC-Doppelschichten (Abbildung 3a). Die Präsenz von Sph verursacht signifikante Veränderungen in den Eigenschaften der Doppelschichten, wie in unseren Experimenten und Simulationen gezeigt wurde (Abbildung S16 bis S19). Interessanterweise sind DOPC/

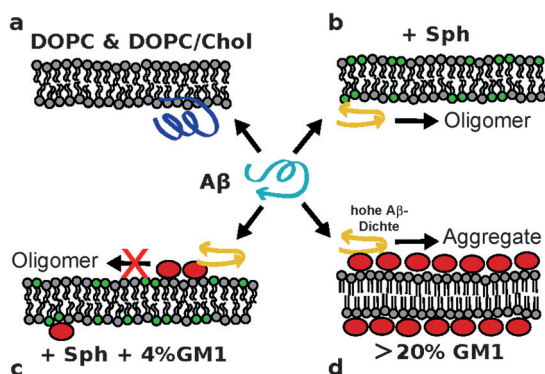


Abbildung 3. Vorgeschlagenes Modell. a) Aβ oligomerisiert nicht, wenn es an DOPC- und DOPC/Chol-Doppelschichten gebunden ist. Der C-Terminus von Aβ hat keine Sekundärstruktur (dunkelblau). b) Oligomerisation von Aβ geschieht in Gegenwart von Sph, für DpPC/Sph- und DOPC/Chol/Sph-Membranen. Der C-Terminus des monomeren Aβ zeigt β -Faltblatt-Strukturen (gelb) gebunden an Doppelschichten, die Sph beinhalten. c) Die Bindung von Aβ an die Kopfgruppe von GM₁ (rote Ellipse) fängt die Peptide ab und hält sie davon ab, Oligomere zu bilden. d) Die hohe Dichte von GM₁ und Aβ erleichtert die Aggregation der Peptide und die Fibrillenbildung (aus der Fachliteratur),^[5] was durch generische Oberflächeneffekte erklärt werden kann.^[18]

Chol/Sph-Mischungen durch transiente fluide Nanoheterogenitäten charakterisiert, wobei das gesamte System sich in der Ld-Phase befindet. Simulationen zufolge scheint Aβ in der DOPC/Sph-Doppelschicht eine Konformation mit einer größeren Zahl an β -Faltblatt-Strukturen einzunehmen als in der reinen DOPC-Membran. Mit dem Wissen, dass β -Faltblatt-Strukturen in supramolekularen Verbindungen wichtig sind, kann eine von Sph verursachte Konformationsänderung von Aβ die beobachteten Unterschiede in der Oligomerisation erklären: keine Oligomerisation in DOPC-, DOPC/Chol- oder DOPC/DSPC-Doppelschichten und ein effektiver Oligomerisierungsprozess innerhalb weniger Stunden in Sph enthaltenden Membranen (Abbildung 3 a,b).

Die Bindung von Aβ zu GM₁ kann die Oligomerisation beschleunigen oder verlangsamen, je nach der Konzentration der Ganglioside und des Peptids.^[18a] Die vollständige Bedeckung der Membran durch negativ geladene GM₁-Zuckerköpfe^[16] und die Reduktion der Dimension von 3D auf 2D können die Aggregation aufgrund von generischen Oberflächeneffekten beschleunigen^[18b,c] (Abbildung 3 d). Jedoch verursacht die Bindung von Aβ zu GM₁ bei niedrigen GM₁-Niveaus – wie bei den eingesetzten physiologischen Mengen (2–4 %) – keine Aggregation der Peptide. Tatsächlich verhindert die Präsenz von GM₁ die Oligomerisation von Aβ (Abbildung 3 c). Die Bindung von Aβ durch die Ganglioside scheint der Grund für die Inhibition der spontanen Oligomerisation zu sein, die für Sph enthaltende Membranen beobachtet wurde.

Unsere Ergebnisse sind der erste molekulare Beweis für GM₁ als Hemmer der Aβ₄₀-Oligomerisation und geben neue Einblicke in die molekularen Mechanismen, die in der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit involviert sein könnten. Unsere Forschungen legen nahe, dass die (mit zunehmendem Alter)^[7,8a,19] abnehmenden GM₁-Niveaus zu einer reduzierten Abwehr gegen den die Oligomerisation verursachenden

Effekt von Sph führen und somit den Beginn der Alzheimer-Krankheit auslösen könnten. Unsere Ergebnisse stützen die Berichte von neuroprotektiven Effekten von GM₁ in Zellkulturen und Rattenmodellen der Alzheimer-Krankheit,^[9,20] und sie helfen, die gefundenen Daten in vivo zu rationalisieren und eine Basis für ein besseres Verständnis von Amyloid-Erkrankungen zu schaffen.

Danksagung

Finanzielle Unterstützung: GACR (P208/12/G016; 14-12598S), MEYS, Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (CZ.1.05/1.1.00/02.0068 CEITEC), CAS for Praemium Academie award. Rechenkapazitäten bereitgestellt von: MetaCentrum (LM2010005) and CERIT-SC (CZ.1.05/3.2.00/08.0144). Wir danken M. Šulc für die analytischen Ultrazentrifugationsergebnisse, J. Humpolíčková für einen Beitrag zu manchen FRET-Experimenten, M. Manna für die Startparametrisierung von Aβ und GM₁, A. Hermetter und M. Cebecauer für hilfreiche Diskussionen und Lorenz Weihrich für die Übersetzung ins Deutsche.

Stichwörter: Alzheimer-Krankheit · Amyloid-Beta-Peptide · Diffusionskoeffizienten · Fluoreszenzspektroskopie · Neuroprotektiva

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 9411–9415
Angew. Chem. **2016**, 128, 9557–9562

- [1] a) M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, M. Stefani, *Nature* **2002**, 416, 507–511; b) G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, E. Nina, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere et al., *Nat. Med.* **2008**, 14, 837–842.
- [2] a) M. Amaro, D. J. S. Birch, O. J. Rolinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 6434–6441; b) P. Narayan, A. Orte, R. W. Clarke, B. Bolognesi, S. Hook, K. A. Ganzinger, S. Meehan, M. R. Wilson, C. M. Dobson, D. Klenerman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 19, 79–83.
- [3] R. F. M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, *Biophys. J.* **2003**, 85, 2406–2416.
- [4] a) S. Devanathan, Z. Salamon, G. Lindblom, G. Gröbner, G. Tollin, *FEBS J.* **2006**, 273, 1389–1402; b) E. Y. Chi, C. Ege, A. Winans, J. Majewski, G. Wu, K. Kjaer, K. Y. C. Lee, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, 72, 1–24; c) T. L. Williams, B. R. G. Johnson, B. Urbanc, A. T. A. Jenkins, S. D. A. Connell, L. C. Serpell, *Biochem. J.* **2011**, 439, 67–77.
- [5] K. Yanagisawa, *J. Neurochem.* **2011**, 116, 806–812.
- [6] R. W. Ledeen, *J. Supramol. Struct.* **1978**, 8, 1–17.
- [7] G. Tettamanti, L. Anastasia in *Handb. Neurochem. Mol. Neurobiol.* (Hrsg.: A. Lajtha, G. Tettamanti, G. Goracci), Springer, Boston, **2010**, S. 99–171.
- [8] a) T. Ariga, M. P. McDonald, R. K. Yu, *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 1157–1175; b) I. Mocchetti, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 2283–2294.
- [9] a) F. Kreutz, R. L. Frozza, A. C. Breier, V. A. Oliveira, A. P. Horn, L. F. Pettenuzzo, C. A. Netto, C. G. Salbego, V. M. T. Trindade, *Neurochem. Int.* **2011**, 59, 648–655; b) R. Yang, Q. Wang, L. Min, R. Sui, J. Li, X. Liu, *Neurol. Sci.* **2013**, 34, 1447–1451; c) F. Kreutz, E. B. Scherer, A. G. K. Ferreira, F. D. S. Petry, C. L. Pereira, F. Santana, A. T. de Souza Wyse, C. G. Salbego, V. M. T. Trindade, *Neurochem. Res.* **2013**, 38, 2342–2350.

- [10] a) F. Göttfert, C. A. Wurm, V. Mueller, S. Berning, V. C. Cordes, A. Honigmann, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2013**, *105*, L01–L03; b) E. Sevcik, G. J. Schütz, *BioEssays* **2016**, *38*, 129–139.
- [11] R. Macháň, M. Hof, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 1377–1391.
- [12] R. Sachl, M. Amaro, G. Aydogan, A. Koukalová, I. I. Mikhalyov, I. A. Boldyrev, J. Humpolíčková, M. Hof, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 850–857.
- [13] M. Amaro, R. Sachl, P. Jurkiewicz, A. Coutinho, M. Prieto, M. Hof, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2751–2760.
- [14] S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, M. E. Welland, C. M. Dobson, E. M. Terentjev, T. P. J. Knowles, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 065105.
- [15] a) A. Kakio, S. I. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutsumi, K. Matsuzaki, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24985–24990; b) A. Kakio, S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutsumi, K. Matsuzaki, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7385–7390.
- [16] L. B. Sagle, L. K. Ruvuna, J. M. Bingham, C. Liu, P. S. Cremer, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15832–15839.
- [17] a) S. Devarajan, J. S. Sharmila, *J. Mol. Liq.* **2014**, *195*, 59–64; b) M. Manna, C. Mukhopadhyay, *PLoS One* **2013**, *8*, e71308.
- [18] a) R. Vácha, S. Linse, M. Lund, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11776–11782; b) A. P. Minton, *Biophys. Chem.* **2000**, *86*, 239–247; c) A. P. Minton, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1641–1648.
- [19] I. Kracun, H. Rosner, V. Drnovsek, Z. Vukelic, C. Cosovic, M. Trbojevic-Cepe, M. Kubat, *Neurochem. Int.* **1992**, *20*, 421–431.
- [20] T. V. Sokolova, I. O. Zakharova, V. V. Furaev, M. P. Rychkova, N. F. Avrova, *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 1302–1313.

Eingegangen am 31. März 2016
Online veröffentlicht am 13. Juni 2016