

Mechanismus der Intervention bei Amyloidose-Erkrankungen durch EGCG

Dr. Jan Bieschke

15.11.2011

Proteinfehlfaltungserkrankungen

Viele im Alter auftretende Erkrankungen sind Proteinfehlfaltungserkrankungen. Hierzu zählen die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, wie die Alzheimersche Erkrankung und Morbus Parkinson, aber auch systemische Erkrankungen, bei denen periphere Organe betroffen sind. Dies ist z.B. bei den AL- und AA-Amyloidosen und der altersbedingten Diabetes (Typ II) der Fall. All diesen Erkrankungen ist gemein, dass ein körpereigenes Protein in unlöslicher Form im betroffenen Gewebe abgelagert wird. Ort der Ablagerung und Identität des abgelagerten Proteins sind dabei für die jeweilige Erkrankung charakteristisch (Dobson 2003).

Kausale Interventionsstrategien bei Amyloiderkrankungen

Therapeutische Ansätze bei der Behandlung der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Erkrankung sind bis heute im Wesentlichen symptomatischer Natur. Kausale Therapieansätze befinden sich derzeit noch in der Entwicklung, bzw. in der klinischen oder vorklinischen Evaluation (Dasilva and McLaurin 2004; Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).

Die hier vorgestellten pharmakologischen Interventionsstrategien zielen primär auf den Prozess der Proteinfehlfaltung und Amyloidbildung im Rahmen der Alzheimerschen und Parkinsonschen Erkrankung. Es sollte jedoch hervorgehoben werden, dass dieselben Moleküle, die Gegenstand der folgenden mechanistischen Untersuchungen sind, ebenfalls antioxidative Eigenschaften besitzen. Dies gilt insbesondere für das Polyphenol EGCG, das sowohl ein potentes Antioxidanz ist als auch Eisen- und Kupferionen komplexieren kann und so eventuell ihre katalytische Wirkung bei der Entstehung von ROS neutralisiert. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden an anderer Stelle ausführlich besprochen (Jomova, Vondrakova et al.; Mandel, Amit et al. 2008; Zhao 2009).

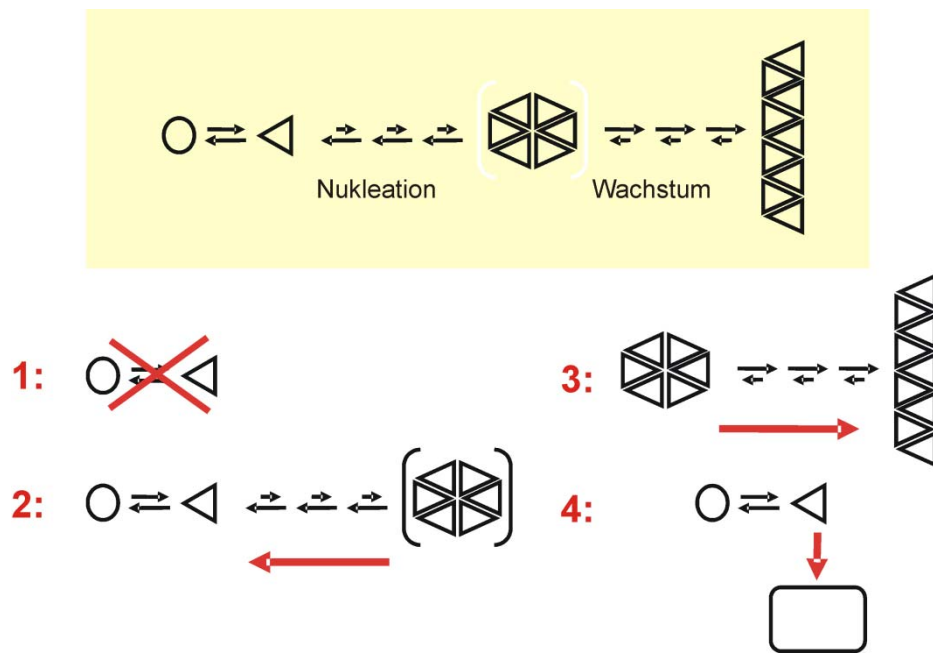


Abb. 1. Interventionsstrategien bei Proteinfehlfaltungserkrankungen

Im Rahmen der Amyloidhypothese zeichnet sich ab, dass in erster Linie oligomere Zwischenstufen der Amyloidkaskade für die Toxizität der fehlgefalteten Proteine verantwortlich sind (Walsh, Klyubin et al. 2002; Shankar, Li et al. 2008). Damit lassen sich verschiedene Strategien zur Verringerung der toxischen Proteinspezies verfolgen (Abb. 1). Die erste Strategie zielt darauf, den Nachschub an aggregationskompetentem monomerem Protein abzuschneiden. Ein Beispiel hierfür sind Inhibitoren der β -Sekretase (Haass, Koo et al. 1992; Vassar 2001), die die Bildung des A β Peptids durch Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) verhindern. Eine zweite Strategie wäre die Verhinderung der Aggregation durch Wirkstoffe, die an die Amyloidstruktur binden und diese destabilisieren (Abb. 1). Eine ausführliche Zusammenfassung findet sich in (Cohen and Kelly 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine neuartige therapeutische Strategie untersucht werden: Die Umleitung der Amyloidkaskade in Richtung nicht toxischer Aggregatstrukturen und die Stabilisierung großer Amyloidfibrillen (Abb. 1). In beiden Fällen wird die Konzentration von Aggregationsintermediaten spezifisch gesenkt, im ersten Fall zugunsten der irreversiblen Bildung von *off-pathway* Aggregaten, im zweiten Fall zugunsten der Bildung stabiler fibrillärer Strukturen.

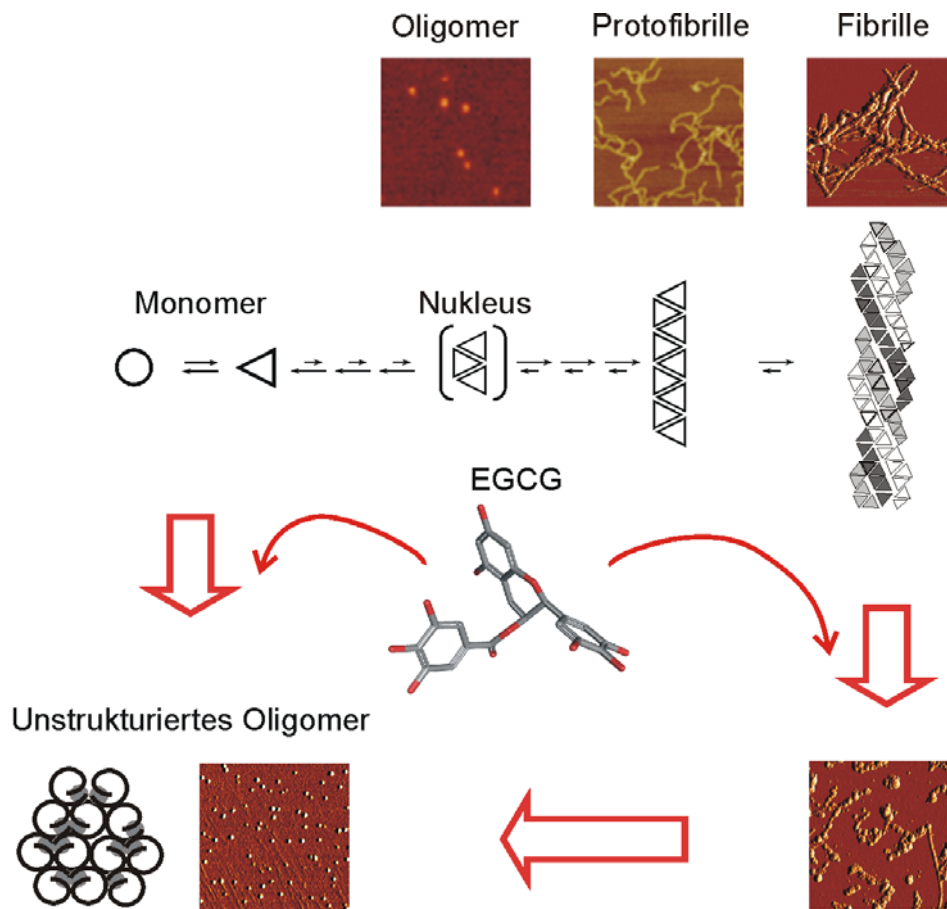


Abb. 2. EGCG leitet die Amyloidkaskade um, so dass an Stelle von Fibrillen inerte kugelförmige Aggregate entstehen

Neue Interventionsstrategien zur Amyloidgenese: EGCG

Catechine aus der Teepflanze und aus Traubenkernen, insbesondere das (-) Epigallocatechingallat (EGCG) haben bereits vor mehr als einem Jahrzehnt das Forschungsinteresse geweckt. Die Blätter der Teepflanze bestehen zu ca. 30% aus Catechinen, ein Drittel davon EGCG (Graham 1992) Neben seiner antioxidativen Wirkung zeigte EGCG vielversprechende Wirkung in Zellmodellen und Mausmodellen zum Tumorwachstum, so dass eine mögliche Anwendung in der Krebsbehandlung intensiv untersucht wurde. Eine Übersicht über die verschiedenen Anwendungsgebiete von EGCG gibt (Zaveri 2006).

EGCG verringert die Toxizität von A β in Pheochromocytoma und Neuroblastoma Zellmodellen (Choi, Jung et al. 2001; Li, Jang et al. 2004). EGCG verringert die Bildung von

amyloiden Ablagerungen (Rezai-Zadeh, Shytle et al. 2005; Rezai-Zadeh, Arendash et al. 2008) und den Verlust des räumlichen Lernvermögens in einem Mausmodell der Alzheimerschen Erkrankung (Wang, Ho et al. 2008). Auch in einem Rattenmodell zeigten sich Verbesserungen des Lernvermögens bei andauernder Behandlung mit EGCG (Haque, Hashimoto et al. 2008). In Tiermodellen der Parkinsonschen Erkrankung verhinderte die Gabe von EGCG oder Grüntee-Extrakt den Verlust an dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* (Levites, Weinreb et al. 2001).

Auch epidemiologische Studien, in denen langjährig Patienten zu ihren Lebensgewohnheiten befragt wurden, zeigten eine negative Korrelation zwischen dem Genuss von grünem Tee und kognitivem Verfall (Kuriyama, Hozawa et al. 2006). Die Inzidenz der Parkinsonschen Erkrankung liegt im asiatischen Raum 5 - 10-fach unter dem Wert in westlichen Gesellschaften (Zhang and Roman 1993). Nicht zuletzt zeigt sich in ersten klinischen Pilotstudien eine Verringerung der LC-Amyloidablagerung und der Dicke der Herzscheidewand von Myelompatienten nach Einnahme von Grüntee-Extrakt (Mereles, Buss et al. 2010; Hunstein 2007).

Mechanismus der protektiven Wirkung von EGCG

Der Mechanismus, durch den EGCG die Amyloidtoxizität verringert, blieb jedoch lange unklar. Frühe Hypothesen konzentrierten sich auf die antioxidative Wirkung des EGCG (Mandel, Amit et al. 2008), siehe Kap 1.5). Es wurde aber auch beschrieben, dass EGCG die Spaltung des APP in nicht amyloidogene Peptide durch die α -Sekretase erhöht (Fernandez, Rezai-Zadeh et al. 2010; Lee, Lee et al. 2009) und die Aktivität der β -Sekretase inhibiert (Jeon, Bae et al. 2003).

Dagmar Ehrnhoefer zeigte 2006 erstmals, dass EGCG direkt die Aggregation eines fehlgefalteten Proteins inhibiert (Ehrnhoefer, Duennwald et al. 2006). Inzwischen ist für eine Vielzahl von amyloidogenen Proteinen nachgewiesen, dass EGCG direkt an das Protein bindet und die Bildung von Amyloidfibrillen verhindert, unter anderem für das α -Synuclein (α S, Bae, Kim et al. 2010; Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008), A β (Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008; Ono, Condrón et al. 2008), Transthyretin (Ferreira, Cardoso et al. 2009), Lysozym (He, Zhao et al. 2009), das Prion-Protein PrP (Rambold, Miesbauer et al. 2008), sowie das Hefeprión Sup35 (Roberts, Duennwald et al. 2009).

EGCG bindet vor allem an ungefaltete Proteine (Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008; Wang, Liu et al. 2010). Die NMR Untersuchung der Bindung von EGCG an α S zeigte die Löschung der

Resonanzen von ca. 30% der Aminosäuren (Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008). Dies deutet auf eine nicht-sequenzspezifische Interaktion mit hydrophoben Bereichen hin, wobei die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen oder durch H-Brücken erfolgen könnte. Im A β Peptid bindet EGCG an die hydrophoben Sequenzen 14-24, sowie 27-37 (M. Lopez, B. Reif, persönliche Mitteilung; Grelle, Albrecht et al. 2011). Dabei verhindert es die Ausbildung des β -Faltblattes in der Region 14-24, von der angenommen wird, dass sie die Amyloidbildung initiiert (Kim and Hecht 2006). EGCG kann aber auch an hydrophobe Bereiche gefalteter Proteine wie Albumin (Maiti, Ghosh et al. 2006) oder Transthyretin binden (Miyata, Sato et al. 2010). Hier wurden mehrere definierte Bindungsstellen an exponierten hydrophoben Bereichen der Proteine beobachtet. Die Bindungsenergie hat dabei sowohl eine entropische als auch eine enthalpische Komponente, woraus zu schließen ist, dass neben hydrophoben Wechselwirkungen auch die Stabilisierung durch H-Brücken erfolgt (Maiti, Ghosh et al. 2006). Eine thermodynamische Analyse der Interaktion von EGCG mit A β ₄₀ bestätigt auch in diesem Fall einen entropischen und einen enthalpischen Beitrag zur Bindung (Wang, Liu et al. 2010). Daneben wird allerdings auch eine reversible kovalente Konjugation, z.B. über die Bildung von Schiff-Basen diskutiert (Ishii, Ichikawa et al. 2011).

Die Analyse von Aggregationsreaktionen in der An- und Abwesenheit von EGCG zeigt nun, dass EGCG die Bildung fibrillärer Aggregate, die Amyloidfarbstoffe wie Kongorot oder Thioflavin T binden, verhindert. Stattdessen bilden sich im Falle von α S und A β , aber auch bei der Mehrzahl anderer amyloidogener Proteine stabile kugelförmige Aggregate (Abb. 2, Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008). Diese kugelförmigen Aggregate sind in Zellversuchen nicht toxisch und besitzen einen geringeren Anteil an β -Faltblattstrukturen als Fibrillen oder Amyloidintermediate. Insbesondere fehlt ihnen die charakteristische Eigenschaft von Amyloiden ihre eigene Bildung zu katalysieren. Wenn die in der Anwesenheit von EGCG gebildeten Strukturen zu einer Lösung von monomerem A β oder α S gegeben werden, beschleunigt sich die Aggregationskinetik nicht. Die EGCG-Aggregate können also nicht als Aggregationskeime wirken, sie befinden sich *off pathway*, also außerhalb der Amyloidkaskade (Abb. 2).

Dieser Mechanismus wurde inzwischen in verschiedenen Proteinsystemen bestätigt, so für verschiedene Formen des α S (Bae, Kim et al. 2010), Lysozym (He, Xing et al. 2009), Transthyretin (Ferreira, Saraiva et al. 2011) und das Hefeprion Sup35 (Roberts, Duennwald et al. 2009). Er ist jedoch nicht völlig universell, sondern hängt im Detail von der Stabilität der

gebildeten Proteinaggregate ab. Casein bildet nach Carboxymethylierung Fibrillen mit β -Faltblattstruktur, die den Amyloidfarbstoff Thioflavin T binden, und wird daher als generisches Modellsystem der Amyloidbildung verwendet (Ecroyd, Koudelka et al. 2008). EGCG verhindert die Fibrillenbildung des Casein durch Bindung an ein β -Faltblatt-Turn-Faltblatt Motiv des Proteins (Hudson, Ecroyd et al. 2009). Das Protein bleibt dabei als lösliches Monomer erhalten. Das Caseinmodell ist jedoch insofern untypisch für amyloidogene Proteine, dass die β -Faltblatt-Turn-Faltblatt Struktur, die charakteristisch für viele Amyloidfibrillen ist (Luhrs, Ritter et al. 2005), sich hier schon im Monomer vorgebildet findet (Hudson, Ecroyd et al. 2009). Beim A β Peptid hingegen, wie auch bei den meisten anderen Proteinen, sind derartige Strukturen charakteristisch für oligomere und protofibrilläre Zwischenstufen der Amyloidkaskade (Mastrangelo, Ahmed et al. 2006), während sie im monomeren Protein nicht auftreten.

Auflösung und Umwandlung von Amyloidablagerungen

(Hauber, Hohenberg et al. 2009) zeigten, dass EGCG die Bildung amyloidartiger Fibrillen eines Fragmentes der PAP (*prostatic acidic phosphatase*) verhindert und bereits gebildete Fibrillen wieder auflöst. Die Amyloidfibrillen dieses *semen-derived enhancer of virus infection* (SEVI) binden das *human immunodeficiency virus* (HIV) und erleichtern dessen Übergang durch die Schleimhäute in den Körper (Münch, Rücker et al. 2007), so dass eine lokale Gabe von EGCG der HIV-Infektion entgegenwirkt (Hauber, Hohenberg et al. 2009). Eine Auflösung oder Umwandlung von Fibrillen durch EGCG wurde mittlerweile ebenfalls für mehrere andere amyloidbildende Proteine beobachtet. Das Hefeprien Sup35 verliert nach Behandlung mit EGCG die Fähigkeit zur Replikation und die fibrilläre Struktur (Roberts, Duennwald et al. 2009). EGCG zerstört Fibrillen des Transthyretin (Ferreira, Saraiva et al. 2011); und auch Fibrillen des *Merozoite surface protein 2* (MSP2) werden durch die Behandlung mit EGCG in amorphe Strukturen umgewandelt (Chandrashekar, Adda et al. 2011) Der Mechanismus dieser Umwandlung konnte von uns am Beispiel von α S und A β Fibrillen erstmals geklärt werden (Bieschke, Russ et al. 2010). Wenn EGCG zu bereits gebildeten Amyloidfibrillen von A β oder α S gegeben wird, geht die fibrilläre Struktur schrittweise verloren und es bilden sich SDS-resistente kugelförmige oder amorphe Strukturen, die nicht Thioflavin T binden, die keiminduzierte Aggregation nicht katalysieren und in neuronalen Zellmodellen (SHSY5Y, PC12) nicht toxisch sind (Bieschke, Russ et al.

2010). Sie besitzen also dieselben Eigenschaften wie die *off-pathway* Aggregate, die vom monomeren α S und A β in Anwesenheit von EGCG gebildet werden. Im neuronalen Zellmodell werden A β -Aggregate nach Behandlung mit EGCG abgebaut (Abb. 3).

Mechanismus der Umwandlung von Amyloidfibrillen

Für eine Umwandlung von fibrillären in amorphe Aggregatstrukturen lassen sich im Wesentlichen zwei Mechanismen postulieren. Entweder werden die Fibrillen durch EGCG aufgelöst oder sie werden direkt, d.h. ohne vorherige Monomerisierung, in amorphe Strukturen überführt (Abb. 4Ai). Eine Auflösung von Fibrillen wäre auf direktem Wege möglich, indem das EGCG an die Fibrillen bindet, oder es könnte indirekt geschehen, indem eine Bindung des EGCG an das monomere Protein das Dissoziationsgleichgewicht zwischen monomerer und fibrillärer Phase verschiebt, indem es Monomere irreversibel aus dem Gleichgewicht entfernt (Abb. 4Aii).

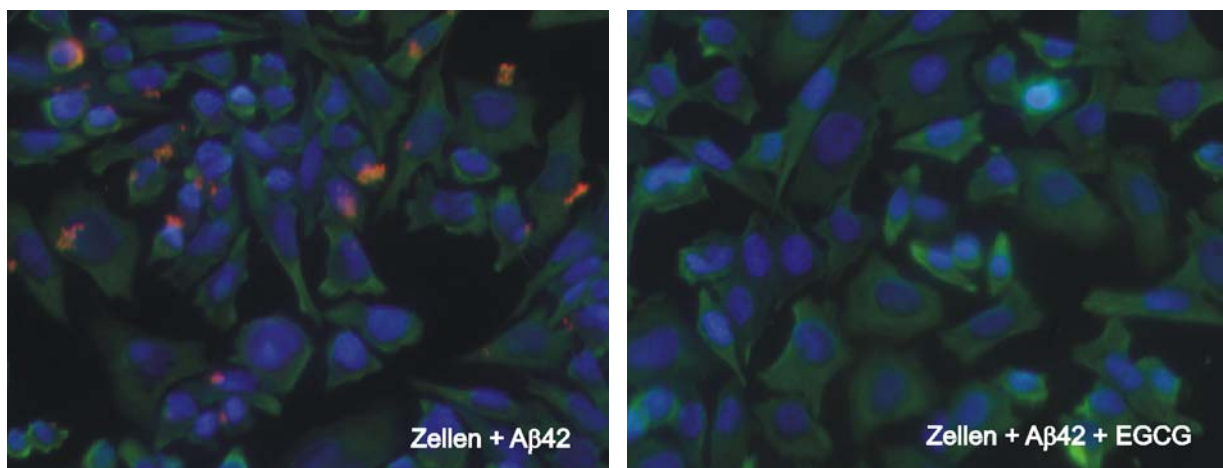


Abb. 3. EGCG Behandlung reduziert intrazelluläre Aggregate in Neuroblastom (SH-EP) Zellen.

Um zwischen diesen Alternativen zu entscheiden, wurden Fibrillen hergestellt, in die fluoreszenzmarkierte Monomere eingebaut waren. Werden nun rot-markierte Fibrillen mit grün-markierten Fibrillen gemischt, so sollte eine Auflösung der Fibrillen mit anschließender Re-Aggregation zu gleichermaßen rot und grün markierten, also gelben, amorphen Aggregaten führen. Werden die Fibrillen vom EGCG *in situ* in amorphe Strukturen überführt, ohne sie vorher aufzulösen, so bliebe die Unterteilung in rot und grün markierte Strukturen erhalten (Abb. 5B). Überraschenderweise war dies bei der Behandlung von A β mit EGCG der

Fall (Bieschke, Russ et al. 2010), so dass man schließen muss, dass EGCG die A β -Fibrillen nicht auflöst, sondern ihre direkte Umwandlung in amorphe Strukturen bewirkt. Die molekularen Details dieses Prozesses müssen jedoch noch geklärt werden. So ist z.B. denkbar, dass EGCG an die β -Faltblattstrukturen des A β in der Fibrille bindet und damit die Cross- β Struktur der Fibrille schwächt, während es gleichzeitig die Aggregation aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, π - π Stapelungswechselwirkungen oder sogar kovalenter Vernetzung fördert.

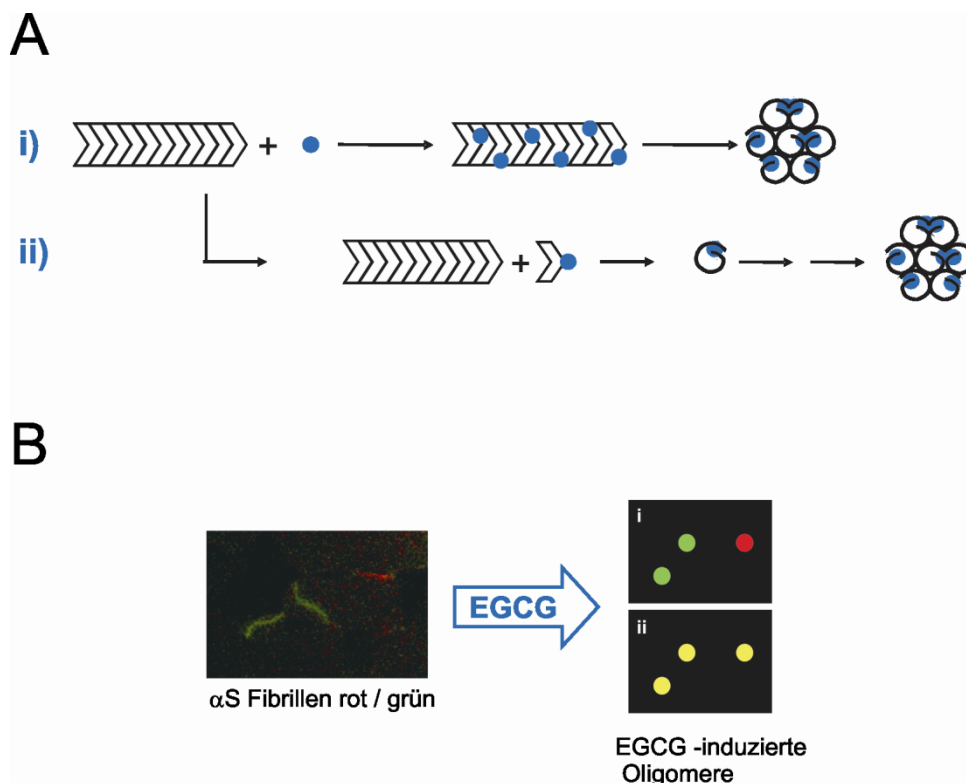


Abb. 4. A) Mögliche molekulare Mechanismen der Umwandlung von fibrillärem A β in kugelförmige Aggregate B) Umwandlung fluoreszenzmarkierter Fibrillen durch EGCG

Perspektiven in der Prävention und Therapie

Ein bekanntes Problem der therapeutischen Anwendung von EGCG ist die große Schwankungsbreite der biologischen Verfügbarkeit von oral zugeführtem EGCG (Review in (Singh, Shankar et al. 2011; Mereles and Hunstein 2011), die auf die geringe Stabilität gegenüber Oxidation, die leicht erfolgende Konjugation an Proteine im Verdauungstrakt, so

z.B. Casein, und die schnelle Metabolisierung im Körper zurückzuführen ist. Durch ein besonders gewissenhaftes Einnahmeregimen lassen sich diese Probleme im Einzelfall kompensieren (Hunstein 2007). Sie behindern jedoch stark die systematische Evaluation eines Behandlungserfolges in klinischen Studien (Mereles and Hunstein 2011). Auch überwinden nur 10-20% des EGCG die Blut-Hirn Schranke (Singh, Arseneault et al. 2008). Mittlerweile existieren verschiedene Ansätze, das Problem der Bioverfügbarkeit zu lösen: Eine Verkapselung des EGCG verbessert die Aufnahme und die langfristige Bioverfügbarkeit (Dube, Nicolazzo et al. 2010; Siddiqui, Adhami et al. 2010). Die Aufnahme von EGCG aus dem Magen-Darm Trakt lässt sich zudem durch gleichzeitige Gabe von Vitamin C (Peters, Green et al. 2010), und Piperin (Lambert, Hong et al. 2004) erhöhen. Eine gleichzeitige Gabe von Fischöl verstärkte die anti-amyloide Wirksamkeit von EGCG in einem Mausmodell der Alzheimerschen Erkrankung (Giunta, Hou et al. 2010).

Darüber hinaus gibt es Ansätze, die zelluläre Verfügbarkeit von EGCG zu erhöhen. Ein Einschluss von EGCG in poly(lactide-co-glycolide)-Nanopartikel, erhöht die unterstützende Wirkung von EGCG bei der Tumorthherapie mit cis-Platin-Verbindungen (Singh, Bhatnagar et al. 2011). Der Einschluss in lipidische Nanopartikel erhöhte die Wirkung von EGCG auf die Spaltung von APP durch die α -Sekretase in Neuroblastom-Zellen (Smith, Giunta et al. 2010) Ein Transport von kleinen Molekülen wie EGCG durch die Zellmembran kann zudem durch die Beleuchtung mit einer gepulsten Laserquelle im roten bis NIR Wellenlängenbereich verstärkt werden (Sommer, Zhu et al. 2010) NIR Laserlicht hat eine hohe Eindringtiefe in menschliche Gewebe und kann den mitochondrialen Stoffwechsel stimulieren (Eells, Henry et al. 2003) und die Wirksamkeit von EGCG gegenüber der Proliferation von Tumorzellen erhöhen (Sommer, Zhu et al. 2010) Die Kombination von gepulster Laserbestrahlung bei 670 nm mit er Gabe von EGCG verringert zudem die Menge von A β Aggregaten und verbessert die metabolische Aktivität in einem Neuroblastom-Zellmodell (Sommer, Bieschke et al. 2011).

Schlussbetrachtung

Bei der Fehlfaltung körpereigener Proteine und der Bildung fibrillärer Strukturen, die unter dem Schlagwort Amyloidogenese zusammengefasst sind, handelt es sich um einen komplexen Prozess, der mit seinen vielen Zwischenschritten das experimentelle Verständnis erschwert,

andererseits aber auch multiple Angriffspunkte liefert, um therapeutisch einzugreifen. Oligomere Zwischenstufen stehen im Zentrum der Pathologie von Proteinfehlfaltungserkrankungen. Sie sind der Hauptträger der Toxizität. Die hier vorgestellte Intervention durch EGCG setzt genau an diesem Punkt der Amyloidkaskade an. Vor einer therapeutischen Anwendung des hier untersuchten Polyphenols EGCG bei Proteinfehlfaltungserkrankungen sind jedoch noch zahlreiche praktische Hürden zu überwinden, bevor man erwarten kann, dass sich die vielversprechenden Ergebnisse *in vitro* und in Tiermodellen auf den Menschen übertragen lassen.

Die Klärung der mechanistischen Grundlagen ist aber das Fundament, auf dem eine jede rationale Therapie fußt. Sie bietet den Ausgangspunkt zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften oder auch für die Neuentwicklung von Wirkstoffen, die auf demselben Wirkprinzip beruhen wie die hier besprochenen Polyphenole aus der Teepflanze. Die vorliegenden Untersuchungen eröffnen in jedem Fall neue Behandlungsstrategien für Amyloiderkrankungen und zeigen als *proof-of-principle*, dass eine Entgiftung amyloider Strukturen sowohl durch Umleitung des Fibrillenbildungsprozesses möglich ist. Es ist meine ausdrückliche Hoffnung, dass die hier vorgestellten Ergebnisse dazu beitragen, wirksame kausale Therapien für die Alzheimersche und Parkinsonsche Erkrankung sowie für andere zerstörerische Formen der Proteinfehlfaltung zu finden.

Beim vorliegenden Text handelt es sich um einen auszugsweisen Abdruck der Habilitationsschrift von Dr. Jan Bieschke. Alle Rechte am Text verbleiben beim Autor.

Literatur

- Bae, S. Y., S. Kim, et al. (2010) "Amyloid formation and disaggregation of alpha-synuclein and its tandem repeat (alpha-TR)." Biochem Biophys Res Commun **400**(4): 531-6.
- Bieschke, J., J. Russ, et al. (2010). "EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7710-5.
- Chandrashekar, I. R., C. G. Adda, et al. (2011) "EGCG disaggregates amyloid-like fibrils formed by Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2." Arch Biochem Biophys **513**(2): 153-7.
- Choi, Y. T., C. H. Jung, et al. (2001). "The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons." Life Sci **70**(5): 603-14.
- Cohen, F. E. and J. W. Kelly (2003). "Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases." Nature **426**(6968): 905-9.

- Dasilva, K. A. and J. McLaurin (2004). "New therapeutic approaches for Alzheimer's disease." Discov Med **4**(24): 384-9.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." Nature **426**(6968): 884-90.
- Dube, A., J. A. Nicolazzo, et al. (2010) "Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate." Eur J Pharm Sci **41**(2): 219-25.
- Ecroyd, H., T. Koudelka, et al. (2008). "Dissociation from the oligomeric state is the rate-limiting step in fibril formation by kappa-casein." J Biol Chem **283**(14): 9012-22.
- Eells, J. T., M. M. Henry, et al. (2003). "Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3439-44.
- Ehrnhoefer, D. E., J. Bieschke, et al. (2008). "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers." Nat Struct Mol Biol **15**(6): 558-66.
- Ehrnhoefer, D. E., M. Duennwald, et al. (2006). "Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models." Hum Mol Genet **15**(18): 2743-51.
- Fernandez, J. W., K. Rezaei-Zadeh, et al. (2010). "EGCG functions through estrogen receptor-mediated activation of ADAM10 in the promotion of non-amyloidogenic processing of APP." FEBS Lett **584**(19): 4259-67.
- Ferreira, N., I. Cardoso, et al. (2009). "Binding of epigallocatechin-3-gallate to transthyretin modulates its amyloidogenicity." FEBS Lett **583**(22): 3569-76.
- Ferreira, N., M. J. Saraiva, et al. (2011). "Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation." FEBS Lett **585**(15): 2424-30.
- Giunta, B., H. Hou, et al. (2010) "Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice." Neurosci Lett **471**(3): 134-8.
- Graham, H. N. (1992). "Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry." Prev Med **21**(3): 334-50.
- Grelle, G., O. Albrecht, et al. (2011). "Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid-beta and alpha-synuclein fibrils." Biochemistry: Epub ahead of print.
- Haass, C., E. H. Koo, et al. (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." Nature **357**(6378): 500-3.
- Haque, A. M., M. Hashimoto, et al. (2008). "Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats." J Nutr Biochem **19**(9): 619-26.
- Hauber, I., H. Hohenberg, et al. (2009). "The main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate counteracts semen-mediated enhancement of HIV infection." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(22): 9033-8.
- He, J., Y. F. Xing, et al. (2009). "Tea catechins induce the conversion of preformed lysozyme amyloid fibrils to amorphous aggregates." J Agric Food Chem **57**(23): 11391-6.
- He, M., L. Zhao, et al. (2009). "Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D-galactose." Biol Pharm Bull **32**(1): 55-60.
- Hudson, S. A., H. Ecroyd, et al. (2009). "(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains kappa-casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway." J Mol Biol **392**(3): 689-700.
- Hunstein, W. (2007). "Epigallocatechin-3-gallate in AL amyloidosis: a new therapeutic option?" Blood **110**(6): 2216.
- Ishii, T., T. Ichikawa, et al. (2011) "Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization." Biosci Biotechnol Biochem **75**(1): 100-6.
- Jakob-Roetne, R. and H. Jacobsen (2009). "Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches." Angew Chem Int Ed Engl **48**(17): 3030-59.

- Jeon, S. Y., K. Bae, et al. (2003). "Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor." *Bioorg Med Chem Lett* **13**(22): 3905-8.
- Jomova, K., D. Vondrakova, et al. "Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders." *Mol Cell Biochem* **345**(1-2): 91-104.
- Kim, W. and M. H. Hecht (2006). "Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(43): 15824-9.
- Kuriyama, S., A. Hozawa, et al. (2006). "Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1." *Am J Clin Nutr* **83**(2): 355-61.
- Lambert, J. D., J. Hong, et al. (2004). "Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice." *J Nutr* **134**(8): 1948-52.
- Lee, J. W., Y. K. Lee, et al. (2009). "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice." *J Nutr* **139**(10): 1987-93.
- Levites, Y., O. Weinreb, et al. (2001). "Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration." *J Neurochem* **78**(5): 1073-82.
- Li, M. H., J. H. Jang, et al. (2004). "Protective effects of oligomers of grape seed polyphenols against beta-amyloid-induced oxidative cell death." *Ann N Y Acad Sci* **1030**: 317-29.
- Luhrs, T., C. Ritter, et al. (2005). "3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48): 17342-7.
- Maiti, T. K., K. S. Ghosh, et al. (2006). "Interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: fluorescence, fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies." *Proteins* **64**(2): 355-62.
- Mandel, S. A., T. Amit, et al. (2008). "Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG)." *J Alzheimers Dis* **15**(2): 211-22.
- Mastrangelo, I. A., M. Ahmed, et al. (2006). "High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers." *J Mol Biol* **358**(1): 106-19.
- Mazzulli, J. R., A. J. Mishizen, et al. (2006). "Cytosolic catechols inhibit alpha-synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates." *J Neurosci* **26**(39): 10068-78.
- Mereles, D., S. J. Buss, et al. (2010) "Effects of the main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on cardiac involvement in patients with AL amyloidosis." *Clin Res Cardiol* **99**(8): 483-90.
- Mereles, D. and W. Hunstein (2011). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises?" *Int. J. Mol. Sci.* **12**(9): 5592-5603.
- Miyata, M., T. Sato, et al. (2010) "The crystal structure of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate-transthyretin complex reveals a novel binding site distinct from the thyroxine binding site." *Biochemistry* **49**(29): 6104-14.
- Ono, K., M. M. Condron, et al. (2008). "Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid beta-protein self-assembly and cytotoxicity." *J Biol Chem* **283**(47): 32176-87.
- Peters, C. M., R. J. Green, et al. (2010). "Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea." *Food Res Int* **43**(1): 95-102.
- Rambold, A. S., M. Miesbauer, et al. (2008). "Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP and the formation of PrP." *J Neurochem* **107**(1): 218-29.
- Rezai-Zadeh, K., G. W. Arendash, et al. (2008). "Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice." *Brain Res* **1214**: 177-87.

- Rezai-Zadeh, K., D. Shytle, et al. (2005). "Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice." *J Neurosci* **25**(38): 8807-14.
- Roberts, B. E., M. L. Duennwald, et al. (2009). "A synergistic small-molecule combination directly eradicates diverse prion strain structures." *Nat Chem Biol* **5**(12): 936-46.
- Shankar, G. M., S. Li, et al. (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." *Nat Med* **14**(8): 837-42.
- Siddiqui, I. A., V. M. Adhami, et al. (2010) "Nanochemoprevention: sustained release of bioactive food components for cancer prevention." *Nutr Cancer* **62**(7): 883-90.
- Singh, B. N., S. Shankar, et al. (2011) "Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications." *Biochem Pharmacol*.
- Singh, M., M. Arseneault, et al. (2008). "Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms." *J Agric Food Chem* **56**(13): 4855-73.
- Singh, M., P. Bhatnagar, et al. (2011). "Enhancement of cancer chemosensitization potential of cisplatin by tea polyphenols poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles." *J Biomed Nanotechnol* **7**(1): 202.
- Smith, A., B. Giunta, et al. (2010) "Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease." *Int J Pharm* **389**(1-2): 207-12.
- Sommer, A., J. Bieschke, et al. (2011). "670 nm Laser Light and EGCG Complementarily Reduce Amyloid-beta Aggregates in Human Neuroblastoma Cells." *Photomedicine and Laser Surgery*: in press.
- Sommer, A. P., D. Zhu, et al. (2010). "Laser modulated transmembrane convection: Implementation in cancer chemotherapy." *J Control Release* **148**(2): 131-4.
- Vassar, R. (2001). "The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **17**(2): 157-70.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-9.
- Wang, J., L. Ho, et al. (2008). "Grape-derived polyphenolics prevent A β oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **28**(25): 6388-92.
- Wang, S. H., F. F. Liu, et al. (2010). "Thermodynamic analysis of the molecular interactions between amyloid beta-peptide 42 and (-)-epigallocatechin-3-gallate." *J Phys Chem B* **114**(35): 11576-83.
- Zaveri, N. T. (2006). "Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications." *Life Sci* **78**(18): 2073-80.
- Zhao, B. (2009). "Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Neurochem Res* **34**(4): 630-8.