

**Untersuchungen zur Toxizität niedermolekularer  
Aggregationsformen von  $\beta$ -Amyloid auf cholinerge Neuronen**



**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Katrin Heinitz  
geb. 01. Oktober 1978 in Lutherstadt-Wittenberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Langner
2. Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schliebs
3. Prof. Dr. rer. nat. Henning Schröder

Halle (Saale), 25.07.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000012209**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012209>]

Wenn unser Gehirn so einfach wäre, dass wir es verstehen könnten, dann wären wir so dumm, dass wir es trotzdem nicht verstehen könnten.

*Jostein Gaarder, Sofies Welt*

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis 4

### 1 Einleitung 7

1.1	Die Alzheimer-Erkrankung .....	7
1.1.1	Neuropathologie.....	8
1.1.2	Symptomatik .....	10
1.1.3	Therapie .....	11
1.2	Das cholinerge System .....	12
1.2.1	Lokalisation des cholinergen Systems im Gehirn.....	12
1.2.2	Komponenten des cholinergen Systems.....	13
1.2.3	Die cholinerge Neurodegeneration bei der Alzheimer-Erkrankung .....	14
1.3	$\beta$ -Amyloid .....	15
1.3.1	Bildung von $\beta$ -Amyloid .....	15
1.3.2	Eigenschaften von fibrillärem $\beta$ -Amyloid .....	16
1.3.3	Eigenschaften von niedermolekularem $\beta$ -Amyloid .....	17
1.3.4	Beeinflussung des cholinergen Systems durch $\beta$ -Amyloid.....	19
1.4	Oxidativer Stress .....	20
1.4.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	20
1.4.2	Oxidativer Stress bei der Alzheimer-Erkrankung.....	21
1.4.3	Induktion von oxidativem Stress durch $\beta$ -Amyloid.....	21
1.5	Aufgaben- und Zielstellung.....	24

### 2 Material und Methoden 25

2.1	Zellkultur.....	25
2.1.1	Kultivierung der Zellen .....	25
2.1.2	Behandlung der Zellen .....	26
2.1.3	Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen.....	26
2.2	Proteinbestimmung .....	27
2.3	Radiochemische Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	27
2.3.1	Aktivität der Cholinacetyltransferase .....	27
2.3.2	Aktivität der Acetylcholinesterase.....	28

---

2.4	Immunhistochemische Darstellung des vesikulären Acetylcholintransporters .....	29
2.5	Fluorimetrischer Thioflavin T - Assay .....	30
2.6	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
2.7	MTT-Assay .....	32
2.8	Dichlorofluorescein-Assay .....	32
2.9	DNA-Fragmentierung .....	33
2.10	Microarrays.....	35
2.10.1	RNA-Extraktion .....	35
2.10.2	Markierung und Hybridisierung der RNA.....	36
2.10.3	Auswertung der Microarrays .....	37
2.11	Quantitative real-time RT-PCR.....	38
2.11.1	RNA-Extraktion .....	38
2.11.2	Reverse Transkription und quantitative Amplifikation.....	38
2.11.3	Auswertung der real-time RT-PCR.....	39
2.12	Bestimmung von Proteinexpressionsveränderungen .....	39
2.12.1	Proteinpräparation.....	39
2.12.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting.....	40
2.12.3	Immunodetektion der Proteine .....	41
2.12.4	Auswertung der Proteinexpressionsveränderungen.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1	Charakterisierung des Zellmodells .....	45
3.2	Charakterisierung der Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) .....	47
3.3	Untersuchungen zur Toxizität von A $\beta$ (1-42) .....	50
3.3.1	Einfluss von A $\beta$ (1-42) auf die Zellviabilität .....	50
3.3.2	Apoptose-Induktion durch A $\beta$ (1-42) .....	51
3.3.3	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch A $\beta$ (1-42) .....	52
3.3.4	Untersuchung der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität auf Genebene .....	54
3.3.4.1	Ergebnisse der Microarrays .....	55
3.3.4.2	Ergebnisse der quantitativen real-time RT-PCR .....	61
3.3.5	Untersuchung der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität auf Proteinebene....	64
3.3.5.1	Beeinflussung der MAPK-Signalkaskaden durch A $\beta$ (1-42) .....	64
3.3.6	Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die A $\beta$ (1-42)-vermittelte Toxizität ..	70

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1 Diskussion hinsichtlich experimentell-methodischer Aspekte.....	73
4.1.1 SN56.B5.G4-Zellen als Modell für cholinerge Neuronen.....	73
4.1.2 Genexpressionsuntersuchungen mit Microarrays .....	76
4.1.3 Genexpressionsuntersuchungen mit real-time RT-PCR .....	78
4.1.4 Proteinexpressionsuntersuchungen mit Western Blotting und Immunodetektion .....	79
4.2 Abhängigkeit der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität vom Aggregationszustand des Peptids .....	81
4.3 Vergleich der Toxizität niedermolekularer A $\beta$ (1-42)-Aggregationsformen mit toxischen Effekten durch oxidativen Stress.....	83
4.3.1 Beteiligung allgemeiner Stress-Signalwege an der Toxizität niedermolekularer A $\beta$ (1-42)-Aggregationsformen .....	86
4.3.2 Niedermolekulares A $\beta$ (1-42) erhöht Stress im Endoplasmatischen Retikulum .....	90
4.3.3 A $\beta$ (1-42)-induzierte Expressionsveränderungen in Verbindung mit der Alzheimer-Pathogenese .....	94
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	95
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>125</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>126</b>
<b>Danksagung</b>	<b>128</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
Acc.Nr.	Accessions-Nummer
Acetyl-Co A	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer`s disease
ADDLs	Amyloid-beta derived diffusible ligands
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidpräkursorprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
BACE	beta-site APP-Cleaving Enzyme, $\beta$ -Sekretase
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholinacetyltransferase
c-jun	Jun-oncogene
CT	Computertomographie
Dad1	Defender against cell death 1
DE	x-fache Expressionsänderung
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C member 3
Dusp16	Dual specificity phosphatase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum

---

ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FAD	familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung
Fkbp11	FK506 binding protein 11
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HACU	High affinity cholin uptake
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDL	High density lipoprotein
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kbp	Kilobasenpaare
mAChR	muskarinerner Acetylcholintransporter
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAS5	Microarray Suite, Version 5
MCI	Mild cognitive impairment
MOPS	N-(Morpholino)-Propansulfonsäure
MRI	Magnetresonanztomographie
MTT	4,5-(Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nAChR	nikotinerger Acetylcholintransporter
NFκB	Nuclear factor κB
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
NTFs	Neurofibrilläre Tangles
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Natriumphosphatpuffer
Pcp4	Purkinje cell protein 4
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on
PD169316	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol
PET	Positronenemissionstomographie
PHFs	Paired helical filaments
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p75 <sup>NTR</sup>	p75-Neurotrophinrezeptor

RA	Retinsäure
RAGE	Receptor of advanced glycosylation end products
RMA	Robust Multiarray Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP600125	1,9-Pyrazoloanthron
Stx5a	Syntaxin 5A
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	Unfolded protein response
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
VHDL	Very high density lipoprotein

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Vor genau 100 Jahren berichtete der deutsche Neuropathologe und Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) erstmals über eine seltsame Erkrankung der Hirnrinde, die er an seiner 51-jährigen Patientin Auguste D. diagnostiziert hatte. Die Patientin litt unter Verhaltensstörungen und fortschreitendem Gedächtnisverlust. Nach dem Tod fand Alzheimer im Gehirn eine ausgeprägte cerebrale Atrophie mit atherosklerotischen und neuronalen Veränderungen vor, die er bisher nur bei älteren Patienten beobachtet hatte (*Alzheimer, 1907*).

Viele Jahre blieben die Erkenntnisse von Alzheimer unbeachtet. Niemand ahnte, welche Prävalenz die später nach ihm benannte Erkrankung haben wird. Heute ist Morbus Alzheimer die häufigste progressive Demenzerkrankung der Industriestaaten. Weltweit schätzt man die Zahl der Betroffenen auf ~ 20 Millionen (*Ferri et al., 2005*). In Deutschland sind ~ 650.000 Erkrankungsfälle bekannt (*www.deutsche-alzheimer.de; Bickel, 2000*). Die zunehmende Lebenserwartung in den industrialisierten Ländern wird in den nächsten 50 Jahren zu einer Verdopplung bis Verdreifachung der Patientenzahlen führen (*Ferri et al., 2005*). Unabsehbare ökonomische Probleme für Pflege- und Gesundheitsversorgung sind die Folge.

Bei der Alzheimer-Erkrankung unterscheidet man zwischen zwei Formen: der familiären (FAD) und der sporadischen Form. Die erbliche familiäre Form, die weniger als 5 % der Fälle betrifft, tritt schon im frühen Lebensalter auf. Verschiedene genetische Mutationen werden für FAD als Ursache diskutiert (siehe Kapitel 1.3.1; *Selkoe, 2001*). Bei der sporadischen Form treten die charakteristischen Symptome erst im höheren Lebensalter auf. Ihre Entstehung ist bislang unbekannt.

Oft überlagert sich die Alzheimer-Pathogenese mit normalen Alterungsprozessen und/oder anderen altersbedingten Hirnerkrankungen wie Morbus Parkinson oder vaskulärer Demenz (*Jellinger, 2006*). Die bei vielen Patienten existierenden Demenz-Mischformen erschweren die zuverlässige in vivo Diagnostik der Erkrankung. Neben neuropsychologischen Tests und Plasmamarkern werden zur Diagnose hauptsächlich bildgebende Verfahren, wie die Computer- (CT), Magnetresonanz- (MRI) und Positronenemissions- (PET)-Tomographie, eingesetzt.

### 1.1.1 Neuropathologie

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch drei wichtige neuropathologische Merkmale gekennzeichnet (*Selkoe, 2001; Mattson, 2004; Parihar und Hemnani 2004; Blennow et al., 2006*).

Das Gehirn der Patienten weist stark-atrophische Veränderungen auf, die vor allem den fronto-temporalen und parieto-okzipitalen Bereich des Cortex und den Hippocampus betreffen (*Psychrembel, 1997*). In diesen Regionen sind wichtige kognitive Funktionen lokalisiert. Neuronen des cholinergen Transmittersystems degenerieren bereits im frühen Erkrankungsstadium (siehe Kapitel 1.2; *Mesulam, 2004b*). Im späteren Krankheitsverlauf werden weitere Transmissionssysteme, wie das glutamaterge (*Francis, 2003*), serotonerge (*Zarros et al., 2005*) und adrenerge (*Matthews et al., 2002*) System, von der Neurodegeneration beeinflusst.

In den degenerierenden Hirnregionen treten senile Amyloid-Plaques auf. Senile Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen des  $\beta$ -Amyloid-Peptids (A $\beta$ ), das unter Kapitel 1.3 detaillierter beschrieben wird.

Außerdem sind in einigen Neuronen des Hippocampus, entorhinalen Cortex und Neocortex so genannte paired helical filaments (PHFs) und neurofibrilläre Tangles (NTFs) detektierbar (*Arendt, 2004; Kidd, 2006; Avila, 2006*). PHFs und Tangles bestehen hauptsächlich aus einem hyperphosphorylierten Protein namens Tau (*Grundke-Iqbal et al., 1986*), das normalerweise die Funktion der Microtubuli reguliert. Zahlreiche Kinasen wurden identifiziert, die an der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins beteiligt sein könnten (*Drewes et al., 1992; Correias et al., 1992; Baumann et al., 1993; Goedert et al., 1997*). Die abnormale Phosphorylierung von Tau fördert dessen Aggregationstendenz und intrazelluläre Ablagerung zunächst als PHFs - später als Tangles. Das hyperphosphorylierte Tau-Protein ist gegen proteolytischen Abbau durch Phosphatasen resistent (*Johnson et al., 1989*).

Neben den drei charakteristischen neuropathologischen Veränderungen können bei der Alzheimer-Erkrankung Beeinträchtigungen zahlreicher weiterer Stoffwechselprozesse beobachtet werden.

Das Gehirn ist das Organ mit dem höchsten Glukosebedarf. Bei Morbus Alzheimer tritt in allen corticalen Regionen ein Glukosehypometabolismus auf (*Hoyer, 2004*;

*Schubert, 2005*). Die Insulinrezeptoren der Patienten zeigen verminderte Sensitivität (*Xie et al., 2002*) und Dysfunktionen in der Insulin-Transduktionskaskade (*Frolich et al., 1999*). Die Aktivitäten verschiedener Schlüsselenzyme der Glykolyse sind reduziert (*Bigl et al., 1996; Bigl et al., 1999; Bigl et al., 2000*). Der Glukose-Hypometabolismus bei Morbus Alzheimer kann mit dem bildgebenden Verfahren der Positronenemissionstomographie (PET) diagnostiziert werden (*Mosconi et al., 2005*).

Störungen im Lipid- und Cholesterolfstoffwechsel werden ebenfalls mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht (*Shobab et al., 2005; Mielke et al., 2006; Sjögren et al., 2006*). So fördert cholesterinreiche Ernährung die Plaquebildung und den Ausbruch der Krankheit (*Refolo et al., 2000*). Die Behandlung mit Cholesterolsynthesehemmern (Statine) vermindert dagegen die Plaqueformation und das Erkrankungsrisiko (*Wolozin et al., 2000; Puglielli et al., 2003*). Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen dem Lipidtransportprotein Apolipoprotein E (ApoE) und Morbus Alzheimer vermutet (*Roses, 2006; Mahley und Huang, 2006*). ApoE existiert in den drei Isoformen  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$ . Der Hauptteil der Bevölkerung exprimiert die Isoform  $\epsilon 3$ . Die Expression der Isoform  $\epsilon 4$  ist mit höheren Cholesterolspiegeln und einem verstärkten Alzheimer-Risiko assoziiert. Die Ursache hierfür ist bisher unklar. Es gibt Hinweise, dass ApoE $\epsilon 4$  die Formation von Amyloid-Plaques fördert, indem es als pathologisches Chaperone fungiert (*Holtzman et al., 2000*). Die Isoform  $\epsilon 4$  wird an nachfolgende Generationen vererbt.

Neben Abnormalitäten im Glukose- und Lipidmetabolismus ist bei der Alzheimer-Erkrankung der Ionenhaushalt gestört. Calciumionen spielen eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen und sind direkt an der Regulation des Überlebens und Sterbens von Neuronen beteiligt. Bei Morbus Alzheimer ist die Calcium-Homeostase beeinträchtigt, was neuronale Dysfunktionen und vermehrten Zelltod begünstigen kann (*LaFerla, 2002; Mattson, 2002; Canzoniero und Snider, 2005*).

Auch das physiologische Gleichgewicht anderer Elemente, wie Aluminium, Eisen, Zink und Kupfer, ist bei der Erkrankung verändert (*Maynard et al., 2005; Sayre et al., 2005; Lui et al., 2006*). In vitro wurde gezeigt, dass Metallionen die Aggregation des A $\beta$ -Peptids fördern (*Bush et al., 1994; Atwood et al., 1998; Huang et al., 2004a*). In vivo reichern sich die Metallionen verstärkt in Amyloid-Plaques an (*Lovell et al., 1998*). Im Tiermodell wurde durch Behandlung mit Metallchelatoren eine Reduktion der Plaquebildung erreicht (*Cherny et al., 2001*). Metallchelatoren werden als mögliche Therapieoption für Morbus Alzheimer diskutiert (*Liu et al., 2005*).

Andere Arbeitsgruppen berichten über Zellzyklusveränderungen bei der Alzheimer-Erkrankung (*Raina et al., 2000; Arendt, 2002; Webber et al., 2005*). Neuronen befinden sich normalerweise außerhalb der Neurogenese in einem post-mitotischen Ruhestadium. Hippocampale Neuronen von Alzheimer-Patienten weisen jedoch einen aktivierten Zellzyklus auf.

Die pathologischen Prozesse im Gehirn der Erkrankten sind von chronischer Neuroinflammation begleitet (*Akiyama et al., 2000; Rozemueller et al., 2005; Tuppo und Arias, 2005; Hoozemans et al., 2006; Sastre et al., 2006*). In der Umgebung der Amyloid-Plaques sind reaktive Astrozyten, aktivierte Mikrogliazellen und erhöhte inflammatorische Proteine (z.B. Zytokine, Akute-Phase-Proteine) nachweisbar. Bestimmte genetische Polymorphismen oder erhöhte Plasmaspiegel einiger inflammatorischer Proteine (Interleukin-1,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin,  $\alpha$ 2-Macroglobulin) konnten mit einem verstärkten Alzheimer-Risiko in Verbindung gebracht werden (*McGeer und McGeer, 2001*). Die Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) vermindert das Erkrankungsrisiko (*McGeer et al., 2006*).

Zusätzlich zur Entzündungsreaktion treten im Alzheimer-Gehirn vermehrt reaktive Sauerstoffspezies und Merkmale von oxidativem Stress auf (*Butterfield und Boyd-Kimball, 2004; Huang et al., 2004b; Nunomura et al., 2006*). Diese Prozesse werden detaillierter unter Kapitel 1.4 erläutert.

### **1.1.2 Symptomatik**

Zu Beginn der Erkrankung treten leichte Gedächtnisstörungen auf. Sie werden auch als Mild Cognitive Impairment (MCI) bezeichnet. Im weiteren Verlauf kommen Unruhe, Sprach-, Erkennungs- und Orientierungsstörungen, motorische und räumliche Beeinträchtigungen und oft euphorische oder depressive Verhaltensänderungen hinzu (*Psychrembel, 1997*). Die Betroffenen sind schließlich nicht mehr fähig, elementare Tätigkeiten selbständig auszuführen und werden zum Pflegefall. Fünf bis zehn Jahre nach dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome endet die Alzheimer-Erkrankung mit dem Tod, der meist durch Sekundärleiden, wie Infektionen, verursacht wird ([www.alzheimer-forschungsinitiative.de](http://www.alzheimer-forschungsinitiative.de)).

### 1.1.3 Therapie

Zur Behandlung von Morbus Alzheimer steht zurzeit lediglich eine medikamentöse Palliativtherapie zur Verfügung. Diese ist auf eine symptomatische Wirkung beschränkt. Es besteht weder die Möglichkeit einer Prophylaxe noch einer Heilung der Krankheit (*Masters et al., 2006; Blennow et al., 2006; Moreira et al., 2006*).

Die kognitiven Defizite, die durch die cholinerge Degeneration verursacht werden, lassen sich durch Einsatz von Acetylcholinesterase-Inhibitoren temporär positiv beeinflussen. Acetylcholinesterase-Inhibitoren verhindern den Abbau des cholinergen Neurotransmitters Acetylcholin (siehe Kapitel 1.2) und erhöhen somit dessen Verfügbarkeit an den synaptischen Endigungen. Die dadurch erzielten Verbesserungen der Gedächtnis- und Verhaltenssymptome wurden in zahlreichen Studien belegt (*Birks, 2006*). In Deutschland sind derzeit drei Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Rivastigmin, Galantamin und Donepezil) zur Behandlung von Morbus Alzheimer zugelassen ([www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de)).

Ein weiterer zugelassener Wirkstoff ist der N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptorantagonist Memantin. Memantin blockiert die Bindung des Neurotransmitters Glutamat an den NMDA-Rezeptor, vermindert die glutamaterge Aktivität und schützt so die Neuronen vor Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität. Die neuroprotektive Wirkung der Substanz trägt zur Verbesserung der krankheitsbedingten Symptomatik bei (*McShane et al., 2006*).

Zusätzlich werden Antioxidantien und durchblutungsfördernde Wirkstoffe, wie z.B. Ginkgolide, Vitamine C und E, Curcumin oder Knoblauchextrakte, als Antidementiva angewandt. Oft ist die Wirkung solcher Substanzen umstritten oder unzureichend belegt (*Frank und Gupta, 2005*).

Bei psychotischen Verhaltensstörungen, die als Begleitsymptome von Morbus Alzheimer auftreten können, werden Antidepressiva (*Lyketsos und Olin, 2002*) und Neuroleptika (*Ballard und Howard, 2006*) eingesetzt.

Derzeit laufen unzählige Bemühungen an der Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten (*Masters et al., 2006; Blennow et al., 2006*). Potenzielle Ansatzpunkte sind die Hemmung der Plaquebildung durch Fibrillisations- und Sekretase-Inhibitoren (siehe Kapitel 1.3; *Higuchi et al., 2005*) oder die aktive/passive Immunisierung mit spezi-

fischen Antikörpern gegen das Amyloid (*Nitsch, 2004; Schenk et al., 2005*). Auch Inhibitoren der Tau-Phosphorylierung werden in vorklinischen Studien getestet. Weitere Hoffnungen sind die erwähnten antiphlogistischen, cholesterolsenkenden oder metallchelatierenden Verbindungen (siehe Kapitel 1.1.2).

## **1.2 Das cholinerge System**

Unter dem cholinergen Transmittersystem werden alle neuronalen Signalwege zusammengefasst, die den Botenstoff Acetylcholin (ACh) zur Neurotransmission verwenden (*Mesulam, 2004a*). Im Zentralnervensystem steuert ACh vor allem Prozesse, die mit Denk- und Lernvorgängen verbunden sind. Aber auch in der Regulation der corticalen Aktivität und Plastizität, des Schlaf-Wach-Rhythmus und des cerebralen Blutflusses ist ACh involviert.

Im vegetativen Nervensystem spielt der Neurotransmitter als ganglionärer und postganglionärer Überträgerstoff eine entscheidende Rolle. Außerdem reguliert ACh die Muskelkontraktion an der motorischen Endplatte.

### **1.2.1 Lokalisation des cholinergen Systems im Gehirn**

Der Ursprung des cholinergen Transmittersystems im Gehirn liegt im basalen Vorderhirn und in der pontine-retikulären Formation. Dort sind die so genannten cholinergen Projektionsneuronen lokalisiert. Das cholinerge basale Vorderhirn besteht aus dem Nucleus basalis Meynert, dem vertikalen Diagonalband von Broca und dem medialen Septum. Die Neuronen des Nucleus basalis Meynert und des vertikalen Diagonalbandes von Broca innervieren vor allem Cortex, Riechkolben und Amygdala. Die Neuronen des medialen Septums innervieren ausschließlich den Hippocampus. Das pontine-cholinerge System besteht vorwiegend aus thalamischen intralaminaren Kernen, die nur einen kleinen Teil des Cortex innervieren. Im Corpus striatum sind außerdem cholinerge Interneuronen lokalisiert (*Mesulam, 1996; Mufson et al., 2000; Schliebs und Arendt, 2006*).

## 1.2.2 Komponenten des cholinergen Systems

Die Bildung und Speicherung des Neurotransmitters ACh erfolgt in den Synapsen der cholinergen Neuronen (Abb.1). Unter Katalyse des Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) wird ACh aus Cholin und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-Co A) in den präsynaptischen Endigungen synthetisiert (Forth, Henschler, Rummel, 2001). Cholin wird über einen hoch-affinen, Natrium-abhängigen Cholintransporter (high affinity choline uptake, HACU) aktiv aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse transportiert.

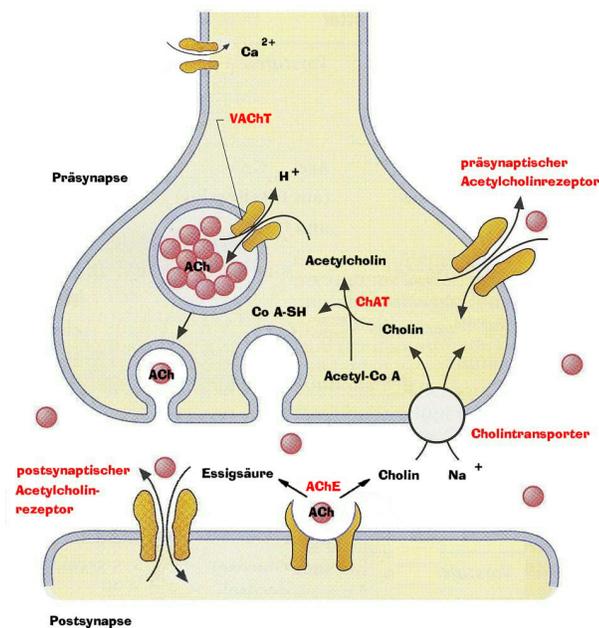


Abb.1. Die cholinerge Synapse (nach Löffler und Petrides, 2003)

Nach der Synthese wird ACh mit Hilfe des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) in präsynaptischen Vesikeln angereichert und bis zur Freisetzung durch ein exzitatorisches, spannungsabhängiges Calcium-vermitteltes Signal gespeichert. Das freigesetzte ACh diffundiert dann durch den synaptischen Spalt und bindet an nikotinerge oder muskarinerge Rezeptoren auf der post- bzw. präsynaptischen Membran (Abb.1). Nikotinrezeptoren (nAChR) sind ionotrope Rezeptoren mit einer Pentamerstruktur, die aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) zusammengesetzt sind (Oddo und LaFerla, 2006). Muskarinrezeptoren (mAChR) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Bisher wurden fünf verschiedene mAChR-Subtypen (M1, M2, M3, M4, M5) identifiziert (Koch et al., 2005). Nach erfolgter Bindung an nAChR oder mAChR wird ACh im synaptischen Spalt durch Acetylcholi-

nesterase (AChE) zu Cholin und Essigsäure abgebaut. Cholin wird erneut in die Präsynapse aufgenommen, um für die Synthese neuer ACh-Moleküle verwendet zu werden.

### 1.2.3 Die cholinerge Neurodegeneration bei der Alzheimer-Erkrankung

Wie bereits erwähnt, ist die Alzheimer-Erkrankung durch einen Verlust cholinergere Neuronen gekennzeichnet. Der cholinerge Zellverlust, der vor allem das basale Vorderhirn und später alle corticalen Bereiche betrifft, korreliert mit dem Schweregrad der kognitiven Beeinträchtigung der Patienten (*Perry, 1986; Pappas et al., 2000; Shionotoh et al., 2000; Auld et al., 2002; Mesulam, 2004b; Schliebs, 2005; Schliebs und Arendt, 2006*). Es wurde die cholinerge Hypothese von Morbus Alzheimer postuliert, welche die Degeneration des cholinergen Systems für die Abnahme der Denk- und Gedächtnisfunktionen verantwortlich macht (*Bartus, 2000*).

Zahlreiche Studien an post mortem Gehirnen von Alzheimer-Patienten belegen, dass verschiedene Komponenten des cholinergen Transmittersystems während der Pathogenese beeinflusst werden (*Nordberg, 1992a; Bierer et al., 1995; Auld et al., 2002; Mesulam, 2004b*). Es wird über verminderte Aktivitäten des Enzyms ChAT (*Bowen et al., 1976; Perry et al., 1977; Coyle et al., 1983*), des Cholintransporters (*Rylett et al., 1983*) und über eine reduzierte ACh-Freisetzung (*Nilsson et al., 1986*) berichtet. Auch nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren weisen im Alzheimer-Hirn veränderte Bindungseigenschaften und eine abnorme Signaltransduktion auf (*Nordberg et al., 1992b, c; Perry et al., 1995*).

Durch die Verabreichung von Cholinometika, wie Acetylcholinesterase-Inhibitoren (siehe Kapitel 1.1.3) oder ACh-Rezeptoragonisten, lassen sich die kognitiven Symptome der Patienten geringfügig verbessern, jedoch nicht aufheben (*Mesulam, 2004b*). Interessanterweise reduziert Rauchen oder die chronische Administration von Nikotin im Tiermodell die Bildung von Plaques (*Nordberg et al., 2002; Hellstrom-Lindhall et al., 2004a, b*).

Die Ursache der cholinergen Neurodegeneration ist bisher ungeklärt. Eine Vielzahl von Publikationen zeigen die Beeinflussung des cholinergen Systems durch A $\beta$  oder Tau (*Auld et al., 2002; Mesulam, 2004b*). Die cholinerge Degeneration tritt jedoch schon sehr frühzeitig im Krankheitsverlauf auf - weit bevor die Akkumulation der pathologischen Peptide in Plaques und Tangles erfolgt (*Selkoe, 2002; Klein, 2006*).

### 1.3 $\beta$ -Amyloid

Als Hauptbestandteil der Alzheimer-Plaques wurde das  $\beta$ -Amyloid-Protein (A $\beta$ ) identifiziert (*Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985*). A $\beta$  ist ein endogenes Peptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa, das auch unter normalen Bedingungen im Organismus gebildet und sekretiert wird (*Haass et al., 1993; Shoji et al., 1992*). Seine physiologische Funktion ist bisher unbekannt. In niedrigen Konzentrationen wurden für A $\beta$  neurotrophe Eigenschaften beschrieben (*Yankner et al., 1990; Lopez-Toledano und Shelanski, 2004*). So wird spekuliert, das Peptid könnte möglicherweise an Differenzierungsvorgängen in der Zelle beteiligt sein.

#### 1.3.1 Bildung von $\beta$ -Amyloid

Im Organismus wird A $\beta$  durch proteolytisches Schneiden aus einer Vorstufe, dem Amyloidpräkursorprotein (APP), gebildet (*Busciglio et al., 1993; Selkoe, 1998; De Strooper und Annaert, 2000; Zheng und Koo, 2006*). Das Vorläuferprotein wird ubiquitär exprimiert. Im Gehirn kommt es in neuronalen Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und nicht-neuronalen Zellen vor. APP ist unter anderem an Zelladhäsion, Zellmigration, Neuritenwachstum, Synaptogenese und neuroprotektiven Prozessen beteiligt. Auch eine Funktion als Rezeptor auf der Zelloberfläche wird diskutiert (*Zheng und Koo, 2006*). Als integrales Membranprotein besitzt APP eine transmembranäre Domäne mit einem langen extrazellulären N- und einem kurzen intrazellulären C-Terminus (Abb.2). Unter physiologischen Bedingungen wird APP vorwiegend über den so genannten  $\alpha$ -sekretorischen Weg abgebaut. Durch die Aktivität des Enzyms  $\alpha$ -Sekretase, das APP innerhalb der A $\beta$ -Sequenz im N-terminalen Ende schneidet, entstehen zunächst zwei Spaltprodukte sAPP $\alpha$  und ein kurzes p3-CT-Fragment. Das p3-CT-Fragment wird anschließend durch das Enzym  $\gamma$ -Sekretase in p3 und CT $\alpha$  gespaltet. Alle Abbauprodukte des  $\alpha$ -sekretorischen Weges sind löslich und nicht pathogen. Bei der Alzheimer-Erkrankung ist der Abbau von APP zugunsten des amyloidogenen,  $\beta$ -sekretorischen Weges vorschoben. Anstelle der  $\alpha$ -Sekretase schneidet das Enzym  $\beta$ -Sekretase (beta-site APP-Cleaving Enzyme, BACE) APP in das lösliche sAPP $\beta$  und das A4-CT-Fragment, welches dann durch  $\gamma$ -Sekretase in CT $\beta$  und pathogenes A $\beta$  gespaltet wird. Durch unterschiedliche Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase können beim amyloidogenen Weg A $\beta$ -Produkte verschiedener Länge (39

bis 42 Aminosäuren) entstehen. Die Spaltprodukte, die am häufigsten bei Morbus Alzheimer vorkommen, sind A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42).

Das humane APP-Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert. Interessanterweise weisen Patienten mit Trisomie 21 (Down-Syndrom), bei denen aufgrund von Meiosestörungen das Chromosom 21 dreimal vorhanden ist, eine alzheimer-ähnliche Pathologie im Hirn auf (*Glennner und Wong, 1984*). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Punktmutationen im APP-Gen identifiziert, die zu einer veränderten Proteolyse des Vorläuferproteins und zur Entstehung der familiären Form von Morbus Alzheimer führen können. Auch Mutationen im Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) - zwei zum Funktionskomplex der  $\gamma$ -Sekretase gehörenden Proteine - konnten mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht werden (*Selkoe, 2001*).

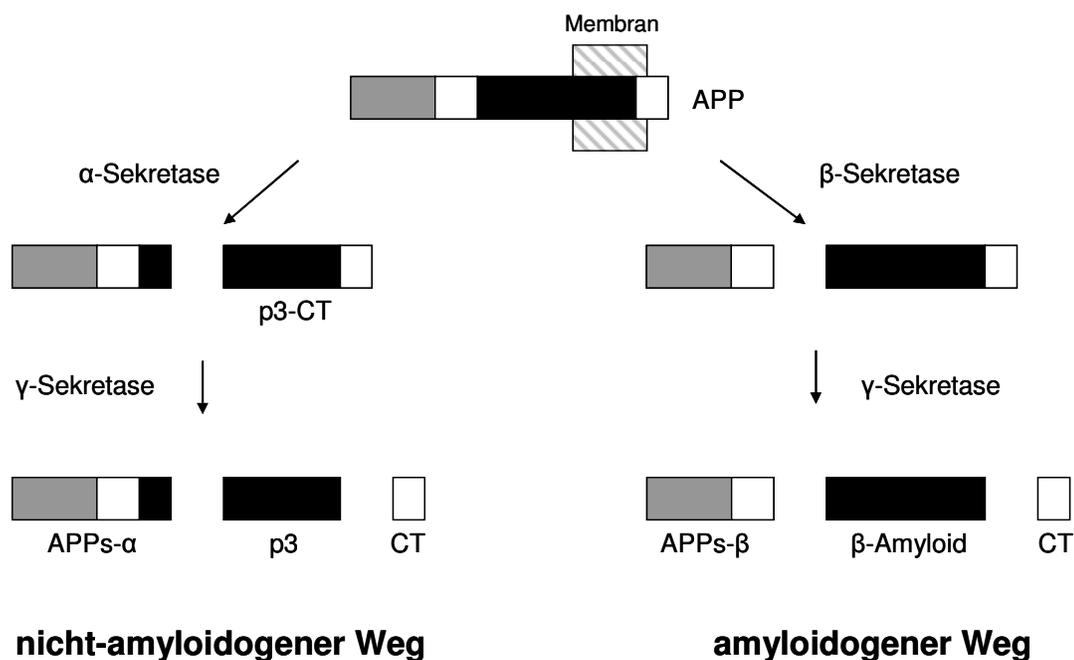


Abb.2. Der amyloidogene und nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung

### 1.3.2 Eigenschaften von fibrillärem $\beta$ -Amyloid

Aufgrund ihrer Hydrophobizität besitzen die A $\beta$ -Peptide eine starke Tendenz zur Selbstaggregation. A $\beta$ (1-42) hat im Vergleich zu A $\beta$ (1-40) die stärkere Aggregationsfähigkeit (*Klein et al., 1999; Bitan et al., 2003*). Während des Aggregationsprozesses erfolgt eine Konformationsänderung von der  $\alpha$ -Helix- zur  $\beta$ -Faltblattstruktur (*Kirkitadze et al., 2001*).

Beim Alzheimer-Patienten lagern sich A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42) als unlösliche Fibrillen in senilen Plaques ab. Fibrilläres A $\beta$  wurde zunächst als Auslöser für die Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer betrachtet (*Hardy und Higgins, 1992*). Eine Vielzahl von Studien mit verschiedenen Zellkulturmodellen belegen die zytotoxischen Wirkungen von fibrillärem A $\beta$  (*Pike et al., 1991; Pike et al., 1993; Lorenzo und Yankner, 1994; Datki et al., 2004; Petkova et al., 2005; Irie et al., 2005; Deshpande et al., 2006*). Für A $\beta$ (1-42) wurde die höchste Neurotoxizität bestimmt (*Klein et al., 1999*). Im Laufe der Zeit entstanden aber Zweifel am aggregierten Amyloid als Ursache für die A $\beta$ -bedingte Neurodegeneration. Denn neuronaler Zellverlust und eingeschränkte Gedächtnisfunktionen korrelierten nur schwach mit der Plaque-Ablagerung im Hirn der Patienten (*Giannakopoulos et al., 2003*). Weiterhin wurden Patienten mit hoher A $\beta$ -Last und kognitiv normalen Fähigkeiten identifiziert (*Delaere et al., 1990*). Auch in transgenen Mäusen mit einer humanen APP-Mutation (Tg2576) konnte bei ausgeprägter Plaque-Pathologie kaum Neurodegeneration beobachtet werden (*Irizarry et al., 1997; Westermann et al., 2002*).

### 1.3.3 Eigenschaften von niedermolekularem $\beta$ -Amyloid

Die Zweifel an der Amyloid-Hypothese von Hardy und Higgins (*Hardy und Higgins, 1992*) führten in den letzten Jahren zu einem Umdenken in der Alzheimer-Forschung. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich verstärkt mit niedermolekularen Aggregationsformen des Peptids und untersuchen deren Effekte auf Neuronen. Dabei wird zwischen Monomeren, Oligomeren bzw. Amyloid-beta derived diffusile Ligands (ADDLs) und Protofibrillen unterschieden. Monomere sind einzelne A $\beta$ -Moleküle, die sich aufgrund ihrer großen Aggregationstendenz schnell zu oligomeren Aggregaten zusammenlagern (Abb.3) (*Teplow, 1998; Chromy et al., 2003; Taylor et al., 2003*). Eine genaue Molekülanzahl wird bei Oligomeren nicht definiert. Sie verfügen als Gesamtkomplex über ausreichende Löslichkeit und enthalten keine fibrillären Strukturen. Die häufig beschriebenen ADDLs gehören auch zu den Oligomeren (*Selkoe et al., 1986; Lambert et al., 1998; Gong et al., 2003; Catalano et al., 2006; Klein, 2006*). Protofibrillen sind Vorstufen des fibrillären A $\beta$ , die bereits geringe Anteile an  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzen (*Harper et al., 1997; Walsh et al., 1999; Hartley et al., 1999*).

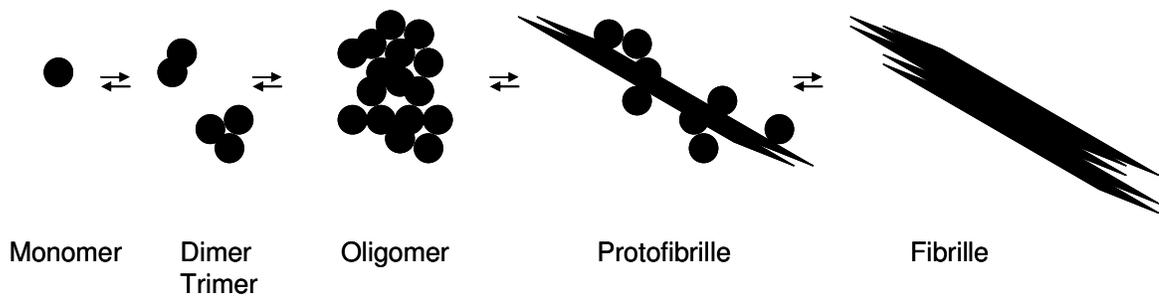


Abb.3. Aggregationsformen von  $\beta$ -Amyloid

Im Jahr 1995 wurde erstmals über die Neurotoxizität löslicher A $\beta$ -Komplexe berichtet (Oda et al., 1995). Mittlerweile wurde an zahlreichen Zellkultur- und Tiermodellen belegt, dass A $\beta$  bereits im nicht-aggregierten Zustand die neuronale Funktion beeinflussen kann (Klein et al., 2004; Klein, 2006; Catalano et al., 2006). Oligomere beispielsweise binden spezifisch an die Oberfläche von Dendriten und Synapsen und können zu Störungen der synaptischen Funktion führen (Lacor et al., 2004). In Hirnschnittkulturen und nach Injektion in Nagetierhirnen verursachten Oligomere eine Verlängerung der Lang-Zeit-Potenzierung, was als eine Beeinträchtigung der kognitiven Funktion betrachtet werden kann (Wang et al., 2002; Walsh et al., 2002b; Cleary et al., 2005; Townsend et al., 2006). Erst kürzlich wurde aus der transgenen Maus Tg2576 eine lösliche, oligomere A $\beta$ -Spezies mit einem Molekulargewicht von 56kDa (A $\beta$ \*56) isoliert, die nach Injektion in Ratten zu Beeinträchtigungen der kognitiven Funktionen führte (Lesne et al., 2006; Cole et al., 2006). Da die induzierten Gedächtnisdefizite scheinbar reversibel sind (Gong et al., 2003), wird eine Behandlung mit spezifischen Antikörpern gegen die oligomeren A $\beta$ -Aggregate als mögliche Therapieoption bei der Alzheimer-Erkrankung diskutiert (Kayed et al., 2003; Klyubin et al., 2005; Lee et al., 2006). Die Anwendung von Oligomer-Formationshemmern, wie z.B. Curcumin, könnte ebenfalls positive Effekte auf den Verlauf der Erkrankung haben (Yang et al., 2005; Walsh et al., 2005). Auch Protofibrillen induzierten elektrophysiologische Veränderungen und Neurotoxizität in corticalen Neuronen (Walsh et al., 1999; Hartley et al., 1999).

Sowohl oligomere als auch protofibrilläre A $\beta$ -Aggregate konnten im Gehirn, Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten detektiert werden, was auf die Bedeutung dieser Formen in der Pathogenese hinweist (Gong et al., 2003). Weiter-

hin korrelieren Neuronenverlust und beeinträchtigte kognitive Fähigkeiten besser mit dem Gehalt an löslichem A $\beta$  als mit der Plaquedichte (*Mc Lean et al., 1999*).

Die Ergebnisse führten zur Etablierung einer neuen Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Erkrankung. Der frühzeitige Gedächtnisverlust der Patienten, der schon vor einer massiven Plaqueablagerung auftritt, wird möglicherweise durch die Wirkung niedermolekularer A $\beta$ -Formen verursacht. Die neurologischen Dysfunktionen werden weniger durch neuronalen Zelltod, sondern durch Störung der synaptischen Funktion induziert (*Selkoe, 2002; Hardy und Selkoe, 2002; Klein, 2006*).

### 1.3.4 Beeinflussung des cholinergen Systems durch $\beta$ -Amyloid

Neben neurotoxischen Effekten kann A $\beta$  in niedrigen Konzentrationen modulatorisch auf Neurone wirken und direkt die Komponenten des cholinergen Systems beeinflussen (*Auld et al., 2002; Tran et al., 2002; Dolezal und Kasparova, 2003; Kar et al., 2004*). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten an Zellkultur- und Tiermodellen eine A $\beta$ -induzierte Hemmung der Cholinaufnahme (*Kar et al., 1998*) und der ChAT-Aktivität (*Pedersen et al., 1996; Pedersen und Blusztajn, 1997*). Auch die Beeinflussung der ACh-Freisetzung durch A $\beta$  wurde nachgewiesen. An corticalen und hippocampalen Hirnschnittkulturen und Synaptosomen verursachte die Inkubation mit löslichen A $\beta$ -Peptiden eine Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung (*Kar et al., 1996; Kar et al., 1998; Lee et al., 2001; Vaucher et al., 2001*). Nach Behandlung mit aggregiertem A $\beta$ (1-42) wurde ACh an Hirnschnitten des basalen Vorderhirns dagegen gesteigert freigesetzt (*Forgon et al., 1998*). Weiterhin beeinflusst das Peptid die Funktion von nikotineren und muskarineren Acetylcholinrezeptoren. A $\beta$ (1-42) besitzt hohe Affinität zu  $\alpha$ 2 $\beta$ 4-nAChR und  $\alpha$ 7-nAChR (*Wang et al., 2000a, b*). Dabei wird widersprüchlich über agonistische und antagonistische Wirkungen an den Rezeptoren berichtet (*Liu et al., 2001; Dineley et al., 2001; Pettit et al., 2001*). An Muskarinrezeptoren des Subtyps M1 unterbricht A $\beta$  die Signalweiterleitung (*Kelly et al., 1996; Huang et al., 2000*).

An dieser Stelle soll kurz erwähnt werden, dass das cholinerge System wiederum die APP-Prozessierung reguliert (*Nitsch et al., 1993*). ACh fördert die Bildung von sAPP $\alpha$  im nicht-amyloidogenen Weg (*Rossner et al., 1998; Hellstrom-Lindahl et al., 2000*). Verminderte cholinerge Aktivität bei Morbus Alzheimer scheint, die APP-Prozessierung zugunsten des amyloidogenen Weges zu verschieben und die Ent-

stehung von weiteren neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden zu induzieren (*Liskowsky und Schliebs, 2006*).

## 1.4 Oxidativer Stress

Wie bereits unter Kapitel 1.1.1 angedeutet, stellt oxidativer Stress ein wichtiges neuropathologisches Merkmal der Alzheimer-Erkrankung dar. Unter oxidativem Stress werden sämtliche Prozesse in einem Organismus zusammengefasst, die mit einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einhergehen und Schädigungen von Zellen verursachen können.

### 1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Sauerstoffderivate, die radikalische Kettenreaktionen initiieren und/oder weiterführen können (*Cui et al., 2004; Andersen, 2004; Halliwell, 2006*). Aufgrund ihrer Reaktivität können ROS mit verschiedenen zellulären Komponenten, wie DNA, Membranlipiden oder Proteinen, reagieren und Schädigungen im Organismus hervorrufen. Zu den ROS zählen Radikale mit freien ungepaarten Elektronen, wie z.B. das Superoxid- ( $O_2^{\cdot -}$ ), das Hydroxyl- ( $OH^{\cdot}$ ) oder das Nitritoxidradikal ( $NO^{\cdot}$ ) und Sauerstoffverbindungen, die selbst keine ungepaarten Elektronen besitzen, aber zu Radikalen weiterreagieren können [z.B. Ozon ( $O_3$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Peroxonitrit ( $ONOO^{\cdot}$ )]. Metallionen, wie  $Fe^{2+}$  und  $Cu^{2+}$ , katalysieren die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*Halliwell und Gutteridge, 1990*). Während des normalen Metabolismus entstehen ROS in der mitochondrialen Atmungskette bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff zu Wasser oder als Nebenprodukte verschiedener enzymatischer Reaktionen. Aktivierte Mikrogliazellen können ebenfalls große Mengen an ROS produzieren, freisetzen und benachbarte Zellen beeinflussen (*Minghetti und Levi, 1998*). Der Organismus verfügt über ein endogenes antioxidatives Abwehrsystem und kann gebildete schädliche Radikale inaktivieren. Die Abwehr wird durch das Zusammenwirken antioxidativer Enzyme, metallchelatierender Proteine, Radikalfänger und Reparaturenzyme realisiert (*Willcox et al., 2004*).

In niedrigen Konzentrationen sind ROS untoxisch und an verschiedenen physiologischen Funktionen in der Zelle beteiligt. So fungieren die Sauerstoffderivate unter an-

derem als Modulatoren der Signaltransduktion (z.B. NO als endothelialer Vasodilatator), der Transkription oder von Apoptose (*Cui et al., 2004*).

### 1.4.2 Oxidativer Stress bei der Alzheimer-Erkrankung

Während des Alterns oder bei pathologischen Prozessen kommt es zum Ungleichgewicht zwischen ROS-Bildung und antioxidativen Abwehrmechanismen. Ein vermehrter Anfall von schädigenden Sauerstoffradikalen ist die Folge. Das Gehirn ist besonders anfällig, da es ein Fünftel des gesamten Sauerstoffbedarfs und einen hohen Energieumsatz besitzt (*Andersen, 2004*).

Auch Morbus Alzheimer ist mit einem verstärkten Auftreten von oxidativem Stress assoziiert (*Mattson und Pedersen, 1998; Butterfield et al., 2002a; Huang et al., 2004b; Canevari et al., 2004; Smith, 2006; Nunomura et al., 2006*). In post mortem Hirngewebe, Cerebrospinalflüssigkeit und Plasma von Alzheimer-Patienten konnten zahlreiche Marker für oxidativen Stress nachgewiesen werden. Die untersuchten Proben zeigten oxidative Veränderungen an Nukleinsäuren (*Smith et al., 1996; Smith et al., 1997*), erhöhte Konzentrationen von 4-Hydroxynonenal und Malondialdehyd, zwei Marker für Lipidperoxidation (*Butterfield et al., 2002b*), und eine verstärkte Proteinoxidation (*Hensley et al., 1998*). Die Aktivitäten endogener antioxidativ wirkender Enzyme, wie Superoxiddismutase (SOD), Catalase, Glutathionperoxidase (GSHPx) und Glutathionreduktase (GSHRd), waren außerdem reduziert (*Zemlan et al., 1989; Pappolla et al., 1992; Gabbita et al., 1999*).

Eine Behandlung mit antioxidativen Substanzen, wie z.B. Vitamin E, reduzierte in Tiermodellen die Tau-Phosphorylierung (*Nakashima et al., 2004*) und Plaquedeposition (*Sung et al., 2004*). Klinische Studien mit Antioxidantien führten jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen bei Alzheimer-Patienten (*Kontush und Schekatolina, 2004; Nunomura et al., 2006*).

### 1.4.3 Induktion von oxidativem Stress durch $\beta$ -Amyloid

A $\beta$  selbst ist in der Lage, oxidativen Stress zu produzieren (*Butterfield, 2002c; Butterfield und Boyd-Kimball, 2004*). Hensley et al. zeigten in in vitro Experimenten, dass A $\beta$  in wässriger Lösung ROS generiert (*Hensley et al., 1994*). In der Zellkultur induziert A $\beta$  die Bildung von Wasserstoffperoxid (*Behl et al., 1994*). Ein möglicher Me-

chanismus hierfür könnte die Reaktion von A $\beta$  mit Metallionen, wie Cu<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup>, sein (Abb.4), die zur Reduktion der Metallionen führt, die wiederum mit O<sub>2</sub> zu reaktiven O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weiterreagieren (*Huang et al., 1999*).

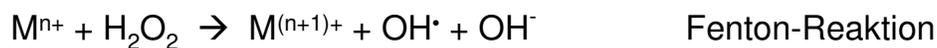
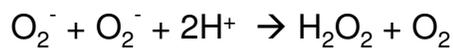
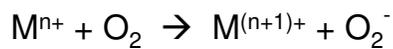
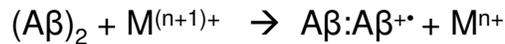


Abb.4. Bildung von ROS durch A $\beta$  (*nach Huang et al., 1999*)

In hippocampalen Primärzellkulturen nach A $\beta$ -Exposition und in *Caenorhabditis elegans* mit APP-Überexpression wurde eine erhöhte Proteinoxidation detektiert (*Yatin et al., 1999*). Andere Publikationen berichten über eine A $\beta$ -induzierte Lipidperoxidation in Primärzellkulturen von Mensch und Ratte (*Butterfield et al., 1994*). In APP-transfizierten PC12-Zellen konnten Marques et al. eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu Wildtypzellen beobachten (*Marques et al., 2003*). Für das oxidative Potenzial des Peptids scheint die Aminosäure Methionin in Position 35 von großer Bedeutung zu sein (*Butterfield und Boyd-Kimball, 2005*).

In niedrigen Konzentrationen sollen monomeres A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42) sogar antioxidative Eigenschaften besitzen (*Zou et al., 2002; Bishop et al., 2003; Kontush, 2001*). Administration der Monomere verminderte beispielsweise in Zell- und Tiermodellen die oxidative Eisen- und Kupfer-induzierte Zytotoxizität (*Zou et al., 2002; Bishop et al., 2003*) und schützte Lipoproteine vor Oxidation (*Kontush, 2001*).

Andererseits kann oxidativer Stress die Tau- und Amyloidpathologie in Zellkulturmodellen begünstigen (*Misonou et al., 2000; Paola et al., 2000; Gomez-Ramos et al., 2003*).

Es nicht geklärt, ob oxidativer Stress eine Ursache oder eine Folge der Amyloid-Akkumulation darstellt. Ebenfalls ist unklar, ob die cholinerge Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer durch eine spezifische Wirkung der neurotoxischen A $\beta$ -Peptide auf bestimmte Targetmoleküle verursacht wird oder sekundäre unspezifische Effekte, die aus der Amyloid-Pathologie resultieren (wie das Auftreten von oxidativem Stress), zum Untergang der cholinergen Neuronenpopulation führen.

## 1.5 Aufgaben- und Zielstellung

Die cholinerge Degeneration stellt ein wichtiges Merkmal der Alzheimer-Erkrankung dar. Die Ursachen für den frühzeitigen Verlust der cholinergen Neuronenpopulation sind jedoch unklar. Die verstärkte Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden ( $A\beta$ ) im Gehirn der Patienten könnte zur cholinergen Neurodegeneration beitragen, indem die Peptide neurotoxische Effekte und eine inhibierende Wirkung auf die cholinerge Transmission besitzen. Die zellulären Mechanismen, die an der  $A\beta$ -induzierten Neurodegeneration beteiligt sind, sind bisher nur unzureichend aufgeklärt.

In der vorliegenden Dissertation soll näher untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Aggregationsformen von  $A\beta(1-42)$  auf die Viabilität cholinergischer Neuronen besitzen. Gene, die an der Vermittlung möglicher neurodegenerativer Effekte beteiligt sind, sollen mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse identifiziert werden. Da zahlreiche Hinweise aus der Literatur daraufhin deuten, dass das oxidative Potenzial von  $A\beta(1-42)$  für dessen Neurotoxizität verantwortlich sein könnte, sollen in der Genexpressionsanalyse die Effekte von  $A\beta(1-42)$  mit denen von oxidativem Stress verglichen werden. Interessante Veränderungen auf Genebene sollen anschließend auf Proteinebene weiter verfolgt werden.

Für die Untersuchungen steht die Neuroblastom-Zelllinie SN56.B5.G4 (*Hammond et al., 1990*) zur Verfügung. Die Zelllinie exprimiert verschiedene cholinerge Marker und stellt ein geeignetes Modell zur Untersuchung der cholinergen Neurodegeneration dar.

## 2 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Merck, Darmstadt, Deutschland; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland und Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Es wurden stets Substanzen in höchster verfügbarer Reinheit verwendet. Chemikalien für molekularbiologische Methoden wurden in spezieller molekularbiologischer Qualität, d.h. RNase- und DNase-frei eingesetzt. Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und statistischen Analyse wurden, wenn nicht anders beschrieben, die Programme GraphPad Prism und GraphPad InStat (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) genutzt.

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die SN56.B5.G4-Zelllinie wurde durch Fusion der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 mit Zellen aus dem Septum von 21-Tage alten Mäusen (Stamm: C57BL/6) erzeugt (*Hammond et al., 1990*). Die Zelllinie wurde von Prof. Dr. B. Wainer, Atlanta, Georgia, USA zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der SN56.B5.G4-Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle's medium (*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*) mit 9 % fötalem Kälberserum (*Gibco BRL, Rockville, MD, USA*), 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (25.000 IE/25.000 µg) bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator (*Heraeus BB16, Osterode, Deutschland*). Für die Kultivierung und zur RNA- und Proteingewinnung wurden T25-Zellkulturflaschen (*Cellstar<sup>®</sup> Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*) verwendet. Für den MTT-Assay und Dichlorofluorescein-Assay wurden 96-Wellplatten; für die Immunhistochemie 24-Wellplatten (*Cellstar<sup>®</sup> Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*) genutzt. Die Zellen wurden stets in einer Dichte von ~ 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin (1x) (*Gibco BRL, Rockville, MD, USA*) gesplittet.

Die Differenzierung der Zellen wurde durch eine dreitägige Kultivierung mit 1 mM dibutyryl-cAMP und 1  $\mu$ M Retinsäure erreicht (*Jankowska et al., 1997; Szutowicz et al., 1999*). Am zweiten Tag wurde das Medium erneuert. Nach erfolgter Differenzierung wurden die Zellen im entsprechenden Experiment verwendet und nicht mehr geteilt. Für die Versuche wurden nur Zellen bis zur Passage 40 genutzt.

### 2.1.2 Behandlung der Zellen

Durch Zusatz von A $\beta$ (1-42) (*American Peptide, Sunnyvale, CA, USA*) bzw. Wasserstoffperoxid zum Kulturmedium wurden die differenzierten Zellen mit den Noxen inkubiert. Vom Wasserstoffperoxid und A $\beta$ (1-42) wurden zuvor Stocklösungen in HEPES 200 mM pH = 8,5 hergestellt. Kontrollzellen erhielten nur Zellkulturmedium mit einer entsprechenden Menge HEPES 200 mM pH = 8,5. Frisches A $\beta$ (1-42) wurde unmittelbar nach Auflösung dem Zellkulturmedium zugefügt. Das Altern von A $\beta$ (1-42) wurde durch eine sechstägige Präinkubation der Stocklösung bei 37 °C erreicht.

Die Inkubation mit den MAPK-Inhibitoren PD98059 (2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on), SP600125 (1,9-Pyrazoloanthron) und PD169316 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol) (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) erfolgte entweder als Coinkubation gleichzeitig mit A $\beta$ (1-42) oder in einer 24-stündigen Präinkubation des jeweiligen MAPK-Inhibitors; gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit A $\beta$ (1-42) nach Entfernung des MAPK-Inhibitors. Von PD98059, SP600125 und PD169316 wurden zuvor Stocklösungen in DMSO hergestellt.

### 2.1.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen

Die Zellen wurden mit einem Nikon T300 Mikroskop mit integrierter Coolsnap Kamera (*Nikon, Inc., El Segundo, CA, USA*) unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware MetaMorph 5.0 (*Universal Imaging Corporation, Downingtown, Pennsylvania, USA*) sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (*Lowry et al., 1951*). Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 20 µl in eine 96-Wellplatte vorgelegt. Nach Zugabe von 200 µl der Lösung C, die durch Mischen von Lösung A (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 M NaOH) und Lösung B (0,5 % CuSO<sub>4</sub> in 1 % Natriumcitrat) im Verhältnis 1 : 50 frisch hergestellt wurde, und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jedem Well 20 µl 1 M Folinreagenzlösung zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 min unter Lichtausschluss wurde die Absorption im Plattenphotometer (*Anthos Labtec HT3, Salzburg, Österreich*) bei 710 nm gemessen. Für die Eichkurve wurde Rinderserumalbumin (*Serva, Heidelberg, Deutschland*) in Konzentrationen zwischen 0,96 - 12 µg/20 µl verwendet. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt.

## 2.3 Radiochemische Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Cholinacetyltransferase und Acetylcholinesterase in undifferenzierten und differenzierten SN56.B5.G4-Zellen erfolgte mit Hilfe von radiochemischen Assays. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen auf dem Zellkulturflaschenboden wurde das Medium gewechselt. Die Hälfte der Flaschen erhielt weiter Kulturmedium, die andere Hälfte wurde für drei Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte das Ernten durch Waschen und Abschaben der Zellen vom Flaschenboden mit Hilfe eines Zellschabers (*Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*) sowie die Aufnahme der abgelösten Zellen in 500 µl PBS-Puffer 0,1 M pH = 7,4. Von der Zellsuspensionen wurden 20 µl zur Proteinbestimmung verwendet, der verbleibende Teil wurde bis zur Enzymmessung bei - 20 °C eingefroren.

### 2.3.1 Aktivität der Cholinacetyltransferase

Die Bestimmung der Aktivität der Cholinacetyltransferase basiert auf der radiochemischen Methode nach Fonnum, bei der tritiummarkiertes Acetyl-Coenzyme A und Cholinchlorid durch die Aktivität des Enzyms zu tritiummarkiertem Acetylcholin um-

gesetzt wird (Fonnum, 1975). Die aufgetauten Zellsuspensionen wurden mit Triton X-100-haltiger 0,25 M Saccharose so verdünnt, dass sich eine Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein und 0,2 % Triton X-100 in jeder Probe ergab. Durch Zugabe von  $5 \mu\text{l}$  dieser Verdünnung zu einer vorbereiteten Substratmischung aus 0,28 mM [ $^3\text{H}$ ]Acetylcoenzyme A (*spezifische Aktivität: 7,4 TBq/mmol; PerkinElmer, Boston, MA, USA*), 20 mM Cholinchlorid, 400 mM KCl, 0,4 mM EDTA, 0,2 mM Eserinsalicylat, 1 mg/ml Rinderserumalbumin und 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH = 7,4 wurde die enzymatische Umsetzung gestartet. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Beendigung der Reaktion durch Waschen der Reaktionsgefäße mit 2,5 ml Natriumphosphat-Puffer 0,01 M pH = 7,4 und gleichzeitiger Überführung des gesamten Inhaltes in Szintillationsgefäße mit 1 ml Acetonitril und Natriumtetraphenylboron (5 mg/ml) sowie 5 ml Toluol-Szintillationscocktail. Die Szintillationsgefäße wurden kurz geschüttelt und zur Extraktion des gebildeten [ $^3\text{H}$ ]Acetylcholins in die organische Phase ca. 20 min stehen gelassen. Anschließend wurde die Radioaktivität im Betacounter PW4700 (*Philips, Hamburg, Deutschland*) gemessen.

Natriumphosphat-Puffer 0,01 M pH = 7,4:

A) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,78 g/1,0 l
B) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,38 g/1,0 l
A) vorlegen, mit B) pH-Wert auf 7,4 einstellen	

Toluol-Szintillationscocktail:

2,5-Diphenyloxazol	4,0 g
1,4-bis-[2-(5-Phenyloxazolyl)]benzen	0,1 g
Isoamylalkohol	100 ml
Toluol	zu 1,0 l

### 2.3.2 Aktivität der Acetylcholinesterase

Zur Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase wurde der radiochemische Assay nach *Johnson und Russell, 1975* verwendet. Die Zellsuspensionen wurden analog der Cholinacetyltransferase-Bestimmung verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde auf  $\sim 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Es folgte die Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  dieser Verdünnung zu einer Lösung aus 50  $\mu\text{M}$  [Acetyl- $^3\text{H}$ ]-markierten Acetylcholin (*spezifische Aktivität: 2,1 TBq/mmol; PerkinElmer, Boston, MA, USA*) in Kaliumphosphat-Puffer 0,05 M pH

= 7,0. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die enzymatische Acetylcholinesterase-Spaltung des radioaktiven Acetylcholins durch Zugabe von 100 µl einer Lösung aus 1 mM Chloressigsäure, 0,5 M NaOH und 2 M NaCl gestoppt. Nach Extraktion des gebildeten [<sup>3</sup>H]Acetats in die organische Phase des Toluol-Szintillationscocktails wurden die radioaktiven Zerfälle im Betacounter (*Philips, Hamburg, Deutschland*) gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Kaliumphosphat-Puffer 0,05 M pH = 7,0:

- |  |              |
|--|--------------|
| A) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>             | 11,4 g/1,0 l |
| B) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | 6,8 g/1,0 l  |
| A) vorlegen, mit B) pH-Wert auf 7,0 einstellen |              |

## 2.4 Immunhistochemische Darstellung des vesikulären Acetylcholintransporters

SN56.B5.G4-Zellen wurden auf Poly-(L)-Lysin-beschichtete Deckgläschen in 24-Wellplatten (*Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*) ausgesät und, wie unter 2.1.1, mit Kultur- oder Differenzierungsmedium behandelt. Nach drei Tagen wurde das Medium entfernt, die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen mit PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Es folgte dreimaliges Waschen der Deckgläschen in TBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Behandlung mit 5 % Ziege-Normal-Serum (*Dianova, Hamburg, Deutschland*) in TBS-Puffer mit 0,3 % Triton X-100 bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper Kaninchenpolyklonal-anti-VACHT 1 : 500 (*Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland*) erfolgte in der gleichen Lösung bei Raumtemperatur über Nacht. Nach drei zehnmütigen Waschschritten in TBS-Puffer wurden die Zellen bei Raumtemperatur 1 h mit dem sekundären Antikörper Cy3-Ziege-anti-Kaninchen 20 µg/1 ml (*Dianova, Hamburg, Deutschland*) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in TBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 und dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Deckgläschen an der Luft getrocknet und anschließend luftblasenfrei in einem Toluol/Entellan-Gemisch auf Objektträger aufgebracht. Die Aufnahme der immunhistochemischen Präparate erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop (*Carl Zeiss, Je-*

na, Deutschland) mit integrierter Kamera unter Verwendung der Software AxioVision (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

TBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4:

Tris	1,214 g
NaCl	8,5 g
Wasser	zu 1,0 l

mit HCl auf pH = 7,4 einstellen

## 2.5 Fluorimetrischer Thioflavin T - Assay

20  $\mu$ l des A $\beta$ (1-42)-haltigen Zellkulturmediums wurden mit 50 mM Glycin pH = 9,5 und 2  $\mu$ M Thioflavin T-Lösung zu einem Endvolumen von 200  $\mu$ l verdünnt und in eine Fluoronunc<sup>®</sup> 96-Wellplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) unter Lichtschutz pipetiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Absorptionswellenlänge von 435 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm in einem Fluoreszenzspektrometer (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, USA). Als Leerwert wurde die Fluoreszenz von A $\beta$ (1-42)-freien Medium der Kontrollzellen verwendet. Alle Proben wurden als Dreifachbestimmung vermessen.

## 2.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vom A $\beta$ (1-42)-haltigen Zellkulturmedium wurde ein  $\sim$  10  $\mu$ g Gesamtprotein entsprechendes Volumen im Verhältnis 1 : 5 mit Probenpuffer (5x) verdünnt und auf einem 10 %-igen nativen Polyacrylamid-Gel (Tab.1) unter Verwendung einer Standard-Elektrophoreseapparatur (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) bei 120 V aufgetrennt. Zur Vermeidung von Proteindenaturierung durch entstehende Hitze wurde die Apparatur mit Eis gekühlt. Nach Auftrennung im Gel wurden die Proteine über Nacht bei 25 V auf eine PVDF-Membran (Immobilion transfer membranes, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA; Porengröße: 0,2  $\mu$ M) geblotet. Der Transfer wurde bei 4 °C unter Verwendung einer Tankblot-Apparatur (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) mit Blotpuffer (1x) durchgeführt. Zum Blocken wurde die Membran 45 min bei Raumtemperatur in 5 % Trockenmilch/TBST-Puffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion der Proteine. Dazu wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit dem primären Antikörper Maus-anti- $\beta$ -Amyloid, monoklonal

1 : 1000 (*Chemicon International, Temecula, CA, USA*) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 3 min in TBST-Puffer schloss sich eine weitere Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus IgG1-HRP 1 : 2000 (*Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA*) an. Beide Antikörper wurden in 5 % Trockenmilch/TBST-Puffer verdünnt. Die Membran wurde weitere siebenmal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Banden wurde das ECL™ Western Blotting Detection System entsprechend den Herstellerangaben (*Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA*) verwendet. Die Signale wurden mittels Autoradiographie unter Verwendung des Autoradiographie-Films Hyblot CL® (*Denville Scientific Inc., South Plainfield, NJ, USA*) sichtbar gemacht.

<b>Sammelgel 3 %:</b>		<b>Trenngel 10 %:</b>
2,5 ml	Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8	-
-	Tris-HCl 1,5 M pH = 8,9	8,4 ml
1,0 ml	Acrylamid 30 %	11,2 ml
6,4 ml	Wasser	14,8 ml
100 µl	APS 10 %	120 µl
10 µl	TEMED	28 µl

Tab.1. Zusammensetzung Sammel- und Trenngel der Nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenpuffer (5x):

Glycerol	5 ml
Wasser	2,7 ml
Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8	2,1 ml
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

Laufpuffer:

Tris 0,05 M	18,2 g
Glycin	79,8 g
Wasser	zu 3,0 l
mit NaOH pH-Wert auf 8,9 einstellen	

Blotpuffer (4x):

Tris-Base	11,5 g
Glycin	43,8 g
Wasser	zu 4,0 l

Blotpuffer (1x):	
Methanol	500 ml
Blotpuffer (4x)	1,0 l
Wasser	2,2 ml

## 2.7 MTT-Assay

Der zur Vitalitätstestung verwendete MTT-Assay basiert auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zum blau-violetten Formazan. SN56.B5.G4-Zellen wurden in 96-Wellplatte ausgesät, differenziert und mit A $\beta$ (1-42), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. den MAPK-Inhibitoren behandelt (wie unter 2.1.2 beschrieben). Nach entsprechender Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank wurde in jedes Well eine Mischung von MTT-Stammlösung (0,25 % in PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4) in Medium (10  $\mu$ l/100  $\mu$ l) pipettiert und für weitere 2 h mit den Zellen inkubiert. Die Lyse des in den vitalen Zellen gebildeten Farbstoffs erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ l Ethanol-DMSO (1:1) und 10-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde bei 570 nm am Plattenphotometer (*Dynex MRX, MTX Lab Systems, Inc., Vienna, VA, USA*) gemessen. Es wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt.

PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4:

A) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,78 g/1,0 l
B) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,38 g/1,0 l
A) vorlegen, mit B) pH-Wert auf 7,4 einstellen	
NaCl	8,5 g/1,0 l

## 2.8 Dichlorofluorescein-Assay

Zur Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) als Sonde eingesetzt. H<sub>2</sub>DCF-DA penetriert die Zellmembran und wird in der Zelle durch ROS zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein umgewandelt. Die Umwandlung kann am Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden.

SN56.B5.G4-Zellen wurden in schwarze 96-Well-Fluoreszenzplatten mit Klarsichtböden (*Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*) gesät und, wie unter 2.1.1, beschrieben differenziert. Am Versuchstag wurde das Medium entfernt und die Zellen

vorsichtig mit PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 (siehe 2.7) gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation der Zellen mit 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA in phenolrotfreiem DMEM (*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*) im Zellkulturbrutschank. Nach Entfernung des H<sub>2</sub>DCF-DA-haltigen Mediums und Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen, wie unter 2.1.2, mit A $\beta$ (1-42) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und für entsprechende Zeit im Brutschank inkubiert. Medium/HEPES behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Fluoreszenzmessung erfolgte zu Inkubationsbeginn sowie nach 1, 2, 4, 6, 12 und 24 h an einem HTS 7000 Bioassay Reader (*PerkinElmer, Boston, MA, USA*). Die Extinktionswellenlänge betrug 485 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Es wurden Sechsfachbestimmungen durchgeführt.

## 2.9 DNA-Fragmentierung

Die behandelten SN56.B5.G4-Zellen (siehe 2.1.2) wurden ohne vorherigen Mediumwechsel mit einer Pipette vom Boden der Zellkulturschale abgespült und durch anschließende Zentrifugation (*MLW T62, Medizintechnik Leipzig, Leipzig, Deutschland*) für 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 resuspendiert und erneut für 2 min bei 12.000 rpm (*Eppendorf Centrifuge, 5417 R, Hamburg, Deutschland*) zentrifugiert. Nach Suspendieren der Zellen in 500  $\mu$ l Lysepuffer und Zugabe von 5  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml), erfolgte eine 40-minütige Inkubation bei 37 °C auf dem Thermomixer (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*). Die in der Zellsuspension enthaltenen Proteine wurden durch Ausfällung mit 125  $\mu$ l NaCl 5 M (60 min, 4 °C) und anschließender Zentrifugation (15 min, 12.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Durch Chloroform-Phenol-Extraktion wurde die DNA aus dem Überstand extrahiert. Dazu wurden 250  $\mu$ l Chloroform und 500  $\mu$ l Rotiphenol<sup>®</sup> (*Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) zum Überstand pipettiert und 2 min kräftig geschüttelt. Es folgte eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Der Überstand des entstandenen Zweiphasengemisches wurde erneut mit 650  $\mu$ l Chloroform versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Durch Zugabe von 1 ml eisgekühlten iso-Propanol wurde die DNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch einen letzten Zentrifugationsschritt pelletiert, nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes für ca. 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 30  $\mu$ l TE-Puffer pH = 8,0 gelöst. 10  $\mu$ l dieser Lösung wurden mit 5  $\mu$ l DNA-Probenpuffer (1x) versetzt und für 5 min bei 65 °C unter Schütteln inkubiert (*Ther-*

*momixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland*). Nach kurzem Abkühlen auf Eis erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 1,75 %-iges DNA-Gel. Als Standard wurde ein 1 kbp und ein 100 bp DNA-Standard (*Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland*) verwendet. Die Auftrennung der DNA wurde mit Hilfe einer Elektrophoreseapparatur (*Easy Cast™ Elektrophoresis System; Biometra, Göttingen, Deutschland*) bei 75 V durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel in einer Transilluminatoreinheit mit integrierter Kamera (*Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland*) betrachtet und anschließend fotografisch dokumentiert.

## Lysepuffer:

Tris-HCl 1 M pH = 8,0	0,5 ml
SDS 20 %	1,5 ml
EDTA 0,5 M	1,0 ml
Wasser	zu 50 ml

## TE-Puffer pH = 8,0:

EDTA	0,19 g
Tris 1 M pH = 8,0	5 ml
DEPC-Wasser	zu 400 ml
mit NaOH auf pH = 8,0 einstellen	
DEPC-Wasser	zu 500 ml

## DNA-Gel:

Agarose	1,75 g
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	4 µl
TAE-Puffer (1x)	zu 100 ml

## DNA-Probenpuffer (1x):

Glycerol	1 ml
DEPC-Wasser	1 ml
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

## Laufpuffer:

TAE-Puffer (1x)	
-----------------	--

TAE-Puffer (10x):

Tris	242 g
EDTA	18,6 g
Eisessig	57 ml
Wasser	zu 1,0 l

auf pH = 8,5 einstellen

## 2.10 Microarrays

### 2.10.1 RNA-Extraktion

Differenzierte SN56.B5.G4-Zellen wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, mit 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42), 250  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder HEPES (Kontrollzellen) behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde die Gesamt-RNA der Zellen unter Verwendung von Tri-Reagent<sup>®</sup> (*Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA*) entsprechend den Vorschriften des Herstellers isoliert. Nach Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung mit iso-Propanol wurde das erhaltende RNA-Pellet in 20  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser (*Promega, Madison, WI, USA*) gelöst. Die Qualität der RNA wurde durch Messung des OD<sub>260/280</sub>-Quotienten bestimmt. Dazu wurden 1  $\mu\text{l}$  der RNA-Lösung in 100  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (siehe 2.9) verdünnt und an einem UV-Vis-Spektrometer Beckman DU-7400 (*Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA*) vermessen. Des Weiteren wurde die RNA auf einem RNA-Gel aufgetrennt. 2  $\mu\text{l}$  der RNA-Lösung wurden mit 6  $\mu\text{l}$  Probenpuffer für 15 min bei 65 °C denaturiert und für ca. 2 h unter Verwendung einer Elektrophoreseapparatur (*BIO-RAD, Hercules, CA, USA*) bei 50 V aufgetrennt. Alle verwendeten Proben zeigten weder einen OD<sub>260/280</sub>-Quotient unter 1,7 noch eine sichtbare Degradierung auf dem RNA-Gel.

RNA-Probenpuffer:

Formamid	720 $\mu\text{l}$
MOPS (10x)	160 $\mu\text{l}$
Formaldehyd	260 $\mu\text{l}$
Ethidiumbromid (10mg/ml)	1,5 $\mu\text{l}$
Glycerol : Wasser (1:1)	160 $\mu\text{l}$
DEPC-Wasser	190 $\mu\text{l}$
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

## RNA-Gel:

Agarose	1 g
DEPC-Wasser	73 ml
Formaldehyd (37 %)	17 ml
MOPS (10x)	10 ml

## MOPS (10x):

MOPS	42 g
Natriumacetat	4,1 g
EDTA	3,8 g
DEPC-Wasser	zu 1,0 l

## RNA-Laufpuffer:

MOPS (1x)

**2.10.2 Markierung und Hybridisierung der RNA**

Für die Genexpressionsanalyse wurden kommerziell erhältliche Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0 (*Affymetrix, Santa Clara, CA, USA*) verwendet. Ein Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0 enthält ~ 45.000 Probesets, welche ~ 39.000 Transcripts und Varianten von ~ 34.000 murinen Genen kodieren. Von den A $\beta$ (1-42)- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen sowie den Kontrollen wurden jeweils drei unabhängig behandelte RNA-Proben mit je drei Microarrays hybridisiert, so dass insgesamt neun Microarrays verwendet wurden. Alle Schritte wurden nach einem von der Firma Affymetrix empfohlenen Standardprotokoll durchgeführt. 20 ng der totalen RNA wurden unter Verwendung eines T7-Promotor enthaltenden Primers und Superscript II (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die Extraktion der gebildeten cDNA erfolgte mit Hilfe eines Phenol-Chloroform-Gemisches und anschließender Ethanol-Ammoniumacetat-Fällung. Die cDNA diente als Template für die folgende in vitro Transkriptionsreaktion mit Biotin-markierten Nucleotiden (*Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA*). Die resultierende, biotinylierte cRNA wurde auf einer RNeasy-Säule (*Qiagen, Valencia, CA, USA*) gesammelt und anschließend für die Hybridisierung fragmentiert.

Die Hybridisierung der cRNA mit den Arrays erfolgte an einer Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Fluidics Workstation 400 (*Affymetrix, Santa Clara, CA, USA*). Nach Bindung mit Phycoerythrin-gekoppelten Avidin wurden die Chips mit einem Hewlett Packard GeneAr-

ray Scanner (*Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, USA*) gescannt. Die Image-Analyse erfolgte mit Unterstützung der Affymetrix GeneChip® Analysis Software Microarray Suite 4.0 (*Affymetrix, Santa Clara, CA, USA*).

### 2.10.3 Auswertung der Microarrays

Die Analyse der Microarrays wurde im Wesentlichen in drei Schritten durchgeführt: 1. Normalisierung der Rohdaten, 2. statistische Analyse und Filterung, 3. Ontologische Einordnung der signifikant veränderten Gene und Literaturrecherche.

Die nach Imageanalyse erhaltenen Affymetrix GeneChip® probe array Files (CEL- und CHP-Files) der hybridisierten Microarrays wurden zunächst in das Softwareprogramm ArrayAssist® (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) importiert, wo sie unter Verwendung des RMA-Algorithmus (*Irizarry et al., 2003a*) normalisiert wurden. Der RMA-Algorithmus stellt eine robuste Methode zur Normalisierung von Multi-Chip-Analysen dar. Alle Rohdaten wurden in die zentrale Datenbank des Europäischen Institutes für Bioinformatik (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) geladen.

Die normalisierten Expressionswerte jedes einzelnen Probesets wurden einer statistischen Auswertung unter Verwendung des Programms R (<http://www.r-project.org>) unterzogen. Dazu wurden je drei Chips zu einer Gruppe zusammengefasst: 1. unbehandelte Kontrollzellen, 2. 50 µM Aβ(1-42)-behandelte Zellen sowie 3. 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Zellen. Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Gruppen wurden für jedes Probeset mittels ANOVA-Statistik und anschließend post-hoc Tukey-Test überprüft. Alle normalisierten Expressionswerte sowie die dazugehörigen, berechneten statistischen Parameter wurden in Microsoft® EXCEL (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*) importiert, wo der gesamte Datensatz durch gezieltes Einsetzen von Filtern reduziert wurde. Für die manuelle Genontologie-Analyse wurden nur Probesets betrachtet, die eine Signifikanz von  $p \leq 0,001$  bei ANOVA und post-hoc Tukey-Test sowie eine Auf- bzw. Abregulation im Vergleich zur Kontrolle von  $\geq 1,5$  aufwiesen. Die Genontologie-Datenbank Amigo (<http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>), der Analyse Center von Affymetrix NetAffx™ (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) und die Literaturdatenbank Pubmed (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>) dienten dabei als Hilfe. Zusätzlich wurde von allen signifikant veränderten Genen ( $p \leq 0,001$ ) eine Genontologie-Analyse unter Verwendung des Programms OntoExpress (<http://vortex.cs-wayne.edu/onto>

express<sup>1</sup>) durchgeführt. OntoExpress berücksichtigt bei der ontologischen Eingliederung das biologische Gesamtprofil des Microarray und vergleicht dies mit dem Profil des signifikanten Datensatzes.

## 2.11 Quantitative real-time RT-PCR

### 2.11.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion für die quantitative real-time RT-PCR wurde, wie unter 2.10.1 beschrieben, durchgeführt.

### 2.11.2 Reverse Transkription und quantitative Amplifikation

Zur Validierung der Ergebnisse der Microarrays wurden die Genexpressionsveränderungen einiger ausgewählter Gene zusätzlich mittels real-time RT-PCR bestimmt. Von jedem Gen wurden auch hier je drei unabhängige Proben pro Gruppe (1. Lösungsmittel-behandelte Kontrollzellen, 2. 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-42)-behandelte Zellen sowie 3. 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Zellen) untersucht.

Die RNA für die real-time RT-PCR wurde mit Hilfe eines Nanodrop Spektrophotometers (*Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA*) quantifiziert. Die Qualität der RNA wurde durch Analyse auf einem RNA-Nanochip unter Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyser (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*) geprüft. Zur Synthese der doppelsträngigen cDNA wurden die Reagenzien des TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents Kits von Applied Biosystems (*ABI #N8080234, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA*) verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription waren folgende: 25 °C, 10 min/48 °C, 30 min/95 °C, 5 min. Anschließend wurde die quantitative singleplex real-time Amplifikation durchgeführt. Dazu wurden 2  $\mu$ l der synthetisierten cDNA mit TaqMan<sup>®</sup> MGB probes (FAM<sup>™</sup>-markiert für das Targetgen; VIC<sup>™</sup>-markiert für das Referenzgen) und dem TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (*ABI #4304437*) nach den Angaben des Herstellers (*Applied Biosystems, Forster City, CA, USA*) in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l gemischt. Die Endkonzentration der cDNA betrug 250 nM, die der Primer 900 nM. Die TaqMan<sup>®</sup> MGB probes sowie die Primer wurden über die Accessions-Nummern (Acc.Nr.) der ausgewählten Gene ermittelt. Die Primer sind vom Hersteller vorgegeben und für diese

Reaktionsbedingungen optimiert. Die real-time PCR wurde an einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems, Forster City, CA, USA*) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 50 °C, 2 min/95 °C, 10 min/95 °C, 15 s - 60 °C, 1 min (40 Zyklen). Von jeder Probe wurde Dreifachbestimmungen ermittelt. Als Referenzgen zur Normalisierung diente 18S RNA.

### 2.11.3 Auswertung der real-time RT-PCR

Die erhaltenen  $C_T$ -Werte wurden anschließend in Microsoft® EXCEL (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*) unter Verwendung der komparativen  $C_T(\Delta\Delta CT)$ -Methode von Applied Biosystems (*Applied Biosystems, Forster City, CA, USA*) ausgewertet. Dabei wurde die Menge des Targetgens ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) durch Normalisierung zum Referenzgen und relativ zu einem Kalibrator (eine der Proben) berechnet. Die x-fache Genexpressionsveränderung wurde aus dem Quotienten der Menge des Targetgens in der jeweiligen Behandlungsgruppe und der Menge des Targetgens in der Kontrolle ermittelt. Die statistische Auswertung der real-time RT-PCR erfolgte, wie unter 2.10.3 beschrieben, durch ANOVA Analyse und anschließendem post-hoc Tukey-Test im Softwareprogramm R (<http://www.r-project.org>). Die Pearson-Korrelation wurde in Microsoft® EXCEL (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*) berechnet.

## 2.12 Bestimmung von Proteinexpressionsveränderungen

### 2.12.1 Proteinpräparation

Differenzierte SN56.B5.G4-Zellen wurden, wie unter 2.1.2, mit 50 µM frischem Aβ(1-42) behandelt. Zu Inkubationsbeginn (0 h) sowie nach einer Behandlungsdauer von 2 h, 6 h, 12 h und 24 h wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 gewaschen, mit einem Zellkulturschaber vom Boden der T25-Kulturflasche gelöst und in 75 µl PBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 mit 15 % Protease-Inhibitorstocklösung (*Complete® EDTA free, Roche, Mannheim, Deutschland*) und 1 % Phosphatase-Inhibitorcocktail II (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (3 x 5 s) unter Eiskühlung. Die Separierung des Zellhomogenates in Membranfraktion und cytosoli-

sche Fraktion wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation (*Eppendorf Centrifuge, 5417 R, Hamburg, Deutschland*) bei 160.000 x g und 4 °C erreicht. Das erhaltene Pellet stellte die Membranfraktion dar, der Überstand bildete die cytosolische Fraktion. Das Membranpellet wurde in 25 µl des gleichen Protease-Phosphatase-Inhibitor-Mix in Lösung gebracht. Von allen Proben wurden 5 µl zur Proteinbestimmung entnommen, der restliche Teil wurde bis zur Verwendung für SDS-PAGE/Western Blotting bei - 20 °C aufbewahrt.

### 2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting

Für die Proteinanalytik wurde eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (*Laemmli et al., 1970*) durchgeführt. Die Methode ermöglicht eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die nach 2.12.1 aufbereiteten Zellhomogenate wurden aufgetaut, mit Solubilizer im Verhältnis 1 : 3 verdünnt, im Thermomixer Compact (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*) für 3 min bei 85 °C denaturiert und bis zur Auftragung auf ein Polyacrylamid-Gel auf Eis gelagert. Für die semiquantitative Proteinanalytik war es erforderlich gleiche Proteinmengen jeder Probe auf einem Gel einzusetzen. In Abhängigkeit von der Sensitivität der verwendeten Antikörper und der Zellhomogenatfraktion wurden Proteinmengen zwischen 25 µg und 70 µg aufgetragen.

Sammelgel 4 %:		Trenngel 10 %:
2,5 ml	Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8	-
-	Tris-HCl 1,5 M pH = 8,9	2,5 ml
1,3 ml	Acrylamid 30 %	3,3 ml
6,1 ml	Wasser	4,1 ml
50 µl	SDS 10 %	100 µl
75 µl	APS 10 %	75 µl
15 µl	TEMED	7,5 µl

Tab.2. Zusammensetzung Sammel- und Trenngel der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 1,5 mm dicken Polyacrylamid-Gel bestehend aus einem 4 %-igen Sammel- und einem 10 %-igen Trenngel (Tab.2) in einer Standard-Elektrophoreseapparatur Mini-Protean<sup>®</sup> II Cell mit Elektrophorese Modell 2000/2.0 Power Supply (*BIO-RAD, Hercules, CA, USA*) und Laufpuffer. Die

Elektrophoresegeschwindigkeit betrug 10 V/cm im Sammel- und 20 V/cm im Trenngel. Als Molekulargewichtsstandard wurde „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ (*BIO-RAD, Hercules, CA, USA*) eingesetzt.

Nach der SDS-PAGE folgte ein 90-minütiger Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (*Roti<sup>®</sup>-PVDF; Porengröße: 0,45 µM; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland*) bei 50 V. Es wurde eine Tankblot-Apparatur Trans-Blot <sup>TM</sup> Cell mit Elektrophorese Modell 2000/2.0 Power Supply (*BIO-RAD, Hercules, CA, USA*) und Blotpuffer verwendet. Die PVDF-Membran wurde zuvor durch eine Präinkubation in Methanol für die Proteinbindung aktiviert.

Solubilizer:

Tris 0,5 M pH = 6,8	1,0 ml
Glycerol 87 %	0,8 ml
SDS-Lösung 10 %	1,6 ml
Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

Laufpuffer:

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
Wasser	zu 1,0 l

Blotpuffer:

Tris	9,08 g
Glycin	43,24 g
Methanol	600 ml
Wasser	zu 3,0 l

### 2.12.3 Immunodetektion der Proteine

Nach dem Western-Blotting wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in 4 % Trockenmilch/TBST blockiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran für 5 min in TBST. Danach schloss sich die Immunodetektion der Proteine an. Folgende Antikörper mit entsprechenden Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden verwendet:

Protein	Antikörper	Spezies	Hersteller	Konzentration	Inkubationszeit	Fraktion
<b>Primäre Antikörper</b>						
ERK	p44/42 MAPK Antibody IgG, polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
JNK	SAPK/JNK (56G8) IgG, monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
p38	p38 Kinase MAPK Antibody, polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
c-jun	c-jun (60A8) IgG monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
p-ERK	phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) (20G11), monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
p-JNK	phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (98F2), monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
p-p38	phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (12F8), monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
p-c-jun	p-c-jun (Ser73) IgG polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	über Nacht, 4 °C	cytosolisch
β-Actin	anti-β-Actin Clone AC-15, monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1 : 5000	2 h, RT	cytosolisch
<b>Sekundäre Antikörper</b>						
ERK, JNK, p38, c-jun, p-ERK, p-JNK, p-p38, p-c-jun	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody		Cell Signaling Denvers, MA, USA	1 : 1000	1 h, RT	
β-Actin	POD-conjugated AffiniPure anti-mouse IgG		Dianova, Hamburg, Deutschland	1 : 1000	1 h, RT	

Tab.3. Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper

Die primären und sekundären Antikörper wurden in 4 % Rinderserumalbumin (*Serva, Heidelberg, Deutschland*) in TBST verdünnt. Zwischen der Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper wurde die Membran unter leichtem Schütteln 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte ein abschließendes Waschen der Membran in TBS 0,01 M pH = 7,4 (siehe 2.4). Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran

in einer Mischung aus 4 ml Lösung A, 1,2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) und 400  $\mu\text{l}$  Lösung B ~ 1 min inkubiert und unverzüglich durch die Kamera einer Kodak Image Station 2000R mit Kodak Molecular Image Software, Version 4.0.0 (*Kodak, Stuttgart, Deutschland*) aufgenommen. Je nach Signalstärke wurden Belichtungszeiten zwischen 1 - 4 min gewählt. Für die anschließende Detektion des Housekeeping-Proteins  $\beta$ -Actin auf der gleichen Membran war ein Entfernen der gebundenen primären und sekundären Antikörper der ersten Immunodetektion durch Strippen erforderlich. Dazu wurde die Membran 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend 3 x 5 min in TBST gewaschen. Die Membran konnte nun erneut geblockt und die Proteinbanden von  $\beta$ -Actin, wie oben beschrieben, durch Immunodetektion sichtbar gemacht werden.

TBST:

TBS-Puffer 0,01 M pH = 7,4 mit 0,1 % Tween 20

Stripping-Puffer:

Glycin	1,5 g
Wasser	zu 100 ml
pH-Wert auf 2-2,5 einstellen	
SDS	100 mg
Tween 20	1,0 g

Lösung A:

Tris	2,42 g
Wasser	zu 200 ml
pH-Wert auf 8,6 einstellen	
Luminol	50 mg

Lösung B:

p-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml

### 2.12.4 Auswertung der Proteinexpressionsveränderungen

Die semiquantitative Auswertung der Proteinexpressionsveränderungen erfolgte über eine densitometrische Messung mit Hilfe des Programms TINA Version 2.09g (*Ray-test, Straubenhardt, Deutschland*). Von der optischen Dichte jeder Proteinbande wurde zunächst ein auf der gleichen Laufbahn bestimmter Hintergrundwert abgezogen.

gen. Zur Normalisierung der Blots wurde auf jedem Blot die hintergrund-korrigierte optische Dichte der Bande des zu untersuchenden Proteins zum Mittelwert der hintergrund-korrigierten optischen Dichten von  $\beta$ -Actin auf einem Blot ins Verhältnis gesetzt. Die optische Dichte der Bande des Zielproteins wurde prozentual auf  $\beta$ -Actin bezogen berechnet. Die mittlere optische Dichte von  $\beta$ -Actin wurde dabei als 100 % definiert. Die ermittelten prozentualen optischen Dichten des Proteins zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden als Expressionswert betrachtet. Von jedem Protein und jedem Untersuchungszeitpunkt wurden mindestens drei unabhängige Blots mit unabhängig behandelten und aufbereiteten Zellhomogenaten analysiert. Die Expressionswerte der unabhängigen Untersuchungen wurden schließlich gemittelt und einer statistischen Auswertung in Microsoft® EXCEL (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*) unterzogen. Es wurde die Proteinexpression jedes Untersuchungszeitpunktes mit der Expression zu Inkubationsbeginn (Zeitpunkt 0 h) verglichen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Zellmodells

Zur Untersuchung des Einflusses von A $\beta$ (1-42) auf cholinerge Neuronen wurde die Neuroblastom-Zelllinie SN56.B5.G4 ausgewählt, die cholinerge Marker exprimiert (*Jankowska et al., 1997; Szutowicz et al., 1999*). Die Zelllinie wurde durch Fusion der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 und Zellen aus dem medialen Septum von 21 Tage alten Mäusen (Stamm: C57BL/6) erzeugt (*Hammond et al., 1990*).

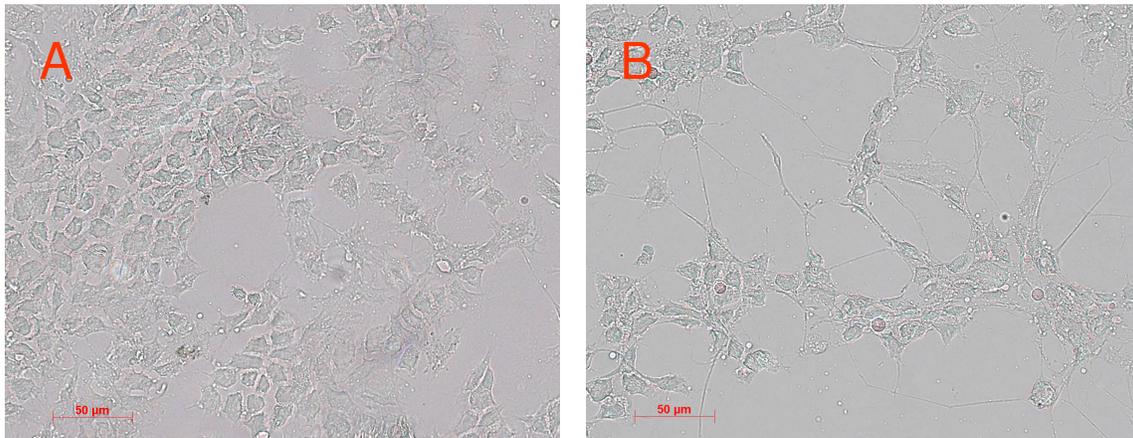


Abb.5. Lichtmikroskopische Aufnahmen undifferenzierter (A) und mit 1 mM dibutyryl-cAMP/1  $\mu$ M RA differenzierter (B) SN56.B5.G4-Zellen

Im undifferenzierten Zustand weisen SN56.B5.G4-Zellen vorwiegend polygonale Formen auf. Kurze Neuritenfortsätze sind erkennbar (Abb.5A). Basalaktivitäten der cholinergen Enzyme Cholinacetyltransferase (ChAT) und Acetylcholinesterase (AChE) sind messbar (Tab.4). Die Expression des vesikulären Acetylcholintransporter-Proteins (VAChT) konnte mit immunhistochemischer Detektion gezeigt werden (Abb.6).

Durch eine dreitägige Differenzierung mit 1 mM dibutyryl-cAMP/1  $\mu$ M RA wird der cholinerge Phenotyp der Zelllinie verstärkt ausgeprägt. Die Differenzierung bewirkt eine reduzierte Teilungsaktivität und ein verstärktes Neuritenwachstum der Zellen (Abb.5B). Die Aktivitäten der cholinergen Enzyme ChAT und AChE in differenzierten Zellen sind etwa dreifach höher als in undifferenzierten Zellen (Tab.4).

Aufgrund der Expression cholinergere Merkmale sind differenzierte SN56.B5.G4-Zellen ein geeignetes Modell für cholinerge Neuronen und sollen daher für die folgenden Untersuchungen zur Toxizität von A $\beta$ (1-42) verwendet werden.

	undifferenzierte Zellen	differenzierte Zellen
<b>ChAT-Aktivität</b> (nmol/min/mg Protein)	0,1484 $\pm$ 0,0129	0,9280 $\pm$ 0,1919 *
<b>AChE-Aktivität</b> (nmol/min/mg Protein)	3,330 $\pm$ 0,526	9,008 $\pm$ 1,494 *

Tab.4. Aktivität der cholinergen Enzyme Cholinacetyltransferase (ChAT) und Acetylcholinesterase (AChE) in undifferenzierten und mit 1 mM dibutyryl-cAMP/1  $\mu$ M RA differenzierten SN56.B5.G4-Zellen ( $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  signifikant gegenüber undifferenzierten SN56.B5.G4-Zellen,  $n = 3$ , Kruskal-Wallis-Test)

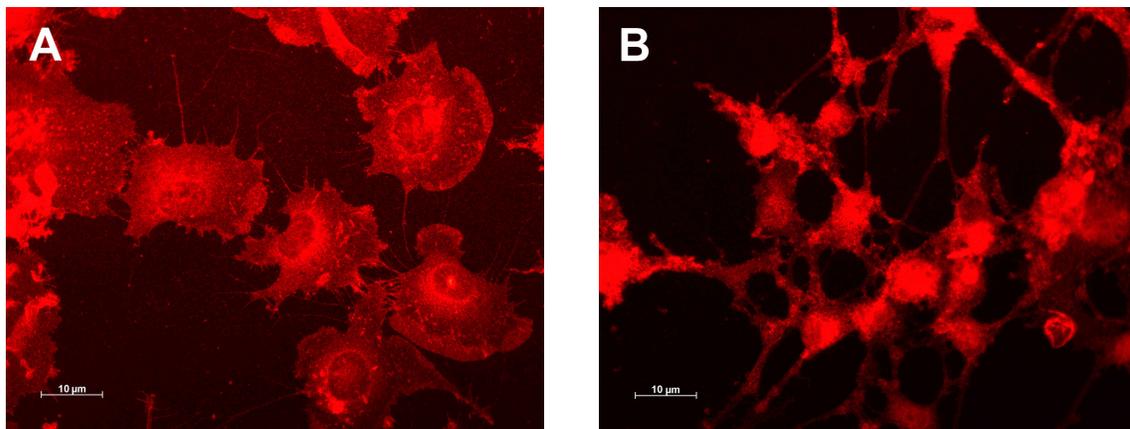


Abb.6. Immunhistochemische Detektion des vesikulären Acetylcholintransporter-Proteins (VACHT) in undifferenzierten und mit 1 mM dibutyryl-cAMP/1  $\mu$ M RA differenzierten SN56.B5.G4-Zellen

### 3.2 Charakterisierung der Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42)

Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden zwei unterschiedliche Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) eingesetzt: frisches A $\beta$ (1-42) und gealtertes A $\beta$ (1-42). Frisches A $\beta$ (1-42) wurde unmittelbar nach Auflösung in HEPES 200mM pH = 8,5 dem Zellkulturmedium zugesetzt und auf die differenzierten SN56.B5.G4-Zellen gegeben. Gealtertes A $\beta$ (1-42) wurde vor Zugabe zum Zellkulturmedium einer sechstägigen Präinkubation in HEPES bei 37 °C unterzogen. Diese Präinkubation soll die Bildung von höhermolekularen Aggregationsformen fördern und den Fibrillengehalt in der Proteinlösung erhöhen.

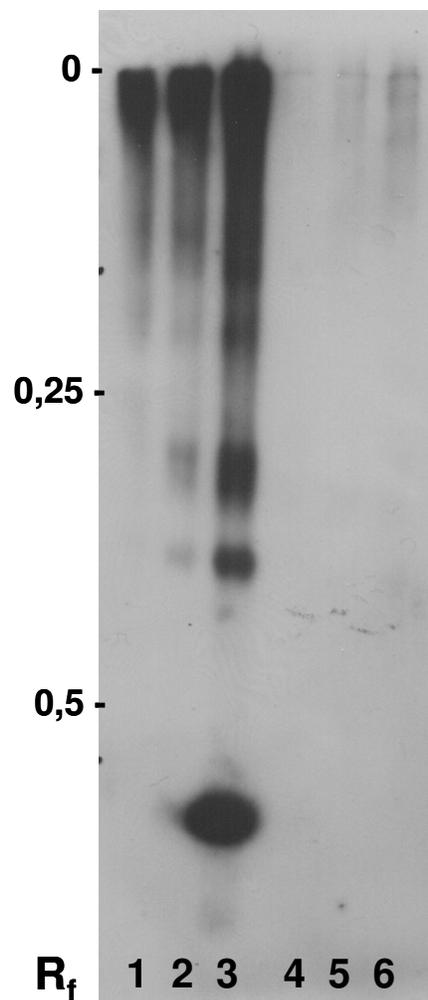


Abb.7. Fibrillenzusammensetzung im frischen A $\beta$ (1-42) und gealterten A $\beta$ (1-42) vor der Inkubation mit differenzierten SN56.B5.G4-Zellen, native PAGE mit anschließender Immunodetektion [1, 2, 3: 10, 25, 50  $\mu$ M frisches A $\beta$ (1-42); 4, 5, 6: 10, 25, 50  $\mu$ M gealtertes A $\beta$ (1-42)]

Die Zusammensetzung der Aggregationsformen beider Proteinlösungen wurde unter Verwendung einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese (native PAGE) und eines fluorimetrischen Thioflavin T-Assays untersucht.

Die Ergebnisse der nativen PAGE sind in Abb.7 dargestellt. Bei der nativen PAGE wurden die einzelnen Aggregationsformen beider Proteingemische in einem Polyacrylamid-Gel entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mittels Immunodetektion sichtbar gemacht. Auf dem Immunoblot des frischen A $\beta$ (1-42) sind in den drei Konzentrationen (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) neben höhermolekularen Aggregationsformen verschiedene Aggregationsformen mit geringem Molekulargewicht (hohe R<sub>f</sub>-Werte) zu erkennen. Der Immunoblot des gealterten A $\beta$ (1-42) zeigt dagegen in den drei Konzentrationen (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) weder Banden im höhermolekularen noch im niedermolekularen Bereich.

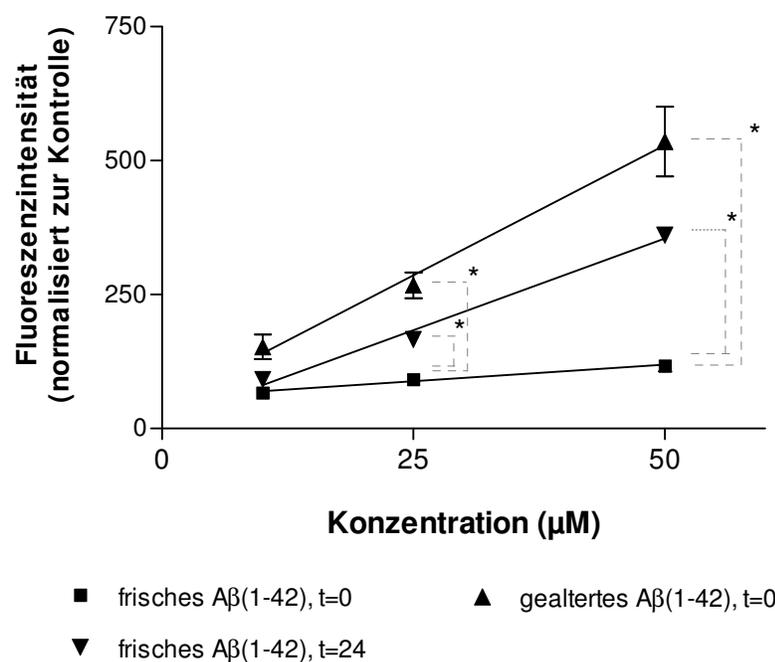


Abb.8. Fibrillengehalt im frischen A $\beta$ (1-42) und gealterten A $\beta$ (1-42) (10, 25, 50  $\mu$ M) vor (t = 0) und nach (t = 24) Inkubation mit differenzierten SN56.B5.G4-Zellen; gemessenen mittels fluorimetrischen Thioflavin T-Assay (Fluoreszenzintensität  $\pm$  SEM, n > 4, \* p < 0,05; Kruskal-Wallis-Test)

Der Fibrillengehalt im frischen und gealterten A $\beta$ (1-42) wurde mit Hilfe des Thioflavin T-Assays quantifiziert. Der fluorimetrische Thioflavin T-Assay nutzt die Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T, selektiv an Fibrillen mit  $\beta$ -Faltblattstruktur zu binden. Niedermolekulare Formen mit  $\alpha$ -Helix-Struktur, wie Monomere und Oligome-

re, werden dagegen nicht erfasst. Die Bindung des Farbstoffes an Amyloid-Fibrillen verursacht eine Verschiebung der Emissionswellenlänge, die an einem Fluoreszenzspektrometer gemessen werden kann. Je höher der Gehalt an Fibrillen, desto höher ist die gemessene Fluoreszenzintensität bei der Wellenlänge 485 nm.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse des Thioflavin T-Assays der beiden untersuchten Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) dargestellt. Alle drei Konzentrationen (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) des gealterten A $\beta$ (1-42) weisen einen deutlich höheren Fibrillengehalt als die entsprechenden Konzentrationen des frischen A $\beta$ (1-42) auf. Zu Inkubationsbeginn mit den Zellen ( $t = 0$ ) ist der Fibrillengehalt im frischen A $\beta$ (1-42) ~ 2 bis 4-fach geringer als im gealterten A $\beta$ (1-42). Während der 24-stündigen Inkubation mit den Zellen bei 37 °C steigt im frischen A $\beta$ (1-42) der Gehalt an hochmolekularen Aggregationsformen zwar an, erreicht aber nicht die Zusammensetzung des präinkubierten gealterten A $\beta$ (1-42).

### 3.3 Untersuchungen zur Toxizität von A $\beta$ (1-42)

#### 3.3.1 Einfluss von A $\beta$ (1-42) auf die Zellviabilität

Mit Hilfe des MTT-Assays wurde zunächst der Einfluss der unterschiedlichen Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) auf die Viabilität von cholinerg-differenzierten SN56.B5.G4-Zellen untersucht. Beim MTT-Assay wird durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gelbes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum blau-violetten Formazan umgewandelt, was spektrophotometrisch gemessen werden kann.

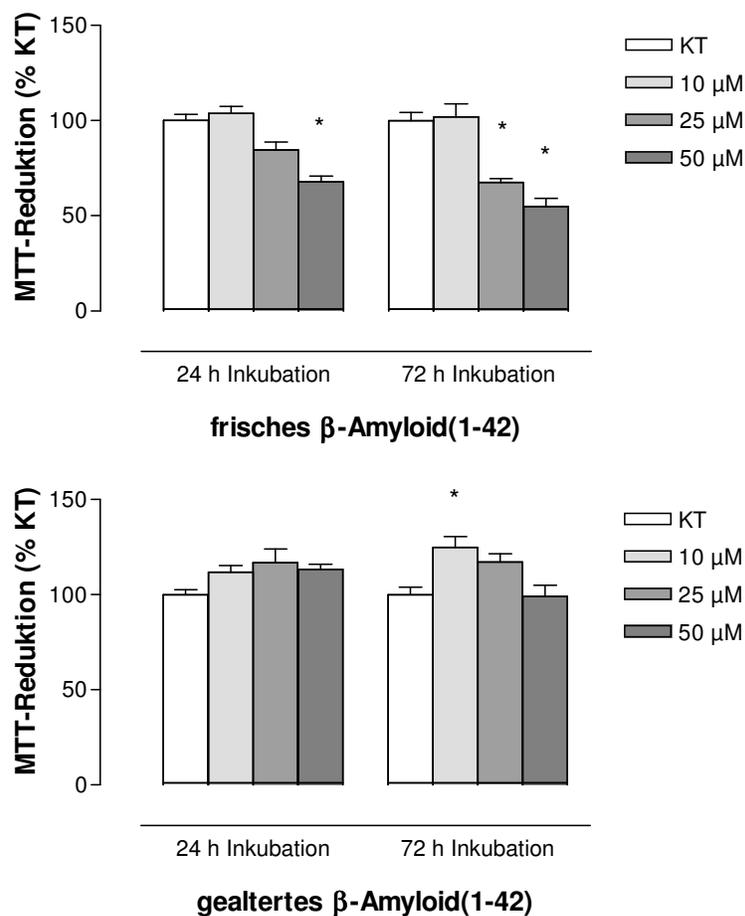


Abb.9. Zellviabilität nach Behandlung von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit frischem A $\beta$ (1-42) und gealterten A $\beta$ (1-42) für 24 h bzw. 72 h; gemessenen mittels MTT-Assay ( $\pm$  SEM, n = 3, \* p < 0,05 signifikant gegenüber Kontrollzellen, Kruskal-Wallis-Test)

Die Exposition von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit frischem A $\beta$ (1-42) - was vorwiegend aus niedermolekularen Aggregationsformen besteht - verursachte in den Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Toxizität (Abb.9). Bereits die 24-stündige Inkubation mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) reduzierte die Zellviabilität in Vergleich zu Kontrollzellen signifikant ( $68 \pm 3$  % vs.  $100 \pm 3$  %). Ein Ausdehnen der Inkubationszeit auf 72 h führte zu einem weiteren Absinken der Zellviabilität auf  $55 \pm 4$  %. Die größten toxischen Effekte konnten jedoch während der ersten 24 h Inkubation beobachtet werden. Auch morphologisch war der Einfluss des frischen A $\beta$ (1-42) auf die Viabilität der differenzierten SN56.B5.G4-Zellen sichtbar (Abb.10). Nach 24-stündiger Inkubation wiesen die Zellen eine deutlich veränderte Gestalt auf. Die normalerweise polygonalen Zellkörper waren teilweise deformiert und die Neuritenfortsätze zwischen den Zellen unterbrochen. Zusätzlich konnte eine verstärkte Vakuolisierung in den Zellen beobachtet werden.

Die Exposition der SN56.B5.G4-Zellen mit fibrillenreichen gealtertem A $\beta$ (1-42) verursachte im Vergleich zu Kontrollzellen keine toxischen Effekte (Abb.9). Weder eine Inkubation von 24 h noch von 72 h mit gealtertem A $\beta$ (1-42) zeigte eine Abnahme der Zellviabilität. Eine 72-stündige Inkubation mit 10  $\mu$ M gealtertem A $\beta$ (1-42) führte dagegen zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität der behandelten Zellen.

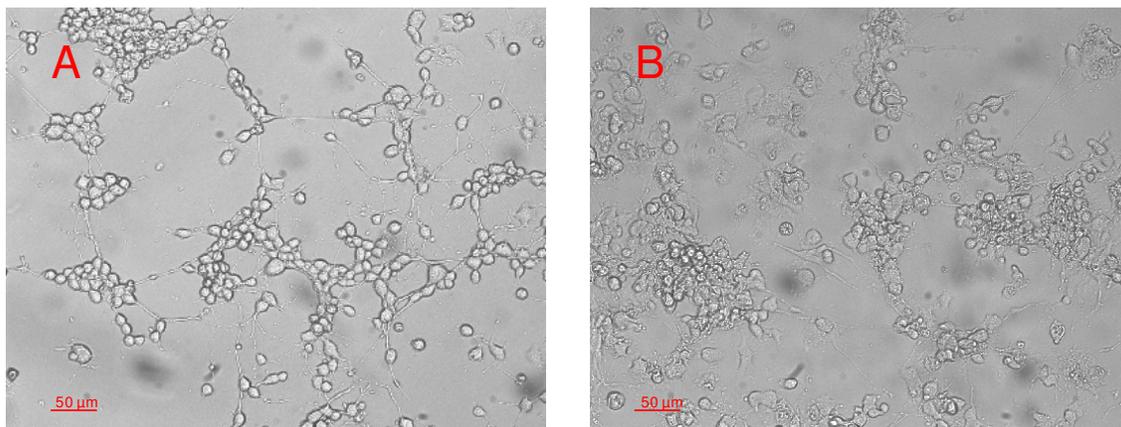


Abb.10. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kontrollzellen (A) und differenzierten (B) SN56.B5.G4-Zellen, die mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) behandelt wurden

### 3.3.2 Apoptose-Induktion durch A $\beta$ (1-42)

Im Verlauf der Apoptose wird die genomische DNA einer Zelle von den Endonukleasen des Zellkerns spezifisch in der Linkerregion zwischen den Histonen geschnitten. Die erzeugten DNA-Fragmente, deren Größe ein Vielfaches von 180 bp beträgt, bil-

den nach Auftrennung im Agarosegel ein typisches Leitermuster. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Toxizität des frischen A $\beta$ (1-42) um apoptotische Vorgänge handelt, wurde die DNA-Fragmentierung in den Zellen nach Inkubation mit frischem A $\beta$ (1-42) detektiert.

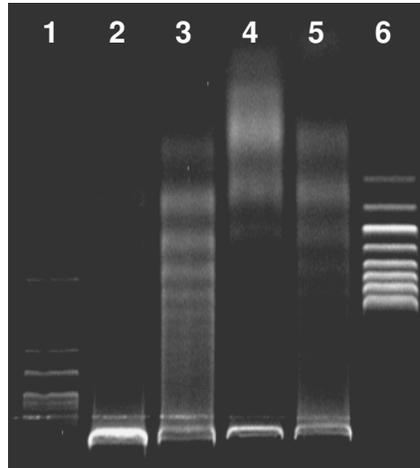


Abb.11. DNA-Fragmentierung in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit A $\beta$ (1-42), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Staurosporin; **1** - 1 kb DNA-Standard; **2** - Kontrollzellen; **3** - 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-42); **4** - 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **5** - 100  $\mu$ M Staurosporin; **6** - 100 bp DNA-Standard

Als Positivkontrolle dienten differenzierte SN56.B5.G4-Zellen, die für 24 h mit 100  $\mu$ M Staurosporin, einem bekannten Apoptose-Induktor, exponiert wurden. Auf dem Agarosegel ist deutlich erkennbar, dass sowohl die Behandlung mit 100  $\mu$ M Staurosporin (5), als auch die 24-stündige Behandlung mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) (3) zu einer DNA-Fragmentierung führt (Abb.11). Kontrollzellen (2) weisen dagegen keine Fragmentierung der genomischen DNA auf.

### 3.3.3 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch A $\beta$ (1-42)

Als möglicher Wirkungsmechanismus für die Neurotoxizität von A $\beta$ (1-42) wird die Induktion von oxidativem Stress diskutiert (siehe Kapitel 1.4.3). Durch die Reaktion mit Metallionen kann das Peptid zur Entstehung zellschädigender, reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) führen. Ob die niedermolekularen Aggregationsformen des frischen A $\beta$ (1-42) auch die Bildung von ROS in den cholinergen SN56.B5.G4-Zellen hervorrufen, wurde mit Hilfe des DCF-Assays untersucht.

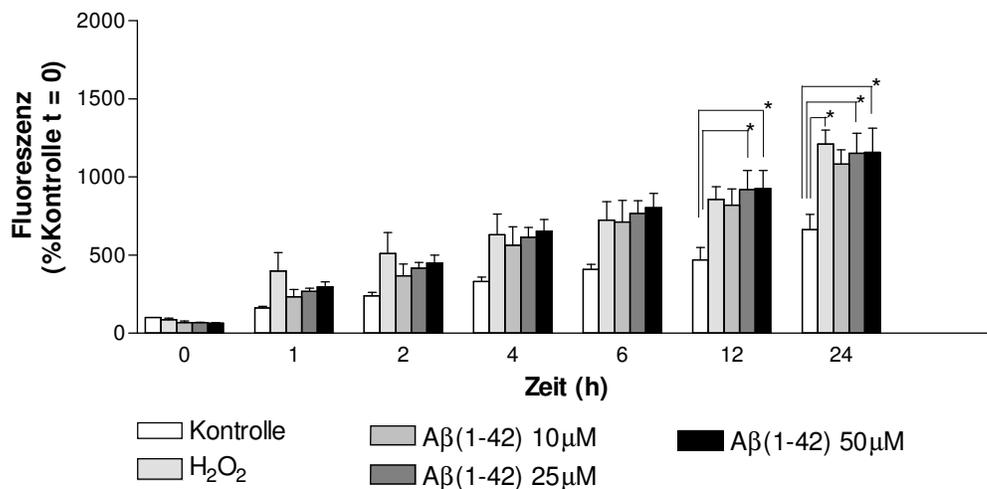


Abb.12. Intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit frischem Aβ(1-42) (10 μM, 25 μM, 50 μM) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250 μM) für 24 h; gemessenen mittels DCF-Assay (± SEM, n = 7, \* p < 0,05 signifikant gegenüber Kontrollzellen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt, ANOVA und post-hoc Tukey-Test)

Die Ergebnisse des DCF-Assays zeigen, dass die Inkubation mit frischem Aβ(1-42) eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von ROS in den cholinergen Zellen induziert (Abb.12). Nach einer Inkubationszeit von 12 und 24 h wurden in den Aβ(1-42)-behandelten Zellen signifikant mehr ROS als in Kontrollzellen gebildet.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Behandlung mit 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestimmt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist für die Bildung von ROS bekannt und wurde deshalb als Vergleichssubstanz eingesetzt. Auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte eine zeitabhängige intrazelluläre ROS-Induktion, die nach 24 h signifikant gegenüber den Kontrollzellen ist.

Vor allem frühe Inkubationszeitpunkte (1h, 2h) sind bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch eine verstärkte ROS-Bildung gekennzeichnet. Zu diesen Zeitpunkten entstehen durch Aβ(1-42)-Behandlungen nur marginale Mengen ROS. Nach längerer Inkubation gleicht sich die ROS-Bildung durch Aβ(1-42) der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an. Der DCF-Assay zeigt weiterhin, dass auch in Kontrollzellen zeitabhängig ROS gebildet werden.

### 3.3.4 Untersuchung der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität auf Genebene

Um zu untersuchen, ob der toxische Effekt des frischen A $\beta$ (1-42) auf cholinerge Neuronen durch das oxidative Potenzial des Peptids verursacht wird, sollten Veränderungen in der Genexpression nach Behandlung von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit frischem A $\beta$ (1-42) sowie nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analysiert werden. Der Vergleich der veränderten Genexpression durch die A $\beta$ (1-42)- bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Toxizität, soll Hinweise über Signalwege liefern, die beim Untergang cholinergischer Neuronen bei der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle spielen könnten.

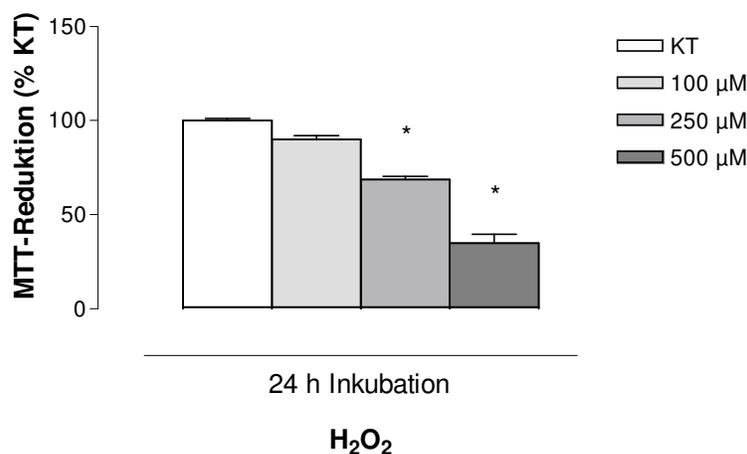


Abb.13. Zellviabilität nach Behandlung von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h gemessenen mittels MTT-Assay ( $\pm$  SEM, n = 4, \* p < 0,05 signifikant gegenüber Kontrollzellen, Kruskal-Wallis-Test)

Dazu war es nötig, in Voruntersuchungen analog zu A $\beta$ (1-42), den toxischen Effekt von oxidativem Stress auf die Zellen näher zu charakterisieren. Es sollte eine Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefunden werden, welche die Zellviabilität von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen in einem ähnlichen Maß beeinflusst wie eine 24-stündige Inkubation mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42). Für die Behandlung mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) konnten signifikante toxische Effekte auf cholinerge Neuronen gezeigt werden. Der konzentrationsabhängige Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellviabilität wurde ebenfalls mittels MTT-Assay untersucht (Abb.13).

Es wurde eine 24-stündige Exposition mit 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Äquivalent-Konzentration zu 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) festgelegt, da diese ebenfalls die Viabilität der Zellen auf ~ 70 % reduziert (siehe Abb.9). Außerdem konnte für die 24-stündige Inkubation mit

250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine ROS-Bildung und Apoptose-Induktion ähnlich wie bei frischem  $\text{A}\beta(1-42)$  nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.2, 3.3.3).

Die Veränderungen in der Genexpression, die  $\text{A}\beta(1-42)$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Zellen induzieren, wurden unter Verwendung der Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Technologie analysiert. Dazu wurde die totale RNA differenzierter SN56.B5.G4-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit 50  $\mu\text{M}$  frischem  $\text{A}\beta(1-42)$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie Kontrollzellen isoliert und nach Umschreiben in cDNA und Biotin-Markierung mit kommerziell-erhältlichen Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0 hybridisiert. Die Validierung einer Auswahl von signifikant veränderten Genen, die sich nach Auswertung der Microarrays ergab, erfolgte mit quantitativer real-time RT-PCR.

### 3.3.4.1 Ergebnisse der Microarrays

Die Unterschiede in der Genexpression zwischen den  $\text{A}\beta(1-42)$ -, den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Zellen sowie den Kontrollzellen wurden mittels ANOVA-Statistik und anschließend post-hoc Tukey-Test für jedes Probeset untersucht. Nur Probesets, die eine Signifikanz von  $p \leq 0,001$  bei ANOVA und post-hoc Tukey-Test aufwiesen, wurden für eine weitere Analyse betrachtet.

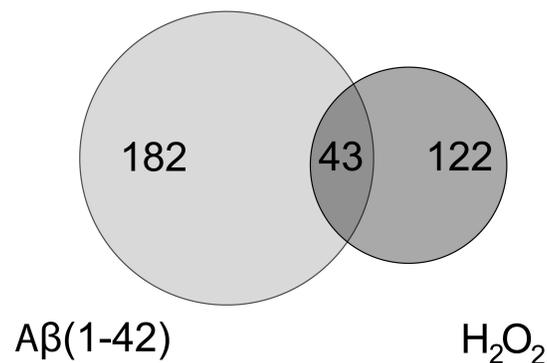


Abb.14. Venn-Diagramm der signifikant veränderten Probesets ( $p \leq 0,001$ ) in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach Behandlung mit frischem  $\text{A}\beta(1-42)$  (50  $\mu\text{M}$ , 24h) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{M}$ , 24h)

In der Gruppe der  $\text{A}\beta(1-42)$ -behandelten Zellen waren im Vergleich zu Kontrollzellen 182 Probesets von insgesamt 45.000 signifikant ( $p \leq 0,001$ ) verändert. In der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gruppe waren im Vergleich zu Kontrollzellen 122 Probesets ( $p \leq 0,001$ ) unterschiedlich reguliert. 43 der veränderten Probesets konnten beiden Behandlungsgruppen

zugeordnet werden (Abb.14). Der post-hoc Tukey-Test zeigte, dass 32 der 43 Probesets gleich ( $p > 0,05$ ) und 11 Probesets unterschiedlich ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den beiden Behandlungsgruppen reguliert waren.

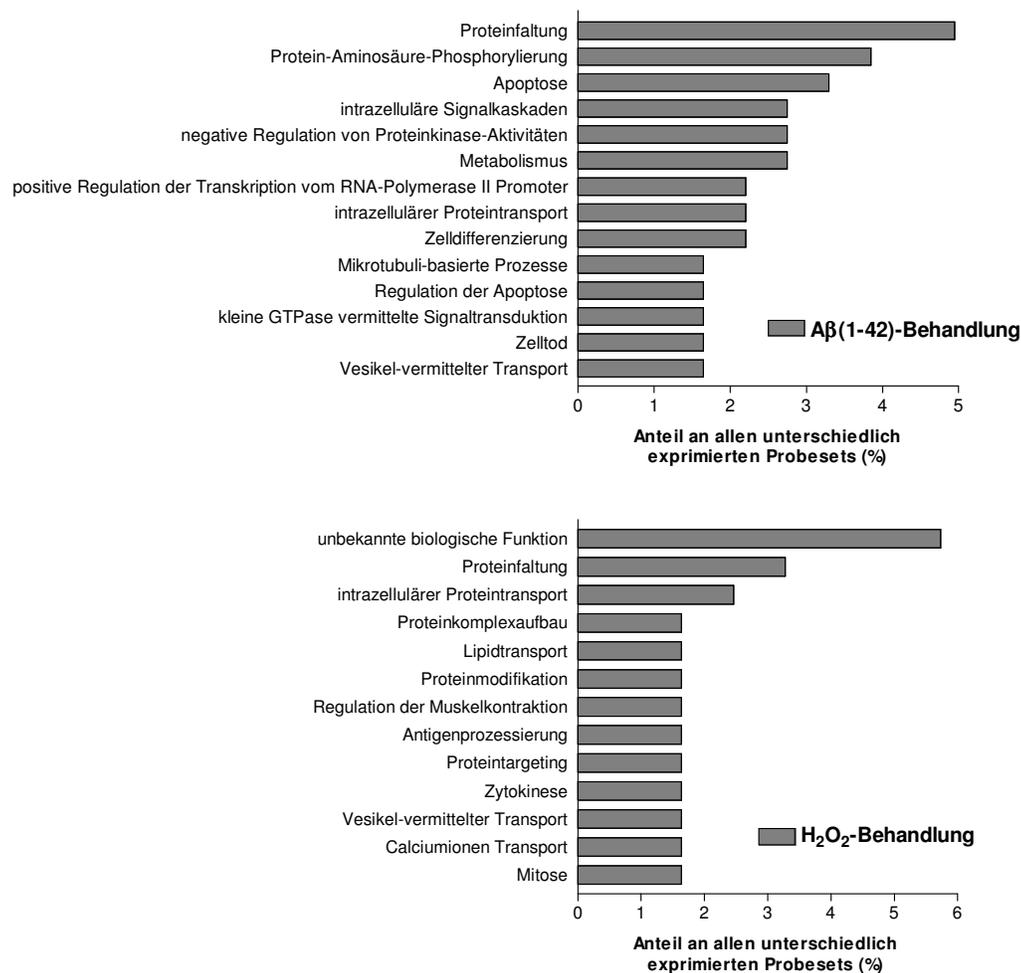


Abb.15. Ergebnisse der Genontologie-Analyse durchgeführt mit OntoExpress; die unterschiedlich regulierten Probesets ( $p \leq 0,001$  in ANOVA und post-hoc Tukey-Test) nach Behandlung der differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit frischem Aβ(1-42) (50  $\mu$ M, 24 h) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M, 24 h) wurden durch OntoExpress entsprechend ihrer biologischen Funktion in verschiedene Genontologie-Kategorien eingeordnet, die Abbildung zeigt die Genontologie-Kategorien mit den meisten unterschiedlich regulierten Probesets ( $p \leq 0,05$  und Anteil > 1,5 % an allen unterschiedlich exprimierten Genen)

Von den signifikant veränderten Probesets beider Behandlungsgruppen wurde unter Verwendung des Programms OntoExpress zunächst eine allgemeine Genontologie-Analyse durchgeführt. OntoExpress teilt jedes Probeset entsprechend seiner biologi-

schen Funktion in verschiedene ontologische Kategorien ein und vergleicht die Häufigkeit der Kategorien mit dem biologischen Gesamtprofil des Genchips (Abb.15).

In der A $\beta$ (1-42)-behandelten Gruppe waren zahlreiche Probesets signifikant verändert, deren Gene an der Faltung von Proteinen beteiligt sind (Proteinfaltung: 4,95 %). Erwartungsgemäß konnte eine verstärkte Häufigkeit von Apoptose- und Zelltod-regulierenden Genen gefunden werden (Apoptose: 3,3 %; Regulation von Apoptose: 1,65 %, Zelltod: 1,65 %). Außerdem zeigten zahlreiche Probesets eine veränderte Expression durch A $\beta$ (1-42), deren Gene eine Rolle bei Phosphorylierungsreaktionen von Proteinen spielen (Protein-Aminosäure-Phosphorylierung: 3,85 %).

Die häufigsten Gene, die in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe verändert wurden, besitzen bisher unbekannte biologische Funktionen (unbekannte biologische Funktion: 5,74 %). Weiterhin waren zahlreiche Gene durch oxidativen Stress auf- oder abreguliert, die Transportprozesse beeinflussen (intrazellulärer Proteintransport: 2,46 %, Lipidtransport: 1,64 %, vesikel-vermittelter Transport: 1,64 %, Calciumionen-Transport: 1,64 %).

Affymetrix ID	Genname	Symbol	DE
<b>Apoptose, Stress</b>			
1421424_a_at	alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	1,99
1454880_s_at	<u>Bcl2 modifying factor</u>	<u>Bmf</u>	1,64
1451029_at	Bcl2-like 2	<u>Bcl2l2</u>	-1,74
1418626_a_at	<u>clusterin</u>	<u>Clu</u>	2,04
1437458_x_at	<u>clusterin</u>	<u>Clu</u>	1,73
1454849_x_at	<u>clusterin</u>	<u>Clu</u>	1,95
1416332_at	cold inducible RNA binding protein	Cirbp	1,51
1418401_a_at	dual specificity phosphatase 16	Dusp16	1,68
1440651_at	dual specificity phosphatase 16	Dusp16	1,58
1436276_at	Expressed sequence AU041707	AU041707	-1,63
1455410_at	<u>Fas apoptotic inhibitory molecule 2</u>	<u>Faim2</u>	-1,79
1417409_at	<u>Jun oncogene</u>	<u>Jun</u>	1,81
1455214_at	microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	-1,51
1419666_x_at	nuclear protein 1	Nupr1	-1,52
1460214_at	<u>Purkinje cell protein 4</u>	<u>Pcp4</u>	2,08
1449110_at	ras homolog gene family, member B	Rhob	1,67
1427020_at	scavenger receptor class A, member 3	Scara3	1,96
1426875_s_at	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1	1,63
1451680_at	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1	1,56
1460287_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Timp2	1,53
<b>Proteinmodifikation/-abbau/ER/Golgi-Apparat</b>			
1435444_at	<u>activating transcription factor 6</u>	<u>Atf6</u>	-1,80
1418528_a_at	<u>defender against cell death 1</u>	<u>Dad1</u>	-1,54

1419162_s_at	<u>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</u>	<u>Dnajc3</u>	-1,97
1419163_s_at	<u>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</u>	<u>Dnajc3</u>	-2,25
1433887_at	<u>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</u>	<u>Dnajc3</u>	-2,71
1449372_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	<u>Dnajc3</u>	-2,32
1449373_at	<u>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</u>	<u>Dnajc3</u>	-3,09
1434714_at	Ero1-like beta (S. cerevisiae)	Ero1b	-1,60
1417267_s_at	<u>FK506 binding protein 11</u>	<u>Fkbp11</u>	-1,75
1425519_a_at	Ia-associated invariant chain	Ii	-1,71
1423074_at	lectin, mannose-binding 2	Lman2	-1,50
1458045_at	Odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	Odz4	-1,64
1417149_at	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha II polypeptide	P4ha2	-1,66
1452779_at	RIKEN cDNA 3110006E14 gene	3110006E14Rik	1,86
1429399_at	ring finger protein 125	Rnf125	1,78
1448170_at	seven in absentia 2	Siah2	-1,70
1421012_at	signal recognition particle receptor, B subunit	Srprb	-1,61
1455584_at	stromal cell derived factor 4	Sdf4	-1,51
1418206_at	stromal cell-derived factor 2-like 1	Sdf2l1	-2,31
1449679_s_at	syntaxin 5A	Stx5a	-1,54
<b>Metabolismus</b>			
1446861_at	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	Gns	-1,55
1415904_at	lipoprotein lipase	Lpl	-1,89
1415977_at	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	Isyna1	-2,05
1417774_at	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	Nans	-1,57
<b>Signaltransduktion</b>			
1450852_s_at	coagulation factor II (thrombin) receptor	F2r	1,65
1429460_at	G protein-coupled receptor 115	Gpr115	2,17
1449027_at	ras homolog gene family, member U	Rhou	1,69
1418105_at	stathmin-like 4	Stmn4	1,69
<b>Strukturmolekül</b>			
1417133_at	peripheral myelin protein	Pmp22	1,88
1452754_at	RIKEN cDNA 5730592L21 gene	5730592L21Rik	-2,31
<b>Transkription/Nukleus</b>			
1416101_a_at	histone 1, H1c	Hist1h1c	2,32
1434384_at	nuclear receptor interacting protein 1	Nrip1	1,64
1439643_at	Origin recognition complex, subunit 4-like (S. cerevisiae)	Orc4l	-1,57
1425528_at	paired related homeobox 1	Prrx1	-1,71
1442285_at	synaptic nuclear envelope 2	Syne2	-1,62
1431044_at	THO complex 1	Thoc1	-1,50
<b>Transport, Endo- and Exozytose, Trafficking</b>			
1425362_at	HIV-1 Rev binding protein-like	Hrbl	-1,81
1433542_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	Inpp5f	1,57
1435772_at	kinesin family member 21B	Kif21b	-1,84
1422203_at	<u>solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3</u>	<u>Slc18a3</u>	1,62
1427035_at	<u>solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14</u>	<u>Slc39a14</u>	-1,62
1453715_at	synaptic vesicle glycoprotein 2c	Sv2c	1,53
<b>andere Funktionen</b>			
1419735_at	casein kappa	Csnk	1,66
1434458_at	Follistatin	Fst	2,07

1417959_at	PDZ and LIM domain 7	Pdlim7	1,59
<b>unbekannte Funktion</b>			
1433943_at	cDNA sequence BC063749	BC063749	-1,51
1436623_at	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	Entpd7	-1,51
1430368_s_at	RIKEN cDNA 1700019D03 gene	1700019D03Rik	-1,66
1451415_at	RIKEN cDNA 1810011O10 gene	1810011O10Rik	1,53
1428261_at	RIKEN cDNA 2310042L06 gene	2310042L06Rik	-1,76
1435315_s_at	RIKEN cDNA 2900034E22 gene	2900034E22Rik	-1,78
1436752_at	RIKEN cDNA 5730478M09 gene	5730478M09Rik	-1,67
1436166_at	storkhead box 2	Stox2	-1,79
1457287_at	Transcribed locus		-1,63
1423707_at	Transmembrane protein 50B	Trem50b	-1,59

Tab.5. Signifikant veränderte Probesets ( $p \leq 0,001$ ) in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach Behandlung mit frischem A $\beta$ (1-42) (50  $\mu$ M, 24h), DE – x-fache Expressionsveränderung

Affymetrix ID	Genname	Symbol	DE
<b>Apoptose, Stress</b>			
1449555_a_at	fetuin beta	Fetub	-1,52
<b>Proteinmodifikation/-abbau/ER/Golgi-Apparat</b>			
1417267_s_at	<u>FK506 binding protein 11</u>	<u>Fkbp11</u>	-1,68
1427127_x_at	heat shock protein 1B	Hspa1b	1,73
1452318_a_at	heat shock protein 1B	Hspa1b	1,72
1429426_at	ring finger protein 139	Rnf139	-1,53
<b>Metabolismus</b>			
1415988_at	high density lipoprotein (HDL) binding protein	Hdlbp	-1,70
Signaltransduction			
1434282_at	inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	Ibtk	-2,01
<b>Strukturmolekül</b>			
1426892_at	utrophin	Utrn	-1,54
<b>Transport, Endo- und Exozytose, Trafficking</b>			
1416551_at	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Atp2a2	-1,59
<b>andere Funktionen</b>			
1452382_at	dynamamin 3, opposite strand	Dnm3os	-1,64
1428280_at	FIP1 like 1 (S. cerevisiae)	Fip111	-2,03
<b>unbekannte Funktion</b>			
1452754_at	RIKEN cDNA 5730592L21 gene	5730592L21Rik	-1,91
1452872_at	RIKEN cDNA 2900054D09 gene	2900054D09Rik	-1,60
1435315_s_at	RIKEN cDNA 2900034E22 gene	2900034E22Rik	-1,86

Tab.6. Signifikant veränderte Probesets ( $p \leq 0,001$ ) in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M, 24h), DE – x-fache Expressionsveränderung

Um einzelne veränderte Gene zu identifizieren, wurde anschließend eine detaillierte Genontologie-Analyse durchgeführt. Wegen des großen Umfangs der Datensätze, wurden nur Expressionsänderungen mit einer  $\geq 1,5$ -fachen Auf- oder Abregulation im

Weiteren betrachtet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5, 6 und 7 zusammengefasst.

Für die A $\beta$ (1-42)-behandelten Zellen resultierten 75 (Tab.5), für die Gruppe der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen 14 (Tab.6) signifikant veränderte Probesets. Von den 75 Probesets der A $\beta$ (1-42)-Gruppe waren 31 auf- und 44 abreguliert (DE  $\geq$  1,5). In der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe wurden 3 aufregulierte und 11 abregulierte Probesets identifiziert (DE  $\geq$  1,5). 15 Probesets mit einer Auf- bzw. Abregulation  $\geq$  1,5 in der A $\beta$ (1-42)-Gruppe und/oder der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe konnten beiden Behandlungsgruppen zugeordnet werden (Tab. 7).

Affymetrix ID	Genname	Symbol	DE	
			A $\beta$	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Apoptose, Stress</b>				
1436276_at	Expressed sequence AU041707	AU041707	-1,63	-1,47
1455410_at	<u>Fas apoptotic inhibitory molecule 2</u>	<u>Faim2</u>	-1,79	-1,42
<b>Proteinmodifikation/-abbau/ER/Golgi-Apparat</b>				
1418528_a_at	<u>defender against cell death 1</u>	<u>Dad1</u>	-1,54	-1,43
1417267_s_at	<u>FK506 binding protein 11</u>	<u>Fkbp11</u>	-1,75	-1,68
1425519_a_at	la-associated invariant chain	li	-1,71	-1,42
1455584_at	stromal cell derived factor 4	Sdf4	-1,51	-1,36
1449679_s_at	syntaxin 5A	Stx5a	-1,54	-1,38
<b>Metabolismus</b>				
1417774_at	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	Nans	-1,57	-1,48
<b>Strukturmolekül</b>				
1452754_at	RIKEN cDNA 5730592L21 gene	5730592L21Rik	-2,31	-1,91
<b>Transkription/Nukleus</b>				
1431044_at	THO complex 1	Thoc1	-1,50	-1,33
<b>unbekannte Funktion</b>				
1436623_at	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	Entpd7	-1,51	-1,37
1430368_s_at	RIKEN cDNA 1700019D03 gene	1700019D03Rik	-1,66	-1,42
1435315_s_at	RIKEN cDNA 2900034E22 gene	2900034E22Rik	-1,78	-1,86
1457287_at	Transcribed locus		-1,63	-1,49
1423707_at	Transmembrane protein 50B	Trem50b	-1,59	-1,35

Tab.7. Signifikant veränderte Probesets ( $p \leq 0,001$ ) in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach Behandlung mit frischem A $\beta$ (1-42) (50  $\mu$ M, 24h) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M, 24h) mit einer  $\geq$  1,5-fachen Veränderung in mindestens einer der beiden Behandlungsgruppen

Diese Probesets wurden manuell entsprechend ihrer Involvierung in biologischen Prozessen in Rubriken klassifiziert. In einigen Fällen war die eindeutige Zuordnung eines Probesets in eine Rubrik aufgrund vielfältiger biologischer Funktionen nicht möglich. In diesen Fällen wurde der Klassifizierung „Apoptose, Stress“ bzw. „Proteinmodifikation/-degradation/ER/Golgi-Apparat“ stets der Vorrang gegeben, da die Ver-

änderung dieser Gene vermutlich in erster Linie aus der Behandlung mit den toxischen Substanzen resultierte. Probesets mit spezieller, nicht den bestehenden Rubriken zuordenbarer Funktion wurden als „andere Funktion“ klassifiziert. Probesets, für die keine biologische Funktion gefunden werden konnte, wurden der Rubrik „unbekannte Funktion“ zugeordnet. Einige Gene des Datensatz, wie z.B. Clusterin, wurden gleichzeitig durch mehrere veränderte Probesets identifiziert. Ursache hierfür ist die Struktur des Affymetrix Genechip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0, bei dem ein Gen auch durch mehrere Probesets kodiert werden kann.

### 3.3.4.2 Ergebnisse der quantitativen real-time RT-PCR

Die Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse erfolgte mit quantitativer real-time RT-PCR. Dazu wurde die Expression von 12 ausgewählten signifikant veränderten Genen der Microarray-Analyse in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen nach Behandlung mit frischem A $\beta$ (1-42) (50  $\mu$ M, 24h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M, 24h) sowie Kontrollzellen unter Verwendung von kommerziellen TaqMan<sup>®</sup> Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammenfassend dargestellt.

In der A $\beta$ (1-42)-behandelten Gruppe konnten für 10 der 12 untersuchten Gene die Ergebnisse der Microarray-Analyse bestätigt werden. Alle 10 Gene wiesen wie bei den Microarrays eine signifikante Auf- bzw. Abregulation (ANOVA und post-hoc Tukey-Test  $p \leq 0,05$ ) von mindestens  $\geq 1,5$  auf. Die signifikante Genexpressionsveränderung der Gene Bcl-2 modifying factor und Jun-oncogene konnte dagegen mit real-time RT-PCR nicht bestätigt werden. Beide Gene zeigten eine geringere Aufregulation als bei den Microarrays, für die keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

In der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Gruppe konnte für 11 der 12 untersuchten Gene, die in der Microarray-Analyse auf- bzw. abreguliert waren, auch in der real-time RT-PCR eine Auf- bzw. Abregulation gezeigt werden. Nur für die Expression des Bcl-2 modifying factors, die in den Microarray-Ergebnissen eine geringe Aufregulation (1,04) zeigte, wurde in der real-time RT-PCR eine Abregulation (-1,57) bestimmt. Die statistische Analyse ergab, dass die ausgewählten signifikant veränderten Gene der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe defender against cell death 1 und FK506 binding protein auch in der real-time RT-PCR signifikante Genexpressionsveränderungen (ANOVA und post hoc Tukey-Test  $p \leq 0,05$ ) aufwiesen. Für die Aufregulation des Fas apoptotic inhibitory mo-

lecule 2 konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Auf die Ergebnisse der statistische Auswertung der anderen Gene der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe in Tabelle 8 soll nicht näher eingegangen werden, da diese aufgrund der festgelegten Filterkriterien der Microarray-Analyse (Auf- bzw. Abregulation  $\geq 1,5$  und  $p \leq 0,001$ ) für eine weitere Klassifizierung ausgeschlossen wurden.

Acc. Nr.	Genname	A $\beta$			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			p (A)
		MA	PCR	p (T)	MA	PCR	p (T)	
XM_129579	activating transcription factor 6	-1,80	-2,20	0,007758	-1,49	-1,67	0,030408	0,008026
NM_138313	Bcl2 modifying factor	1,64	1,06	0,935938	1,04	-1,57	0,178913	0,103585
NM_007537	Bcl2-like 2	-1,74	-2,37	0,041283	-1,45	-1,63	0,156174	0,045473
NM_013492	clusterin	2,04	1,85	0,036173	-1,03	-1,42	0,522901	0,010184
NM_010015	defender against cell death 1	-1,54	-2,37	0,000002	-1,43	-1,50	0,000049	0,000002
NM_008929	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	-3,09	-4,33	0,000073	-2,24	-1,81	0,001500	0,000091
NM_028224	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	-1,79	-2,02	0,003962	-1,42	-1,23	0,194699	0,004640
NM_024169	FK506 binding protein 11	-1,75	-3,41	0,002536	-1,68	-2,59	0,005157	0,002051
NM_010591	Jun-oncogene	1,81	1,17	0,609749	1,21	1,19	0,537574	0,512106
NM_008791	Purkinje cell protein 4	2,08	1,99	0,008157	-1,33	-1,40	0,421913	0,002227
NM_021712	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3	1,62	1,51	0,007236	-1,06	-1,08	0,751617	0,002907
NM_010015	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	-1,62	-2,41	0,000069	-1,27	-1,33	0,007110	0,000086

Tab.8. Ausgewählte, signifikant veränderte Probesets der Microarray-Analyse validiert mit quantitativer real-time RT-PCR in der A $\beta$ (1-42)- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe (MA – x-fach veränderte Genexpression bei Microarray; PCR – x-fach veränderte Genexpression bei real-time RT-PCR (bezogen zur Kontrolle; p (A) – p-Wert ANOVA, p (T) – p-Wert post-hoc Tukey-Test)

Um die Güte der Übereinstimmung beider Methoden zu untersuchen, wurde eine Pearson's Korrelation für die ausgewählten Gene durchgeführt (Tab.8). Eine Pearson's Korrelation spiegelt den Grad der linearen Beziehung zwischen zwei Datenmatrices wieder. Der ermittelte Pearson's Korrelationskoeffizient R kann einen Bereich von  $-1 \leq R \leq 1$  umfassen, wobei bei  $R = -1$  bzw.  $R = 1$  eine perfekte lineare Beziehung zwischen den Datenmatrices besteht.

Die x-fachen Expressionsveränderungen der Microarray-Analyse stellten in diesem Fall eine Datenmatrix dar; die x-fachen Expressionsveränderungen der quantitativen real-time RT-PCR bildeten die andere Datenmatrix. Als Pearson's Korrelationskoeffizient konnte  $R = 0,9237$  ( $p \leq 0,001$ ) bestimmt werden. Der Korrelationskoeffizient bestätigt eine gute Korrelation zwischen den Daten der Microarray-Analyse und der real-time RT-PCR.

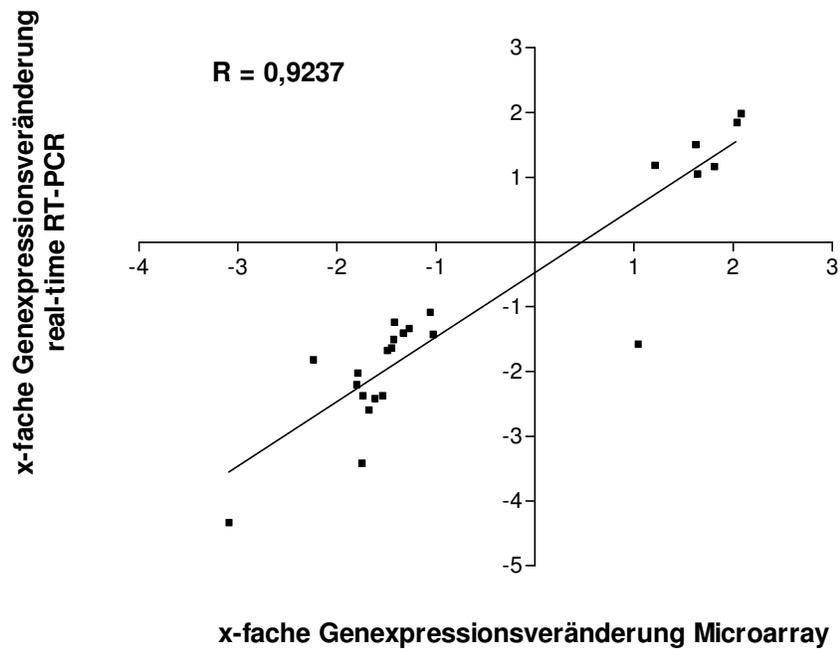


Abb.16. Pearson's Korrelation zwischen den x-fachen Expressionsveränderungen der ausgewählten Gene bestimmt mittels Microarray-Analyse und quantitativer real-time RT-PCR

### 3.3.5 Untersuchung der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität auf Proteinebene

#### 3.3.5.1 Beeinflussung der MAPK-Signalkaskaden durch A $\beta$ (1-42)

In der Microarray-Analyse und der real-time RT-PCR wurde nach A $\beta$ (1-42)-Behandlung eine veränderte Genexpression des Transkriptionsfaktors c-jun (Jun-oncogene) bestimmt (Tab.8). Der Transkriptionsfaktor besitzt wichtige Funktionen in der Regulation von Proliferation und Differenzierung einer Zelle, aber auch apoptotische Prozesse können über c-jun vermittelt werden. Durch duale Phosphorylierung am Serin<sup>63</sup> und Threonin<sup>73</sup> erfolgt die Aktivierung von c-jun im Nukleus (*Hilberg et al., 1993; Behrens et al., 1999; Okazawa und Estus, 2002; Zhu et al., 2002*).

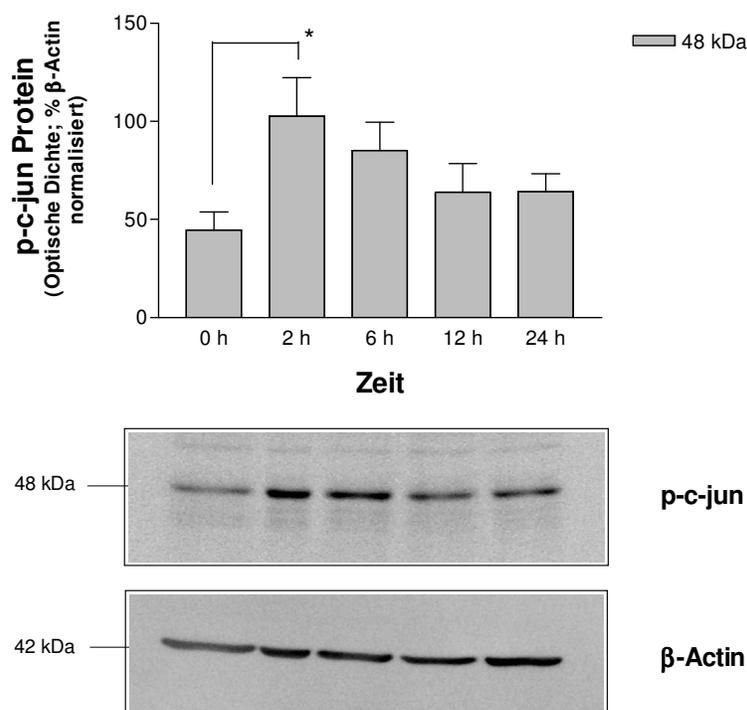


Abb.17. Zeitabhängige Phosphorylierung von c-jun nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 4, \* p < 0,05 signifikant gegenüber Inkubationsbeginn (0 h), T-Test)

Welchen Einfluss frisches A $\beta$ (1-42) auf die Proteinexpression von c-jun in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen hat, wurde mittels Western-Blotting und anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das c-jun-Protein untersucht. Gleichzeitig wurde die zeitabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors mit Hilfe eines Antikörpers gegen die phosphorylierte Form von c-jun be-

stimmt. Dazu wurden differenzierte SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42) behandelt und zu Beginn der Inkubation (0 h) sowie nach 2 h, 6 h, 12 h und 24 h die Zellen für eine Proteinanalyse aufbereitet.

Die Proteinuntersuchung zeigte, dass nach zweistündiger Inkubation mit A $\beta$ (1-42) eine signifikante Aktivierung von c-jun durch Phosphorylierung erfolgt (Abb.17). Für die Expression des c-jun-Gesamtproteins konnte im ausgewählten Untersuchungszeitraum bis 24 h eine marginale, nicht signifikante Erhöhung festgestellt werden (Abb.18).

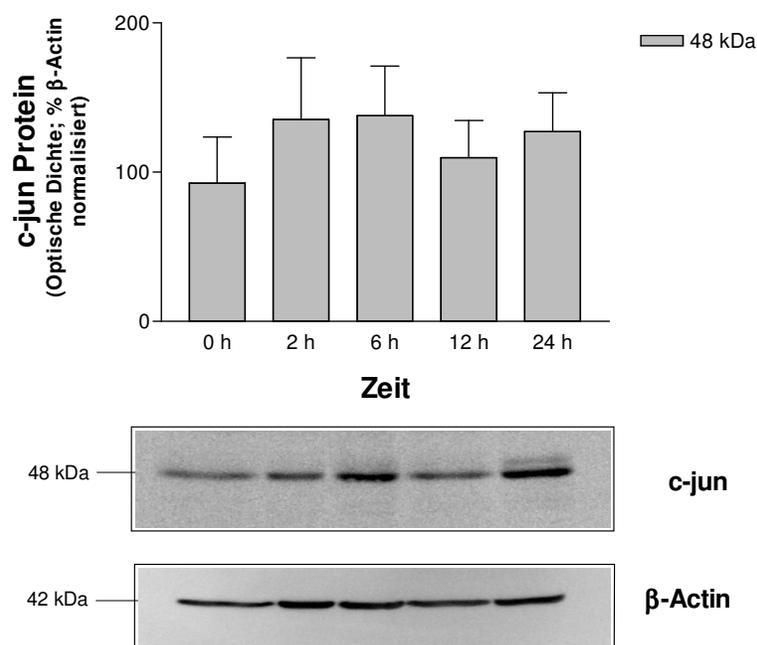


Abb.18. Zeitabhängige Expression des c-jun-Proteins nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 6, T-Test)

Als Schlüsselaktivator für c-jun gilt die c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) (*Lin, 2003; Manning und Davies, 2003; Shen und Liu, 2006*). Die JNK - auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet - gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Extrazelluläre Stimuli (Hitze, Strahlung, Zytokine), die eine Schädigung oder Stress in der Zelle verursachen können, aktivieren JNK. Die Aktivierung erfolgt nach dualer Phosphorylierung eines spezifischen Threonin/Tyrosin-Motifs durch eine übergeordnete Proteinkinase (z.B. MKK4, MKK7).

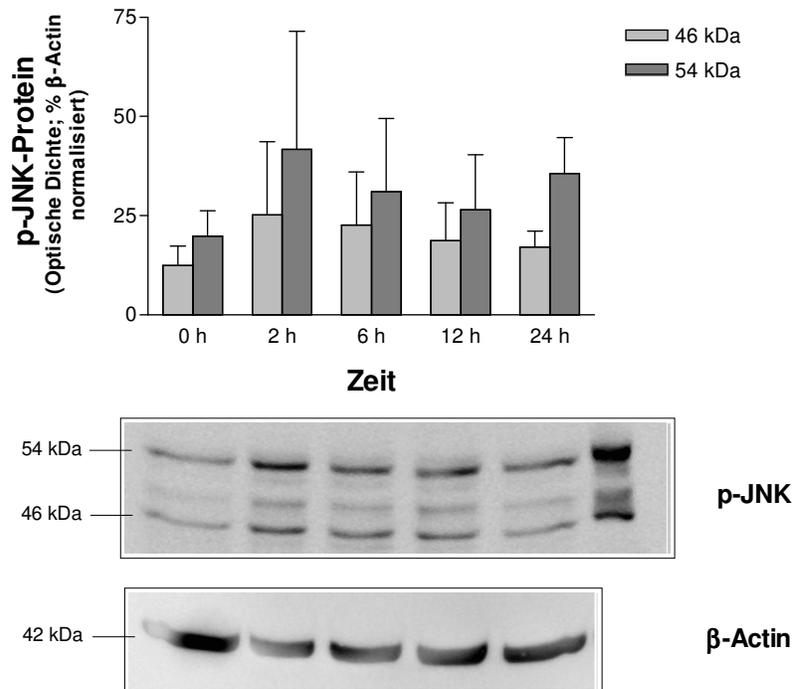


Abb.19. Zeitabhängige Phosphorylierung von JNK nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 4, T-Test)

In einer weiteren Western-Blot-Analyse wurde untersucht, ob JNK - als *downstream* Mediator von c-jun - durch frisches A $\beta$ (1-42) aktiviert bzw. die Proteinexpression verändert wird. Die Ergebnisse der zeitabhängigen JNK-Aktivierung sind in Abb.19 dargestellt. Unter dem Einfluss von frischem A $\beta$ (1-42) konnte in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von JNK beobachtet werden. Die höchste Phosphorylierung von JNK wurde nach zweistündiger Inkubation detektiert. Auch das Gesamtprotein JNK wird während der Inkubation mit A $\beta$ (1-42) in den Zellen erhöht (Abb.20). Nach 12-stündiger Exposition erreicht das JNK-Protein die höchste Expression. Die quantitative densitometrische Analyse ergab jedoch keine statistische Signifikanz der erhöhten Proteinmengen von phospho-JNK und JNK.

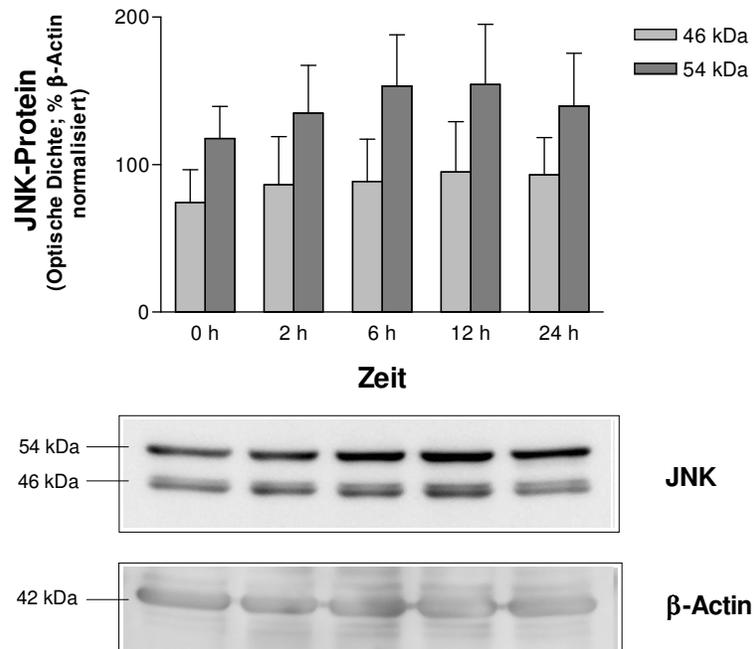


Abb.20. Zeitabhängige Proteinexpression von JNK nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 6, T-Test)

Die Signalkaskade, in der die JNK involviert ist, gehört zur Gruppe der MAPK-Signalkaskaden. MAPK-Signalwege setzen sich aus hierarchisch angeordneten Serin/Threonin Kinasen zusammen, wobei eine übergeordnete MAPK die jeweils unterstehende MAPK durch Phosphorylierung aktiviert (*Chang und Karin et al., 2001; Johnson und Lapadat, 2002*). Die Aktivierung aller MAPK-Signalkaskaden mündet in einem gemeinsamen Endpunkt - der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-jun. Neben dem JNK-Weg existieren zwei weitere MAPK-Signalwege: der ERK- und der p38-Weg, die ebenfalls nach den zentralen Proteinkinasen benannt wurden. Der ERK-Signalweg ist unter anderem in Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung involviert und wichtiger Regulator der neuronalen Funktion. Vor allem Neurotrophine und Wachstumsfaktoren aktivieren ERK in Neuronen (*Rubinfield und Seger, 2005*). P38 wird, wie JNK, vorwiegend durch Umgebungsstress aktiviert. Weitere Funktionen der p38 sind die Vermittlung von Zellwachstums- und Entzündungsprozessen, Zellzyklus oder Zelltod (*Herdegen und Waetzig, 2001; Gallo et al., 2002*). Die Expression und Aktivierung der Proteinkinasen ERK und p38 durch Behandlung mit frischem A $\beta$ (1-42) wurde ebenfalls im vorhandenen Zellmodell mit Western-Blotting untersucht.

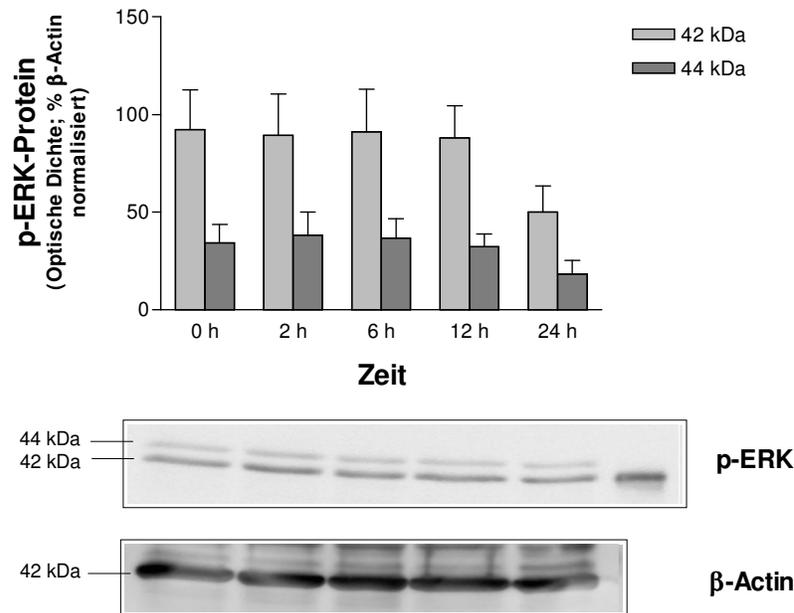


Abb.21. Zeitabhängige Phosphorylierung von ERK nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 6, T-Test)

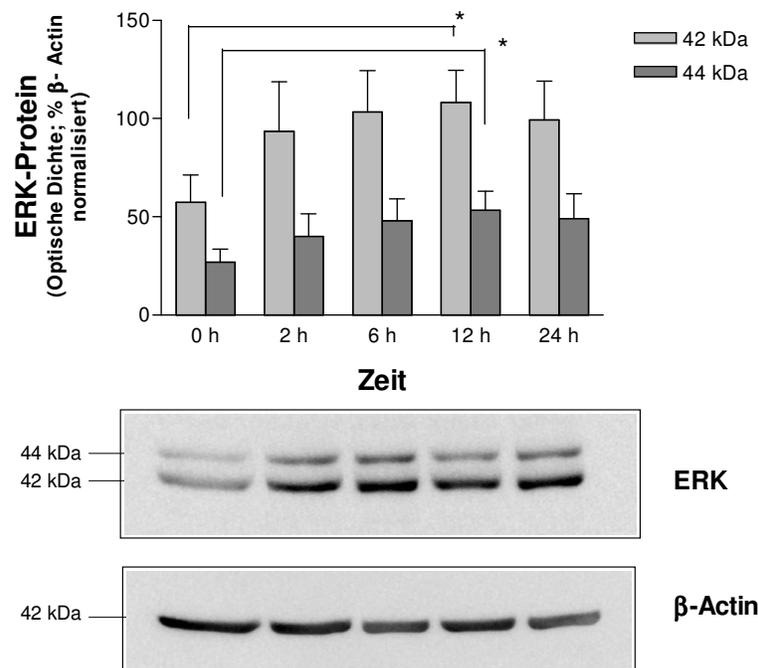


Abb.22. Zeitabhängige Proteinexpression von ERK nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 6, \* p < 0,05 signifikant gegenüber Inkubationsbeginn (0 h), T-Test)

Für die ausgewählten Inkubationszeitpunkte konnte für ERK im Vergleich zum Inkubationsbeginn (0 h) keine verstärkte Phosphorylierung durch Inkubation mit A $\beta$ (1-42) nachgewiesen werden (Abb.21). Nach 24 h wurde lediglich ein geringes Absinken der Immunaktivität des phosphorylierten ERK-Proteins beobachtet. Das Gesamtprotein ERK dagegen zeigt unter A $\beta$ (1-42)-Einfluss eine signifikante zeitabhängige Expressionserhöhung (Abb.22).

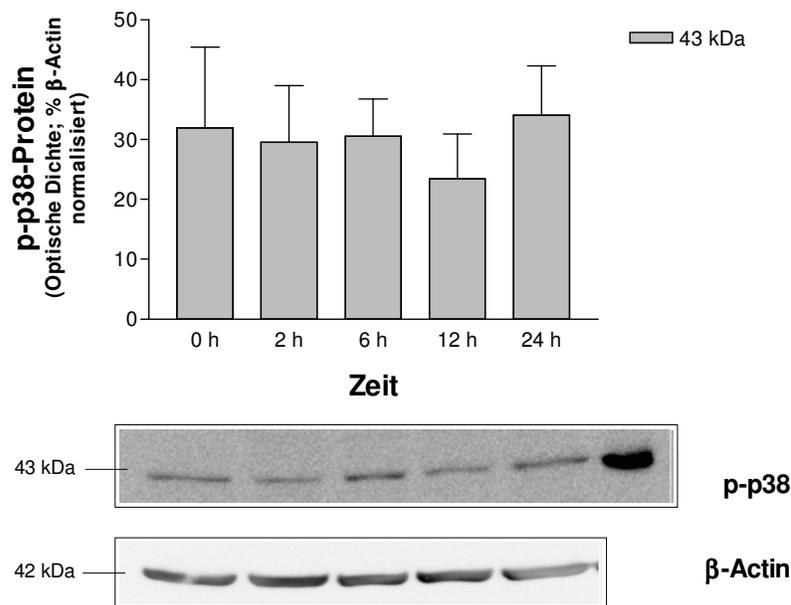


Abb.23. Zeitabhängige Phosphorylierung von p38 nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 4, T-Test)

Als dritte zentrale MAPK wurde die Aktivierung und Proteinexpression von p38 untersucht. Zu keinem der ausgewählten Zeitpunkte konnte eine signifikante zeitabhängige Phosphorylierung von p38 festgestellt werden (Abb.23). Die Expression des Gesamtproteins p38 wird unter dem Einfluss von A $\beta$ (1-42) geringfügig erhöht, wobei nach sechsständiger Inkubation ein Maximum erreicht wird (Abb.24). Die statistische Analyse der densitometrischen Messung zeigte keine Signifikanz der zeitabhängigen p38-Expressionserhöhung.

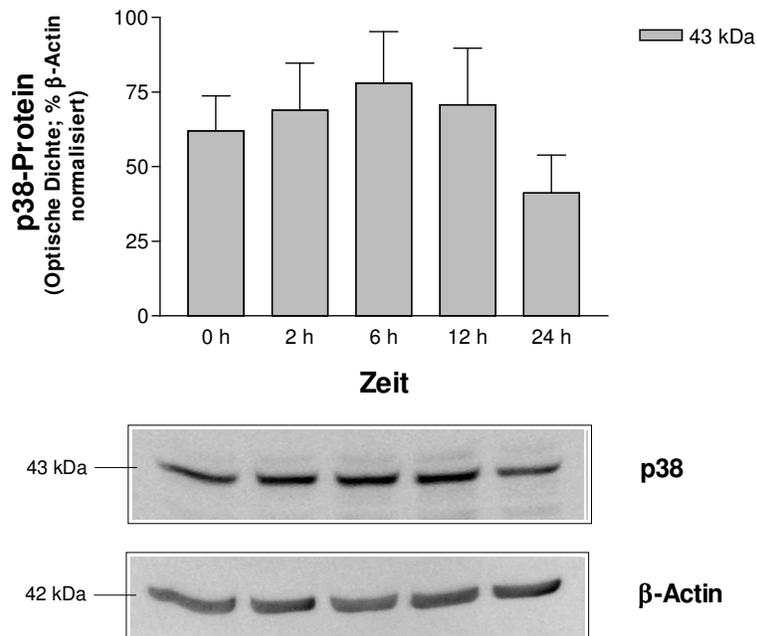


Abb.24. Zeitabhängige Proteinexpression von p38 nach Inkubation von differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit 50  $\mu$ M frischem A $\beta$ (1-42), bestimmt mittels Western-Blot mit anschließender densitometrischer Analyse, (normalisiert zur Expression von  $\beta$ -Actin, n = 5, T-Test)

### 3.3.6 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die A $\beta$ (1-42)-vermittelte Toxizität

Die Gen- und Proteinexpressionsanalyse weisen auf eine Beteiligung der MAPK-Signalwege an der Toxizität von frischem A $\beta$ (1-42) auf cholinerge Neuronen hin. Eine Inhibition der MAPK könnte möglicherweise Einfluss auf die A $\beta$ (1-42)-vermittelte Zytotoxizität besitzen. Um den Zusammenhang zwischen MAPK-Inhibition und A $\beta$ (1-42)-Toxizität zu untersuchen, wurden differenzierte SN56.B5.G4-Zellen mit selektiven MAPK-Inhibitoren und frischem A $\beta$ (1-42) in Prä- oder Coinkubation behandelt. Die Toxizität wurde mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. In Parallelansätzen wurde außerdem der Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Viabilität der SN56.B5.G4-Zellen bestimmt. Auf einen Nachweis der MAPK-Inhibition wurde verzichtet, da die Wirkung der verwendeten Inhibitoren bereits in zahlreichen Publikationen belegt wurde.

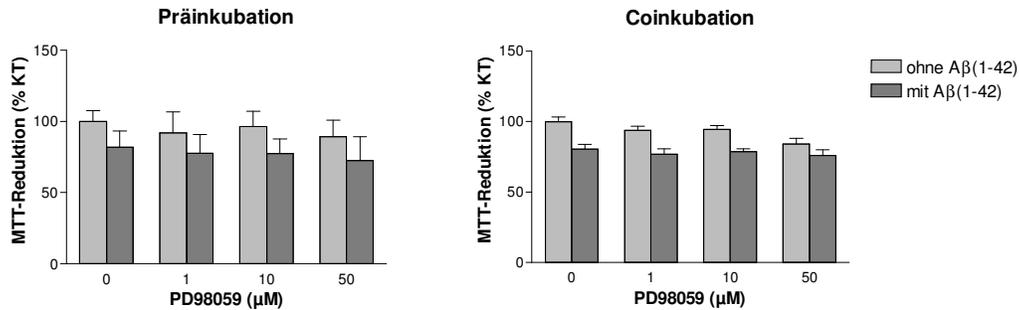


Abb.25. Einfluss von PD98059 auf die Toxizität von 50 μM frischem Aβ(1-42) auf differenzierte SN56.B5.G4-Zellen, gemessen mittels MTT-Assay (Präinkubation: Inkubation mit PD98059 für 24 h, dann Entfernung von PD98059 und Inkubation mit 50 μM frischem Aβ(1-42) für weitere 24 h, n = 4; Coinkubation: gleichzeitige Inkubation von PD98059 und 50 μM frischem Aβ(1-42) für 24 h, n = 5, Kruskal-Wallis-Test)

Zur Hemmung der ERK-Signalkaskade wurde der selektive Proteinkinase-Inhibitor PD98059 eingesetzt (Alessi *et al.*, 1995). Durch Anbindung von PD98059 an die unphosphorylierte, inaktive Form von MAPKK1, der übergeordneten Kinase von ERK, wird die für die Phosphorylierung/Aktivierung von MAPKK1 erforderliche Konformationsänderung und damit die Aktivierung der nachfolgenden ERK-Signalkaskade verhindert. Der MTT-Assay zeigte, dass im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 1 - 50 μM weder die Präinkubation noch die Coinkubation mit PD98059 toxisch für die Zellen ist (Abb.25). Eine Behandlung der Zellen mit PD98059 konnte die Aβ(1-42)-induzierte Abnahme der Zellviabilität nicht verhindern. Alle drei untersuchten Konzentration von PD98059 (1 μM, 10 μM, 50 μM) sowohl als Prä- oder Coinkubation mit Aβ(1-42) führten zu einer ähnlichen Reduktion der Zellzahl auf ~ 70 % wie die Inkubation mit dem Peptid selbst.

Als selektiver JNK-Inhibitor wurde SP600125 verwendet (Bennett *et al.*, 2001). SP600125 besitzt in den verwendeten Konzentrationen (1 μM, 10 μM, 50 μM) keine toxischen Effekte auf die cholinergen Zellen (Abb.26). Für SP600125 konnte in Prä- und Coinkubation kein signifikanter Einfluss auf die Aβ(1-42)-vermittelte Toxizität nachgewiesen werden. Die Präinkubation mit 1 μM SP600125 führt zu einer geringfügigen Erhöhung der Zellviabilität gegenüber der Behandlung mit Aβ(1-42) allein, diese ist aber nicht signifikant.

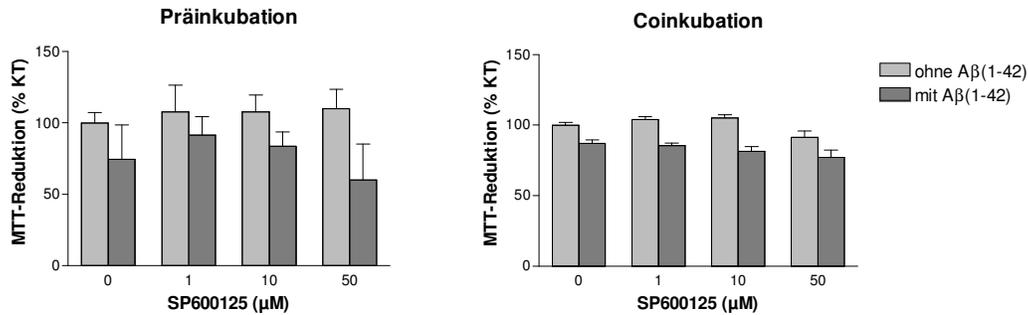


Abb.26. Einfluss von SP600125 auf die Toxizität von 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) auf differenzierte SN56.B5.G4-Zellen, gemessen mittels MTT-Assay (Präinkubation: Inkubation mit SP600125 für 24 h, dann Entfernung von SP600125 und Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) für weitere 24 h, n = 4; Coinkubation: gleichzeitige Inkubation von SP600125 und 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) für 24 h, n = 4, Kruskal-Wallis-Test)

Zur Inhibition von p38 wurde PD169316, ein potenter und selektiver Kinase-Hemmer, eingesetzt (*Gallagher et al., 1997*). Im Konzentrationsbereich zwischen 1 - 10  $\mu\text{M}$  zeigte PD169316 keine Toxizität auf differenzierte SN56.B5.G4-Zellen (Abb.27). Für 50  $\mu\text{M}$  konnte eine signifikante Toxizität von PD169316 beobachtet werden. Trotz der Toxizität von 50  $\mu\text{M}$  PD169316 allein wurde in Coinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) ein signifikanter Anstieg der Zellviabilität gegenüber der Inkubation ohne PD169316 bestimmt. Auch bei der Präinkubation ist dieser positive Effekt auf die Zellviabilität erkennbar.

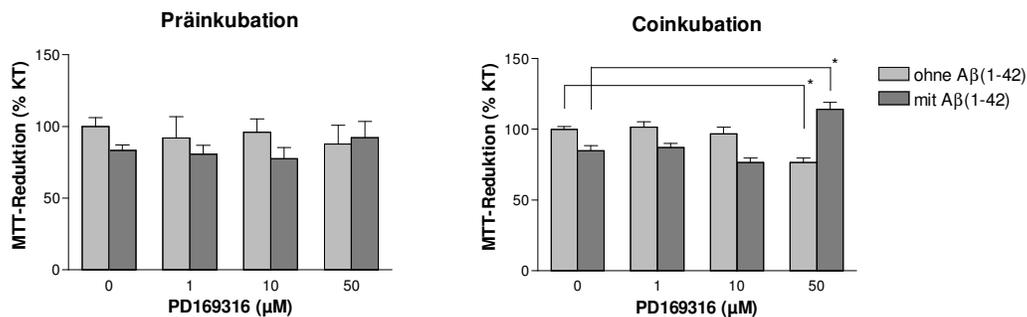


Abb.27. Einfluss von PD169316 auf die Toxizität von 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) auf differenzierte SN56.B5.G4-Zellen, gemessen mittels MTT-Assay (Präinkubation: Inkubation mit PD169316 für 24 h, dann Entfernung von PD169316 und Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) für weitere 24 h, n = 4; Coinkubation: gleichzeitige Inkubation von PD169316 und 50  $\mu\text{M}$  frischem A $\beta$ (1-42) für 24 h, n = 5, \* p < 0,01 signifikant gegenüber der Toxizität ohne PD169316, Kruskal-Wallis-Test)

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion hinsichtlich experimentell-methodischer Aspekte

#### 4.1.1 SN56.B5.G4-Zellen als Modell für cholinerge Neuronen

Neben der Untersuchung von post mortem Hirngewebe, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten, bildgebenden Verfahren und Tiermodellen werden Zellkulturmodelle zur Aufklärung der pathologischen Prozesse bei Morbus Alzheimer genutzt. Man unterscheidet zwischen Primärzell- und organotypischen Hirnschnittkulturen sowie immortalen Zelllinien (*Lindl, 1999*). Primärzell- und Hirnschnittkulturen werden aus einem lebenden Organismus isoliert und ex vivo weiter kultiviert. Zelllinien stammen von Tumorzellen ab und besitzen unbegrenzte Teilbarkeit. Ein Vorteil von Zelllinien gegenüber Primärzellkulturen ist die konstante Zusammensetzung der Kultur. Primärzellkulturen setzen sich oft aus verschiedenen Zellarten mit verschiedenen Neurotransmitterphenotypen zusammen und sind für eine isolierte Betrachtung eines einzelnen Zelltyps ungeeignet.

Die in den Untersuchungen verwendete SN56.B5.G4-Zelllinie stammt von der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 ab. Durch somatische Fusion der Neuroblastom-Zellen mit Neuronen aus dem medialen Septum postnataler Mäuse (Stamm: C57BL/6, 21. Postnataltag) wurden Hybridzellen geschaffen, die Eigenschaften beider parentaler Zelltypen besitzen (*Hammond et al., 1986; Hammond et al., 1990; Lee et al., 1990; Wainer et al., 1991*). Die entstandenen Zellen waren immortal und zeigten die Expression cholinergischer Marker, wobei die Linie SN56.B5.G4 einen besonders stark ausgeprägten cholinergen Phenotyp aufwies (*Blusztajn et al., 1992*). Neben Enzymen des Acetylcholinstoffwechsels, wie Acetylcholinesterase (AChE) und Cholinacetyltransferase (ChAT) (*Jankowska et al., 1997; Szutowicz et al., 1999; Heinitz et al., 2006*), exprimieren SN56.B5.G4-Zellen den Cholintransporter (HACU) (*Blusztajn et al., 1992*) sowie den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) (*Barbosa et al., 1999; Santos et al., 2000; Santos et al., 2001; Barbosa et al., 2002*). Die Zellen können Acetylcholin synthetisieren, speichern und nach Depolarisation ins Zellkulturmedium freisetzen (*Blusztajn et al., 1992*). Durch Behandlung mit Retinsäure und dibutyryl-cAMP wird der Acetylcholinstoffwechsel in den SN56.B5.G4-Zellen stimuliert und eine morphologische und neurochemische Differenzierung zu einem noch stärker

ausgeprägten cholinergen Phenotyp erreicht (*Blusztajn et al., 1992; Heinitz et al., 2006*). Des Weiteren wurde die Expression von Muskarinrezeptoren, Subtyp M2 (*Rosoff et al., 1996; Rosoff und Nathanson, 1999*), Nikotinrezeptoren (*Nilbratt et al., 2007*) und p75-Neurotrophinrezeptoren (p75<sup>NTR</sup>) (*Berse et al., 1999; Madziar et al., 2003*) in der Zelllinie beschrieben. Im Menschen sind M2-Rezeptoren unter anderem in den cholinergen Hirnregionen (basales Vorderhirn, mediales Septum und Hippocampus) zu finden und weisen eine Kolokalisation mit ChAT auf (*Caufield, 1993*). Die cholinerge Degeneration beim Alzheimer-Patienten ist von einer veränderten Signaltransduktion muskarinerg (Mash et al., 1985; Boulay et al., 1996) und nikotinerg (Nordberg et al., 1992b, c; Perry et al., 1995) Rezeptoren begleitet. Der p75<sup>NTR</sup> wird ebenfalls verstärkt in cholinergen Neuronen des Gehirns exprimiert (*Schor, 2005; Lu et al., 2005*) und kann als cholinerges Marker betrachtet werden. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften stellen SN56.B5.G4-Zellen ein geeignetes Modell für cholinerge Neuronen dar.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich differenzierte SN56.B5.G4-Zellen verwendet. Diese besitzen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen stärker ausgeprägte cholinerge Eigenschaften, was in den Voruntersuchungen gezeigt werden konnte. Zum anderen handelt es sich bei den cholinergen Neuronen des humanen Gehirns ebenfalls um Zellen im ausdifferenzierten Zustand.

Die Verwendung der SN56.B5.G4-Zellen in Toxizitätsstudien ermöglicht eine isolierte Betrachtung von Prozessen, die auch bei der Degeneration cholinergischer Neuronen im Alzheimer-Hirn eine Rolle spielen könnten. Jankowska und Mitarbeiter untersuchten beispielsweise, welchen Effekt der akute und chronische Einfluss von Aluminium auf den Acetylcholin-Metabolismus in den cholinergen Zellen hat (*Jankowska et al., 2000*). Fass et al. testeten die Toxizität verschiedener NO-Donoren mit SN56.B5.G4-Zellen (*Fass et al., 2004*). Einige Arbeitsgruppen beschäftigten sich auch mit der A $\beta$ -induzierten Toxizität in den cholinergen Zellen (*Pedersen et al., 1996; Pedersen und Blusztajn, 1997; Le et al., 1997; Colom et al., 1998; Bielarczyk et al., 2003; Magalhaes et al., 2005; Bielarczyk et al., 2006*). Pedersen und Mitarbeiter berichteten, dass die Behandlung der SN56.B5.G4-Zellen mit niedrigen Konzentrationen A $\beta$ (1-28) und A $\beta$ (1-42) eine Reduktion der Acetylcholinsynthese induziert - ein Effekt, der zu den cholinergen Defiziten im Alzheimer-Hirn beitragen könnte (*Pedersen et al., 1996; Pedersen und Blusztajn, 1997*). Neben reduzierten cholinergen Enzymaktivitäten wurden nach Behandlung mit A $\beta$  neurotoxische Effekte beobachtet (*Le et al., 1997; Co-*

*lom et al., 1998; Bielarczyk et al., 2003*). Le et al. zeigten an der Zelllinie, dass die A $\beta$ (1-40)-induzierte Toxizität mit einer gesteigerten Tau-Phosphorylierung und einer erhöhten Expression des APP assoziiert ist (*Le et al., 1997*) - auch Prozesse, die in cholinergen Neuronen des Alzheimer-Hirns von Bedeutung sein könnten.

Trotz der Vorteile, welche die isolierte Betrachtung von Vorgängen in einem einzelnen Zelltyp bietet, ist zu berücksichtigen, dass eine Zellantwort im menschlichen Organismus durch das komplexe Zusammenspiel verschiedenster Hirnzellen entsteht. Diese Komplexität kann mit keinem der derzeit zur Verfügung stehenden Zellkulturmodellen nachgestellt werden. Hirnschnitt- und Primärzell-Kulturen bestehen zwar aus verschiedenen Zelltypen und ahmen einen physiologischen Zellverband nach. Die isolierte Betrachtung von Einzelzellen aus diesem Verband ist aber schwierig, besonders wenn quantitative Veränderungen erfasst werden sollen.

Problematisch an Zelllinien ist weiterhin, dass sie oft eine unphysiologische Proteinexpression zeigen. SN56.B5.G4-Zellen exprimieren beispielsweise keine p140TrkA-Rezeptoren (*Berse et al., 1999*). p140TrkA sind Neurotrophinrezeptoren, die auch in den cholinergen Zellen des basalen Vorderhirns zu finden sind (*Benito-Gutierrez et al., 2006*). Die Rezeptoren sind wie p75<sup>NTR</sup> mit ChAT und VAcHT kolokalisiert und weisen bei Morbus Alzheimer eine Abregulation auf (*Boissiere et al., 1997; Mufson et al., 1997*). Die fehlende Expression bestimmter Rezeptortypen kann eine andere Zellantwort als die physiologische hervorrufen. Über die Expression einiger anderer Rezeptoren in SN56.B5.G4-Zellen ist bisher nichts bekannt und erfordert eine weitere Charakterisierung der Zelllinie.

SN56.B5.G4-Zellen sind murine Zellen. Obwohl zahlreiche in der Forschung genutzte Zellmodelle tierischen Ursprungs sind, lassen sich die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf menschliche Zellen übertragen. Neuroblastom-Zelllinien humaner Abstammung sind z.B. SH-SY5Y (*Gomez-Santos et al., 2002*), LA-N-2 (*Crosland et al., 1996*) oder IMR-32 (*Clementi et al., 1986*). Diese Zelllinien besitzen jedoch nur partiell cholinerge Eigenschaften und sind deshalb als cholinerge Neuronenmodelle ungeeignet.

Nicht zu vergessen ist, dass die Alzheimer-Pathogenese beim Menschen in einem progressiven chronischen Prozess über Jahre verläuft. In allen Zellmodellssystemen kann immer nur kurzzeitige akute Toxizität simuliert werden. Alle Ergebnisse, die mit

Zellkultur- und Tiermodellen erhalten werden, erfordern eine in vivo Validierung im Alzheimer-Patienten.

#### 4.1.2 Genexpressionsuntersuchungen mit Microarrays

Die Verwendung der Microarray-Technologie wurde erstmals 1996 beschrieben (*DeRisi et al., 1996; DeRisi et al., 1997*). Seitdem haben sich Microarrays durch eine stetig steigende Zahl von Nutzern und viele Publikationen in den letzten Jahren zu einer wichtigen molekularbiologischen Methode etabliert (*Yang und Speed, 2002; Allison et al., 2005*). Microarrays, auch als Genchips bezeichnet, ermöglichen die gleichzeitige Bestimmung des Expressionsstatus von zahlreichen Genen bis hin zum Gesamtgenom. Mit den anderen üblichen RNA-Techniken, wie der RT-PCR, Northern Blot oder in-situ Hybridisierung, wäre das aufgrund des immensen Zeit- und Arbeitsaufwands nicht realisierbar. Die Datenmengen, die durch eine Microarray-Analyse entstehen, sind aber so enorm umfangreich, dass es der Entwicklung aufwendiger Auswertungsstrategien basierend auf Zusammenhängen der Mathematik, Statistik und Bioinformatik bedarf. Je nach Art der Microarrays, dem Versuchsdesign und der Fragestellung werden verschiedenste Verfahren und Algorithmen angewandt und ständig weiterentwickelt. Generell sind immer die Schritte Preprocessing (Image-Analyse, Normalisierung der Rohdaten und gegebenenfalls Filterung), Statistische Analyse, Klassifizierung und eine anschließende Validierung zur Auswertung der Ergebnisse nötig (*Allison et al., 2005*).

In der durchgeführten Genexpressionstudie wurden kommerzielle Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> ausgewählt. Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> gehören derzeit als cDNA-Oligonucleotidarrays zu den Marktführern und ihre Anwendung wurde vielfach publiziert (*Irizarry et al., 2003b*). Die Imageanalyse der Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> erfolgte mit der dazugehörigen und etablierten Software Microarray Suite 4.0 (*Affymetrix, Santa Clara, CA, USA*), die speziell für das Scannen der Microarrays entwickelt wurde. Zur Normalisierung der Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Im Wesentlichen unterscheiden sich alle Verfahren in Präzision und Richtigkeit in Abhängigkeit von der Höhe der Expressionsänderung. Die von Affymetrix entwickelte Methode MAS5 (*Microarray Suite, Version 5*) besitzt zwar eine hohe Richtigkeit in der Vorhersage der tatsächlichen Expressionsveränderung, aber die Präzision von MAS5 ist im Bereich größerer Expressionsveränderungen nicht

ideal. RMA dagegen, welche in dieser Studie gewählt wurde, ist durch eine geringe Richtigkeit, aber höhere Präzision bei niedrigen und höheren Expressionsveränderungen gekennzeichnet und wird als bessere Normalisierungsmethode betrachtet (Quakenbush, 2002; Bolstad et al., 2004; Choe et al., 2005; Millenaar et al., 2006). Dennoch ist stark umstritten, welches das beste Normalisierungsverfahren ist (Allison et al., 2005). Auch die statistische Analyse reicht vom einfachen Berechnen der x-fachen Expressionsveränderung bis hin zu multiplen Tests mit Fehlerkorrekturberechnungen (Allison et al., 2005). Dabei treten Diskrepanzen zwischen den Interessen der Naturwissenschaftler und Bioinformatiker auf. Microarrays dienen den Naturwissenschaftlern meist als Screening-Tool, wobei ein gewisses Auftreten von falsch-positiven oder falsch-negativen Genen in der Analyse akzeptiert wird. Oft wird der Probenumfang durch die immensen Kosten der Microarrays begrenzt. Die Bioinformatiker streben dagegen eine Analyse mit höchster Richtigkeit und Zuverlässigkeit an. Je nach Fragestellung der Untersuchung sollte zwischen den Interessen beider Gruppen ein Kompromiss gefunden werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Auswertung wurde auch auf die Berechnung komplizierter Fehlerkorrekturen verzichtet. Dafür wurde in der ANOVA-Analyse und dem post-hoc Tukey-Test ein strenger p-Wert von 0,001 ausgewählt. Von den 45.000 Probesets des Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> werden wahrscheinlich 45 Gene als falsch positiv oder negativ identifiziert. Für die Fragestellung der Arbeit liegt die Fehlerquote in einem akzeptablen Rahmen. In der nachfolgenden Validierung konnten fast alle ausgewählten Expressionsänderungen der Microarray-Analyse mit einer zweiten Methode, der real-time RT-PCR, bestätigt werden. Der Pearson-Koeffizient zeigte eine starke und signifikante Korrelation zwischen beiden Methoden, die den Werten anderer Veröffentlichungen entspricht (Dallas et al., 2005; Nagy et al., 2005). Demnach liefert die ausgewählte Auswertestrategie zuverlässige Daten.

Als letzter Schritt der Analyse ist die Einordnung der signifikant veränderten Gene in sinnvolle ontologische Kategorien nötig ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). Dies erleichtert nicht nur die Übersicht über die Daten, sondern ermöglicht auch eine Identifizierung der involvierten Signalwege. Die Gene können nach verschiedenen Gesichtspunkten (z.B. Zellkompartiment, molekulare Funktion) gruppiert werden. In dieser Studie wurde die Klassifizierung nach biologischen Prozessen bevorzugt, um so Aufschluss über die Vorgänge der Zellantwort zu erhalten. Sowohl die manuelle als auch die Klassifizierung mit Onto-Express ergab ähnliche biologische Kategorien. Der Vorteil

von Onto-Express (*Khatri et al., 2002*) gegenüber der manuellen Klassifizierung ist, dass bei der Einordnung das Expressionsprofil des Genchips berücksichtigt und eine zusätzliche statistische Prüfung der Relevanz jeder Kategorie vorgenommen wird.

Neben unzähligen Algorithmen und Auswerteverfahren von Microarrays steht dem Nutzer eine genauso große Anzahl von Softwareprogrammen zu Verfügung, die bei der Bewältigung der Datenmassen helfen sollen. Welche Methoden und Programme schließlich für die Analyse ausgewählt werden, liegt im Ermessen jedes einzelnen Forschers. Bei der Auswertung von Microarrays gibt es nicht einen Weg und somit auch nicht eine Lösung, welche die Identifizierung aller veränderten Gene ermöglicht. Eine Kombination vieler Methoden wäre nötig, um alle signifikant veränderten Gene mit einer ausreichenden Richtigkeit und Zuverlässigkeit zu identifizieren. Ob das für den jeweiligen Sachverhalt entscheidend ist, liegt ebenfalls bei jedem Forscher selbst. Viel wichtiger ist eine Validierung der erhaltenen Gene mit anderen Methoden wie z.B. der real-time RT-PCR. Und nicht zuletzt ist die Überprüfung der Daten auf Proteinebene erforderlich, denn das Genom muss nicht unbedingt mit dem Proteom korrelieren (*Gygi et al., 1999; Hack, 2004*).

#### **4.1.3 Genexpressionsuntersuchungen mit real-time RT-PCR**

Eine Methode zur Validierung von Microarrays ist die quantitative real-time RT-PCR. Die real-time RT-PCR entwickelte sich in kurzer Zeit, nachdem sie Anfang der neunziger Jahre erstmals beschrieben wurde (*Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993*), zu einer etablierten Labortechnologie (*Valasek et al., 2005; Huggett et al., 2005*). Bei der real-time RT-PCR erfolgt unter Verwendung spezifischer Primer eine Amplifikation einer Targetsequenz, wobei der Amplifikationsprozess über eine Fluoreszenzmessung verfolgt wird. Dazu werden verschiedene Fluoreszenzproben unter anderem DNA-bindende Farbstoffe (z.B. SYBR green), Hybridisierungsproben, Skorpionprimer oder Haarnadelprimer der Reaktion zugesetzt. In der vorliegenden Studie wurden kommerzielle Taqman<sup>®</sup> Assays von Applied Biosystems verwendet, die eine schnelle und einfache Bestimmung der Genexpression erlauben (*Applied Biosystems, User Manual*). Da es sich bei Taqman<sup>®</sup> Probes um sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonucleotide handelt, zeichnen sich die Assays durch eine hohe Spezifität gegenüber DNA-bindenden Farbstoffen aus (*Watson und Li, 2005*). Durch den Amplifikationsschritt weißt die real-time RT-PCR außerdem eine hohe

Sensitivität auf, d.h. selbst von geringen Probemengen kann die Genexpression bestimmt werden.

Wie bei allen RNA-Methoden setzt die Durchführung der real-time RT-PCR ein sauberes Arbeiten voraus. Denn nicht nur die RNA, sondern auch die genutzten Enzyme und Reagenzien, sind relativ labil. Primer und Proben sollten so ausgewählt werden, dass nur spezifische Amplifikationen und keine Cross-Hybridisierungen erfolgen. Bei den verwendeten Taqman<sup>®</sup> Assays handelt es sich um kommerzielle bereits prädesignte Probe- und Primersets, so dass die eigenständige Auswahl von Probes und Primern entfällt.

Problematisch bei der Auswertung der real-time-Amplifikation ist die Normalisierung der Daten. Neben der Normalisierung zum RNA- oder DNA-Gehalt der Probe wird das Targetgen am häufigsten auf den Gehalt eines Referenzgens (Housekeeping-Gene, wie z.B. GAPDH,  $\beta$ -Actin, 18S-RNA) normalisiert (*Suzuki et al., 2005; Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005*). Doch die Verwendung von Referenzgenen ist nicht ideal, da diese nach neueren Untersuchungen auch Expressionsschwankungen unterliegen (*Piechaczyk et al., 1984; Stout et al., 1985; Blomberg et al., 1987*). In vergleichenden Studien brachte die Verwendung der hier gewählten 18S RNA als Referenzgen die besten Ergebnisse (*Schmid et al., 2003; Aerts et al., 2004*). Eine bessere Möglichkeit wäre eine Normalisierung gegen so genannte Spike-in-Controls - eine definierte Menge an RNA-Molekülen, die gezielt der Probe vor der Amplifikation zugesetzt werden (*Huggett et al., 2005*). Eine gleichzeitige Normalisierung zu verschiedenen Housekeeping-Genen könnte auch die Fehlerquote minimieren (*Vandesompele et al., 2002*).

Dennoch stellt die real-time RT-PCR derzeit das sensitivste und zugleich komfortabelste Verfahren zur quantitativen Bestimmung von mRNA dar und ist daher für die Validierung der Microarray-Daten hervorragend geeignet.

#### **4.1.4 Proteinexpressionsuntersuchungen mit Western Blotting und Immundetektion**

Zur Proteinanalytik wurde in der Studie die weit verbreitete Methode SDS-PAGE/Western Blotting mit anschließender Immundetektion durchgeführt (*Kurien und Scofield, 2003; Westermeier und Marouga, 2005*). Dazu wird das Proteingemisch zunächst durch Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel

entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend durch einen elektrophoretischen Transfer auf eine Membran überführt (*Lottspeich und Zorbas, 1998*). Auf der Membran können die Proteine mit verschiedenen Methoden detektiert werden (*Kurien und Scofield, 2003*).

Neben einer ausreichenden Separierung der Proteinmischung im Gel ist für eine quantitative Auswertung vor allem ein effizienter Proteintransfer aus dem Gel in die Membran entscheidend. Die hier verwendeten PVDF-Membranen zeichnen sich durch eine hohe Proteinbindungskapazität aus und sind für quantitative Proteinbestimmungen gut geeignet. Das ausgewählte Detektionsverfahren muss ebenfalls bestimmte Anforderungen erfüllen (*Kurien und Scofield, 2003*). Die Detektion sollte eine hohe Sensitivität mit einem optimalen Signal-Hintergrund-Quotienten aufweisen, un-toxisch, einfach, schnell und kostengünstig sein. Bei quantitativen Analysen ist ein breiter Bereich des linearen Zusammenhangs zwischen Proteinkonzentration und Signalintensität äußerst wichtig. Durch die Antikörper-Antigen-Reaktion, der hier verwendeten Immunodetektion, wird ein hohes Maß von Selektivität und Sensitivität erreicht. Dennoch ist die spezifische Bindung des verwendeten Antikörpers an das Targetprotein Voraussetzung für den Erfolg und die Zuverlässigkeit der Proteinde- tektion. Nicht selten stehen kommerzielle Antikörper zur Verfügung, die eine ungenü- gende Spezifität besitzen (*Herber et al., 2004*). Zahlreiche Isoformen und Splicevari- anten, die von einigen Proteinen existieren (z.B. auch bei den MAPK), erschweren die Herstellung und Gewinnung eines selektiven Antikörpers. Unspezifische Bindun- gen eines Antikörpers lassen sich unter anderem durch das Auftreten zahlreicher Proteinbanden auf dem Blot erkennen.

Zur Visualisierung der Antikörperbindung an das Targetprotein finden verschiedene Verfahren Anwendung. Die höchste Sensitivität und Selektivität besitzt derzeit neben der radioaktiven Markierung die hier genutzte Chemilumineszenz-Detektion (*Laing, 1986*). Beide Methoden ermöglichen über eine densitometrische Messung der Sig- nalintensität eine quantitative bzw. semiquantitative Bestimmung der Proteinexpres- sion. Da jeder Blot hinsichtlich Farbintensität der Proteinbanden und Hintergrund va- riiert, müssen zum Vergleich mehrerer Blots die vermessenen Banden des Tar- getproteins, wie bei der real-time RT-PCR, auf einen bestimmten Bezugswert norma- lisiert werden. Verbreitet ist die Methode der Normalisierung gegen ein Referenzpro- tein (z.B.  $\beta$ -Actin), die, wie bereits diskutiert, nicht ideal ist (siehe 4.1.3). Trotz einiger Verbesserungsmöglichkeiten zeigen die unzähligen Publikationen, welche die Ver-

wendung von SDS-PAGE und Immunoblotting beschreiben, die Bedeutung der Methoden in der Proteinanalytik. Vor allem breite Anwendbarkeit und relativ einfache Durchführbarkeit machen das Verfahren zu einem nicht mehr wegzudenkenden Werkzeug der Molekularbiologen, zu dem es bisher keine vergleichbaren Alternativen gibt.

#### **4.2 Abhängigkeit der A $\beta$ (1-42)-vermittelten Toxizität vom Aggregationszustand des Peptids**

Für die Toxizitätsuntersuchungen am cholinergen Zellmodell SN56.B5.G4 wurden zwei verschiedene Aggregationszustände von A $\beta$ (1-42) eingesetzt: frisches A $\beta$ (1-42) und gealtertes A $\beta$ (1-42). Unter „Alterung“ versteht man die mehrtägige Inkubation von hohen A $\beta$ (1-42)-Konzentrationen (100-500  $\mu$ M) bei 37 °C. Das Altern führt zur Bildung unlöslicher Peptidfibrillen, welche in ähnlicher Form in den Alzheimer-Plaques zu finden sind (*Pike et al., 1991; Pike et al., 1993*). In den Voruntersuchungen konnte bestätigt werden, dass das gealterte A $\beta$ (1-42) im Vergleich zum frischen A $\beta$ (1-42) einen deutlich höheren Fibrillengehalt besitzt. Die native PAGE zeigte, dass sich die beiden verwendeten A $\beta$ (1-42)-Lösungen hinsichtlich der fibrillären Zusammensetzung deutlich unterscheiden. Während sich im frischen A $\beta$ (1-42) zahlreiche Aggregationsformen im niedermolekularen Bereich detektieren ließen, konnten dagegen im gealterten A $\beta$ (1-42) keine Aggregationsformen auf dem Gel nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse beschreiben Klug und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen zum zeit- und pH-Wert-abhängigen Aggregationsverhalten von A $\beta$ (1-40) (*Klug et al., 2003*). Die Aggregationsformen, die sich durch die Präinkubation im gealterten A $\beta$ (1-42) gebildet haben, scheinen ein so hohes Molekulargewicht zu besitzen, dass keine Auftrennung innerhalb der Laufstrecke des Trenngels erfolgt. Die entstandenen Fibrillen bleiben im Sammelgel zurück. Diese Vermutung bestätigen die Ergebnisse des Thioflavin T-Assays. Vor Inkubationsbeginn mit den Zellen wurde im gealterten A $\beta$ (1-42) ein deutlich höherer Fibrillengehalt als im frischen A $\beta$ (1-42) bestimmt. Doch die Zusammensetzung des frischen A $\beta$ (1-42) ist nicht konstant. Während der Exposition mit den Zellen bei 37 °C wird im frischen A $\beta$ (1-42) die Bildung von Fibrillen in ähnlicher Weise gefördert, wie es beim Altern des Peptides erfolgt. Die erhöhte Fluoreszenz im frischen A $\beta$ (1-42) nach 24-stündiger Inkubation mit den SN56.B5.G4-Zellen spiegelt den Anstieg des Fibrillengehaltes wieder. Dieser erreicht aber nicht

den Gehalt des präinkubierten gealterten A $\beta$ (1-42). Eine Ausdehnung der Inkubationszeit wird vermutlich den Gehalt an hochmolekularen Aggregaten im frischen A $\beta$ (1-42) weiter erhöhen bis der Fibrillengehalt dem des gealterten A $\beta$ (1-42) entspricht.

Neben der Zusammensetzung unterscheiden sich frisches und gealtertes A $\beta$ (1-42) auch in ihrer Toxizität auf cholinerge Neuronen. Inkubation mit frischem A $\beta$ (1-42) verursachte in differenzierten SN56.B5.G4-Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Neurotoxizität. Gealtertes A $\beta$ (1-42) zeigte dagegen keine neurotoxischen Effekte. Während der Inkubation mit 10  $\mu$ M gealtertem A $\beta$ (1-42) wurde sogar ein Anstieg der Zellviabilität beobachtet. Diese Zunahme könnte auf die neurotrophen Eigenschaften des Peptids zurückzuführen sein. In geringen Konzentrationen kann A $\beta$ (1-42) auch als neurotrophischer Faktor fungieren (*Whitson et al., 1989; Yankner et al., 1990*). Die neurotrophen Eigenschaften sind vorwiegend bei oligomeren A $\beta$ (1-42), nicht bei A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (25-35) oder fibrillären Formen, zu beobachten (*Lopez-Toledano und Shelanski, 2004*).

Die größte Toxizität des frischen A $\beta$ (1-42) wurde während der ersten 24 h beobachtet, wo auch der Gehalt an niedermolekularen Aggregationsformen am größten ist. Die Ausdehnung der Inkubationszeit auf 72 h verminderte die Zellviabilität nur noch marginal. Die A $\beta$ (1-42)-vermittelte Toxizität scheint vom Aggregationszustand des Peptids abhängig zu sein. Die niedermolekularen Formen von A $\beta$ (1-42), nicht die unlöslichen Fibrillen, sind in diesem Zellmodell die eigentlichen neurotoxischen Spezies, welche die cholinerge Degeneration verursachen. Ähnliches konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (*Howlett et al., 1995; Dahlgren et al., 2002; Petkova et al., 2005; Deshpande et al., 2006*). Dies entspricht neueren Befunden, wonach vor allem die präfibrillären A $\beta$ (1-42)-Aggregate, wie Monomere, Oligomere und Protofibrillen, für die synaptische Dysfunktion im Alzheimer-Hirn verantwortlich gemacht werden (siehe 1.3) (*Hardy und Selkoe, 2002; Selkoe et al., 2002; Klein, 2006*). In zahlreichen Zell- und Tiermodellen wurde gezeigt, dass präfibrilläre A $\beta$ (1-42)-Formen Neurotoxizität induzieren, elektrophysiologische Veränderungen und Störungen der kognitiven Fähigkeiten hervorrufen (*Hartley et al., 1999; Walsh et al., 1999; Walsh et al., 2002a; Kaye et al., 2003; Cleary et al., 2005; Lesne et al., 2006*). Die Ablagerung der toxischen niedermolekularen A $\beta$ -Formen in Plaques könnte eine Art Schutzfunktion des Organismus darstellen (*Lansbury, 1999*).

Dennoch, die Beteiligung des fibrillären A $\beta$  an der cholinergen Neurodegeneration ist nicht auszuschließen, denn in verschiedenen früheren Zellkulturstudien wurde die zytotoxische Wirkung von fibrillärem A $\beta$ (1-42) belegt (*Pike et al., 1991; Lorenzo und Yankner, 1994*).

Welche Rolle die verschiedenen Aggregationsformen des Peptids an der A $\beta$ -vermittelten Toxizität besitzen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Neurotoxizitätsuntersuchungen mit einer einzelnen individuellen A $\beta$ -Aggregationsform sind schwierig, da die verschiedenen Formen im Gleichgewicht miteinander stehen (*Walsh et al., 1999*). Weiterhin beeinflussen verschiedene Faktoren, wie pH-Wert, Metallionen (Cu<sup>2+</sup>; Fe<sup>2+</sup>; Zn<sup>2+</sup>) sowie die verwendeten unterschiedlichen Lösungsmittel, den Aggregationsprozess (*Barrow und Zagorski, 1991; Mantyh et al., 1993; Bush et al., 1994; Atwood et al., 1998; Klug et al., 2003*), so dass in Toxizitätsstudien mit A $\beta$  eine große Heterogenität in der Zusammensetzung der Peptidaggregate existiert. Die Aggregationsform des Peptids scheint also eine entscheidende Rolle bei Morbus Alzheimer zu spielen. Die niedermolekularen Formen, wie sie im frischen A $\beta$ (1-42) zu finden sind, gewinnen neben den unlöslichen Fibrillen zunehmende Bedeutung an der Pathogenese der Demenzerkrankung.

#### **4.3 Vergleich der Toxizität niedermolekularer A $\beta$ (1-42)-Aggregationsformen mit toxischen Effekten durch oxidativen Stress**

Die Mechanismen, die die Toxizität der niedermolekularen A $\beta$ -Formen auf cholinerge Neuronen vermitteln, sind größtenteils unbekannt. Einige Arbeitsgruppen machen das oxidative Potenzial des Peptids für dessen Neurotoxizität verantwortlich (siehe Kapitel 1.4; *Butterfield et al., 2002c; Veurink et al., 2003; Canevari et al., 2004*). Anhand des DCF-Assays konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass auch niedermolekulare Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) zu einer intrazellulären Bildung von ROS in SN56.B5.G4-Zellen führen und somit oxidativen Stress in cholinergen Neuronen induzieren können.

Inwieweit sich die Toxizität des niedermolekularen A $\beta$ (1-42) von der direkten Wirkung von oxidativem Stress abgrenzen lässt, sollte hier mit Hilfe der vergleichenden Genexpressionsanalyse untersucht werden. Als Agens zur Induktion von oxidativem Stress wurde Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ausgewählt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist membranpermeabel. Im Vergleich zu anderen ROS besitzt das Molekül eine geringe Reaktivität. In Ge-

genwart von Metallionen, wie z.B.  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$ , kann es in einer Haber-Weiss- oder Fenton-Reaktion zu hochreaktiven Hydroxylradikalen weiterreagieren (siehe Abb.4; *Halliwell und Gutteridge, 1990; Liochev, 1999; Kehrer, 2000*). Diese Eigenschaften verleihen  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Fähigkeit, indirekt die Integrität verschiedener Moleküle innerhalb der Zelle zu beeinflussen. Neben der Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA können die aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildeten Hydroxylradikale auch direkt in die Signaltransduktion der Zelle eingreifen (*Halliwell und Gutteridge, 1990; Cochrane, 1991; Kehrer, 2000*).  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann auch die Aktivität der AChE beeinflussen (*Molochkina et al., 2005*).

Andere Microarray-Studien verwenden ebenfalls  $\text{H}_2\text{O}_2$  als ROS, um den Einfluss von oxidativem Stress an verschiedenen Zellkulturmodellen zu untersuchen (*Chun et al., 2001; Weigel et al., 2002; Yoo et al., 2003; Nair et al., 2004; Wang et al., 2006*).

Als Äquivalentkonzentration wurde für  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Voruntersuchungen 250  $\mu\text{M}$  ermittelt. 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinflussen nach 24-stündiger Inkubation die Viabilität differenzierter SN56.B5.G4-Zellen in ähnlicher Weise wie 50  $\mu\text{M}$  frisches  $\text{A}\beta(1-42)$ . Darüber hinaus induzierten 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine vergleichbare ROS-Bildung und Apoptose zu  $\text{A}\beta(1-42)$ .

Trotz ähnlicher Neurotoxizität führte die 24-stündige Exposition mit 50  $\mu\text{M}$  frischem  $\text{A}\beta(1-42)$  zu einem anderen Genexpressionsmuster als die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nur eine geringe Anzahl an Genen zeigte durch beide Behandlungen ähnliche Expressionsveränderungen. Signalwege, die während der Neurodegeneration durch  $\text{A}\beta(1-42)$  aktiviert werden, scheinen sich von Signalwegen durch unspezifischen oxidativen Stress zu unterscheiden. Vermutlich ist das oxidative Potenzial des Peptids nicht die einzige Ursache für dessen Neurotoxizität. In verschiedenen Publikationen werden alternative Wirkungsmechanismen von  $\text{A}\beta(1-42)$  diskutiert. Einige Autoren berichten von möglichen rezeptorvermittelten Wirkungen des Peptids. Für  $\text{A}\beta$  konnte die Interaktion mit zahlreichen Membranproteinen gezeigt werden (*Verdier et al., 2004*). Es wird berichtet, dass nicht-fibrilläres  $\text{A}\beta(1-40)$  und  $\text{A}\beta(1-42)$  Bindungsaffinität zum Insulinrezeptor besitzen (*Xie et al., 2002*) und direkt in die Signalweiterleitung des Rezeptors eingreifen, indem die Autophosphorylierung gehemmt wird (*Ling et al., 2002*). Dies könnte Störungen des cerebralen Glukosemetabolismus im Alzheimer-Patienten erklären (*Hoyer, 2004; Schubert, 2005*). Weiterhin wurden für nicht-fibrilläres und fibrilläres  $\text{A}\beta$  agonistische und antagonistische Bindungseigenschaften zum nikotinergeren Acetylcholinrezeptor, Subtyp alpha7 ( $\alpha 7\text{nAChR}$ ) gezeigt (*Wang et*

*al.*, 2000a, Wang *et al.*, 2000b; Dineley *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Über die Expression von Insulinrezeptoren in SN56.B5.G4-Zellen ist bisher nichts bekannt. Ein anderer Rezeptor, der fibrilläres und nicht-fibrilläres A $\beta$  spezifisch bindet, ist der p75 Neurotrophinrezeptor (p75<sup>NTR</sup>) (Coulson, 2006). p75<sup>NTR</sup> wird verstärkt in cholinergen Neuronen des Gehirns exprimiert und reguliert das Überleben und Absterben von Nervenzellen (Schor, 2005; Lu *et al.*, 2005). Die Bindung von A $\beta$  an den Rezeptor führt zur Aktivierung verschiedener Signalmoleküle unter anderem der MAPK JNK und p38 (Costantini *et al.*, 2005a). Bei der Toxizität von A $\beta$ -Oligomeren wird dem p75<sup>NTR</sup> eine protektive Funktion zugeschrieben (Costantini *et al.*, 2005b). SN56.B5.G4-Zellen exprimieren p75<sup>NTR</sup> (Berse *et al.*, 1999; Szutowicz, 2001; Madziar *et al.*, 2003; Szutowicz *et al.*, 2006), so dass eine Beteiligung des Rezeptors an der A $\beta$ (1-42)-induzierten Toxizität in diesem Zellmodell möglich ist. Weitere Beispiele für Membranproteine, die als Bindungspartner von A $\beta$  fungieren können, sind Integrin, Receptor for Advanced Glycosylation End Products (RAGE), Formyl peptide receptor-like 1, N-methyl-D-aspartate receptor, scavenger receptor und auch APP (Verdier *et al.*, 2004).

Neben Proteinen kann A $\beta$ (1-42) auch mit Lipiden interagieren. Das Peptid beeinflusst die Fluidität von Bilayer-Membranen (Mason *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2000), setzt Cholesterol, Phospholipide und Monosialoganglioside aus der Zellmembranen frei (Michikawa *et al.*, 2001) und kann sich selbst in die Membran einlagern (Arispe und Doh, 2003; Lin *et al.*, 2001; Kourie *et al.*, 2001; Kagan *et al.*, 2002). Die Integration von Oligomeren in die Membran erfolgt in Form von Poren oder Kanälen, was zu Störungen im Ionenhaushalt, im osmotischen Gleichgewicht und schließlich zum Absterben des Neurons führt (Quist *et al.*, 2005). Plasmaproteine, wie Apolipoproteine, HDL und VHDL, sind weitere Targets für A $\beta$  (Koudinov *et al.*, 1998). Diese Effekte können ebenfalls bei der Toxizität von A $\beta$ (1-42) in cholinergen SN56.B5.G4-Zellen eine Rolle spielen.

Die vielfältigen diskutierten Wirkungen von A $\beta$  besitzen so große Komplexität, dass ein einziger Wirkungsmechanismus zur Aufklärung der Ursache für die Neurotoxizität des Peptids unwahrscheinlich ist. Neben der Induktion von oxidativem Stress kann die Toxizität von A $\beta$  durch zahlreiche andere Effekte verursacht werden, die ein Absterben der Nervenzellen bewirken können.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Vorgänge, die in einem Zellmodell simuliert werden, niemals die komplexen Reaktio-

nen eines menschlichen Organismus wiedergeben können. Die beiden Behandlungen erfolgen mit Modellsubstanzen, deren pathologische Funktion bei der Alzheimer-Erkrankung zwar nachgewiesen ist, die aber nicht als einzige Pathogene im Krankheitsgeschehen fungieren. Neben A $\beta$ (1-42) sind auch andere Spaltprodukte von APP wie A $\beta$ (1-40) an der Plaquebildung und Neurotoxizität bei Morbus Alzheimer beteiligt. Oxidativer Stress wird neben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch durch andere ROS unter anderem O<sub>3</sub>, O<sub>2</sub><sup>•</sup>, NO<sup>•</sup> oder Metallionen vermittelt.

Weiterhin beschränkt sich die Microarray-Analyse nur auf einen einzelnen Zeitpunkt. Beide Behandlungen könnten trotz gleicher Zellantwort einen unterschiedlichen Zeitverlauf in der Abfolge der Genexpressionsveränderungen aufweisen. Gene, die zu einer definierten Zeit nach Behandlung mit einem Agens keine veränderte Expression zeigen, sind deshalb nicht generell von einer Beteiligung an der Zellantwort auszuschließen. Möglicherweise werden diese nur zu einem anderen Zeitpunkt auf- bzw. abreguliert. Eine umfangreiche Zeitverlaufsanalyse würde Aufschluss über sämtliche involvierte Gene sowie Signalkaskaden liefern, die in einer Zelle nach Einwirkung von oxidativem Stress bzw. A $\beta$ (1-42) veränderte Expression besitzen, und so einen vollständigen Vergleich beider Noxen zulassen.

Dennoch, Microarray-Analysen eines Einzelzeitpunktes machen die Identifikation zahlreicher Gene möglich, die durch Einfluss eines Agens oder Umweltfaktors in einer Zelle bzw. einem Organismus verändert werden. Anhand dieser regulierten Gene lassen sich mögliche involvierte Mechanismen ableiten, welche bei pathologischen Prozessen wie der A $\beta$ -induzierten Neurodegeneration im Alzheimer-Hirn von Bedeutung sein könnten.

#### **4.3.1 Beteiligung allgemeiner Stress-Signalwege an der Toxizität niedermolekularer A $\beta$ (1-42)-Aggregationsformen**

Erwartungsgemäß wurden durch die A $\beta$ (1-42)-Behandlung zahlreiche Gene verändert, die an Stress- und Apoptosevorgängen beteiligt sind. Auch auf Proteinebene konnten Veränderungen detektiert werden, welche im Zusammenhang mit der zellulären Stressabwehr stehen.

MAPK-Signalkaskaden besitzen eine zentrale Funktion in der Zellantwort auf extrazelluläre Stimuli, wie Zytokine, DNA-Schädigung, Hitze, radioaktive Strahlung oder Stress (*Chang und Karin, 2001; Kyriakis und Avruch, 2001; Johnson und Lapadat,*

2002). Die MAPK-Signalwege üben duale Wirkungen aus, da sie einerseits das Überleben und andererseits das Absterben einer Zelle regulieren können. In der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung scheinen MAPK-Signalkaskaden eine wichtige Rolle zu spielen (*Zhu et al., 2001b; Zhu et al., 2002; Dalrymple, 2002; Haddad, 2004; Ferrer et al., 2005*). Zahlreiche Publikationen zeigen die Aktivierung der ERK-, JNK- und p38-Signalkaskaden im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Aktivierte ERK ist beispielsweise verstärkt in Neuronen mit Tau-Ablagerungen nachweisbar (*Perry et al., 1999; Ferrer et al., 2001*). In A $\beta$ -behandelten Hirnschnittkulturen und transgenen Tg2576-Mäusen wurde die Aktivierung von ERK- und dem zugehörigen Transkriptionsfaktor CREB detektiert (*Dineley et al., 2001; Bell et al., 2004*). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass in hippocampalen-Hirnschnittkulturen die Neurotoxizität von A $\beta$ (1-42)-Oligomeren mit einer ERK-Aktivierung verbunden ist (*Chong et al., 2006*).

Auch in dieser Studie aktiviert die Behandlung der differenzierten SN56.B5.G4-Zellen mit niedermolekularem A $\beta$ (1-42) das ERK-Protein, was die Rolle der MAPK bei der Alzheimer-Pathologie unterstützt. Eine Inhibition von ERK und der nachgeschalteten Signalkaskade mit PD98059 hat jedoch keinen Einfluss auf die Viabilität der A $\beta$ (1-42)-exponierten SN56.B5.G4-Zellen. ERK ist im cholinergen Zellmodell an der Antwort auf A $\beta$ (1-42) beteiligt, was die Western-Blot-Analyse zeigt. Zur Vermittlung der Neurotoxizität ist die Funktion der Proteinkinase aber nicht essentiell. Die A $\beta$ (1-42)-induzierte Neurotoxizität scheint über weitere Signalmoleküle bzw. -wege vermittelt zu werden oder die fehlende Funktion der ERK-Kaskade wird durch andere Signalwege ersetzt. Eine ungenügende Spezifität von PD98059 ist auszuschließen, da in umfangreichen Tests die hohe Affinität und Selektivität des Inhibitors nachgewiesen werden konnte (*Davies et al., 2000*). In einer anderen Studie mit undifferenzierten SN56.B5.G4-Zellen konnte nach Behandlung mit A $\beta$ (1-40) keine ERK-Aktivierung festgestellt werden (*Guerra et al., 2004*).

Die Beteiligung der JNK-Kaskade an der Alzheimer-Pathogenese ist ebenfalls in zahlreichen Publikationen belegt (*Zhu et al., 2002; Okazawa und Estus, 2002*). Im Alzheimer-Hirn wird nicht nur über eine Aktivierung, sondern auch über eine Umverteilung der JNK vom Zellkern ins Zytoplasma und eine Kolo-kalisation mit neurofibrillären Veränderungen berichtet (*Zhu et al., 2001a*). In doppelt-transgenen Mäusen mit APP- und PS1-Mutation ist eine JNK-Aktivierung in der Nähe der Plaques in Neuriten mit hyperphosphoryliertem Tau zu finden (*Savage et al., 2002*). Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass die Behandlung von neuronalen Zellen mit A $\beta$  eine JNK-

Phosphorylierung induziert (*Troy et al., 2001; Morishima et al., 2001; Boyzyczko-Coyne et al., 2001*). JNK wiederum kann auch das Tau-Protein phosphorylieren (*Reynolds et al., 1997a, b*).

Der Transkriptionsfaktor c-jun - als JNK-Target - ist auch in den neurodegenerativen Prozessen der Alzheimer-Erkrankung involviert. Es wird berichtet, dass die A $\beta$ -induzierte Apoptose von einer c-jun-Aktivierung begleitet wird (*Anderson et al., 1995; Estus et al., 1997; Kihiko et al., 1999*). Degenerierende Neuronen im Alzheimer-Hirn sind ebenfalls mit der phosphorylierten Form von c-jun assoziiert (*Zhu et al., 2001*). Microarray-Studien von A $\beta$ (1-40)-behandelten corticalen Neuronen (*Cavallaro et al., 2004*) und A $\beta$ (25-35)-injizierten Mäusen (*Kong et al., 2005*) detektierten eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors.

Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Aufregulation des Jun-oncogene (c-jun) sowie die Aktivierung des c-jun-Proteins unterstützen die Rolle der JNK-Signalkaskade bei der A $\beta$ -induzierten Neurotoxizität. Die Aktivierung der JNK auf Proteinebene konnte leider nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zum einen detektierte der verwendete Antikörper nur schwache Proteinbanden von phospho-JNK, was zu einer großen Standardabweichung in der quantitativen densitometrischen Auswertung führte. Zum anderen könnte die JNK-Aktivierung vor dem gewählten Untersuchungszeitpunkt von 2 h erfolgen, da hier bereits die Phosphorylierung von c-jun beobachtet werden konnte. Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung des JNK-Signalweges ist die Aufregulation der dual specificity phosphatase (Dusp16, auch als MPK7 bekannt), die in der Microarray-Analyse gefunden wurde. Dusp16 sorgt als negativer Regulator für die Inaktivierung der JNK durch Dephosphorylierung (*Masuda et al., 2001*).

Hemmung der JNK-Signalkaskade mit SP600125 hatte keinen Einfluss auf die A $\beta$ (1-42)-induzierte Neurotoxizität im vorliegenden Zellmodell. Dies könnte auf die Beteiligung verschiedener Signalwege an der Antwort der cholinergen Zellen auf A $\beta$ (1-42) hindeuten.

Eine erhöhte Expression und Aktivierung von p38 ist mit Amyloid-Plaques und NFT im Alzheimer-Hirn und APP-transgenen Mäusen assoziiert (*Hensley et al., 1999; Zhu et al., 2000; Atzori et al., 2001; Puig et al., 2004*). Dabei zeigt phospho-p38 ein identisches Verteilungsmuster wie phospho-JNK (*Zhu et al., 2000*). Die Rolle von p38 bei der A $\beta$ -induzierten Zytotoxizität wird kontrovers diskutiert. Daniels und Mitarbeiter berichten beispielsweise über eine p38-Aktivierung in N2a-Neuroblastom-Zellen (*Da-*

*niels et al., 2001*), die Arbeitsgruppe von Wei findet dagegen in SH-SY5Y-Neuroblastom-Zellen keinen Effekt nach A $\beta$ -Behandlung (*Wei et al., 2002*).

Die Ergebnisse im vorliegenden Zellmodell sind ebenfalls kontrovers. Einerseits ist zu den ausgewählten Untersuchungszeitpunkten nach A $\beta$ -Behandlung keine veränderte Proteinexpression von p38 und phospho-p38 messbar, was auf eine fehlende Beteiligung der Signalkaskade an der Zellantwort hindeutet. Die Coinkubation mit 50  $\mu$ M PD169316 - einem p38-Inhibitor - führt aber andererseits zu einer signifikanten Erhöhung der Zellviabilität. Die protektiven Effekte, die durch p38-Hemmung beobachtet werden, demonstrieren dagegen eine Beteiligung der p38-Kaskade an der A $\beta$ -vermittelten Neurotoxizität.

Die fehlende Aktivierung im Western-Blot könnte damit zu erklären sein, dass die p38-Phosphorylierung außerhalb der gewählten Untersuchungszeitpunkte erfolgt. Eine andere Erklärung wäre, die ungenügende Spezifität von PD169316 in höheren Konzentrationen hemmt weitere Signalwege, die ein Überleben der Zellen zur Folge haben könnten. Weitere Untersuchungen zur Spezifität des p38-Inhibitors sowie die Auswahl zusätzlicher Zeitpunkte für die Proteinanalyse könnten Klarheit über die Beteiligung von p38 an der Neurotoxizität durch niedermolekulare A $\beta$ -Aggregate schaffen. Eine spezifische MAPK-Hemmung mit zytoprotektiven Effekten sind auf jeden Fall interessante Therapieoptionen zur Verhinderung der cholinergen Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer.

Neben den MAPK soll an dieser Stelle kurz eine weitere Molekülfamilie erwähnt werden, die eine veränderte Genexpression durch frisches A $\beta$ (1-42) zeigt und im Zusammenhang mit Stress- und Apoptoseprozessen in der Zelle steht. Die Bcl-2-Familie, die sich aus pro- (z.B. Bax, Bad, Bim, Bmf) und anti-apoptotischen (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w) Proteinen zusammensetzt, stellt wichtige Regulatoren im Überleben oder Sterben einer Zelle dar (*Cory et al., 2002; Andersen et al., 2005; Zirkel et al., 2006*). Die Beteiligung verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie an der Alzheimer-Pathogenese ist in zahlreichen Publikationen belegt (*Forloni et al., 1993; Paradis et al., 1996; Tamagno et al., 2003; Yao et al., 2005*). In der durchgeführten Genexpressionsuntersuchung wurde eine Abregulation des anti-apoptotischen Bcl-2-l2-Gens (Bcl-w) (*Zhu et al., 2004*) und eine Aufregulation des pro-apoptotischen Bcl-2-modifying factors (Bmf) nach Behandlung der cholinergen SN56.B5.G4-Zellen mit niedermolekularem A $\beta$ (1-42) detektiert. Die veränderte Expression der beiden Vertre-

ter der Bcl-2-Familie fördert apoptotische Prozesse in den Zellen, die zusätzlich zur cholinergen Neurodegeneration beitragen könnten.

Die Untersuchungen zeigen, dass in cholinergen Neuronen niedermolekulare A $\beta$ (1-42)-Aggregate bekannte Apoptose- und Stress-Signalmoleküle bzw. -wege beeinflussen. Einerseits werden protektive Mechanismen aktiviert, um die Zelle vor Schädigungen zu bewahren. Andererseits wird in den Zellen programmierter Zelltod eingeleitet, was zum Absterben des cholinergen Neurons führt.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse mit anderen Studien an Alzheimer-Patienten oder alzheimer-ähnlichen Tier- und Zellmodellen beweist die Relevanz des verwendeten Modells und erlaubt Ableitungen auf die cholinerge Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer.

#### **4.3.2 Niedermolekulares A $\beta$ (1-42) erhöht Stress im Endoplasmatischen Retikulum**

Interessanterweise besitzen zahlreiche Gene, deren Expression durch die Behandlung mit niedermolekularem A $\beta$ (1-42) verändert wurde, biologische Funktionen in der post-translationalen Modifikation (z.B. Faltung oder Glykosylierung) sowie im Abbau von Proteinen. Viele dieser Gene bzw. deren Proteinprodukte weisen eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und/oder im Golgiapparat auf (Abb.15; Tab.5, 6, 7). Der überwiegende Teil der veränderten Gene zeigt eine Abregulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) eine Rolle in verschiedenen neurologischen Erkrankungen spielt (*Imai-zumi et al., 2001; Katayama et al., 2004; Lindholm et al., 2006, Unterberger et al., 2006*). Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist eine Zellorganelle, in der die post-translationalen Modifikation von Proteinen erfolgt. Nach Synthese am Ribosom werden die nativen Proteine im ER gefaltet, glykosyliert oder über intramolekulare Disulfidbindungen verknüpft. Fehlerhaft gefaltete Proteine werden erneuten Faltungsprozessen unterzogen oder zum Abbau ins Proteasom entlassen. Proteine mit korrekter Faltung werden zum Golgiapparat transportiert. Außerdem ist das ER Syntheseort für Cholesterol und Lipide sowie Speicher für intrazelluläres Calcium. Beeinträchtigungen der ER-Funktion, z.B. durch vermehrte Akkumulation ungefalteter Proteine oder

Calcium-Homeostase-Störungen, können Stress im ER hervorrufen. Die Antwort des ERs auf eine verstärkte Anreicherung ungefalteter Proteine wird als unfolded protein response (UPR) bezeichnet. Die UPR beinhaltet adaptive Mechanismen, die zum einen die Synthese neuer Proteine ab- und zum anderen die Faltungsmaschinerie des ERs und Abbauprozesse aufregulieren, um das ER von der Last ungefalteter Proteine zu befreien (*Xu et al., 2005; Schroder und Kaufman, 2006*). Zur Proteinfaltungsmaschinerie des ERs gehören Foldasen (Faltungsenzyme, wie z.B. *cis trans* Peptidylprolylisomerasen), Chaperone (Proteine, die die Faltung anderer Proteine erleichtern wie z.B. BiP, GRP78) und Lectine (z.B. Calnexin, Calreticulin). Die Signalweiterleitung der UPR wird über die drei bisher bekannten Wege vermittelt: IRE1; ATF6 und PERK/ATF4. Diese führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie ATF4, ATF6 oder auch c-jun und NFκB, welche die Antwort der Zelle auf ER-Stress einleiten. Kann das Gleichgewicht im ER nicht mehr hergestellt werden, erfolgt eine ER-spezifische Apoptose. Diese wird unter anderem durch Beteiligung zweier im ER lokalisierter Caspasen - Caspase 4 und Caspase 12 - realisiert (*Nakagawa et al., 2000; Morishima et al., 2002; Hitomi et al., 2004*).

Ergebnisse neuerer Untersuchungen deuten auf die Beteiligung von ER-Stress bei der Alzheimer-Pathogenese hin (*Imaizumi et al., 2001; Katayama et al., 2004; Lindholm et al., 2006*). Es wurde beschrieben, dass Zellen der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH mit einer PS1-Mutation, die eine veränderte APP-Proteolyse und erhöhte Aβ(1-42)-Produktion induziert, höhere Vulnerabilität gegenüber ER-Stress besitzen (*Katayama et al., 1999*). Corticale Neuronen zeigten nach Aβ(1-40)-Behandlung eine erhöhte Proteinexpression von GRP78 und reduzierte Procaspase-12-Aktivität (*Ferreiro et al., 2006*). Caspase-12-defiziente Mäuse erwiesen sich gegenüber Aβ-induzierter Neurotoxizität als resistent (*Nakagawa et al., 2000; Morishima et al., 2002*). Auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind Marker für ER-Stress nachweisbar. Hamos` und Hoozemans Gruppen bewiesen die Aktivierung der UPR im Alzheimer-Hirn anhand einer erhöhten BiP und GRP78-Expression sowie einer gesteigerten Phosphorylierung von PERK - der zentralen Kinase des PERK/ATF4-Signalweges (*Hamos et al., 1991; Hoozemans et al., 2005*).

In der vorliegenden Expressionsuntersuchung zeigten FK506 binding protein 11 (Fkbp11) (*Breimann und Carmus, 2002*) und DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C member 3 (Dnajc3) - zwei Gene, die in der Faltung Protein involviert sind - eine Abregulation durch Aβ(1-42). Dnajc3 (auch als P58IPK bekannt) ist direkt an der Zellant-

wort auf ER-Stress beteiligt, indem es die Aktivität von PERK hemmt (*Yan et al., 2002*). In murinen Embryofibroblasten und HEK-293-Zellen wurde nach Induktion von ER-Stress eine erhöhte Expression von Dnajc3 detektiert (*van Huizen et al., 2003*). Dnajc3-knock-out Mäuse sind durch eine vermehrte Apoptose in Pankreaszellen gekennzeichnet (*Ladiges et al., 2005*). Die beobachtete Abregulierung der Chaperone Fkbp11 und Dnajc3 könnte in den SN56.B5.G4-Zellen eine verstärkte Anreicherung von ungefalteten Proteinen verursachen und so UPR und ER-Stress induzieren.

Ero1-like beta (*S. cerevisiae*) (*Pagani et al., 2000; Mezghrani et al., 2001*), I $\alpha$ -associated invariant chain - die auch von aktivierten Mikrogliazellen im Alzheimer-Hirn exprimiert wird (*Matza et al., 2003; Yoshiyama et al., 2000*) - und procollagenproline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha II polypeptide (*Kivirikko und Myllyharju, 1998*) sind weitere Gene, die in der Proteinfaltung involviert sind und eine A $\beta$ (1-42)-induzierte Abregulation zeigen.

Störungen in der Proteinglykosylierung könnten zusätzlich zur Aktivierung der UPR in den SN56.B5.G4-Zellen führen. Defender against cell death (Dad1), eine integrales ER-Membranprotein, ist für N-Glykosylierungen von Proteinen verantwortlich (*Kelleher und Gilmore, 1997; Makishima et al., 1997*). Homozygote Dad1-knock-out Mäuse sterben bereits in utero durch verstärkte Apoptose (*Nishii et al., 1999*), was die anti-apoptotische Funktion von Dad1 beweist. Die in der Genexpressionsstudie detektierte Abregulation von Dad1 könnte zusätzlich den Tod der cholinergen Zellen fördern. In einer Microarray-Analyse mit humanen Hirnperizyten, die mit A $\beta$ (1-40) mit „Dutch“-Mutation behandelt worden waren, wurde dagegen Dad1 erhöht exprimiert. Auch im Alzheimer-Hirn in der Umgebung seniler Plaques wird Dad1 verstärkt exprimiert (*Rensink et al., 2004*). All das deutet auf eine wichtige Rolle von Dad1 bei der Alzheimer-Pathogenese hin, die genaue Funktion des Gens bzw. Proteins muss jedoch aufgeklärt werden.

Gene mit einer biologischen Funktion im Abbau von Proteinen sind ring finger protein 125 (*Jackson et al., 2000*), seven in absentia 2 (*Habelhah et al., 2002*) und RIKEN cDNA 3110006E14 gene (*NetAffxTM, <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>*).

Ero1-like beta (*Pagani et al., 2000*), Lectin, mannose-binding 2 (auch als VIP36 bezeichnet) (*Nyfelner et al., 2003*), Odd Oz/ten-m homolog 4 (*Drosophila*) (*Wang et al., 1998*) und stromal cell-derived factor 2-like 1 (*Fukuda et al., 2001*) sind UPR- und ER-Stress-induzierbare Gene.

Durch die A $\beta$ (1-42)-Behandlung wurde weiterhin die Expression des Calcium-bindenden Proteins stromal cell derived factor 4 (Cab45) (Scherer et al., 1996), signal recognition particle receptor, B subunit (Miller et al., 1995) und Syntaxin 5A (Stx5a) abreguliert - drei Gene, deren Proteine im ER und/oder Golgiapparat lokalisiert sind. Stx5a ist außerdem am intrazellulären vesikulären Transport beteiligt (Dasscher et al., 1994) und beeinflusst die APP-Prozessierung in neuronalen Zellen (Suga et al., 2005).

Der activating transcription factor 6 (ATF6) ist, wie bereits erwähnt, an der Antwort auf ER-Stress in Säugetierzellen beteiligt (Yoshida et al., 1998; Chen et al., 2002; Shen et al., 2002). Nach Aktivierung wandert ATF6 in den Golgiapparat. Dort erfolgt die Abspaltung der aktiven cytosolischen Domäne des Transkriptionsfaktors, die im Zellkern die entsprechenden Targetgene aktiviert. In SK-N-SH-Zellen mit einer Alzheimer-begünstigenden PS1-Mutation konnte eine Hemmung der ATF6-Aktivierung beobachtet werden (Katayama et al., 1999; Katayama et al., 2001). Die Abregulation von ATF6 durch die Behandlung der SN56.B5.G4-Zellen mit niedermolekularem A $\beta$ (1-42) könnte zur Abschwächung der UPR beitragen, was eine Erhöhung des ER-Stresses in den cholinergen Zellen zur Folge hätte.

In der durchgeführten Expressionsanalyse wurden nach A $\beta$ (1-42)-Behandlung viele veränderte Gene identifiziert, die eine direkte oder indirekte Beteiligung an UPR und ER-Stress in der Zelle aufwiesen. Einige der Gene stehen direkt mit pathologischen Prozessen des Morbus Alzheimer in Verbindung. Diese Gene zeigten vorwiegend eine Abregulation. Andere Microarray-Studien von Alzheimer-betroffenen Hirngeweben beschreiben ebenfalls eine gehäufte Abregulierung von Genen mit Funktionen in Proteinfaltung und -abbau (Loring et al., 2001; Blalock et al., 2003).

Die Ergebnisse lassen die Hypothese ableiten, dass die Behandlung der cholinergen Neuronen mit niedermolekularem A $\beta$ (1-42) zur Abregulation der UPR führt. Die Folge ist eine Störung der zellulären Abwehrmechanismen gegen die verstärkte Akkumulation ungefalteter Proteine, erhöhter Stress im ER entsteht. Der A $\beta$ (1-42)-induzierte ER-Stress könnte neurodegenerative Prozesse stimulieren und zum Absterben des Neurons beitragen.

### 4.3.3 A $\beta$ (1-42)-induzierte Expressionsveränderungen in Verbindung mit der Alzheimer-Pathogenese

Zuletzt werden einige Gene betrachtet, die durch frisches A $\beta$ (1-42) beeinflusst werden und im direkten Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung stehen.

Der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT), welcher für die Anreicherung und Speicherung von Acetylcholin in synaptischen Vesikeln verantwortlich ist, stellt eine wichtige Komponente der cholinergen Neurotransmission dar. Störungen des cholinergen Systems, wie sie bei Morbus Alzheimer auftreten, können auch den VACHT betreffen (*Kish et al., 1990; Ruberg et al., 1990; Wong et al., 1999; Klingner et al., 2003; Hu et al., 2003*). Dabei sind kontroverse Ergebnisse in der Literatur zu finden. Kish und Mitarbeiter beobachteten eine unveränderte VACHT-Expression im Alzheimer-Hirn (*Kish et al., 1990*). Andere Arbeitsgruppen berichten von einer erhöhten Expression des VACHT-Proteins im Alzheimer-Patienten (*Ruberg et al., 1990*) und in alzheimer-ähnlichen Tiermodellen (*Wong et al., 1999; Klingner et al., 2003; Hu et al., 2003*). In der durchgeführten Genexpressionsstudie konnte ebenfalls nach Behandlung der SN56.B5.G4-Zellen mit A $\beta$ (1-42) eine erhöhte Expression des VACHT-Gens (solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3; Slc18a3) detektiert werden. A $\beta$ (1-42) kann somit direkt die Expression von Genen des cholinergen Systems beeinflussen und möglicherweise Störungen in der cholinergen Neurotransmission verursachen.

Anomalitäten in der Metallionen-Homeostase sind, wie bereits erwähnt, Begleitscheinung der neurodegenerativen Erkrankung (*Bush, 2003; Maynard et al., 2005*). In Alzheimer-Gehirn sind beispielsweise erhöhte Zink-Konzentrationen nachweisbar (*Deibel et al., 1996; Danscher et al., 1997; Cornett et al., 1998*). Interessant ist, dass Zink die Aggregation von A $\beta$  beeinflussen kann (*Huang et al., 1997*) und so zur Pathogenese beitragen könnte. In der vorliegenden Microarray-Studie wurde eine veränderte Expression des Zink-Influxtransporters solute carrier family 39, member 14 (Slc39a14) (*Tominaga et al., 2005; Taylor et al., 2005*) durch A $\beta$ (1-42)-Einfluss detektiert. Das könnte ein Hinweis für die Ursache der erhöhten Zinkspiegel im Hirn von Alzheimer-Patienten sein.

Ein weiteres verändertes Gen ist das ubiquitär vorkommende Glykoprotein Clusterin (Apolipoprotein J). Zahlreiche Untersuchungen deuten auf eine direkte Verbindung

zwischen Clusterin und der Alzheimer-Erkrankung hin (*Calero et al., 2000; Trougkos und Gonos, 2002; Calero et al., 2005*). In vitro beeinflusst Clusterin die Fibrillenformation und Neurotoxizität von A $\beta$  (*Oda et al., 1995; Boggs et al., 1996; Matsubara et al., 1996*). In vivo vermittelt das Protein den Transport von löslichem A $\beta$  in Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit (*Ghiso et al., 1993; Zlokovic et al., 1996*) und ist in hoher Konzentration in der Umgebung von Plaques zu finden (*May et al., 1990; Calero et al., 2000*). In einer anderen Microarray-Analyse mit Alzheimer-Hirnen wurde ebenfalls über eine erhöhte Expression des Clusterin-Gens berichtet (*Walker et al., 2004*). Die gefundene Aufregulation nach Behandlung der cholinergen Zellen mit A $\beta$ (1-42) unterstützt die Hypothese, dass Clusterin eine wichtige Rolle bei der neurodegenerativen Erkrankung spielt.

Schlussendlich ist die erhöhte Expression des Purkinje cell protein 4 (Pcp4) ein Hinweis für die Beteiligung des neuronspezifischen Proteins bzw. dessen humanen Homologs (PEP-19) bei Morbus Alzheimer. PEP-19 hemmt unter anderem apoptotische Prozesse in PC12-Zellen (*Erhardt et al., 2000*). In anderen Microarray-Studien mit PS1-defizienten Mäusen (*Mirnics et al., 2003*) und Cerebelli von Alzheimer-Patienten (*Utal et al., 1998*) wurde dagegen eine Abregulation von PEP-19 gefunden.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Alle Gene und Proteine, die nach A $\beta$ (1-42)-Behandlung der cholinergen Zelllinie SN56.B5.G4 eine veränderte Expression aufweisen und indirekt oder direkt mit pathologischen Prozessen der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht werden können, beweisen die Anwendbarkeit des verwendeten Zellmodells in der Alzheimer-Forschung.

Darüber hinaus könnten die identifizierten Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren bei der cholinergen Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle spielen und mögliche Targets für die Entwicklung neuer Arzneistoffe darstellen.

Zur Überprüfung der Richtigkeit der hier diskutierten Hypothesen sind weitere in vivo Studien an alzheimer-ähnlichen Tiermodellen sowie an post mortem Hirngewebe von Alzheimer-Patienten nötig.

## 5 Zusammenfassung

Ein frühzeitig-auftretendes Merkmal der Alzheimer-Erkrankung ist die progressive Neurodegeneration des cholinergen Transmittersystems, die mit den kognitiven Defiziten der Patienten korreliert. Als mögliche Ursache für den Neuronenverlust wurde die verstärkte Akkumulation von fibrillären  $\beta$ -Amyloid-Peptiden ( $A\beta$ ) in so genannte senilen Plaques im Hirn diskutiert. Plaques treten jedoch erst in späteren Erkrankungsstadien auf, so dass eine geringe Korrelation zwischen cholinergem Degeneration und Plaquebildung besteht. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich verstärkt mit präfibrillären Aggregationsformen von  $A\beta$  und ihrer Beeinflussung der neuronalen Integrität.

In der vorliegenden Dissertation wurde zunächst der Einfluss zweier verschiedener Aggregationsformen von  $A\beta(1-42)$  - frisches  $A\beta(1-42)$  und gealtertes  $A\beta(1-42)$  - auf die Viabilität der Neuroblastom-Zelllinie SN56.B5.G4 untersucht. In den Voruntersuchungen wurde bestätigt, dass die Zelllinie cholinerge Marker exprimiert und als geeignetes Modell für cholinerge Neuronen verwendet werden kann. Frisches  $A\beta(1-42)$ , was vorwiegend aus niedermolekularen Aggregationsformen zusammengesetzt war, verursachte in den SN56.B5.G4-Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Zytotoxizität. Fibrillenreiches gealtertes  $A\beta(1-42)$  war dagegen untoxisch. Die neurotoxischen Effekte von  $A\beta(1-42)$  sind abhängig vom Aggregationszustand des Peptids.

Es konnte gezeigt werden, dass die niedermolekularen Aggregationsformen zur Apoptose in den cholinergen Zellen führen. Außerdem erfolgt eine Induktion von oxidativem Stress, da frisches  $A\beta(1-42)$  konzentrationsabhängig intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies in der Zelllinie bildet.

Inwieweit sich die Toxizität der niedermolekularen  $A\beta(1-42)$ -Aggregationsformen von der direkten Wirkung von oxidativem Stress auf cholinerge Neuronen unterscheidet, wurde in einer Genexpressionsstudie mit Hilfe der Microarray-Technologie untersucht. Die Analyse ergab, dass niedermolekulares  $A\beta(1-42)$  und oxidativer Stress zu einem unterschiedlichen Expressionsmuster führen. Das oxidative Potenzial des frischen  $A\beta(1-42)$  ist vermutlich nicht die einzige Ursache für dessen Toxizität.

$A\beta(1-42)$  verändert die Expression von Apoptose- und Stress-regulierenden Genen, wie MAPK- und Bcl-2-Gene. Das Peptid führt zur Abregulation von zahlreichen Genen, die im ER und/oder Golgiapparat lokalisiert sind oder Funktionen bei der Prote-

insynthese oder Proteinmodifikationen besitzen. Die Befunde lassen auf eine Abschwächung von Abwehrmechanismen gegen Stress des Endoplasmatischen Retikulums durch A $\beta$ (1-42) schließen. Die identifizierten Gene und Signalwege könnten auch bei der cholinergen Neurodegeneration im Alzheimer-Patienten eine Rolle spielen.

Weiterhin beeinflusst A $\beta$ (1-42) Gene, die im direkten Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathogenese stehen, so unter anderem Komponenten des cholinergen Systems (vesikulärer Acetylcholintransporter), des Lipid- (Apolipoprotein J) und des Zinkstoffwechsels (Zinktransporter). Anhand dieser Gene wird die Anwendbarkeit des Zellmodells zur Simulation pathologischer Prozesse von Morbus Alzheimer demonstriert.

Einige Änderungen konnten auf Genebene mit quantitativer real-time RT-PCR und auf Proteinebene mit Western-Blotting/Immunodetektion bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstützen die neueren Untersuchungen, in der die niedermolekularen Aggregationsformen von A $\beta$ (1-42) für die cholinerge Neurodegeneration verantwortlich gemacht werden. Die niedermolekularen Formen sind neurotoxisch, fördern Apoptose und (ER)Stress in den Zellen, was einen frühzeitigen Untergang der cholinergen Neuronenpopulation verursachen könnte, der schon weit vor der Anreicherung der A $\beta$ -Peptide in Plaques beobachtet werden kann.

## Summary

Cholinergic dysfunction is an early-onset feature of Alzheimer's disease (AD), which has been suggested to cause, at least partly, the cognitive deficits observed. The accumulation of fibrillar  $\beta$ -Amyloid-peptides ( $A\beta$ ) in senile plaques in the AD brain have been discussed to cause the specific degeneration of cholinergic cells. However, senile plaques are observed in later stages of AD, so a weak correlation between cholinergic degeneration and plaque formation exists. Recent studies provide evidence that also pre-aggregated forms of  $A\beta$  play a major role in mediating neurotoxicity.

Using the neuroblastoma cell line SN56.B5.G4, the effect of different  $A\beta(1-42)$  aggregates on cell viability was investigated. The cell line expresses typical cholinergic characteristics and thus should represent an appropriate model for cholinergic neurons. Fresh  $A\beta(1-42)$ , which contained predominantly low-molecular weight species, induced a concentration- and time-dependent toxicity in cholinergic cells. Aged  $A\beta(1-42)$ , which was rich in fibrils showed no toxic effect, indicating that the neurotoxic effect of  $A\beta(1-42)$  depends on the aggregation stage of the peptide.

It was shown that the low-molecular weight species induced apoptosis in cholinergic cells. Furthermore, fresh  $A\beta(1-42)$  generated oxidative stress by formation of reactive oxygen species in the cell line.

To determine whether the neurotoxicity of fresh  $A\beta(1-42)$  differed from toxicity caused by oxidative stress on cholinergic neurons, a gene expression analyses using microarray technology was performed. The data evaluation showed that  $A\beta(1-42)$  and oxidative stress resulted in a different gene expression pattern. The toxicity mediated by  $A\beta(1-42)$  is probably not only induced by its oxidative potential.

Many of the genes affected by  $A\beta(1-42)$  were involved in apoptosis- and stress regulating pathways (MAPK-, Bcl2-family members).

The peptide also down regulated many genes present in the endoplasmatic reticulum (ER), Golgi apparatus and/or otherwise involved in protein modification and degradation, indicating a potential role of ER-mediated stress in  $A\beta$ -mediated toxicity. The mechanisms identified could presumably play a role in the cholinergic degeneration in AD.

Moreover, a number of genes, which are known to be involved in AD were identified. A $\beta$ (1-42) changed the expression of cholinergic genes (vesicular acetylcholine transporter), of the lipid- (apolipoprotein J) and zinc- (zinc transporter) metabolism. These findings demonstrate the applicability of this cell culture model in AD research.

Most of the changes identified by microarray analysis were validated by quantitative real-time RT-PCR and the related proteins by Western-blotting/immunodetection.

This study supports recent findings of a major role of low-molecular weight A $\beta$ -species in mediating cholinergic neurodegeneration in AD. The low-molecular weight forms are neurotoxic, enhance apoptosis and (ER)stress in the cells, which may account in part for the early-onset cholinergic degeneration before abundant accumulation of plaque formation appears.

## 6 Literaturverzeichnis

Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*. Jan;36(1):84-6, 88, 90-1.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. May-Jun;21(3):383-421. Review.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. Nov 17;270(46):27489-94.

Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. (2006) Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet*. Jan;7(1):55-65. Review. Erratum in: *Nat Rev Genet*. May;7(5):406.

Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148

Andersen JK. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. Jul;10 Suppl:S18-25. Review.

Andersen MH, Becker JC, Straten P. (2005) Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. May;4(5):399-409. Review.

Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. (1995) Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta-induced apoptosis. *J Neurochem*. Oct;65(4):1487-98.

Arispe N, Doh M. (2002) Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A beta(1-40) and (1-42) peptides. *FASEB J*. Oct;16(12):1526-36.

Arendt T. (2002) Dysregulation of neuronal differentiation and cell cycle control in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*;(62):77-85. Review.

Arendt T. (2004) Neurodegeneration and plasticity. *Int J Dev Neurosci*. Nov;22(7):507-14. Review.

Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem*. May 22;273(21):12817-26.

Atzori C, Ghetti B, Piva R, Srinivasan AN, Zolo P, Delisle MB, Mirra SS, Migheli A. (2001) Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. Dec;60(12):1190-7.

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*. Oct;68(3):209-45. Review.

Avila J. (2006) Tau protein, the main component of paired helical filaments. *J Alzheimers Dis*;(9(3 Suppl)):171-5. Review.

Ballard C, Howard R. (2006) Neuroleptic drugs in dementia: benefits and harm. *Nat Rev Neurosci*. Jun;7(6):492-500. Review.

- Barbosa J Jr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA. (1999) Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem.* Nov;73(5):1881-93.
- Barbosa J Jr, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF. (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem.* Sep;82(5):1221-8.
- Barrow CJ, Zagorski MG. (1991) Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science.* Jul 12;253(5016):179-82.
- Bartus RT. (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* Jun;163(2):495-529. Review.
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E. (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* Dec 28;336(3):417-24.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.* 77:817-27.
- Behrens A, Sibilina M, Wagner EF. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet.* Mar;21(3):326-9.
- Bell KA, O'Riordan KJ, Sweatt JD, Dineley KT. (2004) MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time. *J Neurochem.* Oct;91(2):349-61.
- Benito-Gutierrez E, Garcia-Fernandez J, Comella JX. (2006) Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol Cell Neurosci.* Feb;31(2):179-92.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 20;98(24):13681-6.
- Berse B, Blusztajn JK. (1995) Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem.* Sep 22;270(38):22101-4.
- Berse B, Blusztajn JK. (1997) Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *FEBS Lett.* 1997 Jun 30;410(2-3):175-9.
- Berse B, Lopez-Coviella I, Blusztajn JK. (1999) Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression of the cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor. *Biochem J.* Sep 1;342 ( Pt 2):301-8.
- Bickel H. (2000) [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany] *Gesundheitswesen.* Apr;62(4):211-8. German.
- Bielarczyk H, Jankowska A, Madziar B, Matecki A, Michno A, Szutowicz A. (2003) Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid beta-peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem Int.* Mar;42(4):323-31.
- Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Bizon-Zygmanska D, Pawelczyk T, Szutowicz A. (2006) RS-alpha-lipoic acid protects cholinergic cells against sodium nitroprusside and amyloid-beta neurotoxicity through restoration of acetyl-CoA level. *J Neurochem.* Aug;98(4):1242-51.

- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL. (1995) Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem.* Feb;64(2):749-60.
- Bigl M, Bleyl AD, Zedlick D, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. (1996) Changes of activity and isozyme pattern of phosphofructokinase in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* Sep;67(3):1164-71.
- Bigl M, Bruckner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. (1999) Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 106(5-6):499-511.
- Bigl M, Beck M, Bleyl AD, Bigl V, Eschrich K. (2000) Altered phosphofructokinase mRNA levels but unchanged isoenzyme pattern in brains from patients with Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* Mar 29;76(2):411-4.
- Birks J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* Jan 25;(1):CD005593. Review.
- Bishop GM, Robinson SR. (2003) Human Abeta1-42 reduces iron-induced toxicity in rat cerebral cortex. *J Neurosci Res.* Aug 1;73(3):316-23.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. (2003) Amyloid beta - protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:330-335.
- Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. (2004) Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 17;101(7):2173-8.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet.* Jul 29;368(9533):387-403. Review.
- Blomberg J, Andersson M, Faldt R. (1987) Differential pattern of oncogene and beta-actin expression in leukaemic cells from AML patients. *Br J Haematol.* Jan;65(1):83-6.
- Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH. (1992) Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J Neurosci.* Mar;12(3):793-9.
- Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, May PC. (1996) Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem.* Sep;67(3):1324-7.
- Boissiere F, Faucheux B, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. (1997) Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* May;145(1):245-52.
- Bolstad BM, Collin F, Simpson KM, Irizarry RA, Speed TP. (2004) Experimental design and low-level analysis of microarray data. *Int Rev Neurobiol.*;60:25-58. Review.
- Boulay S. F., Sood V. K., Rayeq M. R., Cohen V. I., Zeeberg B. R. and Reba R. C. (1996) Autoradiographic evidence that 3-quinuclidinyl-4-fluorobenzilate (FQNB) displays in vivo selectivity for the m2-subtype. *Neuroimage* 3, 35–39.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain.* Sep;99(3):459-96.
- Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW. (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem.* May;77(3):849-63.
- Breiman A, Camus I. (2002) The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development. *Transgenic Res.* Aug;11(4):321-35. Review.

- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1;90(5):2092-6.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, d Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, (1994) Tanzi RE. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science*. Sep 2;265(5177):1464-7.
- Bush AI. Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer disease. (2003) *Alzheimer Dis Assoc Disord*. Jul-Sep;17(3):147-50. Review.
- Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. (1994) beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 29;200(2):710-5.
- Butterfield DA, Griffin S, Munch G, Pasinetti GM. (2002a) Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J Alzheimers Dis*. Jun;4(3):193-201. Review.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. (2002b) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*. 23:655-664.
- Butterfield DA. (2002c) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*. Dec;36(12):1307-13. Review.
- Butterfield DA, Boyd-Kimball D. (2004) Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol*. Oct;14(4):426-32. Review.
- Butterfield DA, Boyd-Kimball D. (2005) The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1703:149-156.
- Canevari L, Abramov AY, Duchen MR. (2004) Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res*. Mar;29(3):637-50. Review.
- Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. (2000) Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech*. Aug 15;50(4):305-15. Review.
- Calero M, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. (2005) Clusterin and Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*. 38:273-98. Review.
- Ganzoniero LM, Snider BJ. (2005) Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis: too much, too little or in the wrong place? *J Alzheimers Dis*. Nov;8(2):147-54; discussion 209-15. Review.
- Catalano SM, Dodson EC, Henze DA, Joyce JG, Krafft GA, Kinney GG. (2006) The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*.6;6(6):597-608. Review.
- Caulfield MP. (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*. Jun;58(3):319-79. Review.
- Cavallaro S, D'Agata V, Alessi E, Coffa S, Alkon DL, Manickam P, Ciotti MT, Possenti R, Bonini P, Marlier L, Calissano P. (2004) Gene expression profiles of apoptotic neurons. *Genomics*. Sep;84(3):485-96.
- Chang L, Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. Mar 1;410(6824):37-40. Review.
- Chen X, Shen J, Prywes R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* Apr 12;277(15):13045-52

- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI. (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron*. Jun;30(3):665-76.
- Choe SE, Boutros M, Michelson AM, Church GM, Halfon MS. (2005) Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips revealed by a wholly defined control dataset. *Genome Biol.*;6(2):R16.
- Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kaye R, Glabe CG, Tenner AJ. (2006) ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem*. Jul 21;281(29):20315-25.
- Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (2003) Self-assembly of Abeta(1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry*. Nov 11;42(44):12749-60.
- Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH. (2001) Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem*. Feb;76(4):1010-21.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*. Jan;8(1):79-84.
- Clementi F, Cabrini D, Gotti C, Sher E. (1986) Pharmacological characterization of cholinergic receptors in a human neuroblastoma cell line. *J Neurochem*. Jul;47(1):291-7.
- Cochrane CG. (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med.*;12(2):137-47. Review.
- Cole GM, Frautschy SA. (2006) Alzheimer's amyloid story finds its star. *Trends Mol Med*. Sep;12(9):395-6.]
- Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ, Appel SH. (1998) Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *J Neurochem*. May;70(5):1925-34.
- Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD. (1998) Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology*. Jun;19(3):339-45.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J. (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*. Aug 5;267(22):15721-8.
- Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. Sep;2(9):647-56. Review.
- Costantini C, Della-Bianca V, Formaggio E, Chiamulera C, Montresor A, Rossi F. (2005a) The expression of p75 neurotrophin receptor protects against the neurotoxicity of soluble oligomers of beta-amyloid. *Exp Cell Res*. Nov 15;311(1):126-34.
- Costantini C, Rossi F, Formaggio E, Bernardoni R, Cecconi D, Della-Bianca V. (2005b) Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death. *J Mol Neurosci*.;25(2):141-56.
- Coulson EJ. (2006) Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J Neurochem*. Aug;98(3):654-60. Review.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. Mar 11;219(4589):1184-90. Review.
- Crosland RD. (1996) Differentiation agents enhance cholinergic characteristics of LA-N-2 human neuroblastoma cells. *Life Sci.*;58(22):1987-94.

- Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. (2004) Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Aug;28(5):771-99. Review.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. Aug 30;277(35):32046-53.
- Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. (2005) Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? *BMC Genomics*. Apr 27;6(1):59.
- Dalrymple SA. (2002) p38 mitogen activated protein kinase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. Dec;19(3):295-9. Review.
- Daniels WM, Hendricks J, Salie R, Taljaard JJ. (2001) The role of the MAP-kinase superfamily in beta-amyloid toxicity. *Metab Brain Dis*. Dec;16(3-4):175-85.
- Danscher G, Jensen KB, Frederickson CJ, Kemp K, Andreasen A, Juhl S, Stoltenberg M, Ravid R. (1997) Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. *J Neurosci Methods*. Sep 5;76(1):53-9.
- Dascher C, Matteson J, Balch WE. (1994) Syntaxin 5 regulates endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem*. Nov 25;269(47):29363-6.
- Datki Z, Papp R, Zadori D, Soos K, Fulop L, Juhasz A, Laskay G, Hetenyi C, Mihalik E, Zarandi M, Penke B. (2004) In vitro model of neurotoxicity of Abeta 1-42 and neuroprotection by a pentapeptide: irreversible events during the first hour. *Neurobiol Dis*. Dec;17(3):507-15.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. Oct 1;351(Pt 1):95-105.
- Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR. (1996) Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci*. Nov;143(1-2):137-42.
- Delaere P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw JJ. (1990) Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neurosci Lett*. 116:87-93.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*. Dec;14(4):457-60.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. Oct 24;278(5338):680-6.
- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci*. May 31;26(22):6011-8.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci*. Jun 15;21(12):4125-33.
- Dolezal V, Kasparova J. (2003) Beta-amyloid and cholinergic neurons. *Neurochem Res*. Apr;28(3-4):499-506. Review.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J*. Jun;11(6):2131-8.

- Erhardt JA, Legos JJ, Johanson RA, Slemmon JR, Wang X. (2000) Expression of PEP-19 inhibits apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport*. Nov 27;11(17):3719-23.
- Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE. (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci*. Oct 15;17(20):7736-45.
- Fass U, Panickar K, Williams K, Nevels K, Personett D, McKinney M. (2004) The role of glutathione in nitric oxide donor toxicity to SN56 cholinergic neuron-like cells. *Brain Res*. Apr 16;1005(1-2):90-100.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Ribera R, Goutan E, Puig B, Rey MJ, Cardozo A, Vinals F, Ribalta T. (2001) Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathol*. Apr;11(2):144-58.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J. (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. Jan;2(1):3-18. Review.
- Ferreiro E, Resende R, Costa R, Oliveira CR, Pereira CM. (2006) An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. Sep;23(3):669-78.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M. (2005) Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. Dec 17;366(9503):2112-7.
- Fonnum F. (1975) A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem*. Feb;24(2):407-9.
- Forgon M, Farkas Z, Gulya K, Pakaski M, Penke B, Kasa P. (1998) Amyloid beta-peptide and its fragments induce acetylcholine release in in vitro basal forebrain tissue slices of rat brain, but do not affect the choline uptake. *Neurobiology (Bp)*.;6(3):359-61.
- Forloni G, Chiesa R, Smirolto S, Verga L, Salmona M, Tagliavini F, Angeretti N. (1993) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport*. May;4(5):523-6.
- Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag München Jena (2001), 111-124.
- Francis PT. (2003) Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. Sep;18(Suppl 1):S15-21. Review.
- Frank B, Gupta S. (2005) A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann Clin Psychiatry*. Oct-Dec;17(4):269-86. Review.
- Frolich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. (1999) A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*.;893:290-3.
- Fukuda S, Sumii M, Masuda Y, Takahashi M, Koike N, Teishima J, Yasumoto H, Itamoto T, Asahara T, Dohi K, Kamiya K. (2001) Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 12;280(1):407-14.
- Furukawa T, Tanaka S, Plotkin SA. (1975) Restricted growth of human cytomegalovirus in UV-irradiated WI-38 human fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med*. Apr;148(4):1249-51.
- Gallagher TF, Seibel GL, Kassis S, Laydon JT, Blumenthal MJ, Lee JC, Lee D, Boehm JC, Fier-Thompson SM, Abt JW, Soreson ME, Smietana JM, Hall RF, Garigipati RS, Bender PE, Erhard KF,

- Krog AJ, Hofmann GA, Sheldrake PL, McDonnell PC, Kumar S, Young PR, Adams JL. (1997) Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles; inhibition of CSBP kinase. *Bioorg Med Chem.* Jan;5(1):49-64.
- Gallo KA, Johnson GL. (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep;3(9):663-72. Review.
- Gabbita SP, Aksenov MY, Lovell MA, Markesbery WR. (1999) Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* Oct;73(4):1660-6.
- Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B. (1993) The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J.* Jul 1;293 ( Pt 1):27-30.
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR. (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology.* May 13;60(9):1495-500.
- Glenner GG, Wong CW. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* May 16;120(3):885-90.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* Jun 2;409(1):57-62.
- Gomez-Santos C, Ambrosio S, Ventura F, Ferrer I, Reiriz J. (2002) TGF-beta1 increases tyrosine hydroxylase expression by a mechanism blocked by BMP-2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* Dec 20;958(1):152-60.
- Gomez-Ramos A, Diaz-Nido J, Smith MA, Perry G, Avila J. (2003) Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res.* Mar 15;71(6):863-70.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 2;100(18):10417-22.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* May 5;261(13):6084-9.
- Guerra B, Diaz M, Alonso R, Marin R. (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem.* Oct;91(1):99-109.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* Mar;19(3):1720-30.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. (1993) Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci.* Sep 24;695:109-16.
- Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, Bowtell DD, Ronai Z. (2002) Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J.* Nov 1;21(21):5756-65.
- Hack CJ. (2004) Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. *Brief Funct Genomic Proteomic.* Nov;3(3):212-9. Review.
- Haddad JJ. (2004) Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol.* Aug;73(5):359-77. Review.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85. Review.

- Halliwell B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* Jun;97(6):1634-58. Review.
- Hammond DN, Wainer BH, Tonsgard JH, Heller A. (1986) Neuronal properties of clonal hybrid cell lines derived from central cholinergic neurons. *Science.* Dec 5;234(4781):1237-40.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH. (1990) Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* Apr 2;512(2):190-200.
- Hamos JE, Oblas B, Pulaski-Salo D, Welch WJ, Bole DG, Drachman DA. (1991) Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology.* Mar;41(3):345-50.
- Hardy JA, Higgins GA. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* Apr 10;256(5054):184-5. Review.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297:353-356.
- Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. (1997) Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol.* Feb;4(2):119-25.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci.* 19:8876-8884.
- Heinitz K., Beck M., Schliebs R., Perez-Polo J.R. (2006) Toxicity mediated by soluble oligomers of  $\beta$ -amyloid(1-42) on cholinergic SN56.B5.G4 cells, *J Neurochem.* Oct;98(6):1930-46
- Hellstrom-Lindahl E. (2000) Modulation of beta-amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol.* Mar 30;393(1-3):255-63. Review.
- Hellstrom-Lindahl E, Mousavi M, Ravid R, Nordberg A. (2004a) Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol Dis.* Mar;15(2):351-60.
- Hellstrom-Lindahl E, Court J, Keverne J, Svedberg M, Lee M, Marutle A, Thomas A, Perry E, Bednar I, Nordberg A. (2004b) Nicotine reduces A beta in the brain and cerebral vessels of APPsw mice. *Eur J Neurosci.* May;19(10):2703-10.
- Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 12;91(8):3270-4.
- Hensley K, Maidt ML, Yu Z, Sang H, Markesbery WR, Floyd RA (1998) Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci.* 18:8126-8132.
- Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, Bing G. (1999) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* May;72(5):2053-8.
- Herber DL, Severance EG, Cuevas J, Morgan D, Gordon MN. (2004) Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of alpha7nAChR antibodies to mouse brain tissue. *J Histochem Cytochem.* Oct;52(10):1367-76.
- Herdegen T, Waetzig V. (2001) The JNK and p38 signal transduction following axotomy. *Restor Neurol Neurosci.*;19(1-2):29-39. Review.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* Apr;10(4):413-7.

- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. Sep;11(9):1026-30.
- Higuchi M, Iwata N, Saido TC. (2005) Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta*. Aug 1;1751(1):60-7.
- Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. (1993) c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*. Sep 9;365(6442):179-81. Erratum in: *Nature* 1993 Nov 25;366(6453):368.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*. May 10;165(3):347-56.
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT. (2000) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol*. Jun;47(6):739-47.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W. (2005) The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. Aug;110(2):165-72.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P. (2006) Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int J Dev Neurosci*. Apr-May;24(2-3):157-65.
- Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P, Roberts GW. (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration*. Mar;4(1):23-32.
- Hoyer S. (2004) Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*. Apr 19;490(1-3):115-25. Review.
- Hu L, Wong TP, Cote SL, Bell KF, Cuervo AC. (2003) The impact of Abeta-plaques on cortical cholinergic and non-cholinergic presynaptic boutons in Alzheimer's disease-like transgenic mice. *Neuroscience*. 121(2):421-32.
- Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Vonsattel JP, Tanzi RE, Bush AI. (1997) Zinc-induced Alzheimer's Abeta1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J Biol Chem*. Oct 17;272(42):26464-70.
- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. Jun 15;38(24):7609-16.
- Huang HM, Ou HC, Hsieh SJ. (2000) Amyloid beta peptide impaired carbachol but not glutamate-mediated phosphoinositide pathways in cultured rat cortical neurons. *Neurochem Res*. Feb;25(2):303-12.
- Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. (2004a) Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's Abeta peptides. *J Biol Inorg Chem*. Dec;9(8):954-60.
- Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Rogers JT. (2004b) Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci*. Mar;1012:153-63. Review.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. Jun;6(4):279-84. Review.
- Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M. (2001) The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. May 31;1536(2-3):85-96. Review.

- Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. (2005) Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng.* May;99(5):437-47. Review.
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. (1997) APPsw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* Sep;56(9):965-73.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. (2003a) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* Apr;4(2):249-64.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. (2003b) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* Feb 15;31(4):e15.
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* Oct;10(10):429-39. Review.
- Jankowska A, Blusztajn JK, Szutowicz A. (1997) Activities of enzymes of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in SN56 hybrid cholinergic cell line differentiated by dibutyl cyclic AMP and all-trans retinoic acid. *Folia Neuropathol.*; 35(4):247-9.
- Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M, Szutowicz A. (2000) Acute and chronic effects of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in differentiated and nondifferentiated SN56 cholinergic cells. *J Neurosci Res.* Nov 15;62(4):615-22.
- Jellinger KA. (2006) Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly--an update. *J Alzheimers Dis.*;9(3 Suppl):61-70.
- Johnson CD, Russell RL (1975) A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal Biochem.* Mar;64(1):229-38
- Johnson GV, Jope RS, Binder LI. (1989) Proteolysis of tau by calpain. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 29;163(3):1505-11.
- Johnson GL, Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* Dec 6;298(5600):1911-2. Review.
- Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. (2002) The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides.* Jul;23(7):1311-5. Review.
- Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. (1996) Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci.* Feb 1;16(3):1034-40.
- Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. (1998) Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem.* May;70(5):2179-87.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. (2004) Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.* Nov;29(6):427-41. Review.
- Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M. (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* Dec;1(8):479-85.
- Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, George-Hyslop PS, Tohyama M. (2001) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem* Nov 16;276(46):43446-54.

- Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M. (2004) Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat.* Sep;28(1-2):67-78. Review.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* Apr 18;300(5618):486-9.
- Kehrer JP. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* Aug 14;149(1):43-50. Review.
- Kelleher DJ, Gilmore R. (1997) DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13;94(10):4994-9.
- Kelly JF, Furukawa K, Barger SW, Rengen MR, Mark RJ, Blanc EM, Roth GS, Mattson MP. (1996) Amyloid beta-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 25;93(13):6753-8.
- Khatri P, Draghici S, Ostermeier GC, Krawetz SA. (2002) Profiling gene expression using onto-express. *Genomics.* Feb;79(2):266-70.
- Kidd M. (2006) The history of the paired helical filaments. *J Alzheimers Dis.*;9(3 Suppl):71-5.
- Kihiko ME, Tucker HM, Rydel RE, Estus S. (1999) c-Jun contributes to amyloid beta-induced neuronal apoptosis but is not necessary for amyloid beta-induced c-jun induction. *J Neurochem*;73(6):2609-12.
- Kirkitadze MD, Condron MM, Teplow DB. (2001) Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *J Mol Biol.* Oct 5;312(5):1103-19.
- Kish SJ, Distefano LM, Dozic S, Robitaille Y, Rajput A, Deck JH, Hornykiewicz O. (1990) [<sup>3</sup>H]vesamicol binding in human brain cholinergic deficiency disorders. *Neurosci Lett.* Sep 18;117(3):347-52.
- Kivirikko KI, Myllyharju J. (1998) Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol.* Feb;16(7):357-68. Review.
- Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. (1999) Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Ann N Y Acad Sci.* 893:314-20.
- Klein WL, Stine WB Jr, Teplow DB. (2004) Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* May-Jun;25(5):569-80. Review.
- Klein (2006) Synaptic targeting by A $\beta$  oligomers (ADDLs) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. *The journal of Alzheimer's association.* Jan;2(1):43-55. Review
- Klingner M, Apelt J, Kumar A, Sorger D, Sabri O, Steinbach J, Scheunemann M, Schliebs R. (2003) Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int J Dev Neurosci.* Nov;21(7):357-69.
- Klug GM, Losic D, Subasinghe SS, Aguilar MI, Martin LL, Small DH. (2003) Beta-amyloid protein oligomers induced by metal ions and acid pH are distinct from those generated by slow spontaneous ageing at neutral pH. *Eur J Biochem.* Nov;270(21):4282-93.
- Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ. (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med.* May;11(5):556-61.
- Koch HJ, Haas S, Jurgens T. (2005) On the physiological relevance of muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*;12(24):2915-21. Review.

- Kong LN, Zuo PP, Mu L, Liu YY, Yang N. (2005) Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin.* Jun;26(6):666-72.
- Kontush A. (2001) Alzheimer's amyloid-beta as a preventive antioxidant for brain lipoproteins. *Cell Mol Neurobiol.* Aug;21(4):299-315. Review.
- Kontush K, Schekatolina S. (2004) Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* Dec;1031:249-62. Review.
- Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova NV. (1998) Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta.* Feb 23;270(2):75-84.
- Kourie JI, Henry CL, Farrelly P. (2001) Diversity of amyloid beta protein fragment [1-40]-formed channels. *Cell Mol Neurobiol.* Jun;21(3):255-84.
- Kremer JJ, Pallitto MM, Sklansky DJ, Murphy RM. (2000) Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry.* Aug 22;39(33):10309-18.
- Kurien BT, Scofield RH. (2003) Protein blotting: a review. *J Immunol Methods.* Mar 1;274(1-2):1-15. Review.
- Kyriakis JM, Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* Apr;81(2):807-69. Review.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* Nov 10;24(45):10191-200.
- Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, Korth MJ, Sopher BL, Baskin CR, MacAuley A, Goodman AG, LeBoeuf RC, Katze MG. (2005) Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes.* Apr;54(4):1074-81.
- LaFerla FM. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* Nov;3(11):862-72. Review.
- Laing P. (1986) Luminescent visualization of antigens on blots. *J Immunol Methods.* Sep 27;92(2):161-5.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 26;95(11):6448-53.
- Lansbury PT Jr. (1999) Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3342-4. Review.
- Le WD, Xie WJ, Kong R, Appel SH. (1997) Beta-amyloid-induced neurotoxicity of a hybrid septal cell line associated with increased tau phosphorylation and expression of beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.* Sep;69(3):978-85.
- Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Wainer BH. (1990) Immortalized young adult neurons from the septal region: generation and characterization. *Brain Res Dev Brain Res.* Mar 1;52(1-2):219-28.
- Lee TF, Shiao YJ, Chen CF, Wang LC. (2001) Effect of ginseng saponins on beta-amyloid-suppressed acetylcholine release from rat hippocampal slices. *Planta Med.* Oct;67(7):634-7.
- Lee DH, Wang HY. (2003) Differential physiologic responses of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to beta-amyloid1-40 and beta-amyloid1-42. *J Neurobiol.* Apr;55(1):25-30.

- Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T, Lee VM. (2006) Targeting amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A $\beta$  precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem.* Feb 17;281(7):4292-9.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* Mar 16;440(7082):352-7.
- Lin H, Bhatia R, Lal R. (2001) Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* Nov;15(13):2433-44. Erratum in: *FASEB J* 2002 May;16(7):759.
- Lin A. (2003) Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays.* Jan;25(1):17-24. Review.
- Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* Mar;13(3):385-92.
- Lindl, Toni (2002) Zell- und Gewebekulturtechnik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 5. Auflage
- Ling X, Martins RN, Racchi M, Craft S, Helmerhorst E. (2002) Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis.* Oct;4(5):369-74.
- Liochev SI. (1999) The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst.*;36:1-39. Review.
- Liskowsky W, Schliebs R. (2006) Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein. *Int J Dev Neurosci.* Apr-May;24(2-3):149-56.
- Liu G, Garrett MR, Men P, Zhu X, Perry G, Smith MA. (2005) Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta.* Sep 25;1741(3):246-52. Review.
- Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT, Huang X. (2006) Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol.* Jul;155(1):45-51.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK. (2001) beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 10;98(8):4734-9.
- Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 7. Auflage (2003), 1062.
- Lopez-Toledano MA, Shelanski ML. (2004) Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci.* Jun 9;24(23):5439-44.
- Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12243-12247.
- Loring JF, Wen X, Lee JM, Seilhamer J, Somogyi R. (2001) A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* 2001 Nov;20(11):683-95. Erratum in: *DNA Cell Biol* 2002 Mar;21(3):241.
- Lottspeich, Zorbas (1998) *Bioanalytik.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* Jun 11;158(1):47-52.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov;193(1):265-75.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* Aug;6(8):603-14. Review.

- Lyketsos CG, Olin J. (2002) Depression in Alzheimer's disease: overview and treatment. *Biol Psychiatry*. Aug 1;52(3):243-52. Review.
- Madziar B, Tomaszewicz M, Matecki A, Bielarczyk H, Szutowicz A. (2003) Interactions between p75 and TrkA receptors in differentiation and vulnerability of SN56 cholinergic cells to beta-amyloid. *Neurochem Res*. Apr;28(3-4):461-5.
- Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA, Caughey B. (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci*. May 25;25(21):5207-16.
- Mahley RW, Huang Y. (2006) Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol Scand Suppl.*;185:8-14. Review.
- Makishima T, Nakashima T, Nagata-Kuno K, Fukushima K, Iida H, Sakaguchi M, Ikehara Y, Komiyama S, Nishimoto T. (1997) The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. *Genes Cells*. Feb;2(2):129-41.
- Malik MA, Greenwood CE, Blusztajn JK, Berse B. (2000) Cholinergic differentiation triggered by blocking cell proliferation and treatment with all-trans-retinoic acid. *Brain Res*. Aug 25;874(2):178-85.
- Manning AM, Davis RJ. (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov*. Jul;2(7):554-65. Review.
- Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, Maggio JE. (1993) Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem*. Sep;61(3):1171-4.
- Mash D. C., Flynn D. D. and Potter L. T. (1985) Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 228, 1115–1117.
- Mason RP, Jacob RF, Walter MF, Mason PE, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Wood WG. (1999) Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes. *J Biol Chem*. Jun 25;274(26):18801-7.
- Masuda K, Shima H, Watanabe M, Kikuchi K. (2001) MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J Biol Chem*. Oct 19;276(42):39002-11.
- Marques CA, Keil U, Bonert A, Steiner B, Haass C, Muller WE, Eckert A (2003) Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem*. 278:28294-28302.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun;82(12):4245-9.
- Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. (2006) Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem*. Jun;97(6):1700-25. Review.
- Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Ghiso J. (1996) Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J*. Jun 1;316 ( Pt 2):671-9.
- Matthews KL, Chen CP, Esiri MM, Keene J, Minger SL, Francis PT. (2002) Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. *Biol Psychiatry*. Mar 1;51(5):407-16.
- Mattson MP, Pedersen WA. (1998) Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*. Nov-Dec;16(7-8):737-53. Review.
- Mattson MP. (2002) Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurovirol*. Dec;8(6):539-50. Review.

- Mattson MP. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. Aug 5;430(7000):631-9. Review.
- Matza D, Kerem A, Shachar I. (2003) Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol. May*;24(5):264-8. Review.
- May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE. (1990) Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*. Dec;5(6):831-9.
- Maynard CJ, Bush AI, Masters CL, Cappai R, Li QX. (2005) Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol*. Jun;86(3):147-59. Review.
- McGeer PL, McGeer EG. (2001) Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. Nov;58(11):1790-2. Review.
- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. (2006) Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis*;9(3 Suppl):271-6.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. Dec;46(6):860-6.
- McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. (2006) Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Apr 19;(2):CD003154. Review.
- Mesulam MM. (1996) The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*;109:285-97. Review.
- Mesulam MM. (2004a) The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res*;145:67-78
- Mesulam M. (2004b) The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem*. Jan-Feb;11(1):43-9. Review.
- Mezghrani A, Fassio A, Benham A, Simmen T, Braakman I, Sitia R. (2001) Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells. *EMBO J*. Nov 15;20(22):6288-96.
- Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K. (2001) A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J Neurosci*. Sep 15;21(18):7226-35.
- Mielke MM, Lyketsos CG. (2006) Lipids and the pathogenesis of Alzheimer's disease: is there a link? *Int Rev Psychiatry*. Apr;18(2):173-86. Review.
- Millenaar FF, Okyere J, May ST, van Zanten M, Voesenek LA, Peeters AJ. (2006) How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics*. Mar 15;7:137.
- Miller JD, Tajima S, Lauffer L, Walter P. (1995) The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*. Feb;128(3):273-82.
- Minghetti L, Levi G. (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol*. 1998 Jan;54(1):99-125. Review.
- Mirnics ZK, Mirnics K, Terrano D, Lewis DA, Sisodia SS, Schor NF. (2003) DNA microarray profiling of developing PS1-deficient mouse brain reveals complex and coregulated expression changes. *Mol Psychiatry*. Oct;8(10):863-78.

- Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y. (2000) Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A $\beta$ ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*. Jun 13;39(23):6951-9.
- Molochkina EM, Zorina OM, Fatkullina LD, Goloschapov AN, Burlakova EB. (2005) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. *Chem Biol Interact*. Dec 15;157-158:401-4.
- Moreira PI, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G. (2006) Therapeutic options in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. Jun;6(6):897-910. Review.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. Sep 13;277(37):34287-94.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*. Oct 1;21(19):7551-60.
- Mosconi L. (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Apr;32(4):486-510. Review.
- Mufson EJ, Lavine N, Jaffar S, Kordower JH, Quirion R, Saragovi HU. (1997) Reduction in p140-TrkA receptor protein within the nucleus basalis and cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. Jul;146(1):91-103.
- Mufson EJ, Ma SY, Cochran EJ, Bennett DA, Beckett LA, Jaffar S, Saragovi HU, Kordower JH. (2000) Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*. Nov 6;427(1):19-30.
- Nagy ZB, Kelemen JZ, Feher LZ, Zvara A, Juhasz K, Puskas LG. (2005) Real-time polymerase chain reaction-based exponential sample amplification for microarray gene expression profiling. *Anal Biochem*. Feb 1;337(1):76-83.
- Nair VD, Yuen T, Olanow CW, Sealfon SC. (2004) Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. *J Biol Chem*. Jun 25;279(26):27494-501.
- Nakashima H, Ishihara T, Yokota O, Terada S, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S. (2004) Effects of alpha-tocopherol on an animal model of tauopathies. *Free Radic Biol Med*. Jul 15;37(2):176-86.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. Jan 6;403(6765):98-103.
- Nilbratt M, Friberg L, Mousavi M, Marutle A, Nordberg A. (2007) Retinoic acid and nerve growth factor induce differential regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in SN56 cells. *J Neurosci Res*. Feb 15;85(3):504-14.
- Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P, Winblad B. (1986) Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J Neural Transm*.;67(3-4):275-85.
- Nishii K, Tsuzuki T, Kumai M, Takeda N, Koga H, Aizawa S, Nishimoto T, Shibata Y. (1999) Abnormalities of developmental cell death in Dad1-deficient mice. *Genes Cells*. Apr;4(4):243-52.
- Nitsch RM, Slack BE, Farber SA, Borghesani PR, Schulz JG, Kim C, Felder CC, Growdon JH, Wurtman RJ. (1993) Receptor-coupled amyloid precursor protein processing. *Ann N Y Acad Sci*. Sep 24;695:122-7.
- Nitsch RM. (2004) Immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. Oct-Dec;18(4):185-9. Review.
- Nordberg A. (1992a) Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*;139:54-8. Review.

- Nordberg A. (1992b) Neuroreceptor changes in Alzheimer disease. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* Winter;4(4):303-28. Review.
- Nordberg A, Alafuzoff I, Winblad B. (1992c) Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J Neurosci Res.* Jan;31(1):103-11.
- Nordberg A, Hellstrom-Lindahl E, Lee M, Johnson M, Mousavi M, Hall R, Perry E, Bednar I, Court J. (2002) Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *J Neurochem.* May;81(3):655-8.
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jul;65(7):631-41. Review.
- Nyfelner B, Nufer O, Matsui T, Mori K, Hauri HP. (2003) The cargo receptor ERGIC-53 is a target of the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* May 16;304(4):599-604.
- Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, et al. (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol.* Nov;136(1):22-31.
- Oddo S, LaFerla FM. (2006) The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris.* Mar-May;99(2-3):172-9.
- Okazawa H, Estus S. (2002) The JNK/c-Jun cascade and Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2002 Mar-Apr;17(2):79-88. Review.
- Pagani M, Fabbri M, Benedetti C, Fassio A, Pilati S, Bulleid NJ, Cabibbo A, Sitia R. (2000) Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-beta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* Aug 4;275(31):23685-92.
- Paola D, Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M, Pronzato MA. (2000) Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of beta1 and betaII PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 16;268(2):642-6.
- Pappas BA, Bayley PJ, Bui BK, Hansen LA, Thal LJ. (2000) Choline acetyltransferase activity and cognitive domain scores of Alzheimer's patients. *Neurobiol Aging.* Jan-Feb;21(1):11-7.
- Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK (1992) Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 140:621-628.
- Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. (1996) Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci.* Dec 1;16(23):7533-9.
- Parihar MS, Hemnani T. (2004) Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci.* Jun;11(5):456-67.
- Pedersen WA, Berse B, Schuler U, Wainer BH, Blusztajn JK. (1995) All-trans- and 9-cis-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor-alpha. *J Neurochem.* Jul;65(1):50-8.
- Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK. (1996) Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 23;93(15):8068-71.
- Pedersen WA, Blusztajn JK. (1997) Characterization of the acetylcholine-reducing effect of the amyloid-beta peptide in mouse SN56 cells. *Neurosci Lett.* Dec 19;239(2-3):77-80.

- Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci.* Nov;34(2):247-65.
- Perry EK. (1986) The cholinergic hypothesis-ten years on. *Br Med Bull.* Jan;42(1):63-9. Review.
- Perry EK, Morris CM, Court JA, Cheng A, Fairbairn AF, McKeith IG, Irving D, Brown A, Perry RH. (1995) Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience.* Jan;64(2):385-95.
- Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X, Raina AK, Holbrook N, Siedlak SL, Harris PL, Smith MA. (1999) Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport.* Aug 2;10(11):2411-5.
- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. (2005) Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science.* Jan 14;307(5707):262-5.
- Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. (2001) beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci.* Jan 1;21(1):RC120.
- Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, Dani C, Panabieres F, El Sabouty S, Fort P, Jeanteur P. (1984) Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res.* Sep 25;12(18):6951-63.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* Nov 1;563(1-2):311-4.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.* 13:1676-1687.
- Psychrembel (1997) *Klinisches Wörterbuch.* Walter de Gruyter & Co. Verlag, Berlin. 258. Auflage
- Puig B, Gomez-Isla T, Ribe E, Cuadrado M, Torrejon-Escribano B, Dalfo E, Ferrer I. (2004) Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding betaA plaques in APP Tg2576 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Oct;30(5):491-502.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* Apr;6(4):345-51. Review.
- Quackenbush J. (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* Dec;32 Suppl:496-501. Review.
- Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. (2005) Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 26;102(30):10427-32.
- Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. (2000) Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. *J Neurosci Res.* Jul 15;61(2):128-33. Review.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* Aug;7(4):321-31.
- Rensink AA, Otte-Holler I, ten Donkelaar HJ, De Waal RM, Kremer B, Verbeek MM. (2004) Differential gene expression in human brain pericytes induced by amyloid-beta protein. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Jun;30(3):279-91.
- Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. (1997a) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem.* Apr;68(4):1736-44.

- Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. (1997b) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem.* Apr;68(4):1736-44.
- Roses AD. (1998) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. The tip of the susceptibility iceberg. *Ann N Y Acad Sci.* Nov 30;855:738-43. Review.
- Roses AD. (2006) On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and common late-onset Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.*;9(3 Suppl):361-6.
- Rosoff ML, Wei J, Nathanson NM. (1996) Isolation and characterization of the chicken m2 acetylcholine receptor promoter region: induction of gene transcription by leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 10;93(25):14889-94.
- Rosoff ML, Nathanson NM. (1999) Tyrosines 905 and 915 of gp130 are required for maximum induction of m2 muscarinic acetylcholine receptor and VIP gene transcription by cytokines in neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol.* Apr;19(2):289-96.
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol.* Dec;56(5):541-69. Review.
- Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P. (2005) The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* Jun;4(3):223-33. Review.
- Ruberg M, Mayo W, Brice A, Duyckaerts C, Hauw JJ, Simon H, LeMoal M, Agid Y. (1990) Choline acetyltransferase activity and [3H]vesamicol binding in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and rats with basal forebrain lesions. *Neuroscience.*;35(2):327-33.
- Rubinfeld H, Seger R. (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* Oct;31(2):151-74. Review.
- Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH. (1983) Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* Dec 19;289(1-2):169-75.
- Santos MS, Barbosa J Jr, Kushmerick C, Gomez MV, Prado VF, Prado MA. (2000) Visualization and trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in living cholinergic cells. *J Neurochem.* Jun;74(6):2425-35. Retraction in: *J Neurochem.* 2000 Sep;75(3):1332.
- Santos MS, Barbosa J Jr, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA. (2001) Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem.* Sep;78(5):1104-13.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* Apr-May;24(2-3):167-76.
- Savage MJ, Lin YG, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW. (2002) Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *J Neurosci.* May 1;22(9):3376-85.
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. (2005) Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanita.*;41(2):143-64. Review.
- Schenk DB, Seubert P, Grundman M, Black R. (2005) A beta immunotherapy: Lessons learned for potential treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.*;2(5):255-60. Review.
- Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. (1996) Cab45, a novel (Ca<sup>2+</sup>)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol.* Apr;133(2):257-68.
- Schliebs R. (2005) Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease-interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res.* Jun-Jul;30(6-7):895-908.

- Schliebs R, Arendt T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* Nov;113(11):1625-44.
- Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, Kretzler M. (2003) Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int.* Jul;64(1):356-60.
- Schubert D. (2005) Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* May;4(2):240-57. Review.
- Schor NF. (2005) The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol.* Oct;77(3):201-14. Epub 2005 Nov 16. Review.
- Schroder M, Kaufman RJ. (2006) Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Curr Mol Med.* Feb;6(1):5-36. Review.
- Selkoe DJ, Abraham CR, Podlisny MB, Duffy LK. (1986) Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* Jun;46(6):1820-34.
- Selkoe DJ. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* Nov;8(11):447-53. Review.
- Selkoe DJ. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* Apr;81(2):741-66. Review.
- Selkoe DJ. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* Oct 25;298(5594):789-91. Review.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* Jul;3(1):99-111.
- Shen HM, Liu ZG. (2006) JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2006 Mar 15;40(6):928-39. Review.
- Shinotoh H, Namba H, Fukushi K, Nagatsuka S, Tanaka N, Aotsuka A, Ota T, Tanada S, Irie T. (2000) Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol.* Aug;48(2):194-200.
- Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* Dec;4(12):841-52. Review.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science.* Oct 2;258(5079):126-9.
- Sjogren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I. (2006) Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev.* Feb;127(2):138-47.
- Sjogren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I. (2006) Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev.* Feb;127(2):138-47.
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature.* Jul 11;382(6587):120-1.
- Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* Apr 15;17(8):2653-7.
- Smith MA. (2006) Oxidative stress and iron imbalance in Alzheimer disease: how rust became the fuss! *J Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl):305-8. Review.

- Stout JT, Chen HY, Brennand J, Caskey CT, Brinster RL. (1985) Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice. *Nature*. Sep 19-25;317(6034):250-2.
- Suga K, Saito A, Tomiyama T, Mori H, Akagawa K. (2005) Syntaxin 5 interacts specifically with presenilin holoproteins and affects processing of betaAPP in neuronal cells. *J Neurochem*. Jul;94(2):425-39.
- Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Pratico D. (2004) Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. Feb;18(2):323-5.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. Aug;29(2):332-7. Review.
- Szutowicz A, Jankowska A, Blusztajn JK, Tomaszewicz M. (1999) Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J Neurosci Res*. Jul 1;57(1):131-6.
- Szutowicz A. (2001) Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J Neurosci Res*. Dec 1;66(5):1009-18. Review.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawelczyk T, Jankowska-Kulawy A. (2006) Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis*. May 25
- Tanaka S, Furukawa T, Plotkin SA. (1975) Human cytomegalovirus stimulates host cell RNA synthesis. *J Virol*. Feb;15(2):297-304.
- Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M, Danni O. (2003) Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med*. Jul 1;35(1):45-58.
- Taylor BM, Sarver RW, Fici G, Poorman RA, Lutzke BS, Molinari A, Kawabe T, Kappenman K, Buhl AE, Epps DE (2003) Spontaneous aggregation and cytotoxicity of the beta-amyloid Abeta1-40: a kinetic model. *J Protein Chem*. 22:31-40.
- Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI. (2005) Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett*. Jan 17;579(2):427-32.
- Teplow DB. (1998) Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid*. Jun;5(2):121-42. Review.
- Tominaga K, Kagata T, Johmura Y, Hishida T, Nishizuka M, Imagawa M. (2005) SLC39A14, a LZT protein, is induced in adipogenesis and transports zinc. *FEBS J*. Apr;272(7):1590-9.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol*. Apr 15;572(Pt 2):477-92.
- Tran MH, Yamada K, Nabeshima T. (2002) Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides*. Jul;23(7):1271-83. Review.
- Trougakos IP, Gonos ES. (2002) Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. Nov;34(11):1430-48. Review.
- Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, Greene LA. (2001) beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem*. Apr;77(1):157-64.
- Tuppo EE, Arias HR. (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. Feb;37(2):289-305. Review.

- Unterberger U, Hoffberger R, Gelpi E, Flicker H, Budka H, Voigtlander T. (2006) Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* Apr;65(4):348-57.
- Utal AK, Stopka AL, Roy M, Coleman PD. (1998) PEP-19 immunohistochemistry defines the basal ganglia and associated structures in the adult human brain, and is dramatically reduced in Huntington's disease. *Neuroscience.* Oct;86(4):1055-63. Erratum in: *Neuroscience* 1999;88(3):993.
- Valasek MA, Repa JJ. (2005) The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* Sep;29(3):151-9. Review.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
- van Huizen R, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. (2003) P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem.* May 2;278(18):15558-64.
- Vaucher E, Aumont N, Pearson D, Rowe W, Poirier J, Kar S. (2001) Amyloid beta peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholinerelease in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *J Chem Neuroanat.* Jun;21(4):323-9.
- Verdier Y, Zarandi M, Penke B. (2004) Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci.* May;10(5):229-48. Review.
- Veurink G, Fuller SJ, Atwood CS, Martins RN. (2003) Genetics, lifestyle and the roles of amyloid beta and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann Hum Biol.* Nov-Dec;30(6):639-67. Review.
- Wainer BH, Lee HJ, Roback JD, Hammond DN. (1991) In vitro cell cultures as a model of the basal forebrain. *Adv Exp Med Biol.* 1991;295:415-37. Review.
- Walker PR, Smith B, Liu QY, Famili AF, Valdes JJ, Liu Z, Lach B. (2004) Data mining of gene expression changes in Alzheimer brain. *Artif Intell Med.* Jun;31(2):137-54.
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* 274:25945-25952.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002a) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans.* 30:552-557.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002b) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416:535-539.
- Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2005) The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans.* Nov;33(Pt 5):1087-90. Review.
- Wang XZ, Kuroda M, Sok J, Batchvarova N, Kimmel R, Chung P, Zinszner H, Ron D. (1998) Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J.* Jul 1;17(13):3619-30.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. (2000a) Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* Sep;75(3):1155-61.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. (2000b) beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* Feb 25;275(8):5626-32.

- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 924:133-140.
- Wang Y, Cao YY, Jia XM, Cao YB, Gao PH, Fu XP, Ying K, Chen WS, Jiang YY. (2006) Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. *Free Radic Biol Med.* Apr 1;40(7):1201-9.
- Watson DE, Li B. (2005) TaqMan applications in genetic and molecular toxicology. *Int J Toxicol.* May-Jun;24(3):139-45. Review.
- Webber KM, Raina AK, Marlatt MW, Zhu X, Prat MI, Morelli L, Casadesus G, Perry G, Smith MA. (2005) The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev.* Oct;126(10):1019-25. Review.
- Wei W, Wang X, Kusiak JW. (2002) Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J Biol Chem.* May 17;277(20):17649-56.
- Weigel AL, Handa JT, Hjelmeland LM. (2002) Microarray analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic Biol Med.* Nov 15;33(10):1419-32.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22:1858-1867.
- Westermeier R, Marouga R. (2005) Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep.* Feb-Apr;25(1-2):19-32. Review.
- Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW. (1989) Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science.* Mar 17;243(4897):1488-90.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.*;44(4):275-95. Review.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* Oct;57(10):1439-43.
- Wong TP, Debeir T, Duff K, Cuellar AC. (1999) Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J Neurosci.* Apr 1;19(7):2706-16.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* May 15;22(10):RC221.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* Oct;115(10):2656-64. Review.
- Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. (2002) Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 10;99(25):15920-5.
- Yang YH, Speed T. (2002) Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet.* Aug;3(8):579-88. Review.
- Yan Z, Feng J. (2004) Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. *Curr Alzheimer Res.* Nov;1(4):241-8. Review.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubada OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem.* Feb 18;280(7):5892-901.

- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. Oct 12;250(4978):279-82.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. (2005) Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci*. Feb 2;25(5):1149-58.
- Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) *Neurobiol Aging*. 20:325-330.
- Yoo MS, Chun HS, Son JJ, DeGiorgio LA, Kim DJ, Peng C, Son JH. (2003) Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. Jan 31;110(1):76-84.
- Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* Dec 11;273(50):33741-9. Erratum in: *J Biol Chem* 1999 Jan 22;274(4):2592.
- Yoshiyama Y, Arai K, Oki T, Hattori T. (2000) Expression of invariant chain and pro-cathepsin L in Alzheimer's brain. *Neurosci Lett*. Aug 25;290(2):125-8.
- Zarros ACh, Kalopita KS, Tsakiris ST. (2005) Serotonergic impairment and aggressive behavior in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*.;65(3):277-86. Review.
- Zinkel S, Gross A, Yang E. (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. Aug;13(8):1351-9. Review.
- Zemlan FP, Thienhaus OJ, Bosmann HB. (1989) Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res*. Jan 2;476(1):160-2.
- Zheng H, Koo EH. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*. Jul 3;1:5.
- Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. (2000) Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. Oct;59(10):880-8.
- Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA. (2001a) Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. Jan;76(2):435-41
- Zhu X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA. (2001b) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev*. Dec;123(1):39-46.
- Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*. Sep-Oct;11(5):270-81. Review.
- Zhu X, Wang Y, Ogawa O, Lee HG, Raina AK, Siedlak SL, Harris PL, Fujioka H, Shimohama S, Tabaton M, Atwood CS, Petersen RB, Perry G, Smith MA. (2004) Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease. *J Neurochem*. Jun;89(5):1233-40.
- Zlokovic BV. (1996) Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci*.;59(18):1483-97. Review.
- Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. (2002) A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci*. Jun 15;22(12):4833-41.

---

**Lebenslauf**

Name:	Katrin Heinitz
Geburtstag:	01. Oktober 1978
Geburtsort:	Lutherstadt-Wittenberg
1985 – 1991:	Grundschule und Polytechnische Oberschule Jessen
1991 – 1997:	Gymnasium Jessen; Abitur
1997 – 2001:	Studium der Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 2001 – März 2002:	Praktische Ausbildung, „Augustus-Apotheke“, Dresden
April 2002 – November 2002:	Praktische Ausbildung, Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums „Carl-Gustav-Carus“, Dresden
Dezember 2002:	Approbation als Apothekerin
Januar 2003 – Dezember 2004:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Leipzig; Anfertigung einer Diplomarbeit, Abschluss: Diplom-Pharmazeutin
Januar 2004 – Februar 2005:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Leipzig; Anfertigung der Dissertation
März 2005 – April 2005:	Forschungsaufenthalt an der University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA
Mai 2005 – September 2006	Fortsetzung der Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Leipzig; Fertigstellung der Dissertation
Juni 2006 – September 2006	Nebenberufliche Tätigkeit als Apothekerin, „Adler-Apotheke“, Borna
seit Oktober 2006	Trainee, Bayer Bitterfeld GmbH, Greppin

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Heinitz K., Beck M., Schliebs R., Perez-Polo J.R. (2006) Toxicity mediated by soluble oligomers of  $\beta$ -amyloid(1-42) on cholinergic SN56.B5.G4 cells, *J Neurochem.* Oct;98(6):1930-46

### Posterpräsentationen

Heinitz K., Schliebs R. (2004) The response of cholinergic SN56 cells to oxidative stress depends on the cholinergic phenotype, 3. Research Festival for Life Sciences, Leipzig, *Abstract* in: 3rd Leipzig Research Festival for Life Sciences 2004 (J. Thiery, A. Beck-Sickinger, F. Emmrich, Hrsg.), S. 54.

Heinitz, K., Schliebs, R. (2005) Different vulnerability to oxidative stress in nondifferentiated and differentiated cholinergic SN56 cells. 4th Biotechnology Symposium, Leipzig, *Abstract*

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2005) Amyloid  $\beta$ -peptides' role in oxidative stress and neurodegeneration of cholinergic neurons, 13th Annual Science Forum Galveston, *Abstract*

Heinitz, K., Schliebs, R. (2005) Phenotype-dependent differential vulnerability to oxidative stress in cholinergic SN56 cells. 20th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Innsbruck. *Abstract* in: *J Neurochem* 2005, 94 (Suppl. 2), 167

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2005) Amyloid  $\beta$ -mediated neurodegeneration in cholinergic SN56 cells. Study Group Neurochemistry Annual Meeting, 6-8 October 2005, Leipzig, *Abstract* in: *Int. J. Devl Neuroscience* 24 (2006), 220-221

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2005) Mechanism involved in Amyloid- $\beta$ -peptides mediated cholinotoxicity, 4. Research Festival for Life Sciences, Leipzig,

*Abstract* in: 4rd Leipzig Research Festival for Life Sciences 2005 (J. Thiery, A. Beck-Sickinger, F. Emmrich, Hrsg.), S. 152.

Heinitz K., Schliebs R. (2006) Soluble oligomers of  $\beta$ -amyloid(1-42) and hydrogen peroxide affect distinct pools of genes in cholinergic SN56 cell, 5th Biotechnology Symposium, Leipzig, *Abstract*

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2006) Soluble oligomers of beta-amyloid(1-42) and hydrogen peroxide affect distinct pools of genes in cholinergic SN56.B5.G4 cells, 5th Forum of European Neuroscience, Wien, Österreich, *Abstract*

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2006) Beta-amyloid (1-42) and hydrogen peroxide affect distinct pools of genes in cholinergic SN56.B5.G4 cells as revealed by gene expression analysis, 10th International Conference for Alzheimer`s Disease and related Disorders, Madrid Spanien, *Abstract* in: Alzheimer`s & Dementia 2006, Vol 2(3) (Suppl. 1), S.522

### **Vorträge**

Heinitz K., Perez-Polo J.R., Schliebs R. (2006) Gene expression changes involved in toxic effects by soluble oligomers of  $\beta$ -amyloid(1-42) on cholinergic neurons, Neuroscience 2006, Atlanta, Georgia, USA, *Abstract*

Halle (Saale), 25.07.2007

Katrin Heinitz

## Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an meinen Betreuer Prof. Dr. Reinhard Schliebs vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Universität Leipzig. Zum einen möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation und die gute Zusammenarbeit bedanken, zum anderen für die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen und dem Gastaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regino J. Perez-Polo an der University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Andreas Langner vom Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, der die Betreuung meiner Arbeit aus dem pharmazeutischen Fachbereich übernommen hat.

Besonders möchte ich Prof. Dr. Regino J. Perez-Polo von der University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas danken, der nicht nur während meines Gastaufenthaltes, sondern auch darüber hinaus entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Zimmer- und Arbeitsgruppenkollegin Jelena Kouznetsova bedanken. Nicht nur für die vielen wertvollen, fachlichen Diskussionen, sondern auch für die wunderbaren, gemeinsamen Stunden im Büro, die mir jetzt schon sehr fehlen.

Ich danke der guten Seele unseres Labors, der MTA Renate Jendrek, die mich in viele Labortechniken eingeführt hat und mir während der ganzen Zeit immer eine Unterstützung war.

Mein Dank gilt Karin Werrbach-Perez, Diana Ferrari, Diana Cittelly und Juliean Lee von der University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, die mir im Gastlabor hilfreich zur Seite standen und dazu beitrugen, dass der Aufenthalt mit sehr schönen Erinnerungen verbunden ist.

Zu besonderem Dank bin ich PD Dr. Hans Binder, Martin Beck und Maciej Rosowski vom Interdisziplinären Institut für Bioinformatik der Universität Leipzig für die Mitarbeit an der statistischen Auswertung der Microarray-Analyse verpflichtet.

Weiterhin möchte ich mich vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung bei PD Dr. Steffen Rossner für die fachlichen Anregungen und die kritische Durchsicht der Ma-

nuskripte dieser Arbeit, bei Dr. Ulrike Zeitschel für die Beratung in Zellkulturtechniken, bei PD Dr. Uwe Überham für die fruchtbaren Gespräche zu Genexpressionsuntersuchungen und bei PD Dr. Max Holzer und Jens Stieler für die Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen bedanken.

Zuletzt danke ich dem Studentenwerk Leipzig für die immerwährende Bereitstellung des köstlichen Milchkaffees und einem namhaften Schokoriegelhersteller, die stets für eine ausreichende Coffein- und Glukosezufuhr meines Hirns gesorgt haben.

Und natürlich ein großes „Danke“ an alle meine Freunde und meine Eltern, die mich in schwierigen Stunden wieder aufgebaut haben.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 25.07.2007

Katrin Heinitz