

Regulation des Turnover des Tau-Proteins in Nervenzellen bei oxidativem Stress und Neuroinflammation

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

SUSI KECK
aus Quierschied, Kr. Saarbrücken

Juni 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich

Disputation am 12. Dezember 2008

für Papa

und Mama

die viel zu früh von uns gegangen ist

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Neurodegenerative Demenzen mit Schwerpunkt Morbus Alzheimer.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Morbus Alzheimer.....</i>	<i>9</i>
1.2.1	„Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907).....	9
1.2.2	Klinisches Bild und Verlauf der Alzheimer-Krankheit.....	10
1.2.2.1	Makroskopische Veränderungen.....	13
1.2.2.2	Mikroskopische Veränderungen.....	13
1.2.3	Diagnostik.....	16
1.2.4	Therapiemöglichkeiten.....	18
1.2.4.1	Medikamentöse Therapie.....	18
1.2.4.2	Neue Therapieoptionen.....	21
1.2.4.3	Nichtmedikamentöse Therapie.....	23
1.3	<i>APP und β-Amyloid.....</i>	<i>24</i>
1.3.1	Physiologische Funktion von APP und β -Amyloid.....	24
1.3.2	Bildung von β -Amyloid aus APP.....	25
1.3.3	β -Amyloid- Toxizität.....	27
1.4	<i>Tau-Protein.....</i>	<i>27</i>
1.4.1	Physiologie und Funktion von Tau in der Zelle.....	28
1.4.2	Struktur.....	29
1.4.2.1	Mikrotubuli- Bindungsdomäne.....	31
1.4.2.2	Projektionsdomäne.....	32
1.4.2.3	Regulation durch Phosphorylierung.....	34
1.4.2.4	Pathologische Aggregation – PHFs.....	35
1.4.3	Tauopathien.....	38
1.5	<i>Hypothesen zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung.....</i>	<i>39</i>
1.5.1	Übersicht der verschiedenen Hypothesen.....	40
1.5.2	Die Amyloid- und die Tau-Hypothese.....	41
1.6	<i>Oxidativer Stress.....</i>	<i>43</i>
1.6.1	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.....	44
1.6.2	Entstehung reaktiver Stickstoffspezies.....	45
1.6.3	Oxidativer Stress und Morbus Alzheimer.....	46
1.7	<i>Intrazelluläre Proteolyse unter besonderer Berücksichtigung des Proteasoms.....</i>	<i>50</i>
1.7.1	Funktion und Rolle des Proteasoms.....	56
1.7.2	Neurodegenerative Erkrankungen und die Rolle des Proteasoms.....	57
1.8	<i>Neuroinflammation und die Alzheimer-Krankheit.....</i>	<i>59</i>
1.8.1	Interaktion von Mikroglia und Neuronen.....	60
1.8.2	Mikroglia und Morbus Alzheimer.....	61
1.9	<i>Aufgaben- und Zielstellung.....</i>	<i>64</i>
2	Material und Methoden.....	66
2.1	<i>Material.....</i>	<i>66</i>
2.1.1	Humanes Gewebe.....	66
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	67
2.1.3	Enzyme, Proteine und Antikörper.....	68
2.1.4	Elektrophorese und Westernblot.....	69
2.1.5	Versuchssysteme (Kits).....	69
2.1.6	Radiochemikalien.....	69
2.1.7	Zellkultur und Kultivierung primärer Zellen.....	70
2.1.8	Organotypisch hippocampale Schnittkulturen.....	70
2.1.9	Tiere.....	70
2.1.10	Sonstige Stoffe und Verbrauchsmaterial.....	71
2.1.11	Geräte.....	71

2.2	<i>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</i>	73
2.2.1	Nachweis von Proteinen.....	73
2.2.1.1	Gewinnung von Proteinextrakten mittels Zelllyse	73
2.2.1.2	Zellaufschluss mittels Frieren-Tauen-Zyklen.....	73
2.2.1.3	Konzentrieren von Proteinlösungen mittels Vakuumtrockner.....	74
2.2.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test.....	74
2.2.1.5	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	75
2.2.1.6	Detektion von Proteinen im Gel – Coomassie-Färbung	77
2.2.1.7	Proteintransfer auf eine Membran □ Western Blot-Verfahren	77
2.2.1.8	Immunchemischer Nachweis von Proteinen - Immuno-Blot und Detektion.....	78
2.2.1.9	Entfernen von Antikörpern von Western Blot-Membranen	80
2.2.2	Radioaktive Markierung von Proteinen und deren Detektion	81
2.2.2.1	Radioaktive Markierung <i>in vivo</i> mit [³ H]-Lysin und Aufarbeitung der Zellen	81
2.2.2.2	Immunpräzipitation von Proteinen	82
2.2.2.3	Ko-Immunopräzipitation	83
2.3	<i>Spezielle Methoden</i>	83
2.3.1	Tau-Techniken – Charakterisierung und Nachweis von Tau-Proteinen.....	83
2.3.1.1	Aufarbeitung des Gewebematerials.....	83
2.3.1.2	Isolierung von Tau und PHFs aus <i>post mortem</i> Gehirngewebe.....	84
2.3.1.3	<i>In-vitro</i> -Assemblierung von PHFs aus humanem rekombinatem Tau	85
2.3.1.4	Isolierung von Tau-Protein aus HT22-Zellen und primären Neuronen.....	85
2.3.1.5	Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in HT22-Zellen	86
2.3.2	Methoden rund um das Proteasom	87
2.3.2.1	Messung der Aktivität des Proteasoms.....	87
2.3.2.2	Aktivitätsbestimmung in humanem Hirngewebe	88
2.3.2.3	Aktivitätsbestimmung in HT22-Zelllysaten	88
2.3.2.4	Inhibierung der Proteolyse	89
2.4	<i>Biologische Modelle: Zellkulturen und lebende Hirnschnitte</i>	90
2.4.1	Zelllinien als sekundäre, permanente Zellkulturen.....	90
2.4.2	Kultivierung von Zelllinien	91
2.4.3	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	91
2.4.4	HT22-Zellen	92
2.4.5	BV-2 Zellen.....	93
2.4.6	Primärkulturen - Kultivierung primärer neuronaler Zellen	94
2.4.6.1	Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-D-Lysin	94
2.4.6.2	Präparation embryonaler Gehirne und Herstellung einer primären neuronalen Zellkultur aus Mäusen.....	95
2.4.6.3	Immunzytochemie – Quantitative Kontrolle der Neuronenkultur	96
2.4.7	Organotypisch hippocampale Schnittkulturen.....	99
2.4.7.1	Präparation und Kultivierung organotypisch hippocampaler Schnittkulturen.....	99
2.4.7.2	Färben von Schnittkulturen mit Propidiumjodid	100
2.4.7.3	Ko-Kultivierung von Mikrogliazellen auf Schnittkulturen	101
2.4.7.4	Ernte und Lyse von organotypisch hippocampalen Schnittkulturen	101
2.5	<i>Inkubationsschemata</i>	101
2.6	<i>Vitalitätstests und Zellzahlbestimmung</i>	103
2.6.1	Trypanblaufärbung.....	103
2.6.2	MTT-Test.....	104
2.7	<i>Carbonyl-ELISA</i>	105
2.8	<i>Griess-Assay – Nachweis auf NO</i>	105
2.9	<i>Statistische Auswertung</i>	106
3	Ergebnisse	108
3.1	<i>Interaktionen zwischen dem Proteasom und spezifischen Modifikationen des Tau-Proteins in post mortem Gehirngewebe von Alzheimerpatienten</i>	108
3.1.1	Untersuchungen zum Proteasom in Alzheimerhirngewebe.....	108
3.1.1.1	Bestimmung der Proteasomaktivität in <i>post mortem</i> Alzheimergewebe.....	108

3.1.1.2	Vergleich des Proteasomgehalts in Alzheimerproben und altersgleichen Kontrollen...	110
3.1.1.3	Bestimmung des Proteasom-Komplexes in <i>post mortem</i> Alzheimergewebe	111
3.1.2	Korrelation der Proteasomaktivität mit alzheimerspezifischen Tau-Modifikationen....	112
3.1.2.1	Korrelation der Proteasomaktivität mit dem Hyperphosphorylierungsstatus des Tau-Proteins.....	112
3.1.2.2	Korrelation der Proteasomaktivität mit Tau-Aggregaten - Untersuchungen zur Interaktion zwischen PHFs und Proteasom	114
3.1.2.3	Korrelation der Proteasomaktivität mit der PHF-Konzentration	118
3.1.3	Inkubation isolierten Proteasoms mit PHF-Tau <i>in vitro</i>	121
3.1.3.1	Inkubation mit isolierten PHF-Tau aus Alzheimergehirnen.....	121
3.1.3.2	Inkubation mit <i>in vitro</i> assemblierten PHF-Tau aus rekombinantem humanem Tau-Protein	122
3.1.4	Zusammenfassung I.....	123
3.2	<i>Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Tau-Turnovers in neuronalen HT22-Zellen.....</i>	124
3.2.1	Physiologischer Tau-Turnover - Bestimmung der Halbwertszeit des Tau-Proteins in HT22-Zellen	130
3.2.2	Tau-Turnover unter Einwirkung von oxidativem Stress und Untersuchungen zur Rolle des Proteasoms	131
3.2.2.1	Tau-Turnover und Vitalität von HT22-Zellen unter oxidativen Bedingungen.....	131
3.2.2.2	Tau-Turnover unter Hemmung des Proteasoms	134
3.2.3	Optimierung der Proteasomhemmung durch Veränderung der Konzentration und Inkubationsdauer des Inhibitors	136
3.2.3.1	Messung der Aktivität des 20S und 26S Proteasoms	136
3.2.3.2	Unterschiedliche Inkubationsdauer des Proteasominhibitors MG132.....	137
3.2.3.3	Variation der Konzentration zur Hemmung des Proteasoms.....	139
3.2.4	Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung	142
3.2.4.1	Bestimmung der Parameter zur Inkubation mit Okadaic Acid.....	142
3.2.4.2	Vitalität.....	144
3.2.4.3	Turnover	145
3.2.4.4	Aktivität 20S Proteasom.....	146
3.2.5	Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung und oxidativem Stress.....	147
3.2.5.1	Vitalität.....	148
3.2.5.2	Turnover	148
3.2.5.3	Aktivität des 20S Proteasoms	150
3.2.5.4	Oxidationsstatus des Tau-Proteins	151
3.2.6	Zusammenfassung II: Tau-Turnover in HT22-Zellen	153
3.3	<i>Turnover und Phosphorylierung des Tau-Proteins in primären Neuronen und organotypisch hippocampalen Schnittkulturen</i>	156
3.3.1	Vergleich HT22-Zellen und primäre Neurone	156
3.3.1.1	Primäre Neurone und oxidative Belastung	157
3.3.1.2	Hemmung des 20S Proteasoms	158
3.3.1.3	Hyperphosphorylierung mit Okadaic Acid.....	160
3.3.1.4	Hyperphosphorylierung und oxidativer Stress	161
3.3.1.5	Nitrosativer Stress durch SNP	162
3.3.1.6	Zusammenfassung Tau-Turnover in primären Neuronen.....	163
3.3.2	Tau-Turnover in organotypisch hippocampalen Schnittkulturen	164
3.3.2.1	Tau-Turnover nach oxidativer oder nitrosativer Belastung	165
3.3.2.2	Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung	166
3.3.2.3	Ko-Kultivierung von organisch hippocampalen Schnittkulturen mit aktivierten Mikrogliazellen	167
3.3.2.4	Tau-Turnover nach Inkubation mit verminderter Konzentration über einen längeren Zeitraum	170
3.3.2.5	Zusammenfassung Tau-Turnover in OHSK.....	174
3.3.3	Phosphorylierung des Tau-Proteins in primären Zellen – optische Detektion	176
3.3.3.1	Primäre Neurone mit Okadaic Acid - Bestimmung der Konzentration von OA zur Tau-Phosphorylierung per Western Blot	176
3.3.3.2	Inkubation mit SNP über 16 Stunden.....	178
3.3.3.3	Inkubation mit SNP für 30 Minuten in erhöhter Konzentration.....	179

3.3.3.4	Inkubation über 16 Stunden mit Okadaic Acid und SNP in Kombination	180
3.3.3.5	Einfluss aktivierter BV-2 Zellen auf die Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen	182
3.3.3.6	Phosphorylierung des Tau-Proteins in organisch hippocampalen Schnittkulturen	185
3.3.3.7	Einfluss aktivierter BV-2 Zellen auf die Tau-Phosphorylierung in OHSK	186
3.3.3.8	Zusammenfassung Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen und OHSK	189
3.3.4	Zusammenfassung III: Tau-Turnover in primären Zellen	190
4	Diskussion	192
4.1	<i>Erniedrigte Proteasomaktivität durch Bindung von PHF-Tau.....</i>	<i>192</i>
4.2	<i>PHF-Tau: direkte Toxizität durch Phosphorylierung oder indirekte Toxizität durch Aggregation?.....</i>	<i>195</i>
4.3	<i>Proteasom-abhängiger Turnover - stellt das Tau-Protein ein Substrat für das Proteasom dar?</i>	<i>199</i>
4.3.1	Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins durch Phosphatase-Inhibition hemmt den Abbau durch das Proteasom	201
4.3.2	Oxidativer Stress erhöht den Tau-Turnover auf indirektem Wege.....	203
4.3.3	Einfluss oxidativen Stress auf PP1-vermittelte Tau-Phosphorylierung	205
4.4	<i>Nitrosativer Stress hemmt Tau-Turnover durch Phosphorylierung</i>	<i>207</i>
4.5	<i>Mikroglia-vermittelte Effekte</i>	<i>208</i>
5	Zusammenfassung / Summary	214
6	Literaturverzeichnis	219
7	Abkürzungsverzeichnis	249
8	Publikationsverzeichnis.....	251
9	Anhang.....	253
I	Danksagung	253
II	Lebenslauf	255
III	Eidesstattliche Erklärung	256

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Demenzen mit Schwerpunkt Morbus Alzheimer

Der Begriff „Neurodegeneration“ bezeichnet die strukturelle und funktionelle Veränderung neuronaler Zellen, die über Minderung und Verlust der Funktionen bis hin zur Zerstörung des Nervengewebes reicht. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird Demenz folgendermaßen definiert: „Demenz [...] ist ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen. Das Bewusstsein ist nicht getrübt. Die kognitiven Beeinträchtigungen werden gewöhnlich von Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation begleitet, gelegentlich treten diese auch eher auf. Dieses Syndrom kommt bei der Alzheimer-Krankheit, zerebrovaskulären Störungen und anderen Zustandsbildern vor, die primär oder sekundär das Gehirn betreffen“ (WHO/DIMDI 1994/2004). Neurodegenerative Erkrankungen treten oft nach einer jahrelang normalen Funktion des Nervensystems schleichend auf, um danach allmählich über Jahre oder Jahrzehnte fortzuschreiten. Somit unterscheiden sie sich von den meisten metabolischen Erkrankungen (Kandel, Schwartz *et al.* 2000).

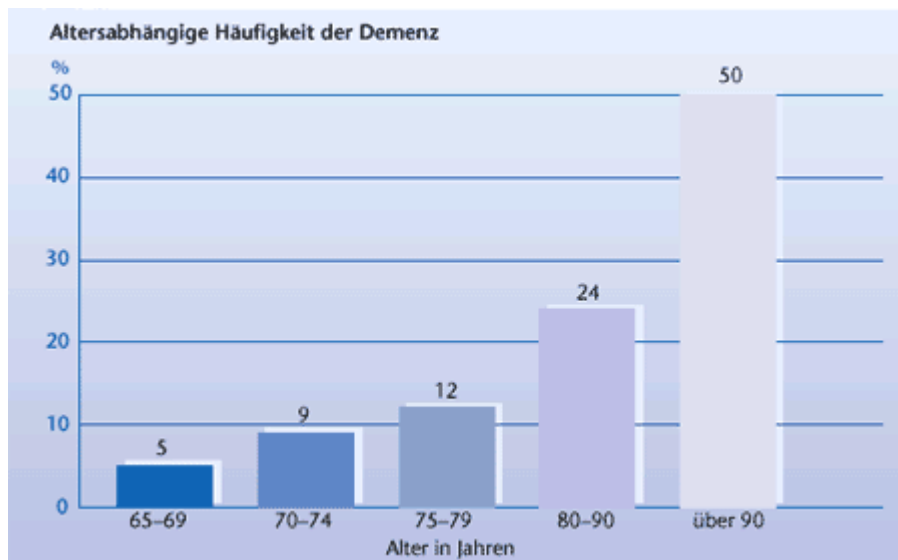


Abbildung 1.1-1: Altersabhängige Häufigkeit der Demenz.

In Deutschland leiden an einer Demenz etwa 1,2 Millionen Menschen. Die Tendenz ist steigend, da das Risiko an Alzheimer zu erkranken mit dem Alter zunimmt. So leidet im

Alter zwischen 65 und 69 Jahren jeder Zwanzigste daran, aber zwischen 80 und 90 Jahren ist schon fast jeder Dritte betroffen (siehe Abb. 1.1-1). Da in unserer Gesellschaft der Anteil älterer Mitbürger zunehmen wird, wird auch eine Zunahme an Demenzkranken erwartet. Obwohl jeder zweite Mensch über 90 Jahre an einer Demenz leidet, sollte nicht vergessen werden, dass die andere Hälfte dieser Altersklasse unverändert geistig fit bleibt.

In der Literatur werden ca. 70 verschiedene Demenzformen beschrieben und Demenzen lassen sich vielfach gliedern. Eine Klassifikation kann nach ätiologischen, topographischen, substrat-orientierten oder genetischen Gesichtspunkten erfolgen.

Ätiologisch werden primäre von sekundären Demenzen unterschieden. Bei 80-90 % aller Demenzen handelt es sich um primäre Demenzen, das bedeutet, dass das Gehirn selbst erkrankt ist, zum Beispiel degenerativ wie bei Morbus Alzheimer oder vaskulär wie bei Morbus Binswanger. 10-20 % der Demenzen sind sekundäre Formen und treten im Rahmen anderer Erkrankungen auf (Weis 1997). Mögliche Kriterien sind in Tabelle 1.1-1 aufgeführt.

Tabelle 1.1-1 Ursachen dementieller Symptomatik

<i>Ursache</i>	<i>Beispiel</i>
Neurodegenerative Erkrankungen	Morbus Alzheimer
Zerebrovaskulär	Morbus Binswanger
Infektiös-inflammatorisch	Multiple Sklerose
Prion-Encephalopathien	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
Toxisch-metabolisch	Alkohol
Medikamentös-toxisch	Neuroleptika
Traumatisch	Schädel-Hirn-Trauma

Eine Topographie-orientierte Klassifikation basiert auf der Lokalisation der Veränderungen nach corticalen bzw. subcorticalen Regionen. Es werden Regionen zusammengefasst, die in der Entstehung der dementiellen Symptomatik involviert sind. Cortical stehen insbesondere die Hippocampusformation, enthorinale Region, Amygdala und unterschiedliche isocorticale Bereiche im Mittelpunkt, während bei den subcorticalen Demenzen die Beteiligung der Basalganglien, des Hirnstammes sowie des Kleinhirns im Vordergrund stehen.

Allerdings gibt es auch Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Regionen, die eine strikte Einteilung nicht möglich machen. So weist zum Beispiel die Corticobasale Degeneration corticale als auch subcorticale Charakteristika auf. Abbildung 1.1-2 stellt eine Übersicht der Lokalisation der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit ihren charakteristischen makroskopischen und mikroskopischen Merkmalen dar.

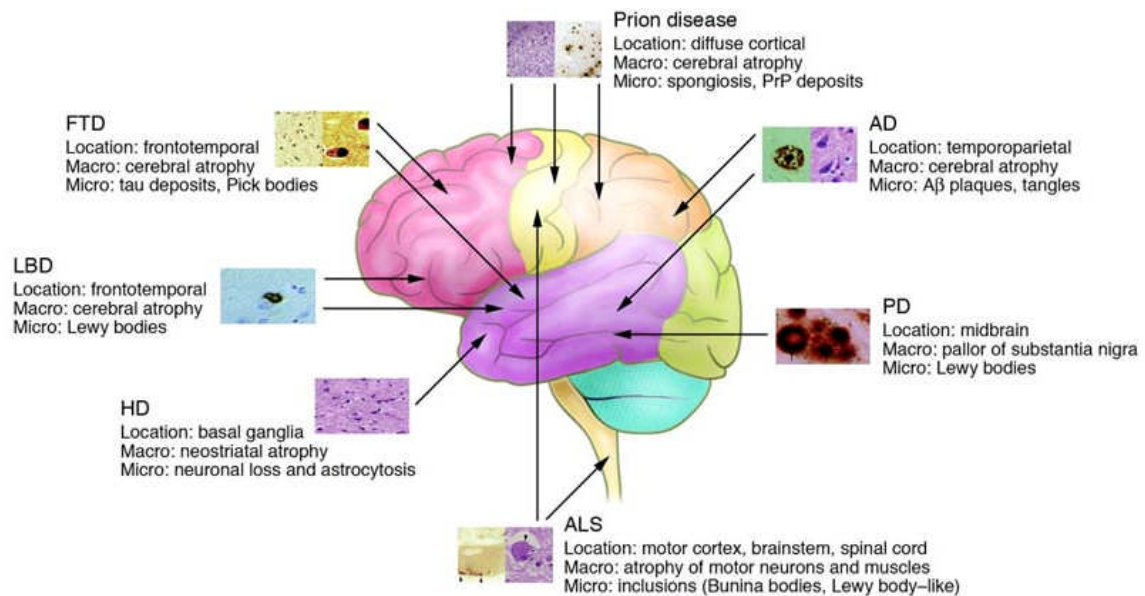


Abbildung 1.1–2 Übersicht der Lokalisation der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen im Gehirn mit ihren charakteristischen makroskopischen und mikroskopischen Merkmalen. AD (engl. Alzheimer disease) = Morbus Alzheimer, PD (engl. Parkinson disease) = Morbus Parkinson, ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, HD (engl. Huntington disease) = Chorea Huntington, LBD (engl. Lewy body dementia) = Demenz mit Lewy-Körpern, FTD = Fronto-Temporale-Demenz (Bertram and Tanzi 2005).

Viele Demenzen zeigen jedoch ähnliche klinische und neuropathologische Merkmale auf. Die Mehrzahl der mit oder ohne Demenz einhergehenden neurodegenerativen Erkrankungen ist durch Ablagerung schwer löslicher filamentöser Proteine extrazellulär (senile Plaques u. a.) und intrazellulär in Form zytoplasmatischer oder intranukleärer Einschlüsse gekennzeichnet. Ihr unterschiedlicher biochemischer Aufbau ist für bestimmte Krankheiten oder Krankheitsgruppen charakteristisch und diagnostisch relevant. Eine Substrat-orientierte Einteilung besteht somit aus der Auflistung der vorliegenden neuropathologischen Veränderungen auf histologischer Ebene und deren Gliederung nach proteinbiochemischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten (Jellinger 2001). Am häufigsten finden sich Tauopathien, α -Synucleinopathien und Polyglukosanstörungen. Tabelle 1.1-2 zeigt eine Übersicht verschiedener relevanter Demenzformen und vereint mehrere Klassifikationen.

Tabelle 1.1-2

<i>Erkrankung</i>	<i>Klinik</i>	<i>Morphologie / Histologie</i>	<i>Gen / Biochemie / Marker</i>
Degenerative Demenzen			
a) Tauopathien (Ablagerungen des Tau-Proteins in Nervenzellen und ihren Fortsätzen)			
Morbus Alzheimer (AK, AD)	Gedächtnis-, Wortfindung-, Merkfähigkeitsstörungen, Ausfälle höherer Hirnleistungen, örtliche Desorientierung, progressive Demenz, tritt sporadisch oder familiär auf	<u>Makroskopisch:</u> progrediente Hirnatrophie insbesondere der fronto-temporalen und parieto-okzipitalen Hirnrinde <u>Mikroskopisch:</u> vakuoläre Degeneration, Amyloidablagerungen (Plaques, Angiopathie) und Tau-Pathologie (Fibrillendegeneration), Synapsen-, Neuronenverlust, vor allem in Hippocampus, Locus coeruleus, gesamter Cortex	Defekt auf Chromosom 21; ApoE ε4, APP, PS1, PS2 / 3+4-Repeat Tau-Triplett mit Amyloid-Ablagerungen
Morbus Pick	psychischer Verfall mit Persönlichkeits-, Verhaltensveränderung und progressiver Demenz einhergehend, tritt sporadisch oder hereditär auf	<u>Makroskopisch:</u> Atrophie der basalen Anteile des Frontal- und Temporallappens, Erweiterung des Seitenventrikels, <u>Mikroskopisch:</u> zerfallene Axone und Dendriten im Stratum moleculare, spezifisches Merkmal ist der einsetzende Neuronverlust in Rindenschicht IIIA, der sich auf Schichten IIIB, II und IIIC ausweitet; ballonierte Neurone mit Tigrolyse (Pick-Zellen) und intrazytoplasmatische, argyrophile Einschlüsse (Pick-Körper)	Tau / 3-Repeat Tau-Dublette ohne Exon 10-Expression immunpositiv für Tau
Progressive supranukleäre Lähmung (PSP)	progressive Paralyse der vertikalen Augenbewegung, Dysarthrie, Muskelrigidität, subcorticale Demenz, tritt meist sporadisch auf	<u>Makroskopisch:</u> Depigmentierung Substantia nigra und Locus coeruleus, Atrophie möglich <u>Mikroskopisch:</u> Neuropilfäden, neurofibrilläre Tangles (NFTs) und Paired Helical Filaments (PHFs)	Tau / 4-Repeat Tau-Dublette + Exon 10 NFTs sind immunpositiv für Tau jedoch negativ für Ubiquitin
Corticobasale Degeneration (CBD)	asymmetrische Akinesien, Rigidität, Dyskinesie, Apraxie, cortico-sensorischer Verlust, Gedächtnisschwäche, ähnlich PSP	<u>Makroskopisch:</u> diffuse Atrophie der Frontal- und Parietalregion, Seitenventrikel dilatiert <u>Mikroskopisch:</u> starker neuronaler Verlust in der Substantia nigra pars compacta mit reaktiver Astroglie, pigmentbeladene Makrophagen, intraneuronale zytoplasmatische sowie gliale Inklusionen	Tau / 4-Repeat Tau-Dublette + Exon 10 Inklusionen: + mit Tau-AK, - mit Ubiquitin-AK

<i>Erkrankung</i>	<i>Klinik</i>	<i>Morphologie / Histologie</i>	<i>Gen / Biochemie / Marker</i>
FTDP-17 (Fronto-Temporale Demenz und Parkinsonismus mit Beziehung zu Chromosom 17)	Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus, Aphasie; Störungen von Persönlichkeit, Verhalten und Sprache autosomal-dominant vererbt	<u>Makroskopisch:</u> asymmetrische Atrophie der Gyri vordere und untere Regionen des Temporallappens, der präfrontalen Areale und Gyrus cinguli <u>Mikroskopisch:</u> Nervenzellverlust, Gliose, Spongiose der limbischen neocorticalen Areale sowie der Assoziationscortices, Substantia nigra stark betroffen; argyrophile neuronale Inklusionen in Hirnstammkerngebieten, Hypothalamus und Basalganglien	Tau / Mutationen an Exon 9, 10, 12, 13 am Chromosom 17q immunpositiv für phosphoryliertes Neurofilament und Ubiquitin, immunnegativ für β -Amyloid
Argyrophile Körnerkrankheit	vermutlich verantwortlich für late-onset Demenz, in welchen keine neuropathologischen Veränderungen gefunden werden	<u>Mikroskopisch:</u> Zytoskelettveränderungen nicht im HE-Schnitt zu erkennen, nur im Silberimprägnationsverfahren; bestehen aus kleinen, argyrophilen Körnchen verstreut im Neuropil und aus farbigen Körpern mit silberangefärbten Filamenten in der subcorticalen weißen Substanz; finden sich am häufigsten in der CA1 Region des Hippocampus, Schicht II der Entorhinalrinde, Amygdala und fronto-orbitalen Region	
b) α-Synucleinopathien (Erkrankungen mit Lewy-Körpern)			
Demenz mit Lewy-Körpern (DLB)	Chronisch progressive neuropsychiatrische Erkrankung, klinische Charakteristika von Parkinsonismussymptome mit oder ohne Demenz	zahlreiche Lewy-Körper (eosinophile Strukturen, dichter Kern mit konzentrisch lamellierter Erscheinung, geordnete Neurofilamente durchmischt mit Mitochondrien, Lipofuscin und glattem ER, 15 μ m \emptyset), häufig in Schicht V und VI, abiotrophe Degeneration im ZNS, häufig kombiniert mit senilen Veränderungen, Verlust pigmentierter Neurone, Aggregation von Melanin, β -Amyloid-Ablagerungen	α -Synuclein, ApoE ϵ 4 / immunreaktiv mit AK gegen Ubiquitin, Neurofilamentprotein, Tubulin, MAP-1 und -2
M. Parkinson mit Demenz (PDD)	idiopathischer Morbus Parkinson mit später subcorticaler Demenz; Tremor, Rigor, Akinese	<u>Makroskopisch:</u> Depigmentierung der Substantia nigra <u>Mikroskopisch:</u> Degeneration nigrostriataler dopaminergener Neurone, Ausfall catecholaminergener Neurone auch in anderen Kerngebieten des Hirnstamms, Lewy-Körper in überlebenden Neuronen der Hirnrinde jedoch ohne Plaques oder Tangles, einige diffuse Plaques im Neocortex, mehrere Tangles im entorhinalen Cortex sowie Hippocampus	α -Synuclein, Parkin1

<i>Erkrankung</i>	<i>Klinik</i>	<i>Morphologie / Histologie</i>	<i>Gen / Biochemie / Marker</i>
<u>Multisystematrophie</u> [Olivo-Ponto-Cerebelläre Atrophie (OPCA), Striato-Nigrale Degeneration (SND), Autonome Dysregulation (Shy-Drager-Syndrome)]	Parkinsonismus, autonome Störungen, zerebelläre Ataxie, meist fehlende Demenz	<u>OPCA:</u> Nervenzellverlust der pontinen Kerngebiete, Nucleus olivaris inferior und Kleinhirn <u>SND:</u> reaktive Astrogliose und Mikrogliose, neuronaler Verlust im Putamen posteriore laterale, Nervenzellverlust in der Substantia nigra ohne Lewy-Körper <u>Shy-Drager-Syndrom:</u> Veränderungen im posterioren lateralen Putamen, Nervenzellverlust in der Substantia nigra ohne Lewy-Körper sowie in den Seitensträngen des Rückenmarks <u>gemeinsam:</u> gliale zytoplasmatische Inklusionen (Gallyas-positiv), meist in der weißen Substanz und in Oligodendrogliazellen	α -Synuclein
c) Ubiquitinopathien			
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	Spastische Parese, Bulbärsyndrom, motorische Systemdegeneration	Degeneration zentraler und peripherer Motoneuronen (Vorderhornzellen, Vorderwurzel, Bulbärkerne), runde Bunina-Körper (aggregierte 10 nm Neurofilamentfäden)	SOD 1, ALS 1-X / Ubiquitin positive Zell- und Kerneinschlüsse
Moto-Neuron Erkrankung mit Demenz (MND)		Atrophie Frontal- und Temporallappen; neuronaler Verlust, Spongiosität und Astrogliose in Schichten I-III; Verlust der Motoneuronen im Rückenmark; neuronale Inklusionen	neuronale Inklusionen: Ubiquitin-positiv aber Tau- und PHF-negativ
d) Polyglutamin-Erkrankungen			
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	siehe Ubiquitinopathien	siehe Ubiquitinopathien	siehe Ubiquitinopathien

Erkrankung	Klinik	Morphologie / Histologie	Gen / Biochemie / Marker
Chorea Huntington (Polyglukosanstörung)	Verhaltensstörungen, choreiforme Hyperkinesien, Rigor, Akinese, Ataxie, Demenz, autosomal-dominant vererbt	<u>Makroskopisch:</u> geringere Hirnmasse, stark atrophierter Nucleus caudatus, verkleinertes Putamen, Seitenventrikel erweitert <u>Mikroskopisch:</u> Verlust der Neurone im Globus pallidus, ventrolateralen Thalamus und Kerngebieten des Subthalamus, der mittelgroßen Spiny-Neurone (enthalten GABA-Substanz P oder GABA-Enkephalin); reaktive Astroglie; Hirnrinde erscheint atroph, jedoch keine histopathologischen Auffälligkeiten, Ausfall der Pyramidenzellen in Schichten III, V und VI des Frontallappens und CA1 Region des Hippocampus, neuronale Kerneinschlüsse von Huntingtin und Ubiquitin	Huntingtin, CAG-Trinukleotid-Wiederholung, Chromosom 4
e) Lobäratrophien			
Fronto-Temporale Demenz (FTD)	Störungen von Persönlichkeit, sozialem Verhalten, episodischem Gedächtnis und Sprache mit oder ohne Muskelatrophie	<u>Makroskopisch:</u> symmetrische Atrophie Frontal- und vorderer Temporallappen, schicht-spezifischer Verlust von Nervenzellen, erweitertes Ventrikelsystem, Spongiosität, reaktive Astroglie, Myelinverlust, <i>Fehlen</i> von Pick-Körpern und Pick-Zellen,	ohne Tau-Pathologie
Morbus Pick	siehe Tauopathien	siehe Tauopathien	siehe Tauopathien
Seltene corticale Demenzformen			
Guam-Neurodegeneration	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS, Motoneurondysfunktion), Parkinsonismus und Demenz; treten individuell oder in Kombination auf	<u>Mikroskopisch:</u> Verlust pigmentierter Neurone der Substantia nigra pars compacta, NFTs in Hippocampus, Entorhinalrinde und Neocortex; eosinophile, stäbchenförmige Körper (Hirano-Körper); Lewy-Körper in Substantia nigra, Hirnrinde und Rückenmark, granulovacuoläre Degeneration, diffuse Amyloidablagerungen	
„Plaque-only“ Alzheimer disease		erhöhte Anzahl neocorticaler Plaques in Gyrus frontalis medius und temporalis superior; keine neocorticalen Tangles, Auftreten von Lewy-Körpern, wird daher als Lewy-Körper-Variante (LBV) des M. Alzheimer betrachtet	

<i>Erkrankung</i>	<i>Klinik</i>	<i>Morphologie / Histologie</i>	<i>Gen / Biochemie / Marker</i>
Morbus Down (Trisomie 21)		Atrophie der cerebralen Hemisphären, senile Plaques und Verlust der Pyramidenneuronen steigen mit dem Alter; Zusammenhang zwischen extrachromosomalem Material und Plaque- / Tangleablagerung ist unklar	
Diffuse neurofibrilläre Tangles mit Kalzifikation (DNTC)	progressive corticale Demenz, begleitet durch psychiatrische und neurologische Symptome ähnlich Morbus Pick und Parkinsonismus	temporale Atrophie mit Kalzifikationen im Globus pallidus und Nucleus dentatus; NFTs im Temporallappen jedoch keine Pick-Körper und keine senilen Plaques	immunpositiv für NFT immunnegativ für β -A4
Vaskulär-bedingte Demenzen			
Cerebrale Amyloid-Angiopathie (CAA)		Ablagerung von beta-Amyloid in leptomeningealen und corticalen Gefäßen ausgelöst durch ischämische / hämorrhagische Veränderungen	
CADASIL	durch rezidivierende Schlafanfälle, Migräne und Demenz gekennzeichnet	Cerebrale Autosomal-Dominante Arteriopathie mit subcorticalen Infarkten and Leukoenzephalopathie ; sowie Lakunen und Markschäden; vorwiegend in Basalganglien und Thalamus	Gendefekt auf Chromosom 19p12
Morbus Binswanger (SAE)	progredienter intellektueller Abbau, mnestiche Funktionsstörungen, neurologische Ausfälle nach ischämischen Insulten	Subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie bei Mikroangiopathie, markante Atrophie der weißen Substanz, zudem meist verfärbt, hart und Foci von Infarkten: Erweiterung des 3. Ventrikel sowie der Seitenventrikel und bilaterale Myelinblässe	
Prionen-Erkrankungen (Infektiös-entzündliche Ursachen)			
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sporadisch)	diffuse Hirnatrophie, progressive Demenz, Kleinhirnsymptome, Myoklonien, Erblindung	<u>Makroskopisch</u> : spongiforme Enzephalopathie, Neuronenverlust, Astroglie, Prionenplaques diffuse, synaptische oder perivasale Ablagerungen von PrP im Gewebe	PrP-Codon 129
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	spastische Paraparese, Kleinhirnataxie, Nystagmus, Myoklonien, Demenz	<u>Makroskopisch</u> : spongiforme Enzephalopathie, Neuronenverlust, Astroglie, Prionenplaques multizentrische PrP-Amyloidplaques	PrP-Codon 129

1.2 Morbus Alzheimer

1.2.1 „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907)

Morbus Alzheimer wurde erstmals 1906 dokumentiert, als der bayerische Nervenarzt Alois Alzheimer über seine Patientin Auguste D. notierte: "Eine Frau von 51 Jahren zeigte als erste auffällige Krankheitserscheinung Eifersuchtsideen gegen den Mann. Bald machte sich eine rasch zunehmende Gedächtnisschwäche bemerkbar, sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht, schleppte Gegenstände hin und her, versteckte sie, zuweilen glaubte sie, man wolle sie umbringen und begann, laut zu schreien." Als Auguste D. fünf Jahre später starb, untersuchte Alzheimer deren Gehirn und fand darin steinharte Ablagerungen, die so genannten Plaques und Fibrillen.



Die Alzheimer-Krankheit macht den größten Teil der primär degenerativen Demenzen im höheren Lebensalter aus. Dieses Krankheitsbild ist am umfangreichsten erforscht und in der Literatur beschrieben. Synonyme zur Bezeichnung sind:

- Morbus Alzheimer
- Präsenile Demenz
- Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)
- Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT)
- Alzheimer-Demenz (AD)
- engl. Alzheimer's disease (AD)

Definiert wird die Erkrankung als „Von A. Alzheimer (1907) erstmals beschriebene präsenile Demenz mit fortschreitender Hirnatrophie, pathologischen Fibrillenveränderungen und senilen Plaques. Wesentlich häufiger ist die nach dem 65. Lebensjahr beginnende senile Demenz vom Alzheimer-Typ, die sich von der klassischen Form klinisch, pathophysiologisch und morphologisch nicht unterscheidet“ (Masuhr 1998).

Die Alzheimer-Krankheit ist die vierthäufigste Todesursache in den USA und eine der häufigsten Geisteskrankheiten überhaupt. Die Anzahl der Erkrankungsfälle (Prävalenz) beträgt ca. 4 Millionen in den USA und ca. 6 Millionen in Europa. In den westlichen Ländern sind ca. 5 % der über 65-Jährigen und 20 % der über 80-Jährigen betroffen; das Risiko wächst mit zunehmendem Alter. In Deutschland leiden zwischen 6 % und 9 % der Altenbevölkerung an einer Demenz, was einer gegenwärtigen Gesamtzahl von 800.000 bis 1,2 Millionen Erkrankten unter den über 65-Jährigen entspricht, wovon ca. 650.000 Menschen an Alzheimer erkrankt sind. Die Neuerkrankungsrate (Inzidenz) steigt von 0,3 % unter den 65-69-Jährigen bis zu 7 % unter den über 90-Jährigen. Pro Jahr treten 200.000 Neuerkrankungen an Demenz auf, 120.000 davon an Alzheimer und 60 % der Inzidenz-Fälle treten bei den über 80-Jährigen auf (Bickel 2000).

Das Risiko des Einzelnen, selbst einmal an einer Demenz zu erkranken, hängt stark von der individuellen Lebenserwartung ab. Frauen stehen diesbezüglich unter einem höheren Risiko als Männer. Ihr Lebenszeitrisiko für eine Demenzerkrankung wird nach den Ergebnissen der Rotterdam-Studie mit 34,5% beziffert, das Risiko der Männer in Folge der geringeren Lebenserwartung hingegen auf nur 16% (Ott, Breteler *et al.* 1998). Somit sind im Durchschnitt 70 % der Demenzpatienten weiblich. Im Allgemeinen deuten die epidemiologischen Studien jedoch nicht auf Geschlechtsunterschiede in der altersspezifischen Prävalenz oder Inzidenz von Demenz-Erkrankungen hin. Zweifellos ist die Zahl der Demenzkranken in den letzten Jahrzehnten angestiegen, doch lässt sich dieser Anstieg durch die höhere Lebenserwartung und die zunehmende Zahl von älteren Menschen erklären. In den letzten 100 Jahren hat sich die Zahl der über 65-Jährigen in Deutschland vervierfacht; die Zahl der über 80-Jährigen hat sich sogar verzehnfacht. Es gibt dennoch keinen Beleg dafür, dass sich das altersspezifische Erkrankungsrisiko verändert hätte.

1.2.2 Klinisches Bild und Verlauf der Alzheimer-Krankheit

Die Symptome, die während der Alzheimer-Krankheit auftreten, betreffen nicht nur das Gedächtnis und das Erinnerungsvermögen. Das allmähliche Auftreten von Gedächtnisstörungen gilt als Kardinalsymptom. Im Verlauf der Krankheit kommt es zu Störungen der Konzentration und Wortfindung, **zeitlicher und räumlicher Desorientierung**, Störungen der Stimmung, des Schlafes und des Antriebs. Körperliche

Einschränkungen der Beweglichkeit und Motorik und auch Persönlichkeitsveränderungen treten in späten Stadien auf. Mit zunehmendem Krankheitsbewusstsein entwickelt sich eine reaktive Depression.

B. Reisberg hat den Verlauf der Alzheimer-Krankheit in 7 Stadien eingeteilt. Sie beziehen sich auf einen unkomplizierten Verlauf ohne zusätzliche körperliche Erkrankungen und Behinderungen (siehe Tabelle 1.2-1).

Tabelle 1.2-1 : Functional Assessment Staging (FAST) (Reisberg 1988)

Alzheimer Stadium	Beschreibung/Diagnose	Dauer des Stadiums
1	Normal	-
2	Subjektive Beschwerden	-
3	Mitarbeiter bemerken eine reduzierte Arbeitsleistung; Schwierigkeiten, sich an fremden Orten zurecht zu finden	7 Jahre
4	Verminderte Fähigkeiten komplexe Aufgaben durchzuführen (z.B. ein Abendessen für Gäste vorzubereiten, mit Geld umzugehen, einzukaufen, usw.)	2 Jahre
5	Selbständiges Überleben ohne Hilfe nicht gewährleistet, Probleme bei der Auswahl der Kleidung	1,5 Jahre
6	Verlust grundlegender Tätigkeiten des Alltags (Anziehen, Waschen, Toilettengang, Urinkontrolle, Darmkontrolle)	2,5 Jahre
7	Verlust der Sprache und der Psychomotorik	6 Jahre und mehr

Frühstadium: Vergesslichkeit

Im frühen Stadium der Erkrankung (1-3) werden die ersten Symptome oft kaum bemerkt. Der Beginn ist so schleichend, dass weder Familie noch Patient den Krankheitsbeginn festlegen können. Die Betroffenen leiden unter nachlassendem Gedächtnis, vor allem des Kurzzeitgedächtnisses, haben Probleme mit Zeitgefühl und Orientierung, abstraktes Denken und Urteilsfähigkeit nehmen ab. Alzheimer-Kranke registrieren ihre Schwierigkeiten anfangs bei vollem Bewusstsein. Die Krankheit entwickelt sich aus dem normalen Leistungsniveau eines Erwachsenen heraus (Stadium 1) und erste subjektive Beschwerden kennzeichnen das zweite Stadium. In beiden Stadien werden keine klinischen Symptome in Sinne einer Alzheimer-Krankheit festgestellt. Das dritte Stadium scheint ein Übergangsstadium zwischen Normalzustand und Demenz zu sein. Die ersten Symptome einer kognitiven Minderleistung treten auf. In der Literatur wird dieser Zustand zwischen normalem Alterungsprozess und sehr früher, klinisch diagnostizierbarer Demenz als „Mild Cognitive Impairment“ (MCI) bezeichnet und beschreibt einen frühen, aber

abnormalen Zustand der kognitiven Beeinträchtigung. Ungefähr 12 % der MCI-Patienten entwickeln eine Demenz (Petersen 2004).

Mittleres Stadium: Deutliche Ausfälle

Ab dem vierten Stadium wird die klinische Diagnose „Demenz“ gestellt und die Betroffenen haben Schwierigkeiten, komplexe Aufgaben im Beruf oder Alltag durchzuführen. Kranke werden immer vergesslicher, Bewegungen werden unpräziser und sie haben Schwierigkeiten bei alltäglichen Verrichtungen und zunehmend Probleme mit der **räumlichen Orientierung**. Sie verlieren das Zeitgefühl und haben mit Wahrnehmungsstörungen und Sinnestäuschungen zu kämpfen. Indirekte Folgen sind Aggressionen, Angstzustände, Depressionen, Halluzinationen, Anspannung, Unruhe und Reizbarkeit. Die neurologischen Defizite treten nicht immer in der gleichen Reihenfolge auf. Nachdem der Krankheitsprozess im Hippocampus des Temporallappens begonnen hat, breitet er sich beim Patienten individuell in unterschiedlicher Geschwindigkeit und Stärke auf verschiedene Regionen des Assoziationskortex aus.

Fortgeschrittenes Stadium: Kontrollverlust

Ab Stadium 5 können Betroffene ihr Leben nicht mehr alleine führen und sind von der Hilfe anderer vollkommen abhängig. Betroffene haben Schwierigkeiten, ihre Kleidung nach Jahreszeit und Anlass auszuwählen und das Gedächtnis ist nicht mehr in der Lage, neue Informationen zu speichern und es treten ausgeprägte **Benennungsstörungen** auf.

Im sechsten Stadium verlieren Betroffene die Fähigkeit, grundlegende Aktivitäten des täglichen Lebens auszuführen. Er vergisst wie man Gebrauchsgegenstände benutzt, wobei Kraft und Koordination erhalten geblieben sind. Zunächst gibt es Schwierigkeiten, sich selbstständig anzuziehen, ein Bad zu nehmen, Schwierigkeiten in der Toilette und am Ende des sechsten Stadiums kommt es zur Stuhlinkontinenz und zum Verlust der Darmkontrolle. Der Beginn des siebten Stadiums kennzeichnet sich durch eine markante Einschränkung der Sprechfähigkeit und die Sprache beschränkt sich auf wenige Wörter. Angehörige werden häufig nicht mehr erkannt; dennoch reagiert der Kranke positiv auf Berührung und vertraute Stimmen. Zusätzlich kommen jetzt körperliche Symptome hinzu. Der Betroffene verlernt die Fähigkeit, zu stehen und zu gehen, anschließend selbstständig zu sitzen, den Kopf aufrecht zu halten, zu lächeln und zu schlucken. Primitivreflexe treten wieder auf.

Nachdem die Diagnose „Alzheimer-Krankheit“ zum ersten Mal gestellt wurde, leben die Betroffenen im Durchschnitt noch etwa 6 bis 10 Jahre, manche aber auch bis zu 20 Jahren. Im Einzelfall ist der Verlauf aber nie vorhersehbar. Im Endstadium verfallen die körperlichen Kräfte zusehends. Die Patienten werden bettlägerig. Sie sterben meist an typischen Alterskrankheiten wie Lungenentzündung, respiratorischer oder kardiovaskulärer Genese, infektbedingte Komplikationen der Bettlägerigkeit wie zum Beispiel Pneumonie (© PFIZER Pharma GmbH 2005).

1.2.2.1 Makroskopische Veränderungen

Makroskopisch ist eine sich über wenige Jahre entwickelnde diffuse zerebrale Atrophie zu beobachten. Pathophysiologisch zeigt das Krankheitsbild eine diffuse Hirnrindenatrophie, wobei die Abnahme der kortikalen Synapsendichte frontal und temporobasal am deutlichsten ausgeprägt ist (siehe Abb. 1.2-1). Eine deutliche Atrophie von Hippocampus und Mandelkern (Corpus amygdaloideum), Vertiefung der Windungsfurchen sowie Erweiterung der Hirnkammern treten auf. Das Gehirn schrumpft um bis zu 20 % durch Verlust der Nervenzellen.

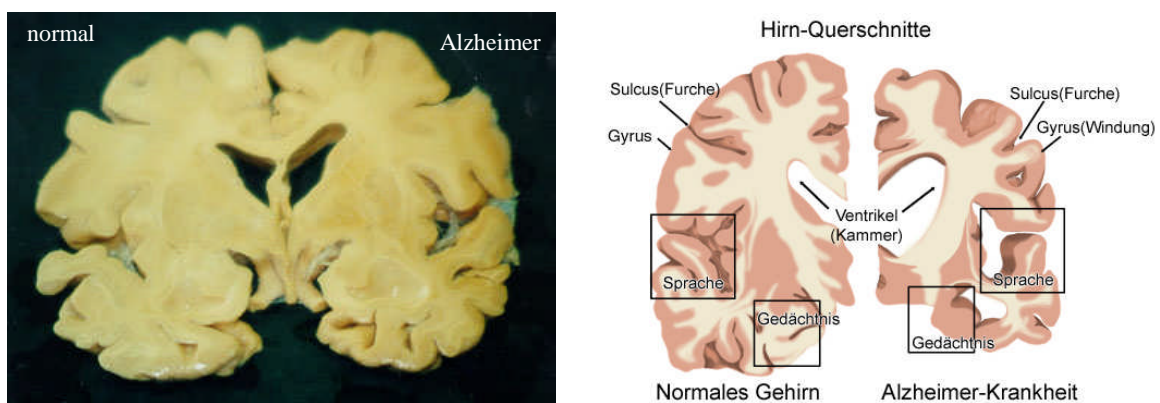


Abbildung 1.2-1 : Querschnitt durch das Gehirn in Frontalansicht Die linke Hälfte der Querschnitte repräsentiert jeweils ein normales Gehirn, die rechte Hälfte ein Gehirn mit Alzheimer-Krankheit. Zu erkennen sind Schrumpfung der Rinde (erweiterte Sulci, Vertiefung der Gyri) und stark erweiterte Ventrikel. Die Areale für Sprache und Gedächtnis zeigen eine deutliche Abnahme. (http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/illus_gehirnmit.htm)

1.2.2.2 Mikroskopische Veränderungen

Alzheimer ist charakterisiert durch eine Reihe von Abnormalitäten im Gehirn, die selektiv Neurone in spezifischen Regionen betreffen, besonders im Neocortex, dem entorhinalen Bereich, Hippocampus, Amygdala, Nucleus basalis, vorderer Thalamus und mehrere

monoaminerge Kerne des Hirnstamms (Locus coeruleus und Raphe Complex). Die geschädigte Region des Gehirns, die Dysfunktion und das Absterben der Neurone ist assoziiert mit Zytoskelett-Abnormalitäten und endet in einem verminderten Gehalt an synaptischen Proteinen in der Region des Gehirns, in denen die Neurone enden. Die Verteilung und das Ausmaß folgen charakteristischen Mustern, die regionenspezifisch und zellspezifisch sind. Die am meist betroffenen Neurone im Neocortex und der Entorhinalen Region sind große glutaminerge Pyramidenneurone (im Neocortex auch Interneurone). Im Hippocampus, besonders in der CA1- und CA2-Region, sind die Pyramidenzellen bevorzugt geschädigt. Die cholinergen Neurone des Nucleus basalis, Nucleus septal media und das diagonale Band von Broca, das den „principal cholinergic Pathway“ zum Neocortex und Hippocampus darstellt, sind zerstört. Dies zeigt sich in einer Erniedrigung des Gehalts an Acetylcholin und cholinergen Markern in dem Projektionsbereich. Andere betroffene Nervenzellen umfassen bestimmte Kerne in der Amygdala, den vorderen Kernen des Thalamus, Locus coeruleus und Raphe-Kernen (Weis 1997).

Die am häufigsten auftretende Veränderung des Zytoskeletts sind neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs). Es sind filamentöse Einschlüsse in den Zellkörpern und proximalen Dendriten, die paarig helikale Filamente (engl. paired helical filaments, PHFs) und gerade Filamente enthalten (siehe Abb. 1.2-2). NFTs treten oft zuerst in den Neuronen des Entorhinalen Cortex auf, der seinen Input vom Isocortex erhält und zum Hippocampus projiziert. Spätere neurofibrilläre Pathologie weitet sich auf den Neocortex aus. Andere fibrilläre zytoskelettäre Veränderungen betreffen Axone und Endigungen (dystrophische Neurite) sowie Dendriten (neuropile Fäden). Als Neuropil werden im ZNS zwischen den Zellkörpern gelegenes, amorph erscheinendes Geflecht bezeichnet, das vor allem aus Dendriten besteht. Beide Läsionen beinhalten zelluläre PHFs.

Das zweite charakteristische pathologische Merkmal der Alzheimer-Krankheit, die sogenannten Amyloidablagerungen („Plaques“), sind fast ausschließlich im extrazellulären Raum des Gehirns sowie im zerebralen Blutgefäßsystem nachweisbar (Selkoe 1999). Mikroskopisch unterscheidet man zwei Subklassen von Amyloidplaques, die neuritischen/senilen und die diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques sind gekennzeichnet durch einen dichten Amyloidkern („amyloid-core“), der von degenerierten Axonen und Dendriten (Braak, Braak *et al.* 1996), sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten umgeben ist (Pike, Cummings *et al.* 1994). Diese kompakten neuritischen Amyloidplaques sind spezifisch für die Alzheimer-Krankheit (siehe Abb. 1.2-2), während

die diffusen Amyloidplaques auch in Gehirnen nicht dementer, alter Menschen nachweisbar sind (Hardy and Selkoe 2002). Diffuse Amyloidplaques sind hauptsächlich im Cerebellum nachweisbar und bedingen in der Regel keine bis wenige zelluläre Veränderung (Yamaguchi, Nakazato *et al.* 1989). Derzeit wird davon ausgegangen, dass diffuse Plaques die Vorstufe der neuritischen Plaques darstellen und somit am Beginn der Krankheit stehen (Giaccone, Tagliavini *et al.* 1989; Tagliavini, Giaccone *et al.* 1988).

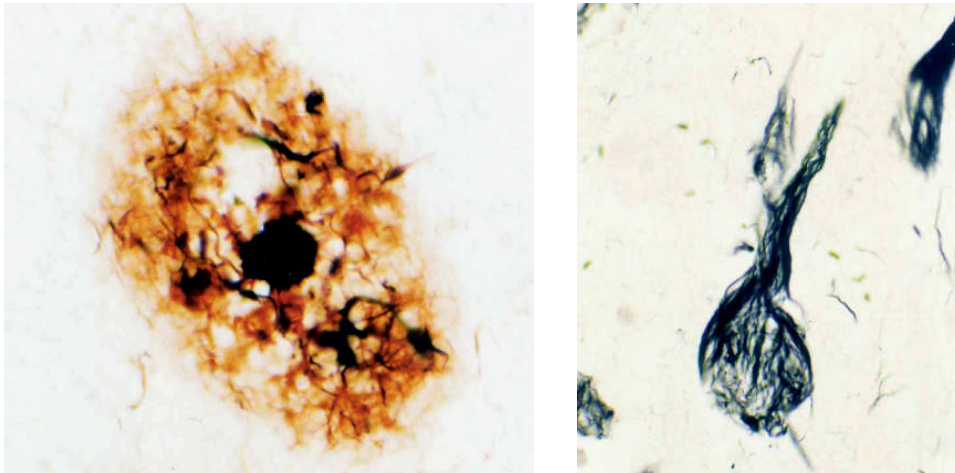


Abbildung 1.2–2 Pathologische Merkmale der Alzheimer Erkrankung Links: Extrazellulärer Plaque, zum Großteil bestehend aus β -Amyloid, und rechts: intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Tangles) bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Bogdanovic 2000).

Über die zeitliche Entwicklung von NFTs und ihre topographische Ausbreitung im Gehirn haben Braak & Braak (1991) berichtet. Die untersuchten Gehirne von dementen sowie nicht-dementen, verstorbenen Personen wurden hinsichtlich der Amyloidablagerungen im Extrazellularraum und der Bildung intraneuronaler neurofibrillärer Veränderungen beurteilt. Das Verteilungsmuster und die Packungsdichte der Amyloidablagerungen und der neuritischen Plaques zeigten eine sehr hohe Variationsbreite. Im Gegensatz zu den Plaques korrelieren Dichte und Verteilungsmuster von Alzheimerfibrillen und Neuropilfäden wesentlich besser mit dem klinischen Schweregrad der neuropsychologischen Beeinträchtigung. Das Auftreten und das Verteilungsmuster von Fibrillen und Neuropilfäden verlaufen nach einem stereotypen Muster. Dies ermöglichte eine Differenzierung von 6 unterschiedlichen Stadien, welche meistens in drei zusammengefasst und als **Braak-Stadien** bezeichnet werden. Die Stadien I und II charakterisieren eine mäßige bis stärkergradige Veränderung der transentorhinalen Prä- α -Schicht im Hippocampus.

Die Stadien III und IV sind als limbische Stadien charakterisiert und zeigen eine stärkere Beteiligung der Prä- α -Schicht in der transentorhinalen Region als auch im entorhinalen Cortex. Weiterhin zeigt sich in diesem Stadium eine sehr geringe Beteiligung des ersten Ammonshornsektors des Hippocampus(siehe Abb. 1.2-3).

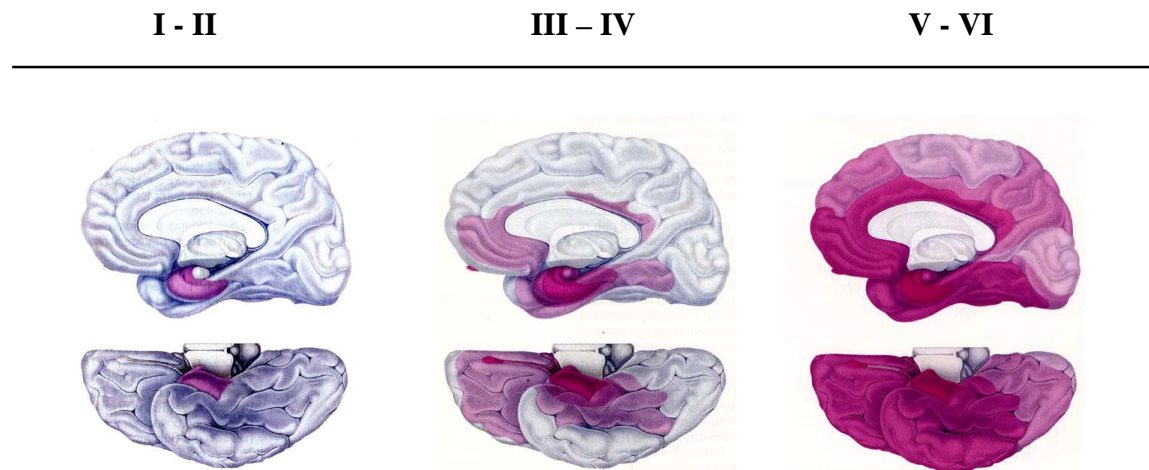


Abbildung 1.2-3 Staging der neurofibrillären Alzheimer-Pathologie Einteilung der Stadien nach Braak & Braak; die rote Farbe kennzeichnet betroffene Areale und das Fortschreiten der Erkrankung (Braak and Braak 1991)

Die Stadien V und VI sind gekennzeichnet durch die Beteiligung isocorticaler Assoziationsareale. Beim Nachweis von zahlreichen neuritischen Plaques und Neurofibrillenveränderungen entsprechend einem Braak Stadium V oder VI besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Demenz durch Morbus Alzheimer verursacht wurde.

1.2.3 Diagnostik

Die Präzision klinischer Diagnosen für Demenzen, im Besonderen der Alzheimer-Erkrankung, hat in den letzten zwanzig Jahren große Fortschritte gemacht. Dennoch ist die Diagnose nach wie vor nur im Ausschlussverfahren möglich. Mit Ausnahme der Gehirnbioptie gibt es noch keine Tests, die definitiv die Diagnose Alzheimer am lebenden Patienten zulassen und so kann die gesicherte Diagnose immer noch erst postmortem am Gehirn festgestellt werden. Um die Diagnose zu erstellen und andere Ursachen der Demenz auszuschließen, vertrauen Ärzte auf Daten von Patienten, physische, neurologische und psychiatrische Untersuchungen, neuropsychologische Tests, Laborbeurteilungen und bildgebende Verfahren (Vollmar, Koch *et al.* Version 05/2005).

Zu Beginn werden eine Eigen- und Fremdanamnese durchgeführt, die die frühen Symptome und deren Zeitverlauf darstellen sollen. Auch wird die Überlagerung mit

anderen möglichen auslösenden Faktoren wie systemische Erkrankungen und Medikamenteneinnahme sowie potenziellen Risikofaktoren in einer körperlichen Untersuchung erfasst. Zusätzlich zu Anamnese und klinischer Untersuchung werden standardisierte (psychometrische) Tests einbezogen wie zum Beispiel Mini-Mental-Status-Test (MMST), DemTect®, Uhrzeit-Zeichnen-Test (UZT, CCT=Clock Completion Test), instrumentelle Aktivitäten des täglichen Lebens (IADL), Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung (TFDD). Für die Diagnosesicherung kann es notwendig sein, die Tests im Verlauf einer Erkrankung mehrfach durchzuführen (Vollmar, Koch *et al.* Version 05/2005).

In einer ersten Screening-Untersuchung werden Laborparameter erfasst (Blutbild, Urin, Schilddrüsenhormone, Elektrolyte einschließlich Serum-Kalzium und Glukose). In den letzten Jahren wurden bildgebende Verfahren entwickelt, die es ermöglichen, am lebenden Patienten das Gehirn zu untersuchen. Eine Abbildung des Gehirns ist mit Hilfe der Computer-Tomographie (CT) oder der Magnetspinresonanz-Tomografie (MRT) möglich geworden. Beide Verfahren sind für die Diagnose von raumfordernden Ursachen einer Demenz (Primärtumor, Metastasen, Blutung, Hydrozephalus) geeignet. Mittels einer Temporal-CT kann eine nachweisbare Hippocampusatrophie eine wichtige Hilfe bei der Diagnose einer Alzheimer-Demenz darstellen.

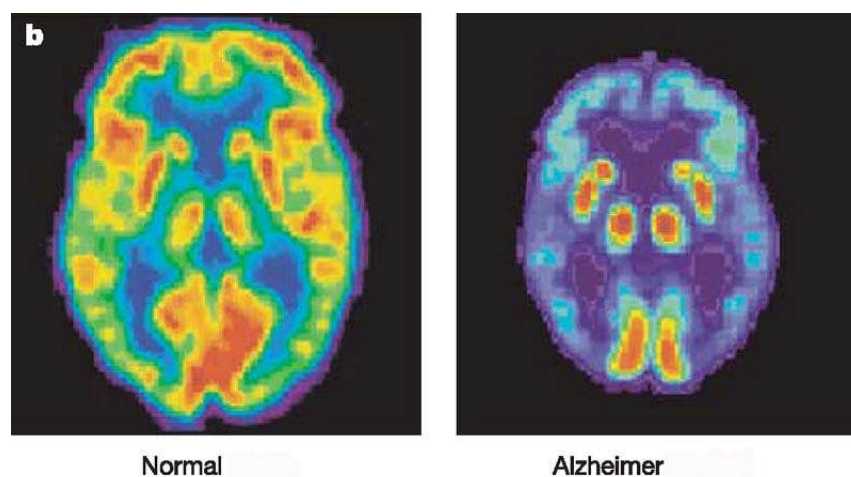


Abbildung 1.2-4 Positronen-Emissions-Tomographie des Gehirns Rote und gelbe Bereiche deuten Glukose-Aufnahme an. Im Alzheimergehirn rechts verminderter Glukose-Metabolismus im frontalen Cortex und Temporallappen im Vergleich zum gesunden Gehirn links (aus: Mattson 2004).

Eine Weiterentwicklung der Methoden stellen die Single-Photon-Emissions-Tomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar (siehe Abb. 1.2-4). Diese zeigen bei einer vorliegenden Alzheimer-Demenz eine Verminderung von Durchblutung

und Stoffwechsel in bestimmten Bereichen des Gehirns an. Ihr Nutzen ist nach heutigen Wissensstand bezüglich der Diagnose Morbus Alzheimer jedoch umstritten (Vollmar, Koch *et al.* Version 05/2005).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten

1.2.4.1 Medikamentöse Therapie

Es sind verschiedene Medikamente zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung und anderer Demenzformen, so genannte Antidementiva, zugelassen. Ihre Wirkmechanismen sind jedoch sehr unterschiedlich, da die Ursachen für das Absterben von Neuronen außerordentlich vielfältig sind: Anhäufung von A β -Plaques, vermehrt gebildete Sauerstoffradikale, mitochondriale Fehlfunktion gefolgt von apoptotischem Zelltod, Störung der cholinergen, dopaminergen und glutamatergen Neurotransmission.

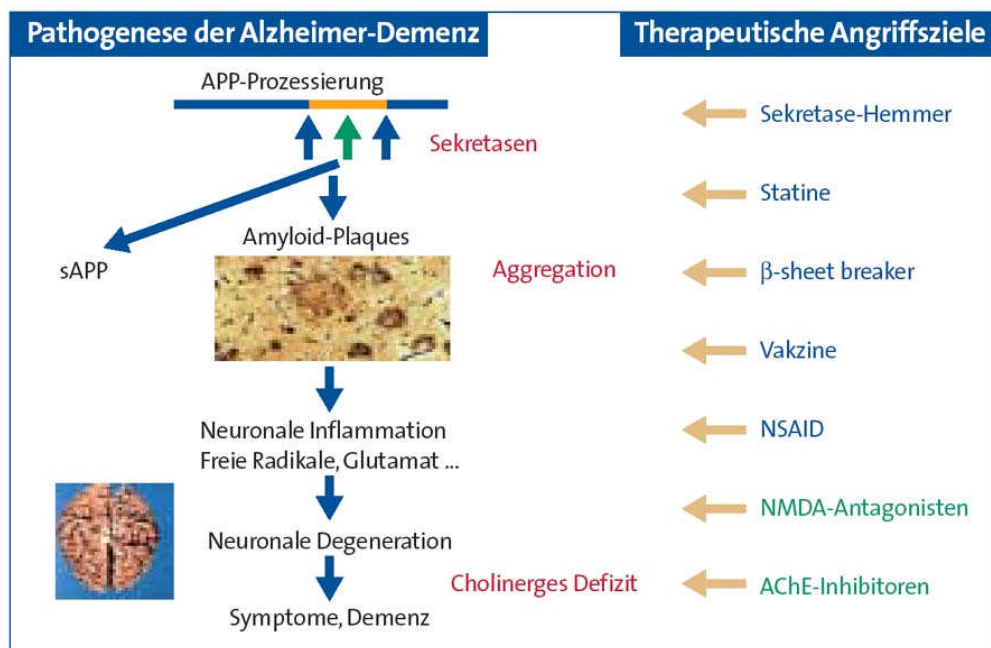


Abbildung 1.2–5 Therapieansätze bei Alzheimer-Demenz Trotz vielfältiger denkbarer Therapieansätze sind derzeit nur für zwei Substanzgruppen (grün) eine antidementive Wirksamkeit und Verträglichkeit belegt (Zukunftsforum Demenz 2004).

Zur Behandlung der Alzheimer-Demenz werden Acetylcholinesterasehemmstoffe, der NMDA-Antagonist Memantin, das Nootropikum Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt verwendet(siehe Abb. 1.2-5). Die Wirkmechanismen von Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt sind jedoch noch nicht genau geklärt.

Die hier vorgestellten Therapieoptionen sind der Empfehlung „Demenz, Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnose und Therapie“ entnommen (Vollmar, Koch *et al.* Version 05/2005).

Acetylcholinesterasehemmstoffe

Bei Alzheimerpatienten konnte ein selektiver Verlust von cholinergen Neuronen diagnostiziert werden (Davies and Maloney 1976). Um das cholinerge Defizit auszugleichen, werden Hemmstoffe der Acetylcholinesterase eingesetzt. Diese Therapie zielt darauf ab, den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), der den Reiz eines Nervenimpulses durch den synaptischen Spalt auf das Folgeneuron überträgt, nicht sofort durch das Enzym Acetylcholin-Esterase abbauen zu lassen. Dadurch wird eine längere Stimulation des Folgeneurons erreicht. Durch die Hemmung der ACh-Esterase kann das Defizit an Acetylcholin zumindest teilweise und vorübergehend ausgeglichen werden.

Der erste zentral wirksame Acetylcholinesterasehemmer (Tacrin, Cognex®), der als Antidementivum in die Therapie eingeführt wurde, verbesserte zwar signifikant die kognitive Funktionen, hatte jedoch ein erhebliches Nebenwirkungspotenzial (vor allem Hepatotoxizität). Drei Substanzen aus der Gruppe der Cholinesterasehemmer sind heute in Deutschland verfügbar: Donepezil (z.B. Aricept®), Galantamin (z.B. Reminyl®) und Rivastigmin (z.B. Exelon®). Alle drei Arzneistoffe sind zugelassen zur Behandlung der milden bis moderaten Alzheimer-Demenz. Sie zeigen in erster Linie eine Verbesserung der kognitiven Leistungen bzw. verzögern die Progression der Demenz. Ein klinischer Einfluss auf Alltagsverhalten und -funktion ist nachgewiesen. Argumente, die für eine Cholinesterasehemmertherapie sprechen, sind signifikante Wirkungen der Cholinesterasehemmer im Vergleich zu Placebo, eine durchschnittliche Verzögerung der Demenzprogression von mehreren Monaten und vor allem Patienten, die positiv auf eine Therapie ansprechen, profitieren von einer medikamentösen Therapie. ACh-Esterase-Hemmstoffe bekämpfen jedoch in erster Linie die Symptome der Alzheimer-Erkrankung und können den Krankheitsprogress nicht hinauszögern.

Memantin

Memantin ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA). Im Gehirn ist Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter und Überstimulation kann zu neuronalen Schäden führen, zur so genannten Exzitotoxizität. Glutamat bindet an viele Rezeptoren unter anderem auch an den NMDA-Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei Gedächtnisvorgängen, Demenz und in der Pathologie der Alzheimer-Demenz spielt (Lipton and Rosenberg 1994; Olney, Wozniak *et al.* 1998; Shimizu, Tang *et al.* 2000). Seit 2002 ist Memantin in Deutschland zur Behandlung der

moderaten bis schweren Alzheimer-Demenz zugelassen (z.B. Axura®, Ebixa®). Bei dieser Patientengruppe zeigten sich leichte Verbesserungen sowohl der Alltagsfähigkeiten als auch der kognitiven Leistungsfähigkeit. Es ist der einzige Arzneistoff, der für dieses Indikationsgebiet zugelassen ist. Memantin konnte über einen Zeitraum von 28 Wochen das Fortschreiten der Alzheimer-Demenz vermindern (Reisberg, Doody *et al.* 2003).

Ginkgo biloba-Extrakt

Der standardisierte Extrakt EGb 761 aus den getrockneten Blättern des Fächerblattbaumes *Ginkgo biloba* steht ebenfalls als Antidementivum zur Verfügung. Über den Wirkmechanismus von EGb 761 bzw. seiner einzelnen Bestandteile herrscht jedoch noch Unklarheit. *Ginkgo biloba* (z. B. Tebonin®, Gingium®, Ginkobil®) konnte in einigen Studien eine Verbesserung der kognitiven Hirnleistungsfähigkeit erreichen, in anderen Studien nicht. Eine Verbesserung klinisch relevanter und beobachtbarer Funktionen ist allerdings nicht reproduzierbar nachgewiesen. Die Ergebnisse der Studien erscheinen zu heterogen und sind teilweise methodisch angreifbar, so dass keine Empfehlung für *Ginkgo biloba* bei Patienten mit Demenz abgegeben werden kann.

Piracetam

Piracetam (2-oxo-1-pyrrolidineacetamid) ist ein zyklisches Derivat der γ -Aminobuttersäure (GABA), weist jedoch keine GABA-Aktivität auf. Es ist ein sehr hydrophiler Arzneistoff, der zu 100 % bioverfügbar ist und nicht metabolisiert wird. Früher wurde Piracetam zur Behandlung des Schwindels verwendet und bei Erkrankungen, die mit dem Alterungsprozess einhergehen. Heute wird es zur symptomatischen Therapie von Hirnleistungsstörungen und zur Behandlung von zerebrovaskulären Beschwerden eingesetzt. Piracetam ist ein nootropischer Arzneistoff (Giurgea 1983), der sowohl bei Tier als auch Mensch die Funktion von kognitiven Prozessen wie z.B. Lernen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit, erhöht. Tsolaki *et al.* konnten zeigen, dass Piracetam die gleiche Wirksamkeit wie Acetylcholinesterasehemmstoffe aufweist (Tsolaki, Pantazi *et al.* 2001). Flicker and Grimley Evans beschreiben jedoch, dass weder für die kognitive Leistungsfähigkeit noch für die Verbesserung klinischer Funktionen überzeugende wissenschaftliche Studien vorliegen (Flicker and Grimley Evans 2001).

1.2.4.2 Neue Therapieoptionen

Statine

Als Statine werden Arzneistoffe bezeichnet, die im Cholesterinstoffwechsel die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) hemmen und dadurch die Konzentration an Cholesterin im Blut senken. Der Zusammenhang zwischen Cholesterin und Alzheimer-Demenz ist schon lange bekannt. ApoE4, ein Protein, das am Transport von Cholesterin beteiligt ist, stellt einen Risikofaktor dar. Statine weisen *in vitro* Effekte auf die APP-Prozessierung auf. In neuronalen und peripheren Zellen erhöhten Statine die α -Sekretase-Spaltung und somit die Bildung des neuroprotektiven löslichen sAPP α bei einer gleichzeitigen Reduktion der A β -Produktion (Fassbender, Simons *et al.* 2001; Kojro, Gimpl *et al.* 2001). Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die Einnahme von Statinen das Risiko an Alzheimer zu erkranken reduzierte (Wolozin, Kellman *et al.* 2000; Jick, Zornberg *et al.* 2000). Prospektive randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien konnten jedoch keinen Nutzen bei Patienten mit altersbedingten kognitiven Defiziten zeigen (Shepherd, Blauw *et al.* 2002; Wald and Law 2002).

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs)

Der Begriff nichtsteroidale Antirheumatika umfasst eine Gruppe von entzündungshemmenden Schmerzmitteln, die im Gegensatz zu den Glukokortikoiden (steroidale Antiphlogistika) nicht alle Phasen der Entzündung hemmen. Nichtsteroidale Antirheumatika hemmen nur die Synthese der Entzündungsmediatoren durch Blockade des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Epidemiologische Studien zeigten, dass Patienten, die lange NSAIDs, in erster Linie Hemmstoffe der Cyclooxygenase 1, einnahmen, ein niedrigeres Alzheimer-Risiko aufwiesen. Auch eine aktuelle Metaanalyse zeigte den protektiven Effekt von NSAIDs auf die Entwicklung von Alzheimer (Etminan, Gill *et al.* 2003). Der protektive Effekt könnte hervorgerufen werden durch die Tatsache, dass NSAIDs (z. Bsp. Ibuprofen) in Zellkultursystemen und in APP-transgenen Tieren die γ -Sekretase-Prozessierung modifizieren und somit zu einem Abfall der A β ₁₋₄₂-Produktion führen, bei jedoch gleichbleibenden Gesamt-A β -Spiegeln (Weggen, Eriksen *et al.* 2001). Dieser Effekt erwies sich als unabhängig vom Ausmaß der Cyclooxygenase-Hemmung. Prospektive Studien mit selektiven COX-2-Hemmern (Naproxen, Rofecoxib) zeigten jedoch keinen Nutzen in der Therapie der Alzheimer-Krankheit (Aisen, Schafer *et al.* 2003; Reines, Block *et al.* 2004).

A β -Vakzine

Im Jahre 1999 wurde ein immunologischer Ansatz getestet, die Alzheimer-Erkrankung mittels Impfung zu bekämpfen. Am APP-transgenen Mausmodell wurde die Bildung der A β -Monomere, Oligomere und Aggregate untersucht. Die parenterale Immunisierung von APP-transgenen Mäusen mit synthetischem, humanem A β_{1-42} führte zur Antikörperbildung, die einherging mit einem Abbau von A β -Ablagerungen und bei Immunisierung von sehr jungen Mäusen mit einer verringerten Bildung von A β -Ablagerungen (Schenk, Barbour *et al.* 1999). Weitere Studien zeigten, dass A β -Immunisierung die A β -Konzentration im Gehirn reduzierte und zur Verbesserung von Lerndefiziten in diesen Mäusen führte (Janus, Pearson *et al.* 2000; Morgan, Diamond *et al.* 2000). Im Mausmodell wurden keine unerwünschten Antigen-Antikörperreaktionen beschrieben. Die Verabreichung der A β_{1-42} -Vakzine an Patienten mit milder bis moderater Alzheimer-Krankheit führte bei 6 % der Patienten zu inflammatorischen Reaktionen im Sinne einer postvakzinalen Meningoenzephalitis (Selkoe and Schenk 2003; Check 2003). Dies führte zum Abbruch der Studie. Eine Nachuntersuchung der Alzheimerpatienten mit hohen Antikörperspiegeln gegen A β zeigte jedoch ein langsames Fortschreiten der kognitiven Defizite bei diesen Patienten (Hock, Konietzko *et al.* 2003). Aus diesem Grund werden gegenwärtig präklinische Studien mit anti-A β -Antikörpern durchgeführt.

Modulation der Sekretasen

Ein weiterer Ansatzpunkt bei frühen Formen der Alzheimer-Demenz stellen die Sekretasen der APP-Prozessierung dar. Auf Substanzen, die die Bluthirnschranke überwinden und zu einem Anstieg der α -Sekretase-Aktivität oder einem Abfall der β - und γ -Sekretase-Aktivität führen, liegt hier das Augenmerk. Durch Gabe von Stimulatoren der α -Sekretase wird die Bildung von löslichem, neuroprotektivem sAPP α gefördert. β - und γ -Sekretase-Hemmstoffe führen zu einer verminderten A β -Produktion. Einige neue Substanzen konnten als γ -Sekretase-Hemmstoffe identifiziert werden: Peptid-Aldehyde (Calpain), Difluoroketone, Cathepsin-D-Inhibitoren und Cathepsin-Y-Blocker (Allain, Bentue-Ferrer *et al.* 2003). γ -Sekretase-Hemmstoffe könnten zu einer 30 – 40%igen Absenkung der A β -Spiegel führen (Selkoe 2004). Ebenso konnten bereits auf Hydroxyethylen basierende peptidometrische Inhibitoren als β -Sekretase-Hemmstoffe synthetisiert werden (Hom, Gailunas *et al.* 2004).

Beta-Faltblatt-Brecher

Ein Schlüsselschritt bei der Bildung des Amyloids ist die Faltung in die β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Wirkstoffe, die diese Faltung verhindern und β -Faltblätter wieder „aufbrechen“ können, stellen einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt dar und werden als Beta-Faltblatt-Brecher („ β -sheet breaker“) bezeichnet. Sie bestehen aus kurzen Peptidketten, die Segmenten aus den amyloidbildenden Proteinen entsprechen und in denen einige Aminosäuren durch ähnliche Bausteine ersetzt wurden (Gilead and Gazit 2004). Bereits 1998 wurde berichtet, dass ein so hergestelltes Protein die Bildung von Amyloid in Gehirnen von Ratten vollständig unterband und zudem bereits gebildete Ablagerungen wieder auflöste (Soto, Sigurdsson *et al.* 1998).

1.2.4.3 Nichtmedikamentöse Therapie

Der Einsatz nichtmedikamentöser Maßnahmen bei Demenzkranken bietet sich in jedem Stadium der Demenzkrankheit an, um das Befinden und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Mit nichtmedikamentösen Maßnahmen wird versucht bestehende Fähigkeiten zu erhalten und gegebenenfalls auszubauen. Dabei hat das Training von alltäglichen Fertigkeiten nachweislich einen vorteilhaften Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Im Anfangsstadium der Erkrankung erfolgt das Training komplexer Verhaltensweisen, im weiteren Verlauf die Unterstützung von Elementarfunktionen wie z.B. das Toilettentraining. Eine Vielzahl von nichtmedikamentösen Therapieformen wird bei Demenzkranken angewendet wie zum Beispiel Verhaltenstherapie, Krankengymnastik, Ergotherapie, Logopädie, Musiktherapie, Gedächtnis-Training und kognitives Training.

1.3 APP und β -Amyloid

Das Amyloid-beta-Peptid ($A\beta$) wurde vor rund 20 Jahren aus Hirnhautgefäßen von Alzheimerpatienten und Down-Syndrom-Patienten isoliert und sequenziert (Glenner and Wong 1984b). Ein Jahr später wurde dieses Peptid als Hauptbestandteil der senilen neuritischen Plaques identifiziert (Masters, Simms *et al.* 1985) und drei Jahre später wurde das APP-Gen (Amyloid-Precursor-Protein) kloniert, das für $A\beta$ kodiert (Kang, Lemaire *et al.* 1987). Durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP entsteht dann β -Amyloid. Amyloid ist der histologische Name für fibrilläres Peptid, das in Aggregaten als β -Faltblattstruktur vorliegt und eine Doppelbrechung polarisierten Lichts erzeugt, wenn es mit Congo Rot oder Thioflavin gefärbt wird (Kandel, Schwartz *et al.* 2000). Aufgrund seiner β -Faltblattstruktur und seines Molekulargewichts von etwa 4 kDa wird es auch als $\beta A4$ bezeichnet (Glenner and Wong 1984a).

1.3.1 Physiologische Funktion von APP und β -Amyloid

Die physiologische Funktion von APP ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise auf eine Rolle als Regulator bei der Synapsenbildung (Priller, Bauer *et al.* 2006), der neuronalen Plastizität (Turner, O'Connor *et al.* 2003) und auf eine Beteiligung am axonalen Transport über eine Interaktion mit Kinesin I (Kamal, Stokin *et al.* 2000). Eine Deletion des APP-Gens in mutierten Mäusen führt nicht zu einer Verkürzung des Lebensalters (Zheng, Jiang *et al.* 1995) und führt zu nur relativ geringen phänotypischen Effekten (Phinney, Calhoun *et al.* 1999).

$A\beta$ wird zumeist als toxisches Nebenprodukt der APP-Prozessierung bezeichnet. Dem Protein wurde meist nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, da die höchsten Konzentrationen in menschlichen Neuronen gefunden wurden und es als ein Indikator des Alterns betrachtet wurde. Interessanterweise kommt es aber auch in großer Menge im gesunden Gehirn vor. Es wurde bereits gezeigt, dass das Protein konstant und während des gesamten Lebens produziert wird. So ist es zum Beispiel in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Blutplasma gesunder Personen zu finden (Seubert, Vigo-Pelfrey *et al.* 1992). Kamenetz und Kollegen konnten zeigen, dass $A\beta$ die exzitatorische Neurotransmission über NMDA-Rezeptoren reduzierte (Kamenetz, Tomita *et al.* 2003) und dadurch die neuronale Aktivität herabgesetzt wurde. β -Amyloid spielt möglicherweise eine wichtige

Rolle bei der Signalübertragung im Gehirn, bei der Bildung und Funktion von Synapsen (Priller, Bauer *et al.* 2006), dem neuronalen Auswachsen und Überleben, wirkt schützend bei oxidativem Stress und überwacht das Eindringen von Toxinen und Pathogenen (Bishop and Robinson 2004).

1.3.2 Bildung von β -Amyloid aus APP

Als APP wird eine heterologe Gruppe von Polypeptiden mit Molekulargewichten von 110–140 kDa bezeichnet, die durch alternatives Spleißen sowie posttranslationale Modifikationen ihre Heterogenität erhalten. Die Isoformen mit 751 und 770 Aminosäuren Länge treten im Gehirn hauptsächlich in Gliazellen auf, während APP der Länge 695 Aminosäuren hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird.

APP stellt ein Typ I-Transmembranprotein dar, das im synaptischen Spalt lokalisiert ist, axonal transportiert wird und in Synapsenfunktionen eingreifen kann. Die große extrazelluläre Domäne des APP umfasst den N-Terminus, während die kürzere Domäne mit dem C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Proteasen, die das APP spalten, werden Sekretasen genannt und es sind drei Formen bekannt (α -, β - und γ -Sekretase), die APP an unterschiedlichen Stellen schneiden (siehe Abb. 1.3-1). Während die β - und γ -Sekretase zur Bildung von β -Amyloid führen, verhindert die α -Sekretase die $A\beta$ -Bildung, da sie APP in der Mitte der $A\beta$ -Domäne schneidet zwischen den Aminosäuren Lys16 und Leu17. Daher wird diese Spaltung auch als nicht-amyloidogen bezeichnet, da nachfolgend kein $A\beta$ mehr gebildet werden kann. Drei Mitglieder der ADAM Familie (a disintegrin and metalloproteinase), ADAM 9, 10 und 17, können als α -Sekretase in verschiedenen Zellsystemen agieren (Lammich, Kojro *et al.* 1999). Die meisten APP-Moleküle werden in der Nähe der Zelloberfläche durch die membranständige α -Sekretase gespalten (Esch, Keim *et al.* 1990; Kamenetz, Tomita *et al.* 2003). Durch diese Spaltung entsteht ein großes lösliches Ectodomänen-Fragment (sAPP α), das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird, und ein membrangebundenes C83-Fragment. Dieses Fragment kann durch nachfolgenden γ -Sekretase-Angriff in ein p3- und ein p7-Fragment gespalten werden. sAPP α weist neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften auf (Small, Nurcombe *et al.* 1994; Furukawa, Sopher *et al.* 1996).

Erfolgt die Spaltung des APPs nicht durch die α -Sekretase, so wird APP in Endosomen internalisiert und unterliegt der Spaltung durch die β -Sekretase und γ -Sekretase. Die β -

Sekretase, auch als BACE bezeichnet (β -site APP-cleaving enzyme), stellt ein Typ I-Membranprotein mit Aspartyl-Protease-Aktivität dar. Es existieren zwei verschiedene BACE-Isoformen. BACE 1 weist β -Sekretase-Aktivität auf, wohingegen BACE 2 α -Sekretase-Aktivität besitzt. BACE 1 und APP weisen ähnliche Verteilungsmuster in der Zelle auf. Sie sitzen in der Plasmamembran und können in Endosomen aufgenommen werden, in denen die Spaltung von APP durch BACE 1 erfolgt (Vassar 2001). Die Spaltung führt zur Bildung eines membrangebundenen C99-Fragments und eines löslichen Fragments, sAPP β , das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Das C99-Fragment kann durch die γ -Sekretase intramembranär weiter gespalten werden.

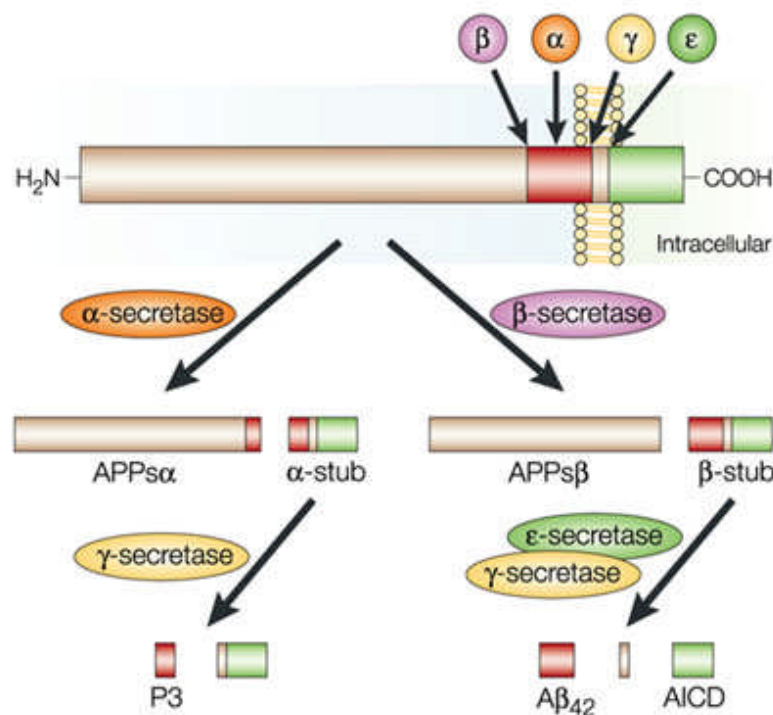


Abbildung 1.3-1 Proteolyse des APP Entstehung der möglichen Fragmente durch die verschiedenen Sekretasen (LaFerla 2002).

Der γ -Sekretase-Komplex setzt sich aus den vier Proteinen Präsenilin, Nicastrin, APh-1 und PEN 2 zusammen (De Strooper 2003). Die Präseniline scheinen die aktive Pore des Proteasekomplexes darzustellen und es existieren zwei verschiedene Homologe, PS 1 und PS 2, die die Plasmamembran mehrere Male durchspannen. Zwei Aspartatreste in der Transmembrandomäne 6 und 7 scheinen für die Proteaseaktivität verantwortlich zu sein. Außer der A β -Bildung entsteht bei der γ -Sekretase-Spaltung ein intrazelluläres Fragment, die APP-intrazelluläre-Domäne (APP intracellular domain, AICD). Das AICD-Fragment enthält einige Aminosäuren der Transmembrandomäne und den C-Terminus des APPs.

Die Spaltung des C99-Fragmentes führt zur Bildung von $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$. β -Amyloid ist ein hydrophobes Peptid, das in der Lage ist zu aggregieren und Oligomere zu bilden. Vergrößern sich die Oligomere, so bilden sich bald Fasern und letztendlich die für die Alzheimer-Demenz charakteristischen $A\beta$ -Plaques. Der Großteil des $A\beta$ stellt $A\beta_{1-40}$ dar, während $A\beta_{1-42}$ nur zu 5-10 % gebildet wird. $A\beta_{1-42}$ aggregiert wesentlich schneller und ist toxischer als $A\beta_{1-40}$. Beide $A\beta$ -Formen weisen unterschiedliche intrazelluläre Produktionsorte auf. $A\beta_{1-40}$ wird vor allem im trans-Golgiapparat gebildet, wohingegen $A\beta_{1-42}$ im endoplasmatischen Retikulum gebildet wird (Hartmann 1999).

1.3.3 β -Amyloid-Toxizität

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die $A\beta$ -Toxizität vom Aggregationsstatus abhängt (Pike, Burdick *et al.* 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass $A\beta$ -Oligomere und Protofibrillen ebenfalls toxische Effekte auslösen und somit eventuell sogar die toxischere Form von $A\beta$ darstellen (Walsh, Hartley *et al.* 1999; Klein, Krafft *et al.* 2001; Walsh, Klyubin *et al.* 2002b). Die $A\beta$ -Oligomerisierung beginnt wahrscheinlich intrazellulär in Neuronen (Walsh, Tseng *et al.* 2000). Die intrazelluläre Anreicherung von $A\beta$ konnte bereits in humanen Gehirnen bzw. in transgenen Mäusen gefunden werden (Takahashi, Milner *et al.* 2002; Oddo, Caccamo *et al.* 2003). Sie wurde in Zusammenhang gebracht mit synaptischer Dysfunktion, einem frühen Ereignis bei der Alzheimer-Erkrankung (Selkoe 2002). Interessanterweise korreliert auch der Schweregrad der synaptischen und kognitiven Dysfunktion im Vergleich zu den unlöslichen $A\beta$ -Spiegeln besser mit den löslichen $A\beta$ -Spiegeln (Lue, Kuo *et al.* 1999; McLean, Cherny *et al.* 1999).

1.4 Tau-Protein

Tau ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein (MAP) und wurde bei seiner Entdeckung durch Weingarten (Weingarten, Lockwood *et al.* 1975) als ein hitzestabiler Protein-Faktor beschrieben, der die spontane Polymerisation von α - und β -Tubulin zu Mikrotubuli fördert. Der Mikrotubuli-Apparat einer Zelle stellt ihr inneres Skelett dar und spielt in einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine fundamentale Rolle. Mikrotubuli dienen als „Schiene“ für längsaxonale Transportvorgänge (Trinczek, Ebner *et al.* 1999) und sind an der Regulation der Zellform wie auch der Zellpolarität maßgeblich beteiligt (Caceres and

Kosik 1990; Drewes, Ebner *et al.* 1998). Mikrotubuli entstehen durch Polymerisation von α -Tubulin Dimeren, deren Tendenz es ist zwischen Phasen der Polymerisation und Depolymerisation zu wechseln und dadurch eine dynamische Instabilität besitzen (Mitchison and Kirschner 1984). Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) können diese dynamische Stabilität beeinflussen, indem sie an Mikrotubuli binden und sie dadurch stabilisieren (Cleveland, Hwo *et al.* 1977b). Das Protein Tau zählt zu den MAPs, wird hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert und ist dort überwiegend im Axon lokalisiert. MAP2 dagegen überwiegt in Dendriten (Binder, Frankfurter *et al.* 1985; Riederer und Matus 1985) und MAP4 ist nicht auf das Nervensystem beschränkt (Tucker 1990; Schoenfeld und Obar 1994).

1.4.1 Physiologie und Funktion von Tau in der Zelle

Das Tau-Protein findet sich in Tierarten, wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Zebrafisch, Krallenfrosch, Nager, Rind, Ziege, Affe und Mensch. Es ist ein primär zytoplasmatisches Protein, das ursprünglich in axonalen Kompartimenten der Neurone detektiert wurde (Binder, Frankfurter *et al.* 1985; Kowall and Kosik 1987). Spätere Untersuchungen ergaben, dass es in dephosphorylierter Form auch in Somatodendriten (Papasozomenos and Binder 1987), sowie im Nukleus vorliegt (Uberti, Rizzini *et al.* 1997; Lefebvre, Ferreira *et al.* 2003). Das Tau-Protein ist an der Polymerisation von Tubulindimeren in Mikrotubuli sowie an deren Stabilisierung beteiligt, wodurch ein neuronales Netz geschaffen wird, das mehrere Rollen erfüllen kann (Cleveland, Hwo *et al.* 1977a/b; Weingarten, Lockwood *et al.* 1975). Mikrotubuli sind nicht nur für die Aufrechterhaltung der Zellform und das zielgerichtete axonale Wachstum essentiell (Liu, Lee *et al.* 1999), sondern spielen auch beim Transport von Molekülen entlang der Axone eine Rolle. So werden Mikrotubuli-Bahnen geschaffen, die Motorproteinen, die mit Vesikeln oder Organellen beladen sind, den Transport entlang der Mikrotubuli ermöglichen. Desweiteren sind Mikrotubuli an der Interaktion mit anderen zytoskelettalen Elementen beteiligt (Buee, Bussiere *et al.* 2000). Möglicherweise werden Funktionsänderungen durch verschiedene Signaltransduktionswege beeinflusst. Eine Kontrolle könnte entweder direkt, durch Phosphorylierung des Tau-Proteins, oder indirekt, über die Regulation des alternativen Spleißens und folglich der Isoformzusammensetzung, ausgeübt werden.

An das Tau-Protein konnte eine Bindung von Proteinkinasen (Reszka, Seger *et al.* 1995; Morishima-Kawashima und Kosik 1996) und Phosphatasen beobachtet werden (Sontag, Nunbhakdi-Craig *et al.* 1996; Liao, Li *et al.* 1998). Durch Überexpression wurde eine Beteiligung des Tau-Proteins an dem durch die Motorproteine Dynein und Kinesin vermittelten intrazellulären Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang der Mikrotubuli gezeigt (Ebner, Godemann *et al.* 1998).

Als eine weitere Funktion des Tau-Proteins wird eine Beteiligung an der Ausbildung von Zellfortsätzen und der neuronalen Polarität diskutiert (Matus 1988; Binder, Frankfurter *et al.* 1985). Die Ausbildung von Zellfortsätzen innerhalb des Zytoskeletts bedingt ein enges Zusammenspiel von Mikrotubuli und Actin-Filamenten in den Wachstumskegeln. Daher wird für das Tau-Protein auch eine Interaktion mit Actin-Filamenten vermutet. In Zellen, denen ein Actin-bindendes Protein fehlt, kann durch Mikroinjektion von Tau-Protein (oder MAP2) das normale Erscheinungsbild der Zellen wiederhergestellt werden (Cunningham, Leclerc *et al.* 1997). Die Funktionen des Tau-Proteins können aber anscheinend von den anderen MAPs größtenteils übernommen werden, da Tau-defiziente *knockout*-Mäuse im Phänotyp nicht auffällig sind (Harada, Oguchi *et al.* 1994).

1.4.2 Struktur

Das humane Tau-Protein wird durch ein einziges Gen kodiert, das über 100kb umfasst und auf dem langen Arm von Chromosom 17 auf der Position 17q21 lokalisiert ist (Neve, Harris *et al.* 1986). Die prä-mRNA besteht aus 16 Exons, von denen jedoch die Exons 4a, 6 und 8 charakteristisch für Proteine des peripheren Nervensystems sind und somit nicht in der mRNA des menschlichen Gehirns auftreten. Isoformen mit Exon 4a-Einschluss werden aufgrund ihres höheren Molekulargewichts auch als „big tau“ bezeichnet und besitzen einen zusätzlichen Einschub aus 254 Aminosäuren. Durch alternatives Spleißen der Tau-mRNA werden sechs Isoformen aus den verbleibenden 13 Exons von Tau im humanen zentralen Nervensystem exprimiert (Goedert, Spillantini *et al.* 1989; Himmler 1989). Sie unterscheiden sich durch An- oder Abwesenheit von einem oder zwei N-terminalen Einschüben aus 29 Aminosäuren (kodiert von Exon 2 und 3) und besitzen entweder drei oder vier C-terminale, unvollständige Sequenzwiederholungen (R) aus 31-32 Aminosäuren (3-Repeat oder 4-Repeat Tau-Isoformen) innerhalb der Mikrotubuli-bindenden Domäne (siehe Abb. 1.4-1). Insgesamt können sechs Isoformen mit einer Länge zwischen 352 und 441 Aminosäuren generiert werden. Exon 10 kodiert für die zweite von vier

Sequenzwiederholungen (R2), die die Mikrotubuli- Bindungsdomäne des Tau-Proteins darstellt. Einschluss des Exons 10 führt zu Isoformen mit vier Bindungsmotiven (4R), Ausschluss zu Isoformen mit nur drei Bindungsmotiven (3R). Das alternative Spleißen von Exon 10 ist humanspezifisch, wobei das Verhältnis der Isoformen 3R/4R-Tau im adulten menschlichen Gehirn ungefähr 1:1 beträgt (Lee, Goedert *et al.* 2001). Die Expression von Tau ist entwicklungsreguliert. So wird im fötalen zentralen Nervensystem zunächst nur die kürzeste 3R-Tau-Isoform ohne N-terminale Einschübe (hTau23) exprimiert, im adulten Stadium dann alle sechs Isoformen (Kosik, Orecchio *et al.* 1989; Goedert und Jakes 1990). Im Gegensatz zum Menschen exprimieren adulte Mäuse nur 4R-Tau (Goedert und Jakes 1990).

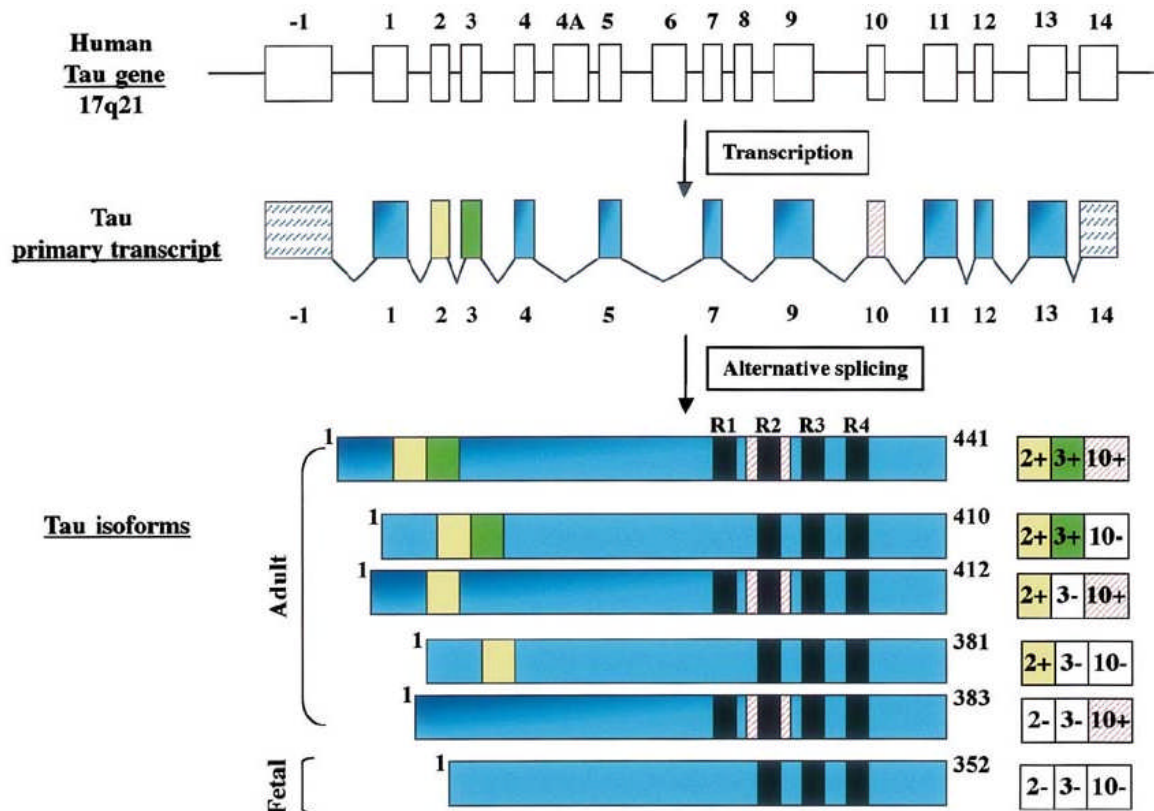


Abbildung 1.4-1 Schematische Darstellung des humanen Tau Gens, des Primärtranskripts und der sechs im menschlichen Gehirn vorkommenden Tau Isoformen Je nach Ein- oder Ausschluss von Exon 10 können die Transkripte in 3R- (-Exon10) bzw. 4R- (+Exon10) Isoformen unterteilt werden. Boxen symbolisieren Exons, Striche symbolisieren Introns (Buee, Bussiere *et al.* 2000).

Anhand von biochemischen Merkmalen und der Art der Interaktionen mit anderen Molekülen kann das Tau-Protein funktionell in eine C-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne (Interaktion mit Mikrotubuli) und eine N-terminale Projektionsdomäne (Wechselwirkung mit Zellkompartimenten und der Plasmamembran) unterteilt werden.

1.4.2.1 Mikrotubuli- Bindungsdomäne

Die Mikrotubuli-Bindungsdomäne befindet sich am carboxyterminalen Ende des Tau-Proteins und umspannt etwa 200 Aminosäuren. Je nach Isoform ist sie durch drei (3R) oder vier (4R) 18 Aminosäuren lange unvollständige Sequenzwiederholungen (Repeats) charakterisiert, die hoch konserviert sind. Diese repetitiven Sequenzen (R1-R4) werden von den Exons 9-12 kodiert und sind durch weniger konservierte, 13 oder 14 Aminosäuren lange Sequenzen verbunden. Die Bindungsmotive 3R und 4R selbst binden nur schwach, während die flankierenden Regionen eine starke Bindungskapazität aufweisen (Mandelkow, Schweers *et al.* 1996; Preuss, Biernat *et al.* 1997).

Alle nativen Tau-Isoformen weisen eine starke Mikrotubuli-Bindung auf, wobei sowohl die Affinität der MT-Bindungsdomäne zu den Mikrotubuli (MT) wie auch die Fähigkeit, das Polymer stabilisieren zu können, mit der Anzahl der Repeats steigt (Goode, Chau *et al.* 2000). So wurde gezeigt, dass die 4R-Isoformen ungefähr dreimal so effektiv an Mikrotubuli binden wie die 3R-Tau-Isoformen (Gustke, Trinczek *et al.* 1994; Goode, Chau *et al.* 2000; Butner and Kirschner 1991). Auch die Stabilität der Mikrotubuli, die mit 4R-Tau interagieren, ist wesentlich stärker ausgeprägt (Goedert and Jakes 1990; Lee, Neve *et al.* 1989). Darüber hinaus wurde die Inter-Repeat-Region iR1/R2 (274 KVQIINKK 281) zwischen den Repeats R1 und R2 als Mikrotubuli- Bindungsstelle identifiziert. Diese Zwischensequenz wird von Exon 10 kodiert und ist daher erwachsenenspezifisch. Sie zeigt eine mehr als zweifach höhere Affinität als jede einzelne Repeat-Region und erhöht die Affinität von 4R-Isoformen im Vergleich zu 3R-Isoformen um das 40-fache (Goode and Feinstein 1994).

Eine starke Mikrotubuli-bindende Aktivität wurde auch in der prolinreichen Region N-terminal der Bindungsdomäne festgestellt (Goode, Denis *et al.* 1997). Vieles deutet darauf hin, dass sowohl die flankierenden Bereiche als auch die Inter-Repeat-Regionen für die Tau-Mikrotubuli-Interaktionen von großer Bedeutung sind. Tau-Konstrukte haben beispielsweise nur eine geringe Affinität zu den Mikrotubuli, wenn sie nur die Sequenz-Repeats R1-R4 aufweisen. Werden die flankierenden Bereiche dem Konstrukt zugefügt, so verstärkt sich die Affinität des Tau-Proteins, an die Mikrotubuli zu binden (Gustke, Trinczek *et al.* 1994). Weiterhin konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass bei Vorhandensein der flankierenden Bereiche Tau aggregiert, anti-parallele Dimere bildet und filamentöse Strukturen ausbildet (Wilson and Binder *et al.* 1995; Schweers, Madelkow *et al.* 1995). Die flankierenden Domänen sind außerdem durch das Vorhandensein von

zahlreichen potentiellen Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet. Sie beinhalten beinahe die Hälfte der 17 Ser/Thr-Pro Motive, die im Tau-Protein vorkommen. Diese Motive sind Substrate für Prolin-gerichtete Kinasen und eine große Anzahl dieser Ser/Thr-Pro Stellen kommen phosphoryliert in humanem Kontroll- sowie Alzheimer-Hirnen vor (Hasegawa, Morishima-Kawashima *et al.* 1992; Morishima-Kawashima, Hasegawa *et al.* 1995).

1.4.2.2 Projektionsdomäne

Im Gegensatz zur Mikrotubuli-Bindungsdomäne scheint die Projektionsdomäne des Tau-Proteins nicht an der Bindung an die Mikrotubuli beteiligt zu sein (Steiner, Mandelkow *et al.* 1990). Während die MT-Bindungsdomäne durch ihren basischen Charakter die negativen Ladungen der Mikrotubuli kompensieren kann, führt die saure Region der Projektionsdomäne zu Abstoßungsreaktionen, wodurch dieser Abschnitt als eine Art Abstandhalter agieren kann (Gustke, Trinczek *et al.* 1994). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Mikrotubuli, die an Tau gebunden sind, eine Parallelstruktur aufweisen, wobei der Abstand der Protofilamente mit der Länge der Projektionsdomäne korreliert (Hirokawa 1982; Chen, Kanai *et al.* 1992).

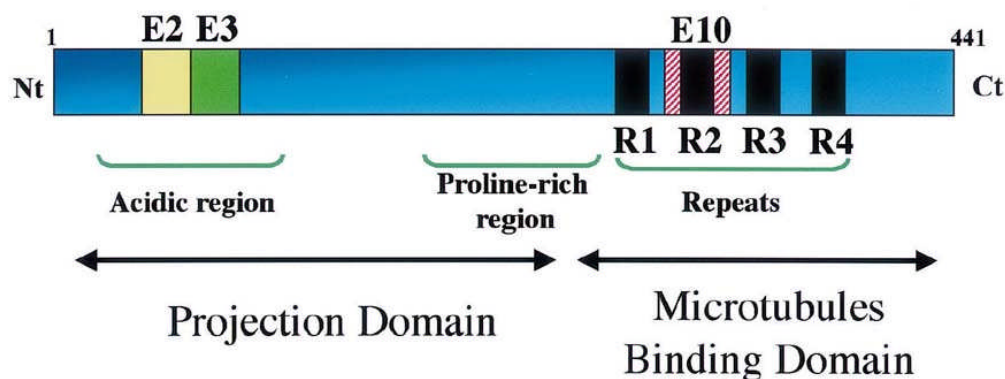


Abbildung 1.4–2 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der längsten Tau-Isoform (2+3+10+) Die Projektionsdomäne einschließlich einer sauren- und Prolin-reichen Region interagiert mit zytoskelettalen Elementen, um den Abstand zwischen den Mikrotubuli im Axon zu bestimmen. Das N-terminale Stück ist auch an Signaltransduktionswegen beteiligt durch Interaktion mit Proteinen. Das C-terminale Stück, die MT-Bindungsdomäne, reguliert die MT-Polymerisation und ist beteiligt an der Bindung funktionaler Proteine wie Proteinphosphatase 2A oder Presenilin 1 (Buee, Bussiere *et al.* 2000).

Da die auf der Projektionsdomäne liegenden Exons 2 und 3 alternativen Spleißprozessen unterliegen, können Isoformen entstehen, deren Projektionsdomäne unterschiedliche Ausmaße besitzen. Hierdurch könnte der axonale Durchmesser durch Tau und andere MAP mitbestimmt werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass nur im peripheren Nervensystem das so genannte *big tau* (Einschluss von Exon 4a) exprimiert

wird, dem Bereich des Nervensystems, in dem Axone mit wesentlich größerem Durchmesser auftreten (Andreadis, Brown *et al.* 1992; Georgieff, Liem *et al.* 1993). Durch seine N-terminale Domäne kann Tau auch mit anderen neuronalen Zellkompartimenten und der Plasmamembran in Wechselwirkung treten (Brandt, Leger *et al.* 1995). So bindet die Projektionsdomäne an Aktin- und Spektrin-filamente sowie an Bestandteile der Plasmamembran. Dies weist auf eine Funktion bei der Stabilisierung der Mikrotubuli durch Interaktion mit anderen zytoskelettalen Bestandteilen hin und spricht für eine Rolle bei der Entwicklung der Zellpolarität.

Das Tau-Protein ist ein biochemisch interessantes und ungewöhnliches Protein. Es besteht zu 10 % aus Glycin und Prolin-Resten und ist mit 18 % reich an Serin- und Threonin-Resten. Insgesamt tragen bei physiologischem pH-Wert 25 % der Aminosäuren eine Ladung. Das macht das Tau-Protein zu einem sehr hydrophilen Protein. Für das Tau-Protein wurde durch analytische Ultrazentrifugation ein Sedimentationskoeffizient von 2.6 S gemessen, was auf eine stark asymmetrische Form hinweist (Cleveland, Hwo *et al.* 1977b). Mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) konnte ein äußerst geringer Anteil von Sekundärstruktur-Elementen, wie α -Helix oder β -Faltblatt an der Gesamtstruktur gemessen werden (Cleveland, Hwo *et al.* 1977b; Schweers, Schonbrunn-Hanebeck *et al.* 1994). Weiterhin denaturiert Tau-Protein auch bei erhöhter Temperatur bis 100 °C nicht (Weingarten, Lockwood *et al.* 1975) und verbleibt auch in 2.5 % Perchlorsäure in Lösung (Lindwall und Cole 1984b). Bei einer elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt das Tau-Protein ein apparentes Molekulargewicht von 50 - 70 kDa, welches wesentlich über dem tatsächlichen Molekulargewicht von 36 - 46 kDa liegt. Auf Grund dieser Eigenschaften wird das Tau-Protein als ein nativ ungefaltetes Protein betrachtet.

Mit Hilfe spezieller Techniken der Elektronenmikroskopie wird das Bild von Tau als ein größtenteils ungefaltetes Molekül bestätigt. Das Tau-Protein konnte als ein elongiertes, filamentöses und flexibles Molekül mit einer Länge von circa 35 nm dargestellt werden (Wille, Mandelkow *et al.* 1992). Am Mikrotubulus gebundenes Tau konnte als senkrecht abstehende filamentöse Struktur mit einer Länge von circa 20 nm auf den Mikrotubuli sichtbar gemacht werden (Hirokawa, Shiomura *et al.* 1988).

1.4.2.3 Regulation durch Phosphorylierung

Die Funktion des Tau-Proteins wird durch posttranslationale Modifikationen gesteuert. Neben der O-Glykosylierung mit N-Acetylglucosamin zieht die Phosphorylierung des Tau-Proteins die größte Aufmerksamkeit auf sich. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass aus Alzheimer-Gehirnen isoliertes Tau-Protein an vielen Stellen phosphoryliert ist und dass die Bindung von Tau an Mikrotubuli durch zahlreiche Phosphorylierungen reguliert wird (Gustke, Steiner *et al.* 1992, Biernat, Gustke *et al.* 1993; Lindwall und Cole 1984a; Drewes, Trinczek *et al.* 1995; Trinczek, Biernat *et al.* 1995).

Eine Phosphorylierung von Tau erfolgt posttranslational an Serin- und Threonin-Resten. Die meisten Kinasen, die an der Tau-Phosphorylierung beteiligt sind, sind so genannte Prolin-gerichtete Proteinkinasen (PDPK). Sie phosphorylieren die Serin- oder Threonin-Reste, die C-terminal in der Nähe eines Prolin-Restes sind (SP- oder TP-Motive). Sie umfassen mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK), Glykogensynthase Kinase 3 (GSK-3) (Mandelkow, Drewes *et al.* 1992), Tau-Tubulin Kinase und Cyclin-abhängige Kinasen einschließlich *cdc2* und *cdk5* (Buee, Bussiere *et al.* 2000). Prolin-gerichtete Phosphorylierungen haben anscheinend mehr eine modulatorische Wirkung (Trinczek, Biernat *et al.* 1995).

Zu den nicht-Prolin-gerichteten Kinasen zählen u.a. die Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase (MARK), Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Casein-Kinase II (Johnson 1992; Greenwood, Scott *et al.* 1994; Drewes, Trinczek *et al.* 1995). Eine Phosphorylierung durch eine nicht-Prolin-gerichtete Kinase kann einen stark regulativen Effekt ausüben. So verhindert die MARK durch Phosphorylierung an Serin262 fast vollständig die Bindung von Tau an Mikrotubuli (Biernat, Gustke *et al.* 1993). Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli wird am stärksten inhibiert, wenn das Tau-Protein an Ser262 und Thr231 gleichzeitig phosphoryliert vorliegt (Sengupta, Kabat *et al.* 1998).

Lange Zeit hatte man Erkenntnisse über die Phosphorylierungsstellen nur durch den Gebrauch von speziellen, gegen Phospho-Epitope gerichtete Antikörper gewinnen können. Der Tau-1-Antikörper erkennt Tau nur, wenn es an den Epitopen Ser199/202 und Thr205 dephosphoryliert ist, und war der erste Phosphat-abhängige Antikörper, der entwickelt wurde (Binder, Frankfurter *et al.* 1985). Mittlerweile wurden viele Antikörper speziell gegen Phospho-Epitope hergestellt, wie beispielsweise. AT8, PHF-1, AT270 und AT180, die die phosphorylierten Epitope Ser202, Ser396, Thr181 und Thr231 erkennen (siehe

Abb. 1.4-3). Auch wurden Antikörper gegen doppelt phosphorylierte Epitope hergestellt, so wie PHF-20 (Ser214+Thr217), PHF-27 (Thr231+Ser235) und AT100 (Thr212+Ser214); die Nummerierung basiert auf der längsten humanen Tau-Isoform von 441 Aminosäuren.

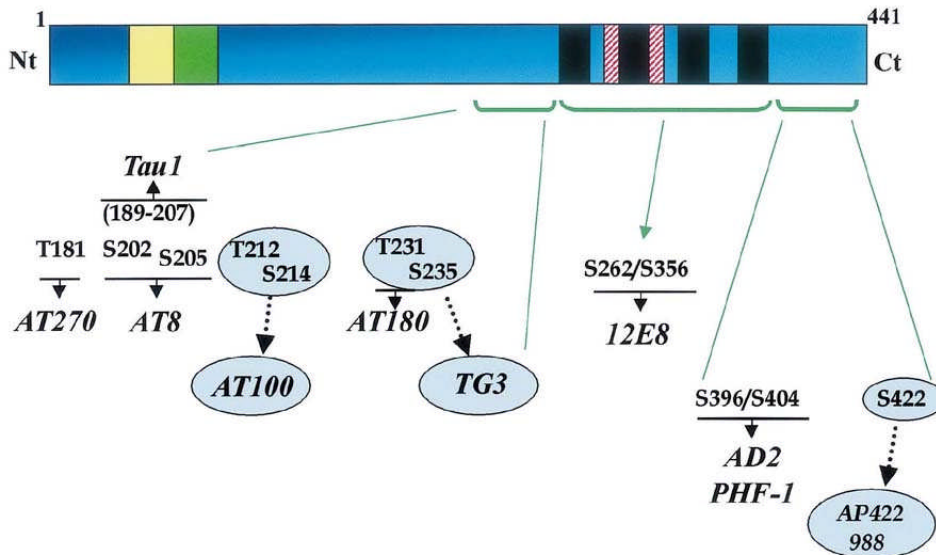


Abbildung 1.4-3 Schematische Darstellung der Hyperphosphorylierungsseiten (AS-Sequenz) der längsten Tau-Isoform und den korrespondierenden spezifischen Antikörpern Die Hyperphosphorylierungsseiten sind in zwei Gruppen an beiden Seiten der MT-Bindungsdomäne angeordnet, mit Ausnahme von Ser262/Ser356. Kursiv sind phosphorylierungs-abhängige Antikörper dargestellt, Antikörper gegen alzheimerspezifische Seiten sind eingekreist (Buee, Bussiere *et al.* 2000).

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten bisher 25 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Hanger, Betts *et al.* 1998), von denen nur 9 Ser/Thr-Pro Motive sind und alle, bis auf Ser262, in den amino- und carboxyterminalen Domänen liegen, die die Mikrotubuli-Binde-Region umgeben (Morishima-Kawashima, Hasegawa *et al.* 1995).

1.4.2.4 Pathologische Aggregation – PHFs

Die Neurofibrillären Bündel (NFTs) sind bei der Alzheimer-Krankheit neben den Amyloid-Plaques das histopathologische Charakteristikum für die neurodegenerative Erkrankung. Die Wissenschaftler Kidd und Terry zeigten 1963, dass die NFTs aus paarweise umeinander gewundenen Fasern des Tau-Proteins bestehen. Diese Ansammlungen von Fasern erscheinen bei negativer Kontrastierung im Elektronenmikroskop als paarige helikale Filamente (*paired helical filaments*, PHFs) mit einer Breite von 10 - 20 nm und einer axialen Periodizität von circa 80 nm (Kidd 1963), wie in Abbildung 1.4-4 dargestellt. In geringerem Maße werden auch gerade Filamente

(*straight filaments*) mit einer gleich bleibenden Dicke um 15 nm gefunden (Crowther 1991). In Alzheimer-Gehirnen kommen die PHFs sowohl in löslicher Form als auch in unlöslicher Form in den NFTs vor.

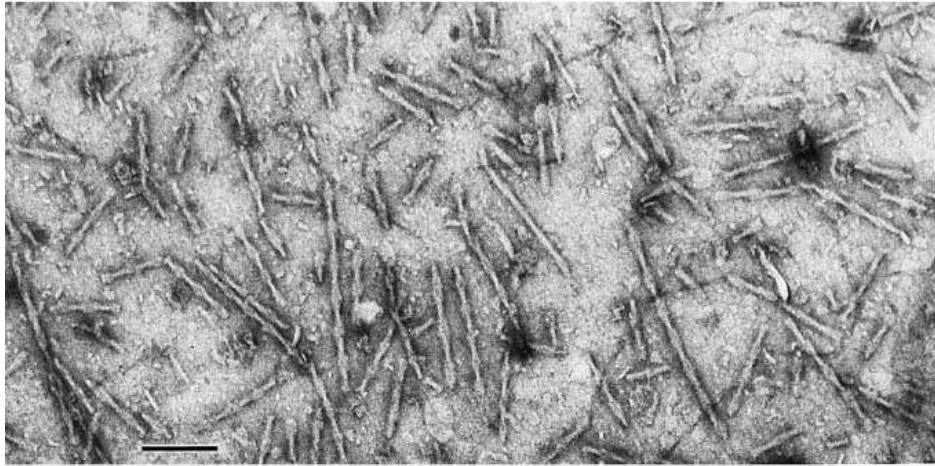


Abbildung 1.4–4 Elektronenmikroskopische Aufnahme intakter PHFs Aus Alzheimergewebe isolierte PHFs nach Färbung mit Uranylacetat zeigen kurze verstreute Filamente. Der Balken repräsentiert eine Länge von 200 nm (Gordon-Krajcic, Yang *et al.* 2000)

Die Struktur der löslichen PHFs ist ähnlich, aber nicht identisch mit der der unlöslichen PHFs (Lee, Balin *et al.* 1991), denn die löslichen können im Gegensatz zu den unlöslichen in der SDS-PAGE zu Monomeren aufgetrennt werden. Wenn PHFs aus Alzheimer-Gehirnen wieder aufgelöst werden, so zeigen die Tau-Proteine nach einer elektrophoretischen Auftrennung drei charakteristische Banden bei 55, 64 und 69 kDa (Greenberg und Davies 1990; Lee, Balin *et al.* 1991; Greenberg, Davies *et al.* 1992; Delacourte, Robitaille *et al.* 1996) sowie eine weitere sehr schwache Bande bei 74 kDa (Goedert, Spillantini *et al.* 1992; Sergeant, David *et al.* 1997). Damit weist das Alzheimer-Tau-Protein ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht auf (Grundke-Iqbal, Iqbal *et al.* 1986). Durch Dephosphorylierung läßt sich dieser Effekt wieder aufheben. Es zeigte sich, dass Alzheimer-PHF aus posttranslational phosphoryliertem Tau-Protein aller sechs Isoformen bestehen (Goedert, Spillantini *et al.* 1992). Normales, lösliches Tau-Protein von gesunden Menschen weist einen Phosphorylierungsgrad von circa 2 Mol Phosphat pro Mol Tau auf. Das aus den PHFs isolierte Tau-Protein hingegen ist mit bis zu 6 - 8 Mol Phosphat pro Mol Tau wesentlich stärker phosphoryliert (Ksiezak-Reding, Liu *et al.* 1992). Dieses hyperphosphorylierte Tau-Protein ist in seiner natürlichen Funktion zur Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli gestört (Yoshida und Ihara 1993).

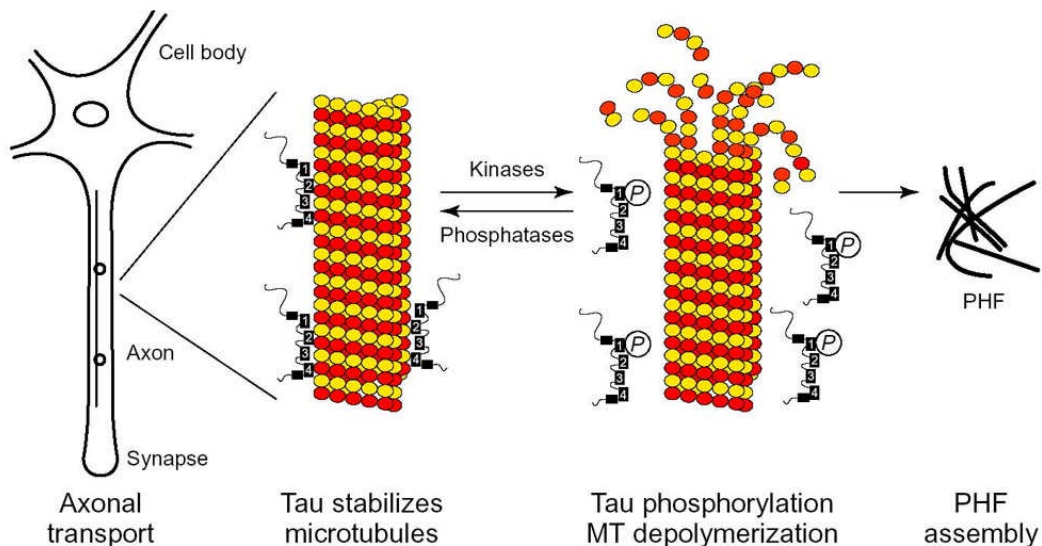


Abbildung 1.4-5 Modell für den möglichen Zusammenhang zwischen axonalen Transportvorgängen, Mikrotubuli und dem Tau-Protein in der Alzheimer- Erkrankung Mikrotubuli dienen bei längsaxonalen Transportvorgängen als Transportschienen. An ihrer Stabilisierung sind Tau-Proteine maßgeblich beteiligt. Durch Phosphorylierung spezieller Phosphorylierungsstellen kann es sich von seinen Bindungsstellen lösen, was einerseits zu einem Zusammenbruch der Mikrotubuli-Struktur führt und andererseits die Akkumulation von Tau zu PHFs begünstigt (Mandelkow and Mandelkow 1998).

Als Ursache für die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in der Alzheimer-Krankheit kann einerseits eine erhöhte Aktivität von Kinasen oder andererseits eine verminderte Aktivität von Phosphatasen in Betracht kommen wie in Abbildung 1.4-5 dargestellt (Trojanowski und Lee 1995; Gong, Shaikh *et al.* 1995; Ladner, Czech *et al.* 1996; Lovestone und Reynolds 1997). Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die Prolin-gerichteten Kinasen, da sie die für Alzheimer-Tau typischen Serin- oder Threonin-Reste gefolgt von einem C-terminalen Prolin-Rest (SP- oder TP-Stellen) phosphorylieren (Lichtenberg-Kraag, Mandelkow *et al.* 1992; Morishima-Kawashima, Hasegawa *et al.* 1995). Lange Zeit wurde die Hyperphosphorylierung als Ursache für die Aggregation des Tau-Proteins zu den PHFs angesehen. Eine andere Theorie vermutet, dass die Hyperphosphorylierung aber auch erst nach der Bildung der PHFs erfolgen könnte. Einige Ergebnisse sprechen für diese Theorie. So konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Tau-Protein sogar vor einer Aggregation zu PHFs schützt (Schneider, Biernat *et al.* 1999). Weiterhin ist fötales Tau-Protein ebenfalls an solchen Stellen phosphoryliert, die als spezifisch für Alzheimer-Tau gelten (Kanemaru, Takio *et al.* 1992; Bramblett, Trojanowski *et al.* 1992). Desweiteren aggregiert auch nicht-phosphoryliertes Tau-Protein *in vitro* zu PHFs (Wille, Drewes *et al.* 1992; Schweers, Mandelkow *et al.* 1995).

In-vitro-Experimente mit rekombinantem Tau-Protein haben gezeigt, dass sich die Polymerisation zu PHFs in Gegenwart von anionischen Makromolekülen beschleunigen lässt. Untersucht wurden Glykosaminoglykane (z.B. Heparin), Ribonukleinsäuren (z.B. RNA), Peptide (z.B. Poly-Glutaminsäure) sowie freie Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure); sie alle zeigten einen positiven Effekt (Goedert, Jakes *et al.* 1996; Perez, Valpuesta *et al.* 1996; Kampers, Friedhoff *et al.* 1996; Wilson und Binder 1997; Friedhoff, Schneider *et al.* 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Tau-Fragmente der Repeat-Region schneller zu PHFs polymerisieren als Tau der gesamten Länge (Wille, Drewes *et al.* 1992; Friedhoff, von Bergen *et al.* 1998). Die minimale Sequenz für die Aggregation von Tau-Protein lässt sich dabei auf ein Hexapeptid (306VQIVYK311) innerhalb der Repeat-Region reduzieren (von Bergen, Friedhoff *et al.* 2000).

1.4.3 Tauopathien

In einer Reihe verschiedener anderer neurodegenerativer Erkrankungen treten NFTs aus aggregiertem Tau-Protein auch in Abwesenheit von Amyloid-Plaques auf. Zu diesen Krankheiten zählen die Pick-Krankheit (PiD, *Pick's disease*), Progressive supranukleare Lähmung (PSP, *progressive supranuclear palsy*), Cortikobasale Degeneration (CBD, *corticobasal degeneration*), Argyrophile Körner Krankheit (AgD, *argyrophilic grain disease*) und die Frontotemporalen Demenzen und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17, *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*). All diesen Krankheiten ist eine neuropathologische Aggregation des Tau-Proteins in Form der NFTs im Gehirn gemeinsam. Daher werden diese Erkrankungen zusammenfassend als „Tauopathien“ bezeichnet (Spillantini und Goedert 1998). Der Mechanismus, wie die einzelnen Erkrankungen mit der Aggregation des Tau-Proteins zusammenhängen, ist jedoch unklar. Wie in Tabelle 1.1-2 bereits beschriebenen herrscht eine große Vielfalt zwischen den einzelnen Krankheiten in Bezug auf betroffene Gehirnregion, Zelltyp, Zusammensetzung der NFTs aus den Tau-Isoformen und der Filament-Morphologie (Feany und Dickson 1996; Tolnay und Probst 1999; Buee und Delacourte 1999; Buee, Bussiere *et al.* 2000). Abbildung 1.4-6 stellt vergleichend das Bandenmuster im Western Blot von löslichem und unlöslichem Tau-Protein aus verschiedenen Tauopathien übersichtlich dar.

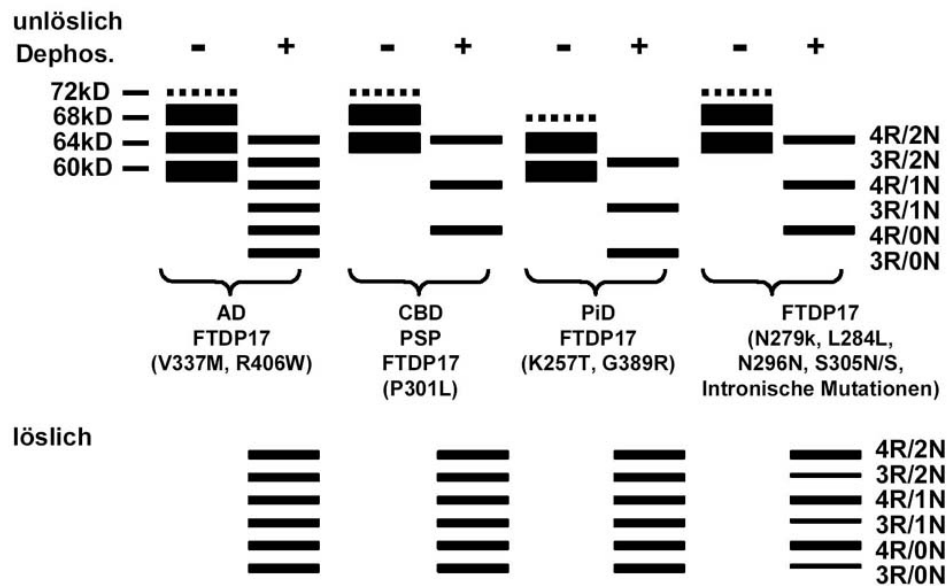


Abbildung 1.4–6 Schematische Darstellung des Westernblot-Bandenmusters von löslichem und unlöslichem Tau-Protein aus verschiedenen Tauopathien nach SDS-Page und Immunoblotting mit Tau-Antikörpern

Charakteristische Bandenmuster zeigen sich bei Alzheimer (AD) als ein Triplet aus 68, 64 und 60 kDa, bei CBD und PSP als ein Duplett aus 68 und 64 kDa und bei der Pick-Krankheit (PiD) als ein Duplett aus 64 und 60 kDa. Für FTDP-17 gibt es je nach Mutation unterschiedliche Varianten (Lee, Goedert *et al.* 2001).

1.5 Hypothesen zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung

Der pathologische Befund von Morbus Alzheimer mit seinen Amyloid-Plaques und den Neurofibrillenbündeln wurde schon vor rund 100 Jahren beschrieben, dennoch ist bis heute nicht geklärt, welche Vorgänge dieses Krankheitsbild auslösen. Zwar gibt es Fälle von genetisch bedingtem Morbus Alzheimer, die mit Mutationen im PS1-, PS2- oder APP-Gen einhergehen, aber die weitaus häufigere, sporadische Form der Krankheit konnte man bislang nicht mit klar definierten Auslösern in Verbindung bringen. Nachfolgend sind verschiedene Hypothesen aufgelistet, die versuchen eine mögliche Erklärung zur Entstehung und den Auslösern der Alzheimer-Erkrankung zu geben.

1.5.1 Übersicht der verschiedenen Hypothesen

Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt, um eine Erklärung für das Entstehen des pathologischen Befundes zu geben. Darunter finden sich verschiedene Auslöser:

- **gestörte Cholesteroll-Homöostase** durch Lipid-Peroxidation und A β , beeinträchtigt die synaptische Plastizität und neuronale Membranintegrität (Koudinov and Koudinova 2005).
- **Apolipoprotein E**
Interaktion von ApoE mit β -Amyloid-Peptid, dessen Konformation, Aggregation und Entfernung dadurch beeinflusst wird (Holtzman 2004).
- **Oxidativer Stress und mitotische Zellzyklus-Signalwege**
gleichzeitige Abnormalität in den Signalwegen von oxidativem Stress oder Mitose kann als Initiator in Alzheimer fungieren („Two hit hypothesis“); neuronale Apoptose in Alzheimer und abnormale Aktivierung von SAPK-Signalwegen als Ergebnis von chronischen, tolerablem oxidativem Stress auf Neuronen (Zhu, Lee *et al.* 2005).
- **Autoimmun-Erkrankung**
Verlust von Neuronen kann von der Anwesenheit bzw. Affinität von neuronenspezifischen Antikörpern zusammen mit einer Dysfunktion der Blut-Hirnschranke abhängig sein (D'Andrea 2003).
- **Störung der glialen Zellfunktionen**
führt in Oligodendrozyten und Astrozyten zu einem Fehler der Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin)-Synthese und Defiziten in der Versorgung mit erhaltenden und protektiven Faktoren für Neurone, in denen sich oxidativer Stress, A β -Toxizität und Dysfunktionen entwickeln.
- **Polymorphismen in Entzündungsgenen**
insgesamt 8 Polymorphismen sind bekannt, die das Alzheimer-Risiko erhöhen, darunter vier inflammatorische Zytokine und zwei Akute-Phase-Reaktanten. erhöhtes Risiko chronisch entzündlicher Reaktionen mit Vulnerabilität und selbstzerstörerischen Prozessen (Grimaldi, Casadei *et al.* 2000).
- **Axonale Transport Dysfunktion** = Tau-Hypothese (Trojanowski, Smith *et al.* 2005)
- **Amyloid-Kaskaden-Hypothese** (Hardy and Selkoe 2002)

1.5.2 Die Amyloid- und die Tau-Hypothese

Bei der **Amyloid-Hypothese** wird die Ansicht vertreten, dass eine Veränderung in der APP-Prozessierung der Auslöser für das Krankheitsbild ist (Hardy und Higgins 1992). Diese Veränderung führt zu einer verstärkten Produktion von $A\beta_{1-42}$, welches aggregiert und so den Kern der entstehenden Plaques bildet. Außerdem soll $A\beta_{1-42}$ auch alle weiteren Ereignisse im Krankheitsverlauf, wie die Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins, Bildung der Neurofibrillen, Neurodegeneration und schließlich die Demenz verursachen (Mudher und Lovestone, 2002). Es ist unklar, wie genau $A\beta_{1-42}$ diese Kaskade auslösen soll, aber es gibt doch einige Hinweise, die diese Hypothese unterstützen. Zum einen sind Mutationen in APP oder Presenilin-Genen eine der Ursachen für genetisch bedingte Alzheimer-Fälle. In Fibroblasten dieser Patienten sowie in Tiermodellen mit entsprechenden Mutationen wurden erhöhte $A\beta_{1-42}$ -Spiegel detektiert (Suzuki, Cheung *et al.* 1994; Tamaoka, Odaka *et al.* 1994; Citron, Vigo-Pelfrey *et al.* 1994). Dies unterstützt die Annahme, dass die verstärkte Produktion von $A\beta_{1-42}$ ein frühes Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Zum anderen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass $A\beta$ eine neurotoxische Wirkung auf Zellkulturen hat und unter einigen Bedingungen die Phosphorylierung des Tau-Proteins *in vitro* bewirken kann (Takashima, Honda *et al.* 1998; Alvarez, Munoz-Montano *et al.* 1999).

Im Widerspruch zu der Amyloid-Hypothese stehen jedoch *in vivo*-Beobachtungen, die in transgenen Mäusen gemacht wurden, die einen erhöhten $A\beta_{1-42}$ -Spiegel aufwiesen. Es wurden zwar die Alzheimer-typische Plaque-Formation gefunden (Citron, Westaway *et al.* 1997; Duff, Eckman *et al.* 1996), andere typische pathologische Charakteristika, wie Formation von Fibrillenbündeln und Degeneration von Neuronen, konnten jedoch nicht beobachtet werden (Irizarry, McNamara *et al.* 1997; Games, Adams *et al.* 1995). Ein anderer widersprüchlicher Punkt ist die selektive Neurodegeneration im menschlichen Alzheimer-Gehirn. Obwohl Amyloid-Ablagerungen in allen Bereichen des Gehirns auftreten, kann nicht überall ein Verlust von Neuronen beobachtet werden. Im Kleinhirn z.B. finden sich fast keine degenerierenden Neurone und keine Fibrillenbündel, obwohl sich dort Amyloid-Plaques bilden (Joachim, Morris *et al.* 1989).

Die **Tau-Hypothese** sieht das entscheidende Ereignis in einer Dysfunktion des axonalen Transports. Im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung wird Tau hyperphosphoryliert, verliert

dadurch seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und bildet stattdessen filamentförmige Aggregate im Zellkörper. Dieser Prozess wird als ein Verlust der Tau-Funktion („*loss of function*“) beschrieben bei gleichzeitiger Entstehung einer toxischen Funktion („*gain of toxic function*“). Durch die Depolymerisation der Mikrotubuli wird der axonale Transport beeinträchtigt. Dies führt zu synaptischer Dysfunktion und letztendlich zur axonalen Degeneration (Trojanowski, Smith *et al.* 2005). Zu Gunsten dieser Hypothese spricht die Tatsache, dass die Fibrillenbündel in degenerierenden Neuronen vorzufinden sind, was ein Indiz dafür sein könnte, dass sie zum Tod dieser Neuronen beitragen. In späten Krankheitsstadien findet man auch extrazelluläre Fibrillenbündel. Außerdem beginnt die Formation von Fibrillen in Gehirnarealen, die eine Rolle beim Gedächtnis spielen (Braak und Braak 1998; Braak, Braak *et al.* 1994) und konnte gut mit dem kognitiven Zustand der Patienten korreliert werden (Nagy, Esiri *et al.* 1995). Allerdings fanden Naslund und seine Kollegen auch eine Korrelation zwischen der Akkumulation von Amyloid und dem kognitiven Zustand der Patienten (Naslund, Haroutunian *et al.* 2000).

Mutationen im Gen, das für das Tau-Protein kodiert, können zwar zur Formation von Fibrillenbündeln führen, nicht aber zur Bildung von Amyloid-Plaques. Mutationen in APP-Genen, PS1- oder PS2-Genen dagegen können beide Pathologien hervorrufen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Amyloid-Aggregation das frühere Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Die Bildung der Tau-Fibrillenbündel scheint eher eine Folge der Bildung der Amyloid-Plaques zu sein. Mutationen im Gen des Tau-Proteins sind jedoch ausreichend, um eine Demenz zu verursachen. Neuere Studien bringen die Amyloid- und die Tau-Hypothese etwas näher zusammen. Studien an transgenen Mäusen, die sowohl mutiertes Tau-Protein als auch mutiertes APP überexprimierten, zeigten, dass die Amyloid- und Tau-Pathologien miteinander in Verbindung stehen. Im Gegensatz zu den Mäusen, die nur die Tau-Mutation überexprimierten, wiesen die Doppelmutanten grundsätzlich mehr Fibrillenbündel auf. Außerdem fanden sich bei den Doppelmutanten Fibrillen in Hirnarealen, die bei den reinen Tau-Mutanten nicht betroffen waren (Lewis, Dickson *et al.* 2001). Eine weitere interessante Beobachtung machten Götz und Kollegen an reinen Tau-Mutanten. Durch Injektion von Amyloid ins Gehirn dieser Mäuse wurde eine verstärkte Fibrillen-Formation in Gehirnarealen hervorgerufen, von denen die Neuronen zur Injektionsstelle projizieren. Dieser Effekt von Amyloid konnte jedoch nur bei Mäusen mit Tau- Mutation beobachtet werden. Bei Mäusen, die das Wildtyp Tau-Protein überexprimierten, löste die Amyloid-Injektion keine Fibrillen-Formation aus (Götz, Chen *et al.* 2001). Die Gegenwart von

Amyloid allein ist demnach *in vivo* nicht ausreichend, um die Fibrillen-Pathologie auszulösen. Dass die Amyloid- und Tau-Pathologien miteinander in Verbindung stehen, konnte also gezeigt werden. Worin genau die Verbindung liegt, ist jedoch noch unklar (Oddo, Caccamo *et al.* 2003).

1.6 Oxidativer Stress

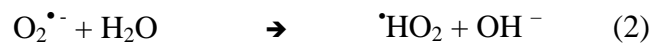
„Normales Attribut des aeroben Lebens ist die strukturelle Schädigung einer Vielzahl von Verbindungen – DNA, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden – durch Oxidation. Die oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies wird oxidativer Stress genannt.“ (Sies 1986). Seit einiger Zeit wird oxidativer Stress und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen gebracht wie Apoplexie, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Coyle and Puttfarcken 1993). Die besondere Anfälligkeit von neuronalem Gewebe auf oxidativen Stress wurde in einer Vielzahl von experimentellen Beobachtungen belegt und durch die besondere Lipidbeschaffenheit sowie den geringen Anteil an reaktiven Schutzmechanismen im Gehirn erklärt (Behl and Holsboer 1998).

Sauerstoff spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Lebensvorgängen, sei es in seiner elementaren Form oder in Form seiner Verbindungen. Dass toxische Effekte von reaktiven Sauerstoffverbindungen ausgehen, ist seit einiger Zeit bekannt (Jaeschke 1995). Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies auf- und abbauenden Systemen gestört ist. Diese Verbindungen werden auch als freie Radikale bezeichnet und sind charakterisiert durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen (Jesberger and Richardson 1991). Im Zusammenhang mit Sauerstoff spricht man von „reactive oxygen species, ROS“ (Williams 1995). ROS entstehen dadurch, dass Sauerstoff als Oxidationsmittel fungiert und Elektronen von anderen Molekülen aufnimmt (Mortimer 1987). Biologisch wichtige Vertreter der ROS sind Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($\bullet OH$). Zur Familie der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) gehören Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\bullet}) und Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$). Die Entstehungsweisen dieser Radikale sind vielfältig und finden sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen statt.

1.6.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

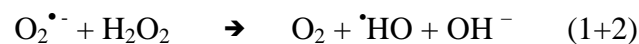
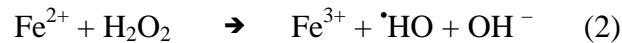
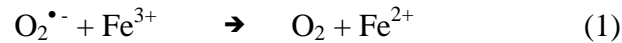
Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter physiologischen Bedingungen ist ein natürlicher Vorgang, wobei der größte Anteil während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien entsteht (Halliwell and Gutteridge 1986). Darüber hinaus wird $O_2^{\bullet -}$ durch immunaktive Zellen gebildet, z. B. durch Makrophagen, Neutrophile und durch Mikroglia im ZNS. Von diesen Zellen wird $O_2^{\bullet -}$ zum Beispiel zur Abwehr von Bakterien produziert (Curnette 1987). Antigen-präsentierende Makrophagen setzen aber auch Zytokine frei, die die Produktion von ROS auslösen können (Finkel 2000). In kleinen Mengen wird $O_2^{\bullet -}$ und NO^{\bullet} auch von immunpassiven Zelltypen wie Fibroblasten, Lymphozyten und Endothelzellen gebildet. Daher wird den ROS auch Funktionen in der Signaltransduktion eingeräumt (Finkel and Holbrook 2000).

Unter aeroben Bedingungen ist Sauerstoff der häufigste Reaktionspartner für Radikalreaktionen (Riley 1994). Die zwei ungepaarten Elektronen des Sauerstoffs werden in der Atmungskette zu H_2O reduziert. Dabei entstehen verschiedene radikalische Zwischenprodukte (Yu 1994):



Häufig wird in Reaktionen die nicht radikale Verbindung Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Radikalen umgewandelt. Ungepaarte Elektronen machen freie Radikale zu bevorzugten Reaktionspartnern. Die dabei entstehenden Endprodukte sind häufig ihrerseits Radikale, was dann zu Kettenreaktionen führen kann. H_2O_2 ist wenig reaktiv und fungiert als gutes Oxidationsmittel. Es diffundiert leicht durch Zellmembranen und wird im menschlichen Körper durch verschiedene Enzyme wie Monoamin-Oxidase, Glykolat-Oxidase und Superoxiddismutase (SOD) gebildet (Halliwell 1992). Der toxische Effekt wird durch Hydroxylradikale ($\cdot OH$) vermittelt. $\cdot OH$ schädigt Makromoleküle wie DNA, RNA, Lipide und Proteine. Die Bildung dieses Radikals verläuft unter anderem über eine Reaktion von

H₂O₂ mit Metallionen, vorrangig mit Übergangsmetallen wie Eisen, Kupfer und Chrom (Stohs and Bagchi 1995). Nach der Fenton-Reaktion reagiert H₂O₂ mit Fe²⁺-Ionen und bildet $\cdot\text{OH}$. O₂^{•-} reduziert Fe³⁺ wieder zu Fe²⁺. Die Kombination der beiden Gleichungen ergibt die Haber-Weiss-Reaktion, die durch Eisen katalysiert wird (Halliwell and Gutteridge 1992):



Reaktive Sauerstoffverbindungen können ferner durch Autoxidation von Catecholaminen gebildet werden. Diese reagieren mit Sauerstoff unter Bildung von Chinonen, welche dann zu Neuromelanin umgebaut werden. Während dieses Vorgangs entstehen reaktive Hemichinone, H₂O₂ und weitere Sauerstoffradikale (Coyle and Puttfarcken 1993). Bei Ischämie von großer Bedeutung ist die Xanthin-Oxidase-Reaktion, bei der Xanthin und Sauerstoff zu O₂^{•-}, H₂O₂ und Harnstoff umgesetzt werden (Olanow 1993). Neben der endogenen ROS-Bildung existieren auch exogene Ursachen, die zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen. Exogene Quellen sind beispielsweise Xenobiotika, ionisierende Strahlung und UV-Licht (Jesberger and Richardson 1991).

1.6.2 Entstehung reaktiver Stickstoffspezies

Stickstoffmonoxid (NO[•]) wird aus der Aminosäure L-Arginin gebildet durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS). Dazu werden verschiedene Co-Substrate und Co-Faktoren wie Sauerstoff und NADPH benötigt. Die NOS liegt in drei verschiedene Formen vor: neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS-I), endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS-III) und die immunologische, inflammatorische oder meistens induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS-II) (Shareef, Sawada *et al.* 1999; Moro, Cardenas *et al.* 2004). NO reagiert mit freien Sauerstoffradikalen und bildet hochreaktive zytotoxische Produkte wie Peroxynitrit (ONOO⁻) und Peroxynitrosäure (ONOOH) (Vaziri, Lee *et al.* 2004). Peroxynitrit kann Schäden an Makromolekülen wie Oxidation von DNA, Einzelstrangbrüche, Lipidperoxidation, Bildung von Proteincarbonylen und die Oxidierung verschiedener Aminosäuren bewirken (Giasson, Ischiropoulos *et al.* 2002). Im Vergleich zur nNOS und eNOS, welche in Neuronen und Endothelzellen exprimiert werden,

produziert die iNOS erheblich mehr NO. Die iNOS wird vorwiegend in Astrozyten und Mikroglia, aber auch teilweise in Oligodendrozyten, Schwannzellen und im cerebralen Endothelium exprimiert (Smith, Kapoor *et al.* 1999; Mikkelsen and Wardman 2003; Moro, Cardenas *et al.* 2004). Die Kontrolle der Expression erfolgt hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene und bezieht Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B mit ein. NO ist auch an der eigenen Regulation in Form von negativem Feedback beteiligt (Smith, Kapoor *et al.* 1999).

NO besitzt neben einer immunoregulatorischen auch eine immunsuppressive Wirkung auf aktivierte proinflammatorische Makrophagen und T-Lymphozyten. Zusätzlich zur Immunantwort ist NO auch an der Modulation der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und der Wanderung von Zellen im ZNS beteiligt (Parkinson, Mitrovic *et al.* 1997). *In vivo*- und *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass NO auch als antioxidatives Agens wirken kann. Es fängt kurzlebige, hochreaktive freie Radikale wie Superoxidanion ($O_2^{\bullet -}$), Hydroxyl-Radikal ($^{\bullet}OH$), Peroxylipidradikale (LOO^{\bullet}) und andere ab. Dabei entstehen verschiedene Stickstoffspezies wie Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-), S-Nitrosoglutathion (GSNO) und Peroxynitrit ($ONOO^-$). GSNO inhibiert den peroxidativen Effekt von $ONOO^-$, während CO_2 und NO den peroxidativen Effekt von $ONOO^-$ neutralisieren und so Proteinoxidationen verhindern (Chiueh 1999; Mikkelsen and Wardman 2003).

1.6.3 Oxidativer Stress und Morbus Alzheimer

Das ZNS besitzt einen besonders hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ist daher empfindlich gegenüber oxidativem Stress (Coyle and Puttfarcken 1993). Das Gehirn ist metabolisch besonders aktiv, hat einen starken Sauerstoffverbrauch und antioxidativ wirksame Enzymsysteme sind weniger stark ausgeprägt. Im Gehirn wurden nur geringe Katalase-Aktivität und moderate Mengen an Glutathionperoxidase und Superoxid-Dismutase (SOD) nachgewiesen und einige Bereiche wie der Globus pallidus und die Substantia nigra sind zudem besonders eisenhaltig (Halliwell 1992). Oxidativer Stress kann neuronalen und glialen Zelltod induzieren (Whittemore, Loo *et al.* 1994; Richter-Landsberg and Vollgraf 1998) und ist vermutlich an einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen und Alterungsprozessen beteiligt (Jesberger and Richardson 1991; Halliwell 1992; Bains and Shaw 1997).

Untersuchungen über oxidierte Proteine in Gehirnen von Alzheimerpatienten ergaben einen signifikanten Anstieg oxidiertes Proteine im Hippocampus (Hensley, Hall *et al.* 1995). Verschiedene andere Produkte oxidativen Stress wurden in Verbindung mit NFTs beobachtet: „advanced glycation endproducts, AGEs“ (Yan, Chen *et al.* 1994), Proteincarbonyle (Hensley, Hall *et al.* 1995), Nitrotyrosin (Goodwin, Uemura *et al.* 1995) und Malondialdehyd (Yan, Chen *et al.* 1994). Die oxidierten Nucleoside 8-Hydroxydeoxyguanosin und 8-Hydroxyguanosin waren vermehrt im Zytoplasma und in verminderter Konzentration im Kern hippocampaler Neurone von Alzheimerpatienten vorhanden und vorherrschend mit RNA assoziiert (Nunomura, Perry *et al.* 1999).

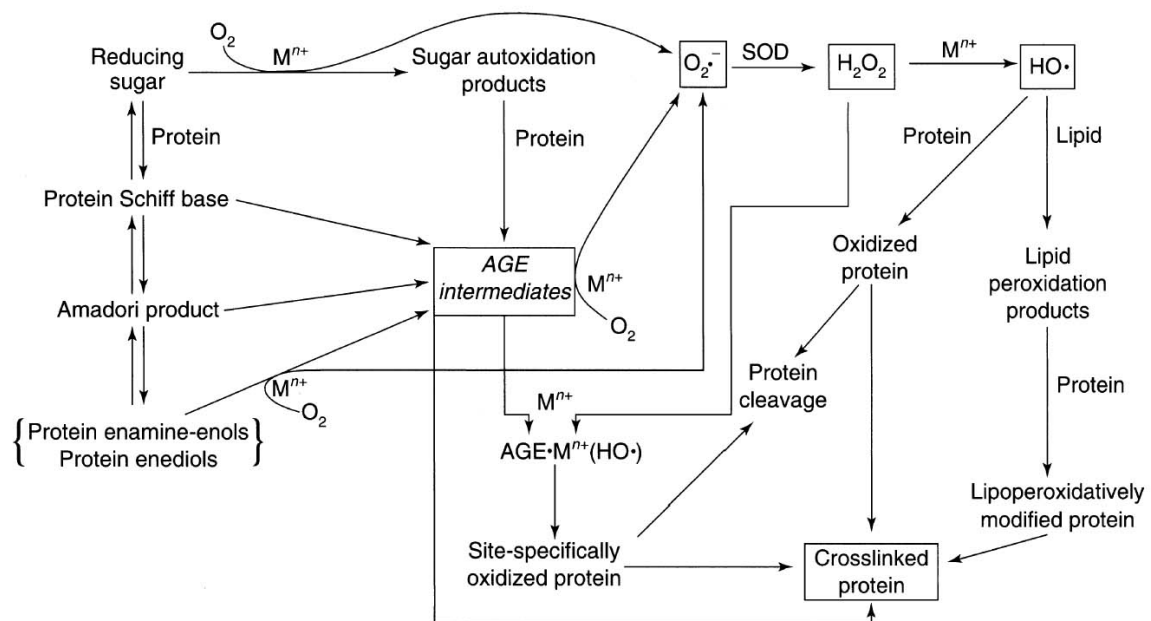


Abbildung 1.6–1 Proteinmodifikationen durch oxidativen Stress bei Morbus Alzheimer
 Proteinmodifikationen werden durch freie Sauerstoffradikale ($O_2^{\cdot-}$ und $\cdot OH$) und oxidative Zwischenprodukte wie H_2O_2 verursacht. Proteine können durch Autoxidation und reaktive Aldehyde (siehe Enole, linke Seite) modifiziert, zu AGEs glykiert und abschließend verknüpft („crosslinked“) werden. Diese Prozesse verlaufen oft synergistisch, so dass die Proteinmodifikation auch die Produktion redox-aktiver Spezies beinhaltet, die die Autoxidation freier Radikale weiter potenzieren (Smith, Rottkamp *et al.* 2000).

Einen weiteren Beleg für die Auswirkungen von oxidativem Stress auf neuronale Schäden zeigte die immunhistochemische Expression von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und der Akkumulation des Endproduktes Poly(ADP-Ribose) im Kern von Neuronen. Bei Alzheimerpatienten waren Expression und Anhäufung wesentlich stärker als in Kontrollgehirnen (Love, Barber *et al.* 1999). Kultivierung von Neuronen haben indirekte Belege über durch freie Radikale vermittelte Zellschädigung, Degeneration und Zelltod ergeben. Kultivierung von hippocampalen Neuronen mit A β verursachte einen starken

Anstieg der intrazellulären Produktion freier Radikale und Radikal-vermitteltem Zellschaden (Behl, Davis *et al.* 1994), der durch verschiedene Antioxidantien unterbunden werden konnte (Mattson, Cheng *et al.* 1992). Aber welche Rolle oxidativer Stress im Zusammenhang mit dem Tau-Protein spielt, ist unbekannt. Ob ***oxidativer Stress einen Einfluss auf den Turnover und die Phosphorylierung des Tau-Proteins hat*** wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Eine weitere Quelle für Radikale sind aktivierte Mikrogliazellen, die in der Hirnrinde von Alzheimerpatienten zu finden sind. Mikroglia sezerniert Stickstoffmonoxid (NO[•]) in Gegenwart von A β (Goodwin, Uemura *et al.* 1995). NO reagiert in einer diffusionskontrollierten Reaktion mit O₂^{•-} zu Peroxynitrit, welches wiederum Tyrosin-Reste nitriert, einschließlich Zytoskelettproteine und NFTs (Good, Werner *et al.* 1996).

Ein kumulativer oxidativer Schaden über einen längeren Zeitraum könnte somit für das späte Einsetzen und das langsame Voranschreiten der Krankheit verantwortlich sein (Coyle and Puttfarcken 1993). Auch wenn die Erzeugung von freien Radikalen kein auslösender Faktor der Alzheimer Krankheit ist, so ist es dennoch ein Teil der pathophysiologischen Kaskade des neuronalen Schadens und Zelltodes. Es ist bisher nicht bekannt welche Rolle nitrosativer Stress im Zusammenhang mit dem Tau-Protein spielt und ob ***nitrosativer Stress einen Einfluss auf den Turnover und die Phosphorylierung des Tau-Proteins hat***.

Abbildung 1.6-2 zeigt mögliche Zusammenhänge zwischen Stickstoffmonoxid und alzheimerspezifischen Merkmalen auf.

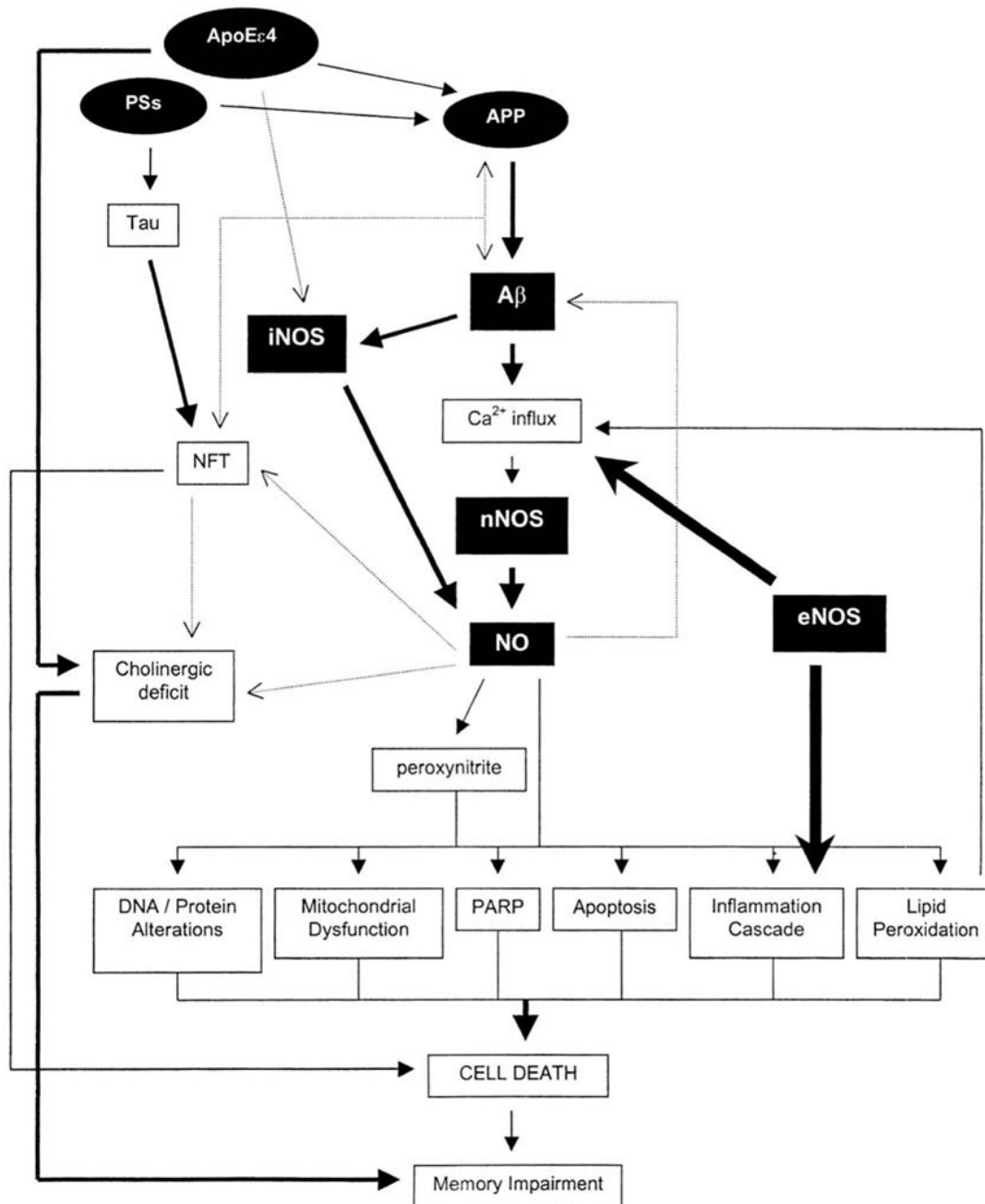


Abbildung 1.6–2 Mögliche Rolle von NO bei der Alzheimer-Erkrankung Die Produktion von NO und Peroxynitrit kann verschiedene neurotoxische Mechanismen auslösen die letztendlich zum Tod der Zelle führen können. Die Abbildung zeigt mögliche Verbindungen zwischen NO und alzheimerspezifischen Charakteristika auf und deren Auswirkung. (Entnommen aus Law, Gauthier *et al.* 2001: “Say NO to Alzheimer’s disease: the putative links between nitric oxide and dementia of Alzheimer’s type”)

Wie also reagiert eine Zelle auf vermehrten oxidativen und nitrosativen Stress und dessen Produkte? Ein sehr effizientes und hoch entwickeltes System stellt die Proteolyse in der Zelle dar, die spezifisch und selektiv Proteine und auch dessen Modifikationen entfernen kann.

1.7 Intrazelluläre Proteolyse unter besonderer Berücksichtigung des Proteasoms

Biologische Systeme bauen ständig Moleküle auf und ab, um ein Gleichgewicht zu halten. Dieses Prinzip des Abbaus und der Wiederverwertung von Proteinen innerhalb der Zelle wird als Proteolyse bezeichnet. Abnormale bzw. geschädigte Proteine werden abgebaut und so der Proteinsynthese wieder zugeführt. Die Proteolyse ist jedoch nicht nur wichtig für die Rückgewinnung von Aminosäurebausteinen. Vielmehr greift sie in essentielle Steuervorgänge der Zelle ein. Proteolyse ist beteiligt an der Regulation der Proteinexpression, der Steuerung metabolischer Wege und spielt eine zentrale Rolle in der Zykluskontrolle.

Die Lebensdauer einzelner Proteine in der Zelle ist sehr unterschiedlich. Es existieren langlebige Proteine mit Halbwertszeiten von bis zu 200 Stunden (Muskelproteine Aktin und Myosin) neben kurzlebigen Proteinen (Tumorsuppressor-Protein p53), die innerhalb weniger Minuten abgebaut werden (Rechsteiner, Rogers *et al.* 1987). Bestimmte Umwelteinflüsse, Signale oder intrazellulärer Programme regulieren Proteine in ihrer Lebensdauer; so werden sie kurzlebig und dann schnell abgebaut. Die Proteolyse und damit Inaktivierung regulatorischer Proteine erfüllt eine wichtige Aufgabe bei der Steuerung intrazellulärer Programme. Der Abbau metabolischer Proteine bewirkt im Zusammenspiel mit der Proteinneusynthese eine Anpassung an geänderte Umgebungsbedingungen. Aufgrund von Stress entstandene abnormale und damit inaktiv gewordene Proteine müssen erkannt und abgebaut werden.

Das Konzept der intrazellulären Proteolyse ist ein sehr modernes. Um einen unkontrollierten Abbau zu verhindern, muss die intrazelluläre Proteolyse sehr selektiv ablaufen. Eine solche Selektivität wird durch zwei Hauptmechanismen erreicht. So wurden zum einen unspezifisch agierende Proteasen in Lysosomen eingeschlossen und somit durch eine Membran von den restlichen Zellbestandteilen getrennt (siehe Abb. 1.7-1). Dieses endosomal-lysosomale System baut durch Endozytose aufgenommene Proteine ab (Hilt and Wolf 1995). Andererseits wurden hochspezifische und komplexe proteolytische Systeme entwickelt, die frei in der Zelle vorliegen und ihre Substratproteine nach Markierung spezifisch erkennen können. Dieses nicht-lysosomale System baut Proteine des Zellkerns, Zytosols und Endoplasmatischen Retikulums ab. Der größte Teil der nicht-lysosomalen intrazellulären Proteolyse wird von dem Ubiquitin-Proteasom-System ausgeführt (Mayer 2000).

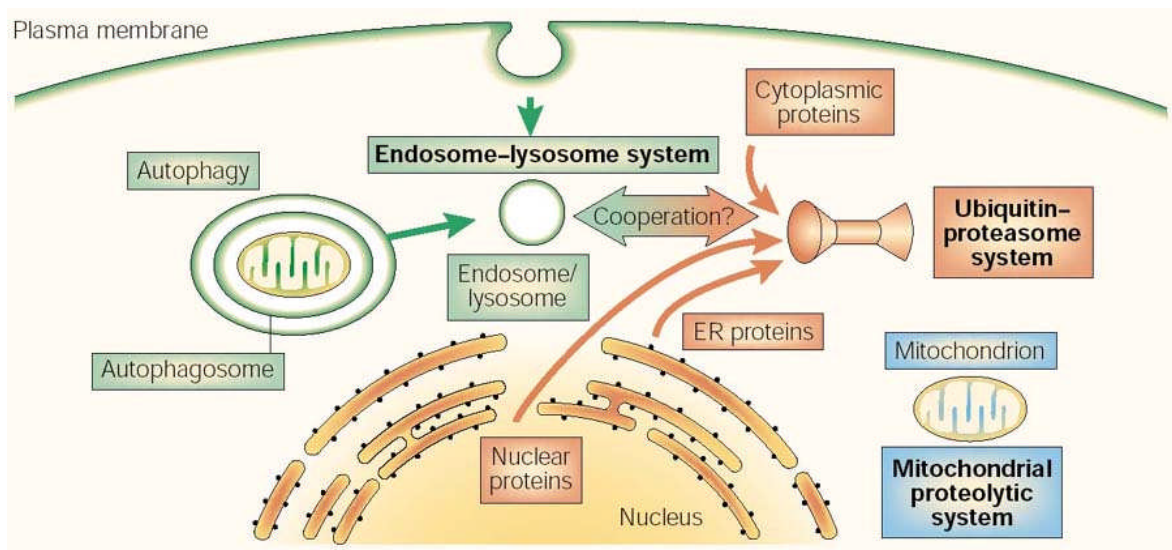


Abbildung 1.7–1 Hauptproteolysewege in eukaryotischen Zellen. Der endosomal-lysosomale Weg (grün) baut extrazelluläre und Oberflächenproteine ab, so z.B. Rezeptoren und ihre Liganden. Intrazelluläre Organellen gelangen in diesen Abbauweg durch Autophagosomen. Der Ubiquitin-Proteasom-Weg (rot) baut Proteine aus dem Zytoplasma, Nucleus und ER ab. Möglicherweise arbeiten diese beiden Wege zusammen. Mitochondrien besitzen ein eigenes proteolytisches System ähnlich zu dem in Prokaryoten (Mayer 2000).

Während Abbausignale auf Proteinebene nur partiell verstanden sind, ist das bisher wichtigste Signalvermittlungssystem des Proteinabbaus, das Ubiquitinsystem, grundlegend beschrieben. Durch Modifizierung mit Ubiquitin können Proteine für den proteolytischen Abbau markiert werden. Ubiquitin ist ein hoch konserviertes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht. Es wird durch Knüpfung einer energiereichen Thiolesterbindung zwischen dem carboxyterminalen Glycinrest des Ubiquitins und einem so genannten Ubiquitin-aktivierendem-Enzym E1 unter Verbrauch von ATP aktiviert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf eine Cysteinseitenkette eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen. E2-Enzyme modifizieren dann abzubauenende Proteine in Zusammenarbeit mit einem Substratprotein-erkennenden-Enzym E3 durch kovalente Bindung des Ubiquitins an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des Substratproteins. Die Wiederholung des Prozesses führt durch Bindung weiterer Ubiquitin-Einheiten an Lysinreste bereits angehängter Ubiquitin-Einheiten zum Aufbau von Multiubiquitinketten, die das so modifizierte Protein zum proteolytischen Abbau determinieren (Weissman 2001). Spezifität wird durch unterschiedliche E2-Enzyme oder E2-E3-Kombinationen erreicht, die eines jeden Substrats eigenes Abbausignal erkennen. Das minimale Signal für eine effiziente proteasomale Markierung ist Tetra-Ubiquitin (Thrower, Hoffman *et al.* 2000).

Proteasomen sind hoch entwickelte Proteasen der Eukaryontenzellen mit zentraler Funktion. Der Größe nach werden zwei Komplexe unterschieden, die entsprechend ihrer Sedimentationskonstanten als 20S und 26S Proteasom bezeichnet werden.

Bei dem 20S Proteasom handelt es sich um das Kernstück des proteasomalen Systems. Es ist eine hochmolekulare, komplexe Protease mit multikatalytischer Funktion (Wilk and Orłowski 1980). Das 20S Proteasom ist ein zylindrisch geformter Partikel (ca. 12×15 nm) mit einem Molekulargewicht von ca. 700 kDa und besteht aus mehreren verschiedenen Untereinheiten (Edmunds and Pennington 1982). Elektrophoretisch lassen sich 13-20 verschiedene Proteinuntereinheiten mit einem Molekulargewicht von 21–35 kDa auftrennen. Elektronenmikroskopisch zeigen die Partikel einen Aufbau aus vier übereinander gelagerten Ringen mit siebenfacher Symmetrie (Baumeister, Dahlmann *et al.* 1988). Der Hohlzylinder ist aus einem Satz von 14 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut und hat eine komplexe Dimerstruktur aus zwei identischen Subkomplexen mit je 7 α - und 7 β -Untereinheiten. Jede der verschiedenen Untereinheiten nimmt innerhalb des Komplexes zwei definierte Positionen ein (Kopp, Dahlmann *et al.* 1993).

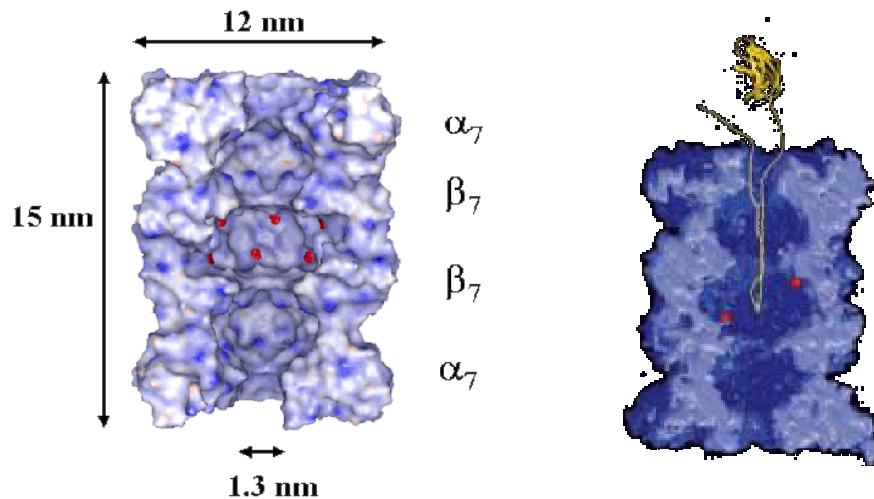


Abbildung 1.7-2 Kristallstruktur des 20 S Proteasoms. Atomare Modelle basierend auf den Kristallstrukturdaten des 20 S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* und Hefe. Die aktiven Seiten, die an der Peptidspaltung beteiligt sind, sind in rot gekennzeichnet. Im rechten Modell ist der Eintritt eines entfaltenen Proteins durch die 1,3 nm breite Öffnung des 20S-Kernkomplexes dargestellt (<http://maupin.ifas.ufl.edu/maupin/20SproteasomeModel.htm>).

Die äußeren Ringe, bestehend aus den α -Untereinheiten, schützen das aus β -Untereinheiten gebildete innere aktive Zentrum vor der zytosolischen Umgebung. Die beiden inneren Ringe mit den β -Untereinheiten tragen die proteolytischen Seiten, die zum zentralen Raum

des 20S-Komplexes zeigen, während die α -Untereinheiten den Eingangsbereich über der Öffnung des äußeren Rings und die Bindung von Regulatoren kontrollieren (Coux, Tanaka *et al.* 1996).

Gereinigte 20S Proteasomen zeigen mindestens fünf unterscheidbare proteolytische, Peptid-spaltende Aktivitäten. Sie können artifizielle Peptidsubstrate an der Carboxylseite von hydrophoben Aminosäuren spalten (chymotryptische Aktivität), basische (tryptische Aktivität) und saure Aminosäuren (Peptidyl-glutamyl-peptid-spaltende Aktivität) schneiden. Zwei weitere unabhängige Peptid-spaltende Aktivitäten schneiden an verzweigten bzw. kleinen hydrophoben Aminosäuren (Orlowski, Cardozo *et al.* 1993). Die einzelnen Peptid-spaltenden Aktivitäten werden verschiedenen katalytischen Zentren des Komplexes zugeschrieben. Sie unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren. Der Abbau der Substrate erfolgt zu Peptiden von 3-20 Aminosäurereste (Kisselev, Akopian *et al.* 1998).

Das 26S Proteasom ist ein hochmolekularer Protease-Komplex von ca. 2000 kDa, der aus einem Satz von mindestens 25 verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut ist. Das 26S Proteasom entsteht durch Anfügen von zwei zusätzlichen 19S Subkomplexen an beiden Enden des 20S Zylinders. In der SDS-Elektrophorese finden sich neben dem 20S Bandenmuster zwölf zusätzliche Banden mit einem Molekulargewicht von 40-110 kDa. Die 19S Subkomplexe zeigen eine V-förmige Struktur, sind um ca. 180 ° gegeneinander verdreht an den 20S-Komplex assoziiert und dienen der Regulation des proteasomalen Abbaus. Das 26S Proteasom wird durch ATP aktiviert, erkennt die spezifisch polyubiquitinierten Substrate und baut sie sehr schnell ab. Die ATPasen und Polyubiquitin- absplattenden Hydrolasen befinden sich im 19S Regulator

Die Suche nach möglichen Modulatoren der proteasomalen Aktivität führte zur Entdeckung eines 700 kDa Proteasomen-Aktivators, PA700, der sich später als identisch mit dem 19S Subkomplex zeigte. Der 19S Komplex setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen (Bochtler, Ditzel *et al.* 1999). Die so genannte »Basis« besteht aus acht Untereinheiten, wovon sechs der Familie der AAA-ATPasen zuzurechnen sind. Die ATPase-Untereinheiten bilden vermutlich einen hexameren Ring und interagieren direkt mit der Öffnung des 20S Proteasomenzylinders (Baumeister, Walz *et al.* 1998). Der Zugang zum Zylinder des 20S Proteasom wird durch den regulatorischen 19S Komplex kontrolliert wie in Abbildung 1.7-3 dargestellt (Groll, Bajorek *et al.* 2000). Ihre genaue

Funktion für den Abbau ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte eine Chaperonaktivität nachgewiesen werden (Braun, Glickman *et al.* 1999). Es wird daher vermutet, dass sie die Substrate für den Abbau entfalten und in den proteolytischen Zylinder übertragen. Die Basis des 19S Komplexes ist vermutlich nicht an der Bindung ubiquitiniertes Substrate beteiligt. Sie scheint jedoch eine Bindungsstelle für nicht-ubiquitinierte aber entfaltete Proteine zu besitzen (Braun, Glickman *et al.* 1999). Die Erkennung und Bindung der ubiquitinierten Substrate erfolgt durch den zweiten Subkomplex des 19S-Proteasoms, dem so genannten »Deckel«. Dieser besteht aus mindestens acht verschiedenen Untereinheiten ohne ATPase-Aktivität (Glickman, Rubin *et al.* 1998).

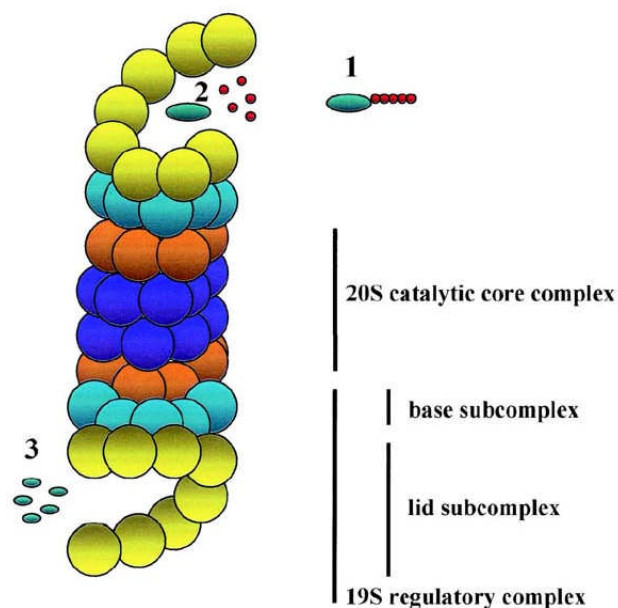


Abbildung 1.7–3 Aufbau der Untereinheiten und Proteinabbau durch das 26S Proteasom (schematisch) Der katalytische Kernkomplex des 20S Proteasoms besteht aus vier axial gestapelten 7-gliedrigen Ringen: zwei innere Ringe der β -Untereinheiten (dunkelblau) und zwei äußere Ringe, die durch die nicht-enzymatischen α -Untereinheiten gebildet wurden (orange). Der regulatorische 19S Komplex besteht aus einer Basis (hellblau) und einer Kappe (gelb). 1) Markierung eines Substratproteins durch kovalente Bindung von Ubiquitin-Monomeren (rote Kugeln) mittels der Ubiquitin-Enzyme E1-E3. 2) Eintritt in den 19S Komplex. Das Substratprotein wird erkannt, deubiquitiniert, entfaltet, in den katalytischen 20S Kern weitergeleitet und abgebaut. 3) Ausscheiden von kurzen Peptiden und Aminosäuren an der gegenüberliegenden Öffnung.

Säugetierzellen enthalten einen ATP-unabhängigen Aktivator der proteasomalen Tätigkeit gegen chromogene Substrate. Er wurde zuerst aus roten Blutzellen gereinigt und als PA28 bzw. 11S Aktivator benannt (Dubiel, Pratt *et al.* 1992). Es handelt sich um ein Heptamer aus einer α - und einer β -Untereinheiten. Die biologische Funktion des 11S Regulators ist

nicht genau bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie mit der Prozessierung von Antigenen zusammenhängt (Rechsteiner, Realini *et al.* 2000).

Da der 20S Kernkomplex zwei Bindungsstellen für Regulatoren besitzt, sind unterschiedliche Komplexe von Proteasomen denkbar. Tanahashi *et al.* quantifizierte die Bindung der Regulatoren und mögliche Komplexe.

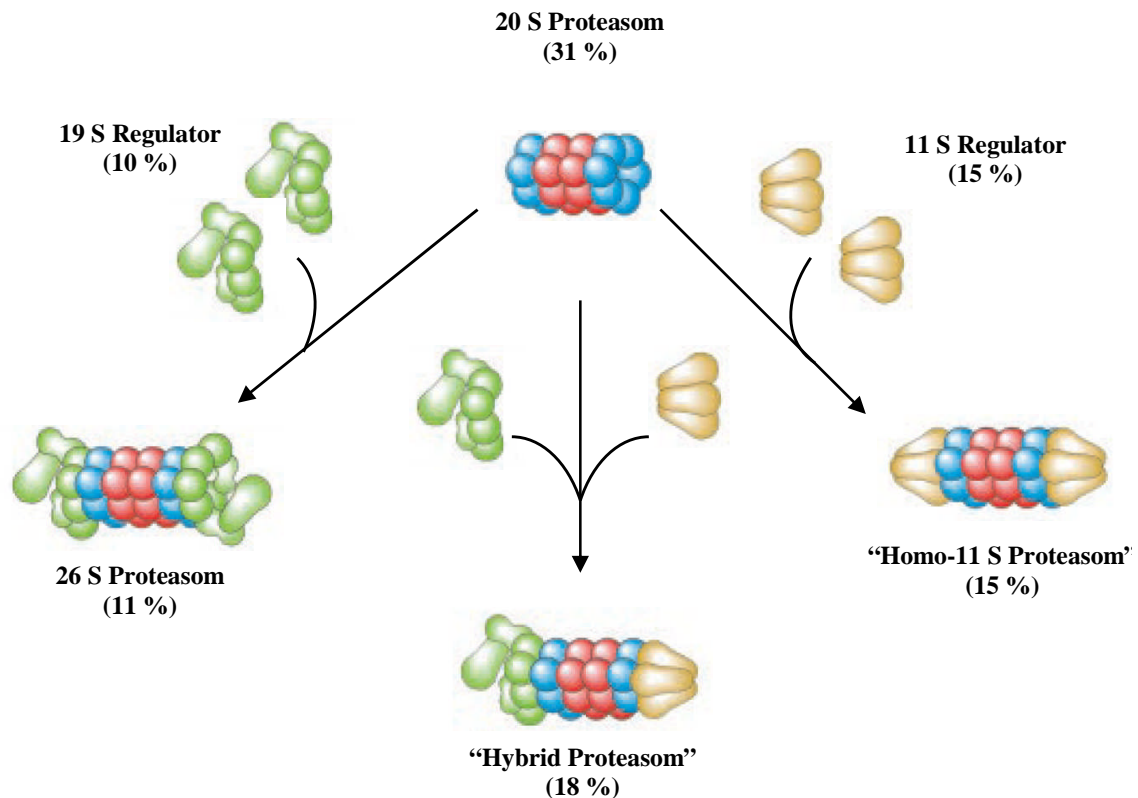


Abbildung 1.7-4 Das 20 S Proteasom, seine Regulatoren und mögliche Komplexe An jedem der beiden Enden des 20 S Proteasoms kann der 11S- und/oder 19 S Regulator gebunden werden. Die prozentuale Angabe beschreibt das Vorkommen der Komponenten und Komplexe im Zytosol von HeLa-Zellen. (Tanahashi, Murakami *et al.* 2000)

20S Proteasomen werden in Zytoplasma und Zellkern sowohl in freier Form als auch in 26S Proteasomen integriert gefunden (Peters, Franke *et al.* 1994; Yang, Fruh *et al.* 1995) und sind somit nicht nur inaktive Vorläuferproteine. Das 20S Proteasom kommt somit am häufigsten vor. In HeLa-Zellen wurde der 20S Komplex so häufig entdeckt wie der 26S Komplex und das Hybrid-Proteasom zusammen (Tanahashi, Murakami *et al.* 2000).

1.7.1 Funktion und Rolle des Proteasoms

Mittlerweile ist bekannt, dass eukaryotische Zellen die Mehrzahl der Proteine über den ATP-abhängigen Mechanismus abbauen (Ciechanover 1994). Das 26S Proteasom ist hierfür das wichtigste proteolytische Element (Coux, Tanaka *et al.* 1996; Bochtler, Ditzel *et al.* 1999). Es reguliert über seine verschiedenen aktiven Zentren eine Vielzahl biologischer Prozesse in der Zelle (Kisselev and Goldberg 2001), so zum Beispiel:

- Umsatz normaler Proteine
- Kontrolle des Zellzyklus
- Kontrolle der Proteinqualität
- selektive Erkennung und Abbau abnormer und oxidiertes Proteine
- Signaltransduktion, Prozessierung und Abbau von Vorläuferproteinen und Transkriptionsfaktoren
- Antigenpräsentation
- Genexpression
- Entzündungsreaktionen
- Apoptose
- Onkogenese

Ein geregelter Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) spielt eine entscheidende Rolle in einer großen Vielzahl essentieller zellulärer Wege. Diese Bahnen sind stark miteinander verschaltet, so dass Ausfälle des proteasomalen Abbaus schwere Störungen im Netzwerk der zellulären Funktionen hervorrufen können. Defekte im Ubiquitin-Proteasom-System sind die Ursache schwerer Erkrankungen (Wolf and Hilt 2004).

Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise einer Beteiligung von Proteasomen in parallelen Wegen einer Ubiquitin-unabhängigen Proteolyse *in vivo*, in denen 26S Partikel in der Lage sind Substrate abzubauen ohne dass sie vorher ubiquitiniert wurden (Benaroudj, Tarcsa *et al.* 2001) und dass auch der 20S Kern-Komplex alleine ohne Regulatoren prozessiert (Kisselev, Akopian *et al.* 1999; Tofaris, Layfield *et al.* 2001). Dies scheint besonders für entfaltete bzw. nativ ungefaltete Proteine zuzutreffen. Oxidierte Proteine zum Beispiel, die durch die Oxidation stärkerer entfaltet sind, werden bevorzugt vom 20S Proteasom erkannt und abgebaut (Davies 2001; Grune, Merker *et al.* 2003).

Werden z.B. aufgereinigte Proteine durch Sauerstoffradikale, Wasserstoffperoxid oder andere Oxidanzien oxidiert, so werden sie anschließend schnell und selektiv abgebaut, wenn sie mit zytosolischen Zellextrakten inkubiert werden. 70-80 % der proteolytischen Aktivität gegenüber oxidierten Proteinen werden durch das 20S Proteasom ausgeführt (Davies and Goldberg 1987; Pacifici, Kono *et al.* 1993; Grune, Reinheckel *et al.* 1997). Oxidationsprozesse zerstören die Tertiärstruktur der Proteine und führen dadurch zu einer partiellen Entfaltung. Dadurch werden hydrophobe Gruppen zugänglich gemacht, die ein bevorzugtes Substrat für das 20S Proteasom darstellen (Pacifici, Kono *et al.* 1993; Chao, Ma *et al.* 1997).

1.7.2 Neurodegenerative Erkrankungen und die Rolle des Proteasoms

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch neuronale Einschlüsse aggregierter Proteine charakterisiert. Der Mechanismus dieser Ablagerungen ist nach wie vor unbekannt. Es ist auch noch nicht geklärt, ob diese Ablagerungen die Ursache oder das Ergebnis der Neurodegeneration darstellen, da der exakte Zeitpunkt, an dem sie auftreten, nur geschätzt werden kann. Die Beteiligung von Ubiquitin bei diesen Einschlüssen wurde 1987 in Form von Ubiquitin-Protein-Konjugaten entdeckt (Mori, Kondo *et al.* 1987). Seither wurden in fast allen Neurodegenerativen Erkrankungen Ubiquitin-Konjugate gefunden wie zum Beispiel der Alzheimer-Erkrankung, Morbus Parkinson, Morbus Pick, Kreutzfeld-Jakob-Erkrankung oder Polyglutamin-Erkrankungen wie Morbus Huntington (Bence, Sampat *et al.* 2001; Taylor, Hardy *et al.* 2002). Obwohl diese Erkrankungen unterschiedlichsten Ursprungs sind, sind vermehrte Ubiquitin-Protein-Konjugate und ein scheinbarer Nicht-Abbau ein gemeinsames Merkmal. Ob es sich dabei um eine „abnorme“ Konformation oder ein Unvermögen der proteasomalen Proteolyse-Kaskade handelt, ist jedoch ungewiss. Es wird auch diskutiert, dass es sich um eine physiologische Antwort auf ein Übermaß an fehlgefalteten Proteinen handelt, die dann absichtlich unschädlich „zwischenlagert“ werden (Kopito 2000) oder es sich um protektive Maßnahmen handeln könnte, um dadurch Toxizität durch Monomere zu unterbinden (Sisodia 1998; Bucciantini, Giannoni *et al.* 2002). So konnte zum Beispiel bei der Alzheimer-Erkrankung gezeigt werden, dass die β -Amyloid-Oligomere toxischer sind als die eigentlichen Fibrillen (Walsh, Klyubin *et al.* 2002a/b).

Ebenso wie ubiquitinierte Einschlüsse so sind auch oxidierte Proteine in Form von Carbonylen ein gemeinsames Merkmal von Neurodegenerativen Erkrankungen (Smith,

Carney *et al.* 1991; Alam, Daniel *et al.* 1997). Sie werden oft als Indiz für erhöhte Konzentrationen von freien Radikalen genommen. Genauso gut können sie aber auch das Ergebnis eines nicht erfolgten Abbaus sein, der normaler Weise durch das Proteasom erfolgen würde. Nicht nur, dass oxidativer Stress zur Schädigung von Proteinen führt, als Folge können einige geschädigte Proteine selbst das Proteasom in seiner Funktion hemmen (Grune, Reinheckel *et al.* 1995; Friguier and Szweda 1997; Shringarpure, Grune *et al.* 2000). So kann eine Akkumulation oxidiertes Proteine, z.B. auch des A β durch 4-Hydroxynonenal, die Funktion des UPS beeinträchtigen (Shringarpure, Grune *et al.* 2000). Auf der anderen Seite führt eine Hemmung des Proteasoms zu verstärktem oxidativem Proteinschaden, ubiquitinierten Proteinen, Lipidperoxidation und reaktiven Stickstoffspezies (Lee, Hyun *et al.* 2001). Es stellt sich also die Frage nach dem Huhn oder dem Ei (Ciechanover and Brundin 2003).

Die Rolle des Ubiquitin-unabhängigen Proteinabbaus in Neurodegenerativen Erkrankungen ist aber nicht nur im Zusammenhang mit oxidativem Stress gegeben. Es wurde bereits gezeigt, dass auch das ungefaltete Protein α -Synuclein im Morbus Parkinson *in vivo* ein Substrat des 20S Proteasoms ist (Tofaris, Layfield *et al.* 2001). In Studien an postmortem Gehirnen von Alzheimerpatienten wurden geringere Proteasom-Aktivität gemessen (Keller, Hanni *et al.* 2000; Lam, Pickart *et al.* 2000; McNaught, Olanow *et al.* 2001). Unklar ist aber die Ursache. Es ist nicht bekannt, ob **weniger Proteasom vorhanden ist oder es durch alzheimerspezifische intrazelluläre Tau-Modifikationen gehemmt wird**. Würde es sich um eine Inhibition handeln, so könnte nicht abgebautes Tau aggregieren und zur PHF-Bildung beitragen. Bisher ist aber nicht untersucht, ob das Tau-Protein durch den Proteasom-Komplex verstoffwechselt wird.

Das Proteolyse-System, das für den Tau-Metabolismus *in vivo* verantwortlich ist, ist noch nicht gut charakterisiert. Dennoch wurde bereits gezeigt, dass das Tau-Protein durch verschiedene Proteasen *in vitro* prozessiert werden konnte. So z.B. durch Caspasen (Canu, Dus *et al.* 1998), Calpaine (Yang and Ksiezak-Reding 1995) und Thrombin (Olesen 1994). Die zunehmende Zahl unstrukturierter oder nahezu ungefalteter Proteine, die Ubiquitin-unabhängig von Proteasomen abgebaut wurden, lassen die Frage aufkommen, ob das Tau-Protein auf ähnliche Art und Weise prozessiert werden könnte. Es wurde bisher noch nicht untersucht, ob **das Tau-Protein generell auch ein Substrat des Proteasoms darstellt und ob bestimmte Modifikationen wie Oxidation oder Hyperphosphorylierung bevorzugt erkannt werden**.

1.8 Neuroinflammation und die Alzheimer-Krankheit

Entzündungen können im gesamten Organismus auftreten und so auch im Gehirn. Auch für Morbus Alzheimer wurden Entzündungsreaktionen im Gehirn festgestellt. Folgende Entzündungswege wurden bisher beschrieben (Akiyama, Barger *et al.* 2000):

- **Komplement-Aktivierung**
hervorgerufen durch unlösliche Ablagerungen von A β und Tangles, zellulären Abbauprodukten, freier DNA, Neurofilamenten und Myelin-Fragmenten
- **Akute-Phase-Proteine**
 α 1-Anti-Chymotrypsin und α 2-Macroglobulin sind in senilen Plaques enthalten
- **Zytokine und Chemokine (IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β)**
wichtig für inter- und intrazelluläre Signalweiterleitung, scheinen in Alzheimer-Hirnen alle erhöht im Vergleich zu Kontrollen
- **Cyclooxygenase (COX)**
Enzym, das in der Arachidonsäure-Kaskade zur Prostaglandin-Synthese führt
wird selbst durch proinflammatorische Mediatoren hoch reguliert,
Angriffspunkt für nicht-steroidale antiinflammatorische Wirkstoffe (NSAIDs)
- **Blutkoagulation und Fibrinolyse-System**
Thrombin, Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA), Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) sind in senilen Plaques zu finden
- **Freie Radikale**
führen zu oxidativen Schäden, AGEs, Malondialdehyd, 8-OH-deoxyguanosin, 4-OH-nonanal, Nitrotyrosin und Lipidperoxidation; beeinflussen die neuronale Integrität durch Triggern der redoxsensitiven, NF- κ B-vermittelten Transkription verschiedener proinflammatorischer und/oder Apoptose-verwandter Gene umliegender Zellen
- **Zellmediatoren (Mikroglia, Astrozyten, Neuronen)**
Neurone: exprimieren mRNA der Proteine für die Komplement-Kaskade, COX, Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, TNF- α
Astrozyten: bei A β -Ablagerungen zu finden, um diffuse Plaques und besonders neuritische Plaques herum, können Entzündungsmediatoren, Prostaglandine und Komplement-Faktoren ausschütten
Mikroglia: phagozytotisch und neurotoxisch, bei A β -Ablagerungen zu finden, besonders in neuritischen Plaques, erhöhte Expression von MHCII, Ausschüttung von Radikalen, Zytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde ausschließlich die durch Zellmediatoren vermittelte Entzündung betrachtet. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Interaktion von Mikrogliazellen und Neuronen gelegt unter besonderer Berücksichtigung des Turnovers und der Phosphorylierung des Tau-Proteins.

1.8.1 Interaktion von Mikroglia und Neuronen

Mikroglia bezeichnet eine Population von Makrophagen, die ausschließlich im Gehirn vorkommt. Mikrogliazellen exprimieren die gleichen Oberflächenantigene und können die gleichen Funktionen wie Makrophagen aus peripherem Gewebe ausüben. Sie sind phagozytisch aktiv, präsentieren Antigene oder verschiedene Zytokine und setzen zytotoxische Stoffe frei (Giulian and Corpuz 1993; Barron 1995; Benveniste 1995; Wekerle 1995).

Mikrogliazellen spielen eine bedeutende Rolle sowohl im gesunden als auch im pathologischen Hirn. Sie können dabei sowohl neurotrophische als auch neurotoxische Eigenschaften besitzen. Bestimmte Zytokine werden von Mikrogliazellen produziert, die das Überleben von Neuronen begünstigen. Dazu gehören zum Beispiel der Nervenwachstumsfaktor NGF, der Hauptfibroblastenwachstumsfaktor BFGF und der transformierende Wachstumsfaktor TGF. Im aktivierten Zustand können Mikrogliazellen aber auch eine Reihe toxischer Substanzen sezernieren, die das Absterben neuronaler Zellen begünstigen. So zum Beispiel können die während des respiratorischen Bursts der Mikrogliazellen entstehenden freien Sauerstoffradikale eine schädigende Wirkung auf Neurone ausüben (Kreutzberg 1996; Moore and Thanos 1996; Streit 1996).

Mikrogliazellen können zwei verschiedenen Morphologien aufweisen: amöboid und ramifiziert. Während der frühen postnatalen Entwicklung des zentralen Nervensystems zeigen Mikrogliazellen eine amöboide Morphologie. Sie sind hauptsächlich verantwortlich, zelluläre Bestandteile zu phagozytieren, die aufgrund spontaner Degeneration und Remodellierung von Nervenfasern entstehen (Ling and Wong 1993; Moore and Thanos 1996). Es wird angenommen, dass sich die amöboiden Mikrogliazellen aus Monozyten bzw. anderen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs entwickeln, welche während der späten pränatalen sowie der frühen postnatalen Entwicklungsphase in das Gehirn einwandern, da zu diesem Zeitpunkt die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig ausgeprägt ist. Etwa mit Beginn der dritten postnatalen Woche reifen die Mikrogliazellen vollständig aus und nehmen eine ramifizierte Morphologie an (Ling and Wong 1993).

Die im adulten Hirn auftretenden ramifizierten Mikrogliazellen befinden sich in einem ruhenden Zustand (Kreutzberg 1996; Streit 1996). Diese ruhende Mikroglia kann jedoch während verschiedener pathologischer Ereignisse des Gehirns aktiviert werden. Die Überführung der ramifizierten ruhenden Mikroglia in das aktivierte Stadium ist durch Proliferation und verschiedene immunphänotypische und morphologische Veränderungen der Zellen gekennzeichnet. Charakteristisch für aktivierte Mikroglia sind die Hochregulation von MHC-Molekülen und die verstärkte Expression von verschiedenen Makrophagenoberflächen-Antigenen. Aktivierten Mikrogliazellen nehmen eine amöboide Morphologie an bei gleichzeitiger Hypertrophie der Zellen. Sie werden phagozytotisch aktiv und sezernieren verschiedene zytotoxische Substanzen wie zum Beispiel freie Sauerstoffradikale, Stickoxid, Proteasen, Arachidonsäure-Derivate und Zytokine (Giulian 1995; Kreutzberg 1996; Streit 1996; Zielasek and Hartung 1996). Die Aktivierung von Mikrogliazellen wurde bei Infektion, Entzündung, Trauma, Ischämie und bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson-Krankheit, der Amyotrophen Lateralsklerose, der Multiplen Sklerose und der Prionenkrankheit beobachtet (Barron 1995; Giulian 1995; Kreutzberg 1996; Moore and Thanos 1996; Streit 1996; Brown and Kretzschmar 1997; McRae, Dahlstrom *et al.* 1997).

1.8.2 Mikroglia und Morbus Alzheimer

Das Vorkommen einer Gliose in Gehirnen von Alzheimerpatienten wurde bereits von Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer 1907). Der erste spezifische Hinweis für eine Beteiligung entzündlicher Prozesse an der Genese der Alzheimer-Krankheit war jedoch der Nachweis von Mikrogliazellen in und um senile Plaques herum. Heute ist vielfach dokumentiert, dass in den Gehirnen von Alzheimerpatienten aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten zu finden sind und es zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin-1 und -6) und neurotoxischen Mediatoren und Komplementfaktoren kommt (Eikelenboom and Veerhuis 1996; Hull, Fiebich *et al.* 1996). Wie diese entzündlichen Prozesse an der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit beteiligt sind, ist heute nur teilweise geklärt. Wahrscheinlich sind sie nicht die Ursache, sondern Teil eines *circulus vitiosus*, der letztendlich zum Untergang von Neuronen und zum klinischen Bild der Demenz führt. Innerhalb dieses Prozesses können Mikrogliazellen unterschiedliche Funktionen haben (Hull, Fiebich *et al.* 1996). Nach Aktivierung können sie Substanzen freisetzen, die direkt zellschädigend für benachbarte Neurone sind wie in

Abbildung 1.8-1 dargestellt (Banati, Gehrman *et al.* 1993). Desweiteren wirken sie bei der Phagozytose von Zelltrümmern mit und bilden Zytokine, die zu weiteren inflammatorischen Prozessen einschließlich der Aktivierung von Astrozyten führen (Rogers, Webster *et al.* 1996; Mattson, Barger *et al.* 1997).

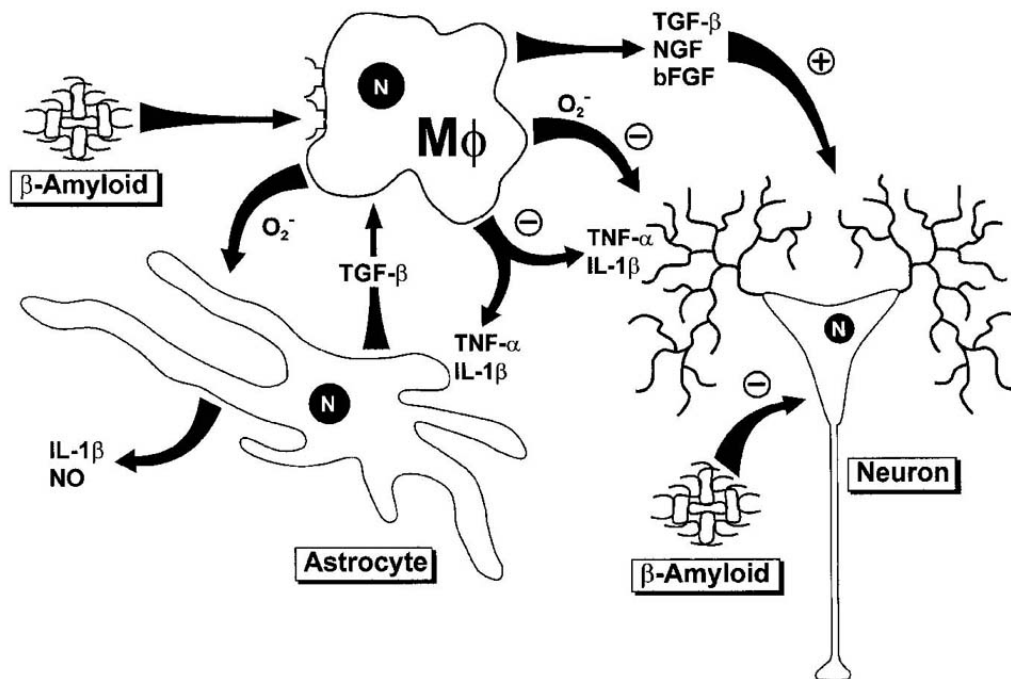


Abbildung 1.8–1 Zusammenspiel von Mikroglia, Astrozyten und Aβ bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit Aktivierung von Mikrogliazellen (MΦ) durch β-Amyloid führt zur Ausschüttung von Superoxidanion (O₂^{•-}), TNF-α und IL-1β, was wiederum Astrozyten zur Ausschüttung von IL-1β und NO anregt (Minagar, Shapshak *et al.* 2002).

Bereits 1964 vermutete Terry, dass Mikrogliazellen die Zelle des Amyloid-Proteins sind (Terry, Gonatas *et al.* 1964). Obwohl Mikrogliazellen *in vitro* offenbar grundsätzlich in der Lage sind, das Vorläuferprotein APP des β-Amyloids zu bilden (Bauer, König *et al.* 1991), ließ sich keine mRNA für dieses Protein in Mikrogliazellen finden, die mit senilen Plaques assoziiert sind (Scott, Johnson *et al.* 1993). Damit schied eine direkte „amyloidogene“ Rolle der Mikrogliazellen aus. Heute wird aufgrund von *In-vitro*-Befunden diskutiert, dass Mikrogliazellen in Alzheimer-Gehirnen über so genannte „scavenger“ (Freß)-Rezeptoren verfügen, die auf aktivierten Mikrogliazellen in Alzheimer-Gehirnen exprimiert sind, die dann Aβ-Aggregate binden und Teile davon phagozytieren können (Christie, Freeman *et al.* 1996). Dies führt zur Zellimmobilisierung und zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die neurotoxisch wirken können (El Khoury, Hickman *et al.* 1996).

Darüber hinaus kann offenbar A β zusammen mit Interferon- γ die Produktion von TNF- α in Mikrogliazellen aktivieren, was dann zumindest *in vitro* zu neuronalem Zelltod führt (Meda, Cassatella *et al.* 1995). Araujo und Cotman konnten zeigen, dass A β Mikrogliazellen zur Bildung von Interleukin-1 (IL-1) anregen kann (Araujo and Cotman 1992). IL-1 kann dann selbst die APP-Regulation und/oder den Metabolismus von A β beeinflussen (Rogers, Webster *et al.* 1996) bzw. als wichtiges proinflammatorisches Zytokin die Produktion weiterer Zytokine wie IL-6 oder von Akute-Phase-Proteinen wie alpha1-Antichymotrypsin (ACT) in Astrozyten anregen (Abraham 1992; Lieb, Fiebich *et al.* 1996). Sowohl IL-6 als auch ACT wird eine pathogenetisch relevante Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit zugeschrieben (Hull, Fiebich *et al.* 1996). Die kontinuierliche Gegenwart von A β -Plaques kann also zu einer permanenten Aktivierung von Mikrogliazellen führen, was letztendlich zu einer chronischen Entzündung im ZNS führt (Cotman, Tenner *et al.* 1996).

Die Rolle aktivierter Mikrogliazellen und der Inflammation bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird ausführlichst untersucht, allerdings nur im Hinblick auf eines der beiden pathologischen Merkmale, die β -Amyloid Plaques. Welche Rolle aktivierte Mikrogliazellen bei Entstehung und Verlauf des anderen Merkmals, also des hyperphosphorylierten Tau-Proteins und den Tangles, spielen, darüber wird in der Literatur kaum berichtet. Wenig bekannt ist über die *funktionelle Bedeutung der Mikroglia-Neuron-Interaktion im Hinblick auf Entstehung der pathologischen Tau-Tangles*. Es finden sich bisher keine Hinweise in der Literatur, ob *Mikrogliazellen Einfluss auf Turnover und Phosphorylierung des Tau-Proteins in Neuronen nehmen*.

1.9 Aufgaben- und Zielstellung

In mehreren Originalarbeiten wurde gezeigt, dass oxidativer und nitrosativer Stress bei der Alzheimer-Krankheit beobachtet werden kann und zur Oxidation von Proteinen im Gehirn führt. Einen wichtigen Abbauweg zur selektiven Entfernung funktionsuntüchtiger, oxidierter Proteine innerhalb der Zelle stellt das Proteasom dar. Die Rolle dieser multikatalytischen Protease bei der Pathologie der Alzheimer-Krankheit ist bisher nicht vollständig geklärt, aber in postmortem Hirngewebe von Alzheimerpatienten wurde eine eingeschränkte Funktionalität dieser Protease nachgewiesen. Unklar ist aber die Ursache. Es galt zu klären, ob *weniger Proteasom vorhanden ist oder es durch alzheimerspezifische intrazelluläre Tau-Modifikationen gehemmt wird.*

Die Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob eine gestörte Funktion des 20S Proteasoms als mögliche Ursache für die Zellschädigung in Betracht gezogen werden kann. Anschließend galt es zu untersuchen, ob alzheimerspezifische Tau-Modifikationen in der Lage sind das Abbausystem auch in einem *In-vitro*-System zu beeinträchtigen. Hierfür wurde humanes Tau-Protein und seine Modifikationen aus postmortem Hirngewebe isoliert und die verschiedenen Tau-Formen mit isoliertem 20S Proteasom *in vitro* inkubiert und die proteolytische Aktivität gemessen. Die zunehmende Zahl unstrukturierter oder nahezu ungefalteter Proteine, die Ubiquitin-unabhängig von Proteasomen abgebaut werden, lassen die Frage aufkommen, ob das Tau-Protein auf ähnliche Art und Weise prozessiert werden könnte. Es sollte daher untersucht werden, ob *das Tau-Protein generell auch ein Substrat des Proteasoms darstellt und ob bestimmte Modifikationen wie Oxidation oder Hyperphosphorylierung bevorzugt erkannt werden.*

Das Tau-Protein liegt in unterschiedlichen Isoformen und Phosphorylierungszuständen in der Zelle vor und bei abnormer Phosphorylierung kommt es zur Bildung von Protein-Aggregaten, die sich in der Zelle ablagern und nicht abgebaut werden. Inwiefern extrazelluläre Ereignisse die Tau-Phosphorylierung beeinflussen können, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Wie auch in der Peripherie sind im ZNS Ablagerungen und absterbendes Gewebe klassische Stimulantien für entzündliche Prozesse. Auch im Gehirn werden phagozytierende Zellen, so genannte Mikrogliazellen, angezogen, die ihrerseits sowohl proinflammatorische Zytokine als auch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffoxid-Radikale ausschütten. Aber welche Rolle oxidativer und/oder nitrosativer Stress im

Zusammenhang mit dem Tau-Protein spielen, ist ungeklärt. Des weiteren also sollte untersucht werden, ob *oxidativer und/oder nitrosativer Stress einen Einfluss auf den Turnover und die Phosphorylierung des Tau-Proteins haben.*

Vor diesem Hintergrund sollte am Modell der HT22-Zellen *in vivo* der Einfluss von oxidativem und nitrosativem Stress auf die Phosphorylierung und den Turnover des Tau-Proteins in hippocampalen Neuronen untersucht werden. Mittels spezifischer Antikörper sollten mögliche alzheimerspezifische abnorme Tau-Phosphorylierungen detektiert werden. Durch Einsatz aktivierter Mikrogliazellen sollten mögliche pathophysiologische Funktionen der Mikroglia-Neuron-Interaktion bei der Alzheimer-Krankheit auf Einzelzellbasis aufgeklärt werden. Im Vordergrund stand die *funktionelle Bedeutung der Mikroglia-Neuron-Interaktion im Hinblick auf die Entstehung der pathologischen Tau-Tangles*. Es sollte speziell untersucht werden, ob *Mikrogliazellen Einfluss auf Turnover und Phosphorylierung des Tau-Proteins in Neuronen nehmen.*

Die Interaktion zwischen Mikroglia und Neuronen stellt einen sehr komplexen Vorgang dar, bei dem längst nicht alle Mediatoren bekannt sind. Um den Einfluss oxidativen und nitrosativen Stress im Gesamtzusammenhang zu betrachten, wurden statt einzelner chemischer Komponenten auch aktivierte Mikrogliazellen als schädigendes Agens eingesetzt. Die physiologischen Vorgänge und komplexen Interaktion wurden am Modell der organotypisch hippocampalen Schnittkulturen eines Mäusehirns untersucht. In diesem Teil der Arbeit sollte sich zeigen, ob die Aussagen aus den Einzelzellstudien auch für den Gewebeverband gültig sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humanes Gewebe

Das Hirnmaterial von Alzheimer- und Kontrollpatienten stammte aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut der Universitätsklinik Mainz und wurde mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Ohm zur Verfügung gestellt. Das verwendete Hirngewebe umfasste tiefgefrorene Gewebestücke, die 9 bis 12 Jahre in 4%-igem Formalin gelagert worden waren. Charakteristische Merkmale des verwendeten Materials sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2.1-1 Zur Versuchsdurchführung verwendetes Gewebematerial

Nr.	Code	Geschlecht	Alter ¹	PMZ ²	NFT ³	βA4 ⁴	Striatum	Frtl ⁵	GR ⁶	Occ ⁷	Temp ⁸
Kontrollen											
20	MZ0336-88	w	62	o. A.	1,0	1,0				✓	
23	MZ0599-88	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.				✓	
25	MZ0444-89	o. A.	o. A.	o. A.	1,0	4,0			✓		
47	MZ0880-90	w	87	o. A.	2,0	2,0			✓		
48	MZ0915-90	w	81	o. A.	1,0	2,0	✓		✓		
49	MZ0061-91	w	83	18	2,0	o. A.			✓	✓	✓
75	MZ0422-91	w	80	56	2,0	1,0	✓		✓		
Alzheimer											
19	MZ0663-88	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.		✓		✓	✓
24	MZ0339-89	m	81	o. A.	6,0	o. A.			✓		
39	MZ0252-90	m	84	18	6,0	4,0			✓	✓	✓
46	MZ0687-90	w	81	14	6,0	o. A.			✓	✓	✓
51	MZ0070-91	w	84	19	6,0	4,0	✓		✓	✓	✓
61	MZ0209-91	w	89	16	6,0	4,0	✓		✓	✓	✓
74	MZ0415-91	m	86	23	6,0	4,0			✓		
79	MZ0505-91	m	80	16	6,0	3,0	✓		✓	✓	✓
96	MZ0838-91	w	79	7	6,7	4,0	✓		✓	✓	✓
102	MZ0143-92	w	82	46	6,0	4,0	✓		✓	✓	✓

¹ zum Todeszeitpunkt in Jahren, ² postmortem Zeit in Stunden = Zeitverzögerung zwischen Tod und Probennahme/Fixierung des Gewebes, ³ Stadien der Ausbreitung neurofibrillärer Läsionen nach Braak und Braak, ⁴ β-Amyloid, ⁵ Frontallappen (Lobus frontalis), ⁶ Gyrus rectus, ⁷ Occipitallappen (Lobus occipitalis), ⁸ Temporallappen (Lobus temporalis), **w** weiblich, **m** männlich, **o. A.** ohne Angabe

Das Gewebematerial bestand aus mehreren Proben von zehn Alzheimerpatienten und sieben Kontrollen und umfasste insgesamt fünf Regionen – die Lobi temporalis, occipitalis und frontalis sowie Gyrus rectus und das Striatum. Drei der Kontrollproben entsprachen dem Braak-Stadium I, weitere drei dem Braak-Stadium II und zu einer lagen keine Angaben vor. Neun der Alzheimer-Proben waren mit Braak-Stadium IV diagnostiziert worden. Die Kontrollproben stammten bis auf zwei ohne Angabe des Geschlechts ausschließlich von weiblichen Patienten und einem Altersdurchschnitt von 78,6 Jahren, während bei den Alzheimer-Proben das Geschlechterverhältnis ausgewogen war und der Altersdurchschnitt bei 82,9 Jahren lag. Die durchschnittliche postmortale Zeit der Proben betrug 23 Stunden.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma
3-Aminobenzamid (3-ABA)	Sigma
3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)l)butoxy]-1-(2H)-isoquinolinone (DPQ)	Alexis Biochemicals
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma
3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluen (BHT)	Sigma
3-Morpholinopyrrolidin (SIN-1)	Sigma
β -Glycerolphosphat	Sigma
ALLN (Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal, Calpain-Inhibitor I)	Calbiochem
Ammoniumsulfat	Fluka
Amyloid β -Protein (1-40, 1-42)	Bachem
Aprotinin	Sigma
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Borax (Natriumtetraborat)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Cycloheximid (CHX)	Calbiochem
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma
Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
Griess` Reagens auf Nitrit	Fluka
Heparin (mittleres Molekulgewicht 6.000)	Sigma
Interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$), rekombinant	PeproTech Ec
Kaliumcarbonat	Merck

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lactacystin	Affiniti
Leupeptin	Sigma
Lipopolysaccharid (LPS; E. coli Serotyp 0111:B4)	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Sigma
Methanol	Baker
MG132 (N ^α -Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)	Affiniti
Milchpulver	Roth
Milipore H ₂ O	selbst hergestellt
Natriumchlorid	Sigma
Natriumnitroprussidhydrat (SNP)	Sigma
Natriumorthovanadat (NA ₃ VO ₄)	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Neutralrot (N-246)	Molecular Probes
N-Methyl-D-aspartat (NMDA)	Sigma
Nonidet P40 (Polyethylenglycol)	Roche
N-Tosyllysinchloromethylketon (TLCK)	Sigma
N-Tosyl-L-phenylalanylchloromethylketon (TPCK)	Sigma
Okadaische Säure (Okadaic Acid, OA)	Calbiochem
Pepstatin A	Sigma
Perchlorsäure	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS)	Sigma
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma
Propan-2-ol	Baker
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech
Saccharose	Sigma
Salzsäure 37%	Merck
Sarkosyl	Sigma
Sojabohnen-Trypsininhibitor	Sigma
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Bachem
Thioflavin S (ThS)	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl	Merck
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Trypanblau, 0, 5% (w/v)	Sigma
Wasserstoffperoxid	Sigma

2.1.3 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tau-Protein, rekombinant, human	Upstate Biotechnology
20S Proteasom (aus humanen Erythrozyten)	Labor T. Grune (isoliert nach Hough, Pratt et al. 1987)
polyklonale Kaninchen-Antikörper anti-Proteasom	

19S Regulator ATPase-Untereinheit 7 (Mss1)	Affiniti
20S Proteasom α/β Untereinheiten	Affiniti
monoklonale Maus-Antikörper	
• anti-humanes PHF-Tau, Klon	
AT8	Autogen Bioclear
AT100	Autogen Bioclear
AT270	Autogen Bioclear
PHF-1	Labor Peter Davies (Greenberg, Davies et al. 1992)
• anti-Tau	
Tau-1	Chemicon
TAU-5	BD Pharmingen
Peroxidase-markierter anti-Maus IgG-Antikörper	Amersham
Peroxidase-markierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper	Amersham
Isolectin-B4 FITC	Sigma
Rabbit anti-mouse GFAP	Dako
Rabbit anti-mouse NF 200	Sigma
Goat anti-mouse NF-L	Santa Cruz
Donkey anti-goat FITC	Dianova
Goat anti-mouse Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	Molecular Probes

2.1.4 Elektrophorese und Westernblot

β -Mercaptoethanol (MSH)	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1 40%ig	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Blotpapier	Bio-Rad
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
ECL-Hyperfilm	Amersham
Molekulargewichtsmarker (prestained, broad range)	Bio-Rad
Molekulargewichtsmarker (wide range)	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma
Nitrozellulosemembran 0,45 μ m	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma

2.1.5 Versuchssysteme (Kits)

BCA Protein Assay Kit	Pierce
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham

2.1.6 Radiochemikalien

[³ H]-Lysin	Perkin Elmer
[³ H]-Formaldehyd	NEN

[³⁵S]-Methionin/Cystein NEN

2.1.7 Zellkultur und Kultivierung primärer Zellen

Aqua dest., steril	selbst hergestellt
B27 serumfreies Supplement ohne Antioxidans	GIBCO BRL
B27 Supplement	GIBCO BRL
Fetales Kälberserum (FKS), steril	Biochrom KG
Glucose	Merck
Glutamin, steril	GIBCO BRL
HBSS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	GIBCO BRL
HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom KG
DMEM Medium, 4.5 g/l Glucose, steril	GIBCO BRL
DMEM ohne Methionin/Cystein	GIBCO BRL
Neurobasal Medium, steril	GIBCO BRL
PBS-Lösung, autoklaviert	Sigma
Penicillin/Streptomycin, flüssig, steril	Biochrom KG
Poly-D-Lysin-hydrobromid, lyophilisiert	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL

2.1.8 Organotypisch hippocampale Schnittkulturen

L-Ascorbinsäure (Vitamin C)	Sigma
Gewebekleber „Histoacryl“	Braun
Glucose 20%, steril	Braun
Glutaraldehyd	Serva
IMMU-MOUNT (Eindeckmittel)	Shandon/Pittsburg
Insulin, vom Rind, lyophilisiert	GIBCO BRL
MEM 25 mM Hepes	Gibco
Natriumbicarbonat 7.5%, flüssig	GIBCO BRL
Natriumhydrogenphosphat x 7 H ₂ O	Sigma
Natriumhydrogenphosphat x H ₂ O	Sigma
N-Methyl-D-aspartat (NMDA)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Pferdeserum, steril	Biochrom KG
Pikrinsäure	Roth
Propidiumjodid	Sigma
Saccharose	Sigma
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Merck
Trizma Base	Sigma

2.1.9 Tiere

Mausstamm C57BL/6

Tierstall Institut für Anatomie, Charité

2.1.10 Sonstige Stoffe und Verbrauchsmaterial

6-/ 24-/ 96-Loch-Platten	Falcon
Dialyseschlauch, semipermeabel	Sigma
Fettstift	DAKO Diagnostic
Filtermembranen	Falcon
Gelatinierte Objektträger	selbst hergestellt
Gewindeflaschen DURAN	Roth
Insulinspritzen Omnifix	Braun
Kanülen, 0,45 mm	Braun
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen (steril; 35 x 10 mm und 100 x 20 mm)	Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
Präparierbesteck (steril)	Aeskulap
Quarzglasküvetten	Hellmer
Reaktionsgefäße 0,5 / 1 / 2 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten	Falcon
Spritzen, 5 ml	Braun
Zellkultureinsätze	Falcon
Zellkulturflaschen	Nunc
Zellschaber	Biochrom KG
Zentrifugenröhrchen 15 / 50 ml	Falcon

2.1.11 Geräte

Binokkular	Olympus
Blot-Apparatur	Bio-Rad
Brutschrank	Heraeus Instruments
Digitale Kamera (Software SensiCam 3.0)	Olympus
Dounce-Homogenisator Sonoplus GM70	Bandelin
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN II	Bio-Rad
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop BX50	Olympus
Fluorometer RF-5001PC	Shimadzu
Fluorometer Wallac™ 1420 VICTOR ²	Perkin Elmer
Gasbrenner	gasprofi 2
Haemocytometer	VWR
Inverses Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop IX70	Olympus
Kaltlichtquelle KL 1500 electronic	Schott
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Rotina 35 R	Hettich
Laminar-Flow-Box LAMIN AIR HP72	HERAEUS
Mikroskop GZ6	Leica
Mikrowelle	Moulinex
pH-Meter (pH 537)	WTW
Photometer Ultraspec. 2000	Pharmacia Biotech
Pipetboy	Hirschmann
Pipetten, einstellbar	Finnpipette
Plattenreader ELX 800	Biotech Instruments
Schüttler	Eppendorf

SpeedVac SC 110	Savant
Stereomikroskop SZX9	Olympus
Szintillationszähler LS 6500	Beckmann
Thermomixer compact 5350	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Ultrazentrifugen Beckman L-70 und Beckman Optima™ TL	Beckmann Coulter
Ultrazentrifugen-Rotoren Typ 70 Ti, TLS-55, TLA-100.4	Beckmann Coulter
Überkopfschüttler Roto-Shake Genie	Scientific Industry
Vibratom	Technical Products
	International
Wasserbad	GFL
Zellzentrifuge	MLW

2.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Nachweis von Proteinen

2.2.1.1 Gewinnung von Proteinextrakten mittels Zellyse

Zur Gewinnung von Proteinextrakten werden kultivierte Zellen geerntet und anschließend in einem Puffer aufgeschlossen (lysiert). Bei der Lyse wird die Membran der Zellen zerstört, so dass die Proteine frei in dem Lösungsmittel vorliegen. Durch Einsatz von Seifen, z.B. Triton-X-100, werden Membranproteine solubilisiert und intrazelluläre Proteine können aus den Zellen austreten. Eine nachfolgende Ultraschallbehandlung oder das Homogenisieren mittels Insulinspritze führt zum vollständigen Zerfall der Zellmembran. Um den Verdau von Proteinen zu verhindern, werden dem Lyse-Puffer Proteasehemmer zugesetzt.

Die kultivierten Zellen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in einem angemessenen Volumen eiskaltem PBS-Puffer abgeschabt. Die Suspension wurde durch Zentrifugation bei $800 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten pelletiert und das Pellet mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Lyse-Puffer auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben homogenisiert und die unlösliche Proteinfraction durch 10 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm ($20.800 \times g$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgetrennt. Der Überstand wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4 (PBS-Puffer)

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$, 1,8 mM KH_2PO_4

Lyse-Puffer

20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton-X-100, 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat, 1 mM Na-orthovanadat, $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM PMSF (Zugabe erst kurz vor Gebrauch)

2.2.1.2 Zellaufschluss mittels Frieren-Tauen-Zyklen

Bei dieser Variante des Zellaufschlusses wird die Lyse der Zellen herbeigeführt, in dem durch wiederholte Bildung von Eiskristallen die Membranen der Zellen zerstört werden. Für die Zellernte wurden die Zellen im Kulturmedium mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und in einem Zentrifugenröhrchen bei $300 \times g$ zentrifugiert. Zum Waschen wurde das Pellet in eiskaltem PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS mit 1 mmol/l DTT aufgenommen

und die Zellen durch scheren vereinzelt und mittels einer Insulinspritze homogenisiert. Die Lyse der Zellen wurde durch fünf wiederholte Frieren-Tauen-Zyklen erreicht. Die Proben wurden für 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff (N₂) getaucht und anschließend in einem Thermomixer bei 25 °C und 800 rpm wieder aufgetaut. Die lysierten Proben wurden entweder als Gesamtproteinextrakt bei -20 °C aufbewahrt oder 30 Minuten bei 14.000 rpm / 4 °C abzentrifugiert und der Überstand eingefroren.

2.2.1.3 Konzentrieren von Proteinlösungen mittels Vakuumtrockner

Wenn das Volumen einer Probe zu groß ist oder die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt, ist eine schnelle und schonende Methode Lösungsmittel zu entfernen das Zentrifugieren unter Vakuum. Durch Anlegen eines Vakuums wird die Siedetemperatur des Lösungsmittels erniedrigt, so dass bei Raumtemperatur das Lösungsmittel schneller verdampft und somit schonend entfernt werden kann. Die gleichzeitige Zentrifugation der Lösung treibt die Gasblasen aus und verhindert das Schäumen. Dies ermöglicht es Proben einzuengen und somit das Volumen zu reduzieren bei gleichzeitiger Konzentrationserhöhung (Pohl 1990).

Die Proben wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und mit offenem Deckel in einen Vakuumtrockner (SpeedVac) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Dauer der Zentrifugation unter Vakuum richtete sich nach dem zu entfernenden Volumen bzw. der zu erzielenden Proteinkonzentration und lag zwischen 30 Minuten und 6 Stunden.

2.2.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgten mit dem „BCA Protein Assay Kit“ von Pierce. Diese Methode kombiniert die bekannte Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) mit der hoch sensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion des Kupferkations Cu¹⁺ durch Zusatz eines Reagenzes, das Bicinchonininsäure (BCA) enthält. Durch Chelatisierung eines Kupferions mit zwei BCA-Molekülen entsteht ein violett gefärbter Komplex, der eine starke Absorption bei 562 nm aufweist und dessen Extinktion linear mit der Proteinkonzentration einher geht (Smith, Krohn *et al.* 1985).

Da zu Beginn der Arbeit noch kein Plattenreader zur Verfügung stand, wurde die Konzentration nach dem Reagenzglas Protokoll bestimmt (Test Tube Protocol, Verhältnis

Probe zu Reagenz = 1:21). Ein Aliquot der Proben wurde zuvor in einem geeignetem Verhältnis mit PBS verdünnt (je nach Konzentration der Probe zwischen 1:4 und 1:80) und in einem Dreifachansatz 50 µl des zu untersuchenden Lysates mit 950 µl der frisch angesetzten BCA-Lösung in einem Eppendorfgesäß gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, was dem „Enhanced Test Tube Protocol“ entsprach. Nach einer Abkühlphase von 15 Minuten wurden die Proben in einer 1 ml Quarzküvette bei 562 nm spektralphotometrisch gemessen. Als Standard diente ein Doppelansatz von bovinem Serumalbumin (BSA) in wäßriger Lösung im Konzentrationsbereich 50 – 400 µg/ml aus deren Messwerten eine Eichkurve erstellt wurde.

Um Probenmaterial und Reagenz zu sparen und um die Messung zu beschleunigen, wurde die Konzentrationsbestimmung später auf das 96-Lochplatten-Format umgestellt (Microwell Plate Protocol, Verhältnis Probe zu Reagenz = 1:9). Hierzu wurden 25 µl des verdünnten Lysats in die Löcher der Platte pipettiert und mit 200 µl BCA-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C. Als Standard wurde BSA im Konzentrationsbereich von 0-1500 µg/ml verwendet. Die Platte wurde dann anschließend in einem Plattenreader bei 562 nm gemessen und die Extinktionen in ein Excel-Datenblatt übertragen.

BCA-Lösung: 50 Vol BCA-Puffer + 1 Vol CuSO₄-Lösung
(1 Teil Reagenz B + 50 Teile Reagenz A)

BSA-Eichreihe: 2 mg/ml (w/v) BSA-Stammlösung in Millipore-H₂O

„Microwell Plate Protocol“: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/ml

„Enhanced Test Tube Protocol“: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µg/ml

2.2.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung und Analyse von Proteinmischungen. Bei diesem Trennverfahren wird die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zur Auftrennung nach Molekulargewicht ausgenutzt. Proteine binden die Seife Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Sie unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe bei dann vergleichbaren hydrodynamischen Eigenschaften. SDS denaturiert Proteine und unterbindet dadurch Protein-Protein-Wechselwirkungen. In einem elektrischen Gleichstromfeld wandern die SDS-Protein-Komplexe zur Anode und der

Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix trennt die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Laemmli 1970). Der Anteil des Acrylamids im Trenngel richtet sich nach den zu untersuchenden Proteinen und liegt zwischen 7,5 % und 12 % (siehe Tabelle 2.2-1). In dem darüber aufgetragenen Sammelgel liegt die Konzentration bei 5 % und ermöglicht das „Sammeln“ und Wandern der Komplexe zum Trenngel unabhängig von der Molekülgröße. TEMED katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, die die Polymerisierung initiieren und beschleunigt auf diese Weise die Reaktion.

Tabelle 2.2-1 Zusammensetzung für zwei Minigele 0,75 mm

	Sammelgel	Trenngel		
	5 %	7,5 %	10 %	12 %
H ₂ O	3 ml	5,3 ml	4,6 ml	4,1 ml
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	-
37,5% Acrylamid	670 µl	2 ml	2,7 ml	3,2 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	40 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	20 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Es wurden jeweils Trenn- und Sammelgel frisch zubereitet und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und TEMED sofort zwischen die Glasplatten der zusammengebauten Elektrophorese-Apparatur eingefüllt. Pro Gel wurden zunächst 5 ml Trenngel eingefüllt und mit wenigen Tropfen Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und mit Sammelgelpuffer gespült. Danach wurde der Kamm eingesetzt und die Apparatur mit 1-2 ml Sammelgel aufgefüllt. Die Laufkammer wurde mit 800 ml 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen gespült. 10 µg Protein wurden mit 4 µl 5 x Probenpuffer gemischt, mit H₂O ad 20 µl aufgefüllt, anschließend 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann anzentrifugiert. Die Proteinproben wurden gegen 5 µl Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 50 V gestartet und beim Erreichen der Proben des Trenngels auf konstante 70 mA umgeschaltet. Die Laufdauer richtete sich nach der Stärke der Auftrennung und lag zwischen 90 und 240 Minuten.

Verwendete Lösungen

10 × PBS:	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O, 18 mM KH ₂ PO ₄
PBT:	1 × PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
5 × Probenpuffer:	62,5 mM Tris, pH 6.8; 2 % SDS; 10 % Saccharose; 1 % MSH; 2 mM EGTA; 1 mM PMSF, 1 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8.8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, pH 6.8
10 × Elektrophoresepuffer:	0,25 M Tris (Base), 1,92 M Glycin, 1 % SDS

Vor der Elektrophorese wurden die konzentrierten 10 × Lösungen mit H₂O auf die einfache Konzentration verdünnt.

2.2.1.6 Detektion von Proteinen im Gel – Coomassie-Färbung

Wird das Gel nicht für den Immuno-Blot weiterverwendet oder um zu überprüfen, ob der Proteintransfer beim Blotten vollständig verlaufen ist, kann das Gel gefärbt und die Proteine somit sichtbar gemacht werden. Häufige Verwendung findet Coomassie-Brilliant Blau. Es ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der über seine Sulfonat-Gruppen hauptsächlich elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Aminosäuren eingeht. Das in der Färbelösung enthaltene Methanol und die Säuren fixieren die Proteine im Gel. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 100 ng pro Bande (Neuhoff, Arold *et al.* 1988).

Zum Färben wurden die Gele ca. 30 Minuten unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend mehrfach in Entfärber geschüttelt bis der Gel-Hintergrund klar war. Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele anschließend entweder getrocknet oder in den PC eingescannt.

Färbelösung: 0,05 % Coomassie-Blue (R250), 6 % TCA, 7 % Eisessig, 20 % Methanol

Entfärber: 7 % Eisessig + 40 % Methanol + 53 % H₂O

2.2.1.7 Proteintransfer auf eine Membran □ Western Blot-Verfahren

Das Western Blot-Verfahren beschreibt eine Methode, bei der nach elektrophoretischer Auftrennung die Proteine aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine geeignete Trägerschicht, z. B. Nitrocellulose, übertragen und dort immobilisiert werden. Die Bindung der Makromoleküle an Nitrocellulose erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster bleibt nach dem Transfer (Blot) erhalten, so dass ein exaktes Replik des

ursprünglichen Gels entsteht (Towbin, Staehelin *et al.* 1979). Die vom Gel auf den Träger übertragenen Proteine werden konzentriert, sind anfärbbar und der spezifischen Reaktion mit anderen Molekülen frei zugänglich. Der Nachweis der auf Trägermembranen übertragenen Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper (s. Kapitel 2.2.1.8.).

Von den unterschiedlichen Transfermethoden wurde das elektrophoretische Semidry-Blotting gewählt. Auf der Platin/Edelstahl-Anode wurde übereinander ein Sandwich aus drei Lagen Filterpapier, der Nitrocellulosemembran, dem zu blottenden Gel und erneut drei Lagen Filterpapier gelegt. Filterpapier und Nitrocellulosemembran wurden vorher mit Transfer-Puffer getränkt. Nachdem Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit aus dem Sandwich ausgerollt worden waren, wurde der Kathodendeckel aufgelegt und der Proteintransfer für 25 Minuten bei 15 V durchgeführt bzw. 1,5 mm dicke Gele wurden ca. 50 Minuten lang geblottet.

Transfer-Puffer 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol

2.2.1.8 Immunchemischer Nachweis von Proteinen - Immuno-Blot und Detektion

Bei dem Immuno-Blot handelt es sich um eine spezielle Technik des Western-Blot-Verfahrens. Es beschreibt eine immunologische Methode, bei der man die auf die Membran transferierten und immobilisierten Proteine mit geeigneten Antikörpern reagieren lässt (Burnette 1981). Dazu wird der Blot zunächst mit einem unmarkierten spezifischen anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert und der Nachweis des zu untersuchenden Proteins erfolgt dann indirekt durch einen Sekundärantikörper. Dieser ist gegen den Primärantikörper gerichtet und in geeigneter Weise markiert, z.B. durch Konjugation des Enzyms Peroxidase (HRP). Die angeschlossene Enzym-Substrat-Reaktion hat hohe Nachweisempfindlichkeit.

Zur Maskierung der unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran (Blockieren) werden makromolekulare Substanzen verwendet, die an der Nachweisreaktion nicht beteiligt sein dürfen. Häufig verwendet wird 2 % bis 10 % Rinderserumalbumin (Burnette 1981) oder das preisgünstigere und weniger kreuzreaktive Blockiersubstrat Magermilch bzw. 5 % Magermilchpulver (Duhamel and Johnson 1985). In der Praxis zeigte sich, dass der Block-Puffer nach dem einzusetzenden Antikörper ausgewählt werden sollte, da es erhebliche Unterschiede in der Hintergrunddetektion gab. Wurde mit Rinderserumalbumin geblockt,

wurde der Antikörper in PBT gelöst. Für das Blockieren eines Blots mit 5 % Magermilch empfiehlt es sich auch den Antikörper in Magermilchpulver zu lösen. Allerdings ist die Verdünnung bei 4 °C nicht so lange haltbar und häufiges Einfrieren und Auftauen zerstört den Antikörper.

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper in ihrer eingesetzten Verdünnung und dem Lösungsmittel aufgeführt.

Tabelle 2.2-2: verwendete Antikörper

Bezeichnung Antikörper (AK)	Spezies	Verdünnung	Lösungsmittel
<u>Primärantikörper</u>			
AT8	Maus	1:2000	PBT
AT100	Maus	1:2000	PBT
AT270	Maus	1:1000	Magermilch
Tau-1	Maus	1:2000	Magermilch
TAU-5	Maus	1:2000	PBT
PHF-1	Maus	1:50	PBT
19S Regulator ATPase Untereinheit 7 (Mss1)	Kaninchen	1:1000	PBT
20S Proteasom α/β Untereinheit	Kaninchen	1:1000	PBT
<u>Sekundärantikörper</u>			
Anti-Kaninchen-IgG-Ak, Peroxidase-markiert	Esel	1:2000	PBT
Anti-Maus-IgG-Ak, Peroxidase-markiert	Schaf	1:2000	PBT

Die Membran wurde nach dem Blotten in einem Glasfärbeschälchen für 30 Minuten in Block-Puffer bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Vor der Zugabe des Primärantikörpers wurde der Block-Puffer verworfen und die Membran 3 × 5 Minuten mit PBT gewaschen, um überschüssiges Blockreagenz zu entfernen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte entweder für 90 Minuten bei RT oder über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 4 °C auf einem Schüttler. Danach wurde der Primärantikörper entweder zur möglichen Weiterverwendung eingelagert oder verworfen und die Membran erneut 3 x 5 Minuten in PBT gewaschen, um ungebundenen Körper zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde dann für 90 Minuten auf die Membran gegeben und sanft geschüttelt (ca. 300 rpm). Eine Inkubation über Nacht ist an dieser Stelle nicht sinnvoll, da das konjugierte Enzym am nächsten Tag in der Detektion keine Aktivität mehr zeigt. Der

Sekundärantikörper wurde anschließend verworfen und die Membran vor der Detektion erneut dreimal mit PBT gewaschen.

Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde mit dem ECLTM-System durchgeführt. Es handelt sich dabei um zwei Reagenzien, die Chemilumineszenz erzeugen, wenn sie gemischt werden. Die Antikörper-gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des enthaltenen Luminols, das sich danach in einem angeregten Zustand befindet und unter Lichtemission wieder in den Grundzustand übergeht. Die Chemilumineszenz hält ca. 5 bis 20 Minuten an und kann durch Exposition auf einem blaulicht-sensitiven Autoradiographie-Film (z.B. Hyperfilm ECL) sichtbar gemacht werden.

Zur Detektion einer Membran eines Minigels wurde in der Dunkelkammer zunächst 4 ml ECL-Detektionslösung (0,125 ml/cm²) hergestellt, wobei die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Membran wurde dann mit der ECL-Detektionslösung benetzt und für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt, die Membran in eine Plastikfolie eingewickelt und damit ein Film belichtet. Die Belichtungszeit wurde empirisch ermittelt und lag zwischen 5 Sekunden und 15 Minuten. Zum Entwickeln wurde der Film 1 Minuten in Entwicklerlösung und 5 Minuten in Fixierlösung gehalten, danach mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt. Die Membran wurde anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert. Entwickelte Filme wurden eingescannt und ausgewertet.

Block-Puffer 10 % FCS in PBT oder 10 % Magermilchpulver in PBT

2.2.1.9 Entfernen von Antikörpern von Western Blot-Membranen

Ein einzelner Western Blot kann aufeinander folgend mit mehreren Antikörpern analysiert werden. Dazu muss ein bereits gebundener spezifischer Antikörper wieder von der Membran entfernt bzw. abgestreift werden (engl. to strip), um nachfolgend mit einem anderen spezifischen Antikörper inkubiert zu werden (Kaufmann, Ewing *et al.* 1987). Das „Strippen“ zerstört die Antigen-Bindungskapazität des Antikörpers und löst ihn in dem umgebenden Puffer. Vor der erneuten Zugabe eines Antikörpers muss die Membran jedoch zunächst nochmals geblockt werden. Bevor eine weitere Immunodetektion durch Blocken der Membran eingeleitet wird, kann zuvor überprüft werden, ob der Primärantikörper vollständig entfernt wurde, in dem die Membran nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert

und anschließend detektiert wird. Dies empfiehlt sich besonders dann, wenn das gleiche Protein untersucht werden soll bzw. wenn ein anderes Protein die gleiche Position auf der Membran einnimmt.

Die Membranen wurden mit ca. 20 ml Strip-Puffer benetzt und für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit PBT gewaschen und erneut in Block-Puffer geschüttelt.

Strip-Puffer 200 mM Glycin, 1 % Tween 20, 0,1 % SDS, pH 2.2

2.2.2 Radioaktive Markierung von Proteinen und deren Detektion

Die radioaktive Markierung ermöglicht es durch Einbau markierter Aminosäuren Proteine qualitativ und quantitativ nachzuweisen und so ihre „Lebensdauer“ zu bestimmen. Proteinsyntheseleistung, Akkumulationsvorgänge aber auch Abbauwege eines Proteins können so im zeitlichen Verlauf betrachtet und analysiert werden. Die Markierung von Proteinen erfolgt am effektivsten durch das so genannte metabolische Labeling. Dabei werden im Kulturmedium die zur Neusynthese von Proteinen benötigten Aminosäurebausteine durch radioaktiv markierte Aminosäuren ausgetauscht bzw. ersetzt und somit in die Proteine eingebaut. Als Isotope zur Markierung werden β -Strahler verwendet (z.B. ^3H oder ^{35}S), deren Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen oder autoradiographisch im Phosphor-Imager dargestellt und anschließend densitometrisch ausgewertet werden kann.

2.2.2.1 Radioaktive Markierung *in vivo* mit [^3H]-Lysin und Aufarbeitung der Zellen

Im Pulse-Chase-Experiment wurden Zellen einmalig in radioaktiven Medium inkubiert (*pulse*) und anschließend in nicht-radioaktivem Medium die Untersuchungen durchgeführt und der Verbleib der aufgenommenen Radioaktivität verfolgt (*chase*). Zur radioaktiven *in vivo* Markierung wurden HT22-Zellen in einer Dichte von 3×10^4 Zellen / cm^2 in T75-Kulturflaschen ausgesät. Zur metabolischen Markierung der Proteine (*pulse*) wurden 25 μl [^3H]-Lysin zu den Zellen in 20 ml HT22-Medium dazugegeben (1,25 μCi / ml) und die Zellen dann für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Markierung wurde das Pulse-Medium entfernt und die Zellen mit warmen HT22-Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt geerntet oder in nicht-radioaktivem Medium die Experimente durchgeführt (*chase*).

Zur Ernte der Zellen wurden diese in ihrem Medium mit einem Zellschaber vom Flakon gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 300 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet zwei Mal mit je 20 ml kaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert. Zum dritten Waschgang wurde das Pellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Zum gegebenen Zeitpunkt wurden die Pellets dann mit 500 µl PBS und einer Omnifix-Spritze homogenisiert. Es folgte eine Frieren-Tauen-Lyse mit 5 Zyklen mit Tauchbädern in flüssigem Stickstoff und Auftauen in einem Thermomixer bei 37 °C und 800 rpm. Abschließend wurde die Proteinlösung nochmal mit einer 1 ml Spritze homogenisiert und die festen Bestandteile für 30 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.2.2.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Bei der Immunpräzipitation (IP) werden bestimmte Proteine aus einer Lösung isoliert, in dem die hohe spezifische Affinität von Antikörpern zu dem entsprechenden Antigen, also Protein, ausgenutzt wird. Die Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt dann durch Kopplung des Antikörpers an eine feste Matrix, meist Protein A/G Sepharose, die anschließend von der Proteinlösung abgetrennt wird. Das Präzipitat wird danach gelelektrophoretisch analysiert und detektiert.

Die Immunpräzipitation des Tau-Proteins wurde nach Zwilling et al. durchgeführt (Zwilling, König *et al.* 1995). Die gequollene Sepharose wurde 1:1 mit Tris/NaCl-Puffer äquilibriert und zuerst eine Präadsorption des Zelllysates mit 10 % Protein-A Sepharose durchgeführt, um alle unspezifischen Bindungspartner aus dem Lysat zu entfernen. Nach 1 Stunde Inkubation bei 4 °C wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert und das gereinigte Lysat weiterverwendet. Für die Primäantikörperreaktion wurden zu 100 µl der Proteinlösung 4 µg Tau-5-Antikörper zugegeben und in einem Gesamtvolumen von 2000 µl Tris/NaCl-Puffer für 2 Stunden bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden 4 µg des Sekundäantikörpers HRP-Schaf-anti-Maus-IgG hinzugefügt und erneut 2 Stunden bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur

Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in die Lösung 40 µl Protein-A Sepharose beigefügt und die Kopplung für 16 Stunden über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Kontrollen wurden nur mit Zweitantikörper und Sepharose inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose von dem Lysat bei 12.000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert und fünf mal mit Puffer gewaschen.

Im Anschluss erfolgte eine 12%-ige SDS-PAGE. Die Sepharose-gebundenen Proteine wurden im Anschluss in einer 12%-ige SDS-PAGE von der Sepharose abgelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden dann mit Coomassie-Blau gefärbt und die Banden analysiert.

Tris/NaCl Puffer: 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0

2.2.2.3 Ko-Immunopräzipitation

Bei der Ko-Immunopräzipitation wird eine mögliche Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht. Ist diese Verbindung sehr stabil, werden Proteine mit aus einer Lösung isoliert, wenn ihr Bindungspartner präzipitiert wird. Dabei erfolgen Immunopräzipitation und Detektion im Western Blot nicht mit dem selben Antikörper, sondern mit einem gegen das ko-isolierte Protein. So wurde in den Versuchen zum einen mit anti-Tau-Antikörpern präzipitiert und mit anti-Proteasom-Antikörpern im Blot detektiert und zur Kontrolle mit anti-Proteasom-Antikörpern präzipitiert und dann mit anti-Tau-Antikörpern detektiert.

2.3 Spezielle Methoden

2.3.1 Tau-Techniken – Charakterisierung und Nachweis von Tau-Proteinen

2.3.1.1 Aufarbeitung des Gewebematerials

Zur Herstellung von Proteinhomogenaten aus postmortalem Gehirngewebe wurden Gewebeproben von vier verschiedenen Gehirnregionen von insgesamt 12 Alzheimer-Patienten verwendet. Es handelte sich bei allen Proben um Braak-Stadium IV und das mittlere Alter betrug 82,0 Jahre bei einer Spanne von 80-84 Jahren. Zur Kontrolle wurden Gewebeproben von insgesamt 6 Patienten verwendet, wobei es sich bei drei Patienten um Braak-Stadium I und bei drei weiteren um Braak-Stadium II handelte. Das mittlere Alter betrug hier 81,6 Jahre bei einer Spanne von 79-86 Jahren. Zur Gewinnung der

Proteinlösungen wurden die Gewebeprobe in PBS mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis homogenisiert und durch fünffache Frieren-Tauen-Zyklen lysiert. Anschließend wurden die Lysate fünfzehn Mal mit einer 18-Gauge Nadel geschert und die unlöslichen Bestandteile durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 g entfernt. Der lösliche Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet und bei -20 °C gelagert.

2.3.1.2 Isolierung von Tau und PHFs aus *post mortem* Gehirngewebe

Die Isolierung von Tau-Protein und PHFs (PHF-Tau) aus post-mortem Gehirnen wurde gemäß der Vorschrift von Lee *et al.* durchgeführt (Lee, Wang *et al.* 1999). *Post mortem* Gehirne von Patienten mit Braak-Stadium V/IV und Kontroll-Gehirne wurden auf Eis frei von Meningen und Blutgefäßen seziiert. Die Proben wurden dann pro Gramm Gewebe in 1,5 ml kaltem Puffer, der RAB-Puffer, Protease-Inhibitoren, 0,75 M NaCl und 100 nM Okadaische Säure enthielt, mittels eines Dounce-Homogenisators homogenisiert. Die Homogenate wurde dann bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert, um restliche Mikrotubuli zu depolymerisieren. Anschließend wurden die Proben in einer Ultrazentrifuge in dem Festwinkelrotor 70 Ti bei 11.000 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgetrennt und in dem Festwinkelrotor TLA-100.4 bei 100.000 g für 60 Minuten bei 4 °C erneut zentrifugiert. Die Überstände enthielten überwiegend Rohextrakte löslichen normalen Taus während Rohextrakte PHF-Taus in den Pellets verblieben.

Zur Aufreinigung des Taus wurden die salzhaltigen Überstände aufgeköcht, zentrifugiert und das hitzestabile Tau dann durch 50 %ige Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert. Die nach Zentrifugation im Pellet enthaltenen Tau-Proteine wurden in einem kleinen Volumen von 0,5 × RAB-Puffer resuspendiert und dann gegen den gleichen Puffer dialysiert, um überschüssige Salze zu entfernen. Anschließend wurde das Tau mit 2,5 %iger Perchlorsäure behandelt, um säureunlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Säurestabiles Tau-Protein wurde nach anschließender Zentrifugation und Dialyse erhalten. Die Reinheit lag nach Silberfärbung bei größer 80 % und die Ausbeute betrug ca. 1,5 mg lösliches Tau-Protein pro 100 g Hirngewebe.

Um PHF-Tau zu gewinnen, wurden die Pellets der ersten und zweiten Zentrifugation vereinigt, in 10 ml (1:10 w/v) PHF-Extraktionspuffer resuspendiert und bei 15.000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. In Gegenwart von 10 % Saccharose und bei geringen Zentrifugalkräften verbleiben isolierte PHFs oder kleine PHF-Aggregate im Überstand, während intakte oder fragmentierte NFTs und größere PHF-Aggregate heraus zentrifugiert

werden. Anschließend wurden die Pellets in der gleichen Art und Weise re-extrahiert, die Überstände vereinigt, mit Sarkosyl ad 1 % versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Eine Sarkosylbehandlung entfernt membranöses Material der PHF-Rohpräparation und reichert gleichzeitig PHF-Tau an. Anschließend wurden die Sarkosylextrakte bei 100.000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets enthielten ungereinigtes PHF-Tau (PHF-A), wurden in RAB-Puffer resuspendiert und bei -70°C gelagert. Um hoch gereinigtes PHF-Tau (PHF-B) zu erhalten, wurden die Pellets in RAB-Puffer resuspendiert, auf einen diskontinuierlichen 1,0–2,5 M Saccharose-Gradienten geladen und in dem Ausschwingrotor TLS-55 bei 175.000 g, 4 °C für 16 Stunden zentrifugiert. Das braune Material der Saccharose-Grenzschichten 1,25 - 1,5 M, 1,75 – 2,0 M und 2,25 - 2,5 M wurde gesammelt und mit 2 M Guanidinisothiocyanat bei 37 °C für 1 Stunde extrahiert. Der Extrakt wurde bei 50.000 g, 25°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand gegen RAB-Puffer dialysiert und dann bei -70°C gelagert.

<u>RAB-Puffer:</u>	100 mM MES (pH 6,8), 0,5 mM MgSO ₄ , 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF
<u>Protease-Inhibitoren:</u>	Leupeptin, Pepstatin, Sojabohnen-Trypsininhibitor, TPCK und TLCK (je 1 µg/ml)
<u>PHF-Extraktionspuffer:</u>	10 mM Tris, 10 % Saccharose, 0,85 M NaCl, 1 mM EGTA, pH 7,4

2.3.1.3 *In-vitro*-Assemblierung von PHFs aus humanem rekombinatem Tau

PHFs wurden aus humanem rekombinatem Tau (Tau_{rek}) *in vitro* assembliert gemäß der Vorschrift von Friedhoff *et al.* (Friedhoff, Schneider *et al.* 1998). Etwa 20 µl einer 100 µg/ml Lösung von humanem rekombinatem Tau (Tau_{rek}) wurde bei 37 °C in einer Mischung aus 20 mM MOPS/NaOH (pH 7,0) und äquimolarem Heparin als polyanionischem Ko-Faktor über 48 Stunden inkubiert. Eine erfolgreiche Polymerisation wurde mittels des Thioflavin S-Assays bestätigt. Dazu wurden Proben mit oder ohne 5 µM Thioflavin S-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Exzitation von 440 nm und Emission von 480 nm betrachtet.

2.3.1.4 Isolierung von Tau-Protein aus HT22-Zellen und primären Neuronen

Die Aufreinigung von Tau aus Gehirngewebe macht Gebrauch von seiner Assoziation mit Mikrotubuli in wiederholten Assemblierungszyklen oder seiner Hitzestabilität und

Löslichkeit in Perchlorsäure (Lee, Wang *et al.* 1999). Anschließend erfolgt eine Ammoniumsulfatfällung oder Ultraschallbehandlung mit nachfolgender Ionenaustauschchromatographie. Diese Prozedur erfordert mehrere Schritte und ist sehr zeitaufwändig. Eine schnelle und leichte Methode zur Aufreinigung stellt die Methode nach Kontsekova *et al.* dar. Sie nutzt die Hitzestabilität des Tau-Proteins aus und verändert die immunogenen Eigenschaften des Tau-Proteins nicht (Kontsekova, Cattaneo *et al.* 1995).

Zur Isolierung des Taus wurden HT22-Zellen oder primäre Neurone geerntet, zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS in einem Eppendorfgefäß resuspendiert und anschließend für 5 Minuten in einem Thermomixer auf 95°C erhitzt. Hitzeinstabile Proteine wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 Minuten entfernt. Der das thermostabile Tau enthaltende Überstand wurde entweder einer Proteinbestimmung zugeführt oder bei -70°C gelagert. Alternativ, falls mit gleichen Zellzahlen gearbeitet wurde, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und direkt in Elektrophorese-Ladepuffer geerntet, abgekocht, zentrifugiert und dann eingefroren.

2.3.1.5 Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in HT22-Zellen

Die Phosphorylierung des Tau-Proteins wird durch das Gleichgewicht von Kinasen (Cdk5, GSK-3 β) und Phosphatasen (Proteinphosphatase 1 und 2A) gesteuert. Eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins kann erzielt werden, in dem die Kinasen aktiviert oder die Phosphatasen blockiert werden. Das Dinoflagellat-Toxin Okadaische Säure (engl. Okadaic Acid, OA) ist ein ionophor-ähnliches Polyetherderivat einer C₃₈-Fettsäure, das leicht in Zellen eindringt (siehe Abb. 2.3-1). OA ist ein bekannter Inhibitor der Proteinphosphatasen 1 und 2A (Bialojan and Takai 1988) und wurde zu Untersuchungen der Mikrotubuli-Organisation und Tau-Phosphorylierung verwendet (Xie, Litersky *et al.* 1998).

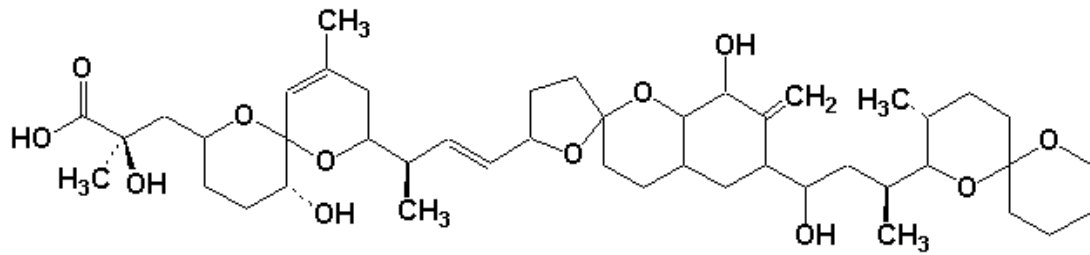


Abbildung 2.3–1 Strukturformel der Okadaischen Säure

OA wurde in Wasser gelöst und als 100 μ molare Stammlösung bei -20°C gelagert. Zur Hemmung der PP2A wurde das Medium der Zellen gewechselt. Frisches Medium mit 0,5 μM OA wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen so für 3 Stunden vor den Versuchen vorinkubiert.

2.3.2 Methoden rund um das Proteasom

2.3.2.1 Messung der Aktivität des Proteasoms

Das hydrophobe Fluoropeptid N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amido-4-methyl-cumarin (suc-LLVY-AMC) ist ein Substrat für das Proteasom. Der Abbau dieses Peptids ist spezifisch für die chymotryptische Aktivität des Proteasoms. Dabei wird das Substrat in die einzelnen Aminosäuren zerlegt und das Fluorophor 7-Amido-4-methyl-cumarin freigesetzt (siehe Abb. 2.3-2). In einem Fluoreszenzspektrometer läßt es sich sodann anregen und detektieren.

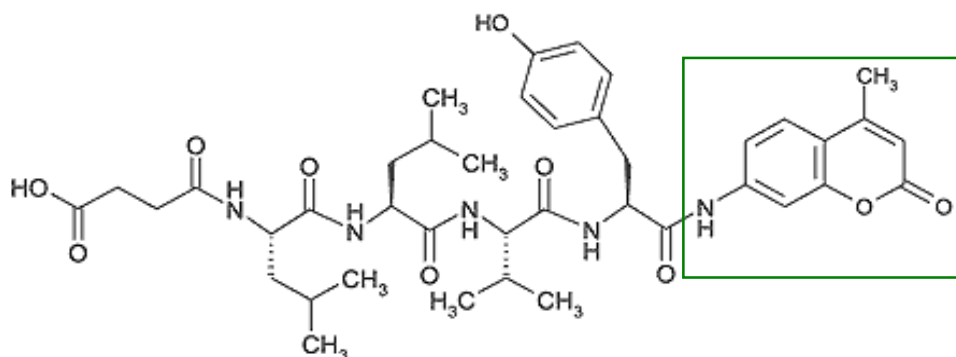


Abbildung 2.3–2 N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amido-4-methyl-cumarin, das Fluorophor ist grün gekennzeichnet

2.3.2.2 Aktivitätsbestimmung in humanem Hirngewebe

Zur Bestimmung der proteasomalen 20S Aktivität in postmortalen Gewebe wurden Proteinlysate jeder Probe untersucht (Pacifci and Davies 1990). Dazu wurden 20 µl Lysat mit 0,2 mM des Fluoropeptides suc-LLVY-AMC mit Proteolyse-Puffer ad 300 µl für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit oder ohne Zusatz von Lactacystin zur Hemmung des Proteasoms, um eine mögliche Freisetzung des Fluorogens durch andere Vorgänge auszugrenzen. Durch Zugabe von 300 µl eiskaltem Ethanol wurde die Abbau-Reaktion gestoppt.

Proteolyse-Puffer 50 mM Tris (pH 7,8), 20 mM KCl, 5 mM MgOAc und 1 mM DTT

Anschließend wurde ein Aliquot von 500 µl Reaktionsansatz mit 2 ml 125 mM Boratpuffer pH 9,0 vermischt und die Fluoreszenz bei 380 nm Exzitations- und 440 nm Emmissionswellenlänge gemessen (Split Ex/Em = 3/10, Sensitivity = high). Die 20S Proteasomaktivität wurde als Lactacystin-sensitiver Suc-LLVY-AMC-Abbau bestimmt.

Die Errechnung der proteolytischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{min}} = \frac{\text{FU} \times \text{VF} \times \text{AV} \times 200}{\text{P} \times \text{t} \times 114.000}$$

FU = Absolute Fluoreszenzeinheiten (bei 200 µmol/l AMC-Peptid mit 114.000 FU bei einem 200 µmol/l AMC-Standard), **VF** = Verdünnungsfaktor bei Ethanol / Boratpufferverdünnung, **AV** = Ansatzvolumen (300 µl), **P** = µg Protein pro Inkubationsansatz, **t** = Inkubationszeit in Minuten

2.3.2.3 Aktivitätsbestimmung in HT22-Zellysaten

Die Messung der proteasomalen Aktivität in der Zelllinie HT22 erfolgte nach dem Protokoll von T. Grune (Grune, Reinheckel *et al.* 1995). Die Zellen wurden zur Messung in Lysispuffer geerntet und durch Frieren-Tauen-Zyklen bei 25°C und 800 rpm in einem Thermomixer aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm entfernt. Der Überstand enthielt das Proteinlysate mit dem Proteasom. Die Aktivität wurde bei allen Versuchen in 96-Lochplatten bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellysate mit einem Mastermix aus 33,5 µl 3 x 20S-Inkubationspuffer und Wasser ad 90 µl angesetzt. Wo angegeben, wurde ATP in einer finalen Konzentration von 5 mM dazu

gegeben. Zum Start der Reaktion wurden 10 µl 2 mM Fluoropeptid zu jeder Probe gegeben und dann sofort die Platten bei 37 °C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert.

Lysispuffer 250 mM Saccharose, 25 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (frisch dazu), pH 7,8

3 x 20S-Inkubationspuffer 450 mM Tris-HCl (pH 8,2), 90 mM KCl, 15 mM MgOAc, 15 mM MgCl₂, 3 mM DTT (frisch dazu)

Anschließend wurde die Aktivität in einem Fluoreszenzspektrometer bei 360 nm Exzitation und 485 nm Emission gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität wurden Standards des fluorogenen Peptids in DMSO mitgeführt und eine Eichgerade im Bereich 0 mM bis 50 mM erstellt. Die nachfolgende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben. Die spezifische proteolytische Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität in } \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{min}} = \frac{\text{absolute FU} \times \text{AV}}{\text{P} \times \text{t} \times \text{m}}$$

FU = gemessene Fluoreszenzeinheit, **AV** = Ansatzvolumen (100 µl), **P** = µg Protein pro Inkubationsansatz, **t** = Inkubationszeit in Minuten, **m** = Steigung der Eichgeraden, Fluoreszenz pro µM AMC

Innerhalb des Bereiches der Eichgeraden war die gemessenen Fluoreszenz proportional zur Aktivität des Proteasoms

2.3.2.4 Inhibierung der Proteolyse

Zur Hemmung der Aktivität des Proteasoms wurden die Substanzen MG132 und Lactacystin verwendet (siehe Abbildungen 2.3-3 und 2.3-4). MG132 gehört zur Klasse der Peptidaldehyde, die die chymotryptische Aktivität des Proteasoms in einer potenten aber reversibeln Weise hemmen. Lactacystin dagegen ist ein nicht-peptidischer Inhibitor, es handelt sich um einen natürlichen, selektiven und irreversiblen Hemmstoff des chymotryptischen Zentrums (Tomoda and Omura 2000).

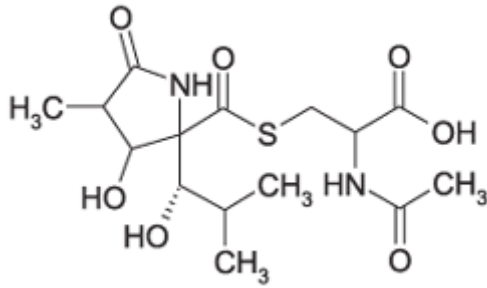


Abbildung 2.3–3 Lactacystin

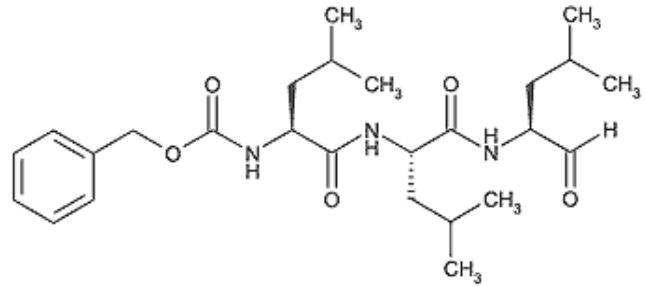


Abbildung 2.3–4 MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-H)

Lactacystin wurde vor den Versuchen im Zellkultursystem wenn nicht anders angegeben in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. MG132 wurde vor und während der Experimente in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

2.4 Biologische Modelle: Zellkulturen und lebende Hirnschnitte

2.4.1 Zelllinien als sekundäre, permanente Zellkulturen

Elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen an organotypisch hippocampalen Gehirnschnitten hat das Verständnis der Gedächtnisvorgänge im Gehirn enorm vorangetrieben. Obwohl Gehirnschnitte ein ausgezeichnetes komplexes Modellsystem darstellen, bestehen sie aus einer heterogenen Zellpopulation. Somit ist es schwierig einzelne neuronale oder mikrogliale Komponenten zu isolieren und biochemisch zu untersuchen. Untersuchungen an einer homogenen Zellpopulation, zum Beispiel einer neuronalen oder mikroglialen Zelllinie, erlauben es, zellspezifische Fähigkeiten zu erkennen (Morimoto and Koshland 1990). Zellkulturexperimente mit permanenten Zelllinien stellen ein geeignetes Modellsystem dar, um komplexe zelluläre Vorgänge und Regulationsmechanismen vereinfacht zu betrachten und aufzuklären. Permanente Zelllinien können zu großen Zellzahlen herangezogen werden, sind einfach in der Handhabung und es existiert bereits reichhaltiges Datenmaterial über sie.

2.4.2 Kultivierung von Zelllinien

Als sekundäre Zellkulturmodelle wurden in dieser Arbeit die Zelllinien HT22 und BV-2 verwendet. Hierbei handelte es sich um adhärenente Zellen, die in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von FKS, Penicillin/Streptomycin sowie Glutamin bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert wurden. Die Zellen wurden alle 2 – 3 Tage bzw. bei Konfluenz gesplittet, das heißt in DMEM mit einem Zellschaber geerntet, mittels Auf- und Abpipettieren vereinzelt, mit frischem Medium verdünnt und in neuen Zellkulturgefäßen wieder ausgesät.

Kulturmedium: DMEM (3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose), 10 % FKS (hitzeinaktiviert),
1 % L-Glutamin (200 mM), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.4.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Eukaryotische Zelllinien können kryokonserviert und später wieder aufgetaut und weiter kultiviert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen eines T75-Flakons mit warmem Kulturmedium gewaschen und in 10 ml Medium mittels eines Zellschabers geerntet. Die Suspension wurde durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und für 10 Minuten bei 250 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3 ml einer 1:1 Mischung aus Kulturmedium und Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO, sterilfiltriert) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt, in einem Gefrierschrank auf -80 °C abgekühlt (1 °C / Minute) und ab dem folgenden Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurde ausreichend warmes Kulturmedium in einem Zellkulturgefäß vorgelegt und die Kryoröhrchen mit den Zellen in einem Wasserbad rasch erwärmt. Der gesamte Inhalt wurde sodann in das Kulturgefäß überführt und im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das DMSO und tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

Einfriermedium: 60 % FKS, 20 % Glycerol, 20 % DMSO

2.4.4 HT22-Zellen

Die Zelllinie HT22 ist ein glutamatsensitiver Subklon der neuronalen Zelllinie HT4. Die Zelllinie HT-4 besteht aus Zellen, die aus dem Hippocampus einer Maus isoliert und mittels des temperatur-sensitiven Onkogens SV40 T-Antigen immortalisiert wurden (Frederiksen, Jat *et al.* 1988). Western Blot Untersuchungen zeigten, dass HT-4 Zellen neuronenspezifische Enolase exprimieren und das Neurofilament-Triplet (68, 160 und 200 kDa), aber nicht gliäres fibrilläres saures Protein (GFAP), was somit eher neuronalen als glialen Charakter suggeriert (Lendahl and McKay 1990). HT22-Zellen wurden aufgrund ihrer Glutamatsensitivität selektioniert, exprimieren jedoch keine ionotropen Glutamatrezeptoren (Maher and Davis 1996).

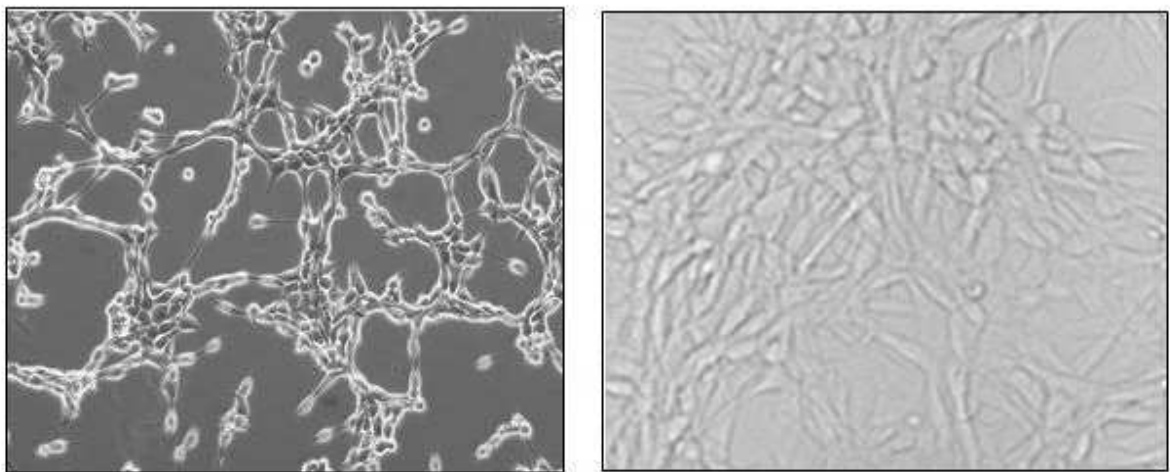


Abbildung 2.4-1 HT22-Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop aufgenommen Die linke Abbildung zeigt die Zellen im Phasenkontrast, die rechte Abbildung zeigt die Zellen im Durchlicht.

HT22-Zellen wurden in Kulturmedium mit zusätzlich 0,35 % Glucose in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Zur Ernte oder zum Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml warmem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 10 ml Medium abgelöst, mittels einer 20 G Kanüle vereinzelt und eins zu drei in neue Flakons transferiert. Für die Kultivierung der Zellen über einen 72 Stunden Zeitraum wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 20 ml DMEM aufgenommen und in einem T75-Flakon inkubiert.

HT22-Medium: 500 ml Kulturmedium plus 10 ml (2 %) Glucose-Stammlösung

Glucose-Stammlösung: 1,995 mg Glucose in 10 ml DMEM, sterilfiltriert

2.4.5 BV-2 Zellen

Die mikrogliale Zelllinie BV-2 wurde durch Infektion primärer muriner Mikrogliazellen mit einem *v-raf/v-myc*-Onkogen tragenden Retrovirus (J2) von Blasi *et al.* generiert und immortalisiert. BV-2 Zellen eignen sich gut als Modellsystem für *In-vitro*-Studien (siehe Abb. 2.4-2), da die meisten morphologischen, phänotypischen and funktionalen Eigenschaften so erhalten blieben, wie sie auch für frisch isolierte Mikrogliazellen beschrieben wurden (Blasi, Barluzzi *et al.* 1990). Wie auch primäre Mikrogliazellen zeigen BV-2 Zellen nach ihrer Aktivierung eine amöboide Morphologie. Sie weisen Eigenschaften peripherer Makrophagen auf in Bezug auf ihr antigenes Profil, der Phagozytoseaktivität und der antimikrobiellen Aktivität. BV-2 Zellen unterscheiden sich jedoch durch ihre Expression einwärts gerichteter K⁺-Kanäle und der Ausbildung spinaler Fortsätze (Bocchini, Mazzolla *et al.* 1992). Stimulierte BV-2 Zellen sezernieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 und exprimieren typische mikrogliale Marker wie beispielsweise Makrophagen-inflammatorisches-Protein 1-alpha (MIP-1) mRNA und MHC-II-Moleküle (Laurenzi, Arcuri *et al.* 2001).



Abbildung 2.4–2: BV-2 Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop

Die Zellen wurden in Kulturmedium in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Bei Subkonfluenz wurden die adhärenenten Zellen geerntet, vereinzelt und im Verhältnix eins zu zehn in frischem Medium in Kulturflaschen neu ausgesät.

2.4.6 Primärkulturen - Kultivierung primärer neuronaler Zellen

Für viele Fragestellungen werden Primärzellen den etablierten Zelllinien vorgezogen, da davon ausgegangen wird, dass sie eher dem entsprechenden *in vivo*-Zelltyp ähneln. Viele Forscher haben die Erfahrung gemacht, dass Primärzellen häufig auch unter *In-vitro*-Bedingungen die Aktivitäten und Funktionen widerspiegeln, die sie in ihrer physiologischen Umgebung zeigen. Allerdings sind Primärzellkulturen im allgemeinen in Bezug auf die Kulturbedingungen etwas anspruchsvoller als etablierte Zelllinien. So benötigen sie zum Beispiel wachstumsfördernde Substanzen oder Hilfen zur Anheftung (Morgan and Darling 1994).

Zur Verbesserung und zur Veränderung von Oberflächeneigenschaften von Kulturgefäßen aus Glas wie auch aus Plastik kann man bestimmte Verfahren anwenden. So kann man durch Vorbeschichtung der Kulturgefäße erreichen, dass z.B. Nervenzellkulturen besser überleben oder dass Differenzierungsvorgänge erst dadurch *in vitro* möglich gemacht werden können. Gerade für tierische Zellkulturen spielt bei den strikt adhärenenten Zelllinien die Oberfläche des Kulturgefäßes eine entscheidende Rolle, wobei prinzipiell die Zellen bei physiologischem pH-Wert an ihrer Oberfläche negative Ladungen tragen. Zellen können auf Oberflächen mit positiver als auch mit negativer gezüchtet werden. Es scheint wohl eher die Ladungsdichte als die Qualität der Ladung entscheidend für das Anheften der Zellen an die jeweilige Oberfläche zu sein (Lindl 2000).

2.4.6.1 Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-D-Lysin

Primäre neuronale Kulturen wachsen nur auf beschichteten Gefäßen. Das Beschichten von Oberflächen mit Polylysinen führt zu einer positiven geladenen Oberfläche und ermöglicht die Anheftung primärer Nervenzellen. Dazu wurde aus Poly-D-Lysin und sterilem Wasser eine Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml hergestellt und eingefroren. Zur Beschichtung der 6-Lochplatten wurde eine geeignete Menge mit sterilem Wasser auf 20 ng/ml verdünnt und auf die Platten gegeben (1 ml/Loch). Sterile Deckgläschen wurden in eine 24-Lochplatte gegeben und vollständig mit Poly-D-Lysin-Lösung bedeckt. Die Platten wurden über Nacht in einen Inkubator bei 37 °C gestellt, am nächsten Tag vor der Präparation zwei Mal mit sterilem Wasser gespült und unter der Laminar-Flow-Box getrocknet. Falls Kulturschalen nicht direkt verwendet wurden, wurden sie mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C im Kühlschrank für maximal 2 Wochen aufbewahrt.

2.4.6.2 Präparation embryonaler Gehirne und Herstellung einer primären neuronalen Zellkultur aus Mäusen

Für die Herstellung neuronaler Primärkulturen wurden Embryonen im Alter von 15-16 Tagen verwendet (E 15-16) und nach G. J. Brewer präpariert und kultiviert (Brewer, Torricelli *et al.* 1993). Dazu wurde die trächtige Maus mittels Genickbruch getötet, auf den Rücken gelegt und das Abdomen mit 70 % Alkohol gereinigt. Die Bauchhöhle wurde mit einer großen Schere geöffnet, die Embryonen im Uterus aus der Bauchhöhle entnommen und in eine Petrischale unter einer Laminar-Flow-Box überführt, die mit eisgekühlter Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) gefüllt war. Der Uterus wurde dann mit einer kleinen Schere eröffnet, die Nabelschnur durchtrennt und der Embryo dekapitiert.

Die Präparation der Gehirne fand unter semisterilen Bedingungen unter einem Binokular statt. Der Kopf wurde in eine weitere Petrischale überführt, die mit eisgekühltem HBSS ohne Phenolrot gefüllt war. Der Schädel wurde entlang der Fontanelle vom Genick bis zu den Augenhöhlen mit einer Feinschere aufgetrennt und das Gehirn mit einem Löffel entnommen. Dann wurde mit zwei Pinzetten das Kleinhirn abgetrennt, der Hypothalamus entfernt, die Hirnhälften getrennt und von den Hirnhäuten befreit. Die Großhirnhälften wurden dann mit einer umgedrehten Glaspasteurpipette und Saughilfe in ein 15 ml Röhrchen überführt und drei Mal vorsichtig mit 8 ml HBSS ohne Calcium- und Magnesium-Ionen gespült. Nach der letzten Spülung wurde der Puffer auf 4,5 ml reduziert und für 15 Minuten mit 0,5 ml 2,5 %iger Trypsin-Lösung bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proteolyse wurde mit 500 µl Kälberserum gestoppt und das Gewebe drei Mal mit 8 ml HBSS gespült, um die zweiwertigen Kationen wieder zuzuführen. Der ersten Spülung wurden 100 µl 0,05 %ige DNase-Lösung hinzu gegeben, um ein Agglomerieren der Gehirne durch freie DNA zu unterbinden. Anschließend wurde einmal in 4 ml warmen Neurobasal Medium (NBM) gespült und das Volumen bis auf den Konus des Röhrchens reduziert. Danach wurde der durch Trypsin angedaute Gewebeverband mechanisch durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer feuerpolierten Pasteurpipette dissoziiert (Trituration), um die Zellen voneinander zu trennen. Dazu wurde mit einer kräftigen Saughilfe zuerst die Wand der Pipette mit Medium benetzt, dann das Gewebe 2-3 mal grob eingesaugt und dann die Kapillare am Boden angesetzt und ca. 7 mal trituiert bis die Suspension ein homogenes Aussehen hatte. Nach dem Absetzen der größeren Gewebestücke wurde der homogene Überstand in ein neues Röhrchen überführt und für 3-4 Minuten bei Raumtemperatur und 250 g zentrifugiert. Der Überstand mit den

Zelltrümmern wurde verworfen und das Pellet ad 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zur Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau angefärbt und die lebenden und toten Zellen ausgezählt. Die Vitalität lag im Schnitt bei ca. 70 %. Danach wurden die Zellen in einer Dichte von ca. $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 6-Lochplatten in 1,3 ml serumfreien Medium ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (siehe Abb. 2.4-3). 24 Stunden nach Anlegen der Kultur wurde das Medium durch Antioxidantien-freies Kulturmedium ersetzt. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch frisches ersetzt. Die Kulturen wurden zwischen Tag 4 und 12 *in vitro* zum Experiment eingesetzt.

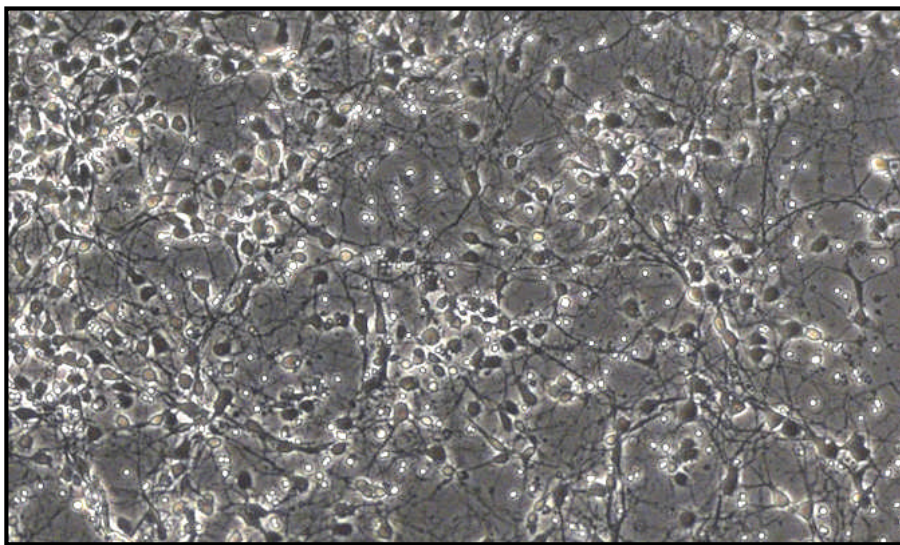


Abbildung 2.4-3 Primäre Neurone der Maus, 4 Tage in Kultur

Für die Immunzytochemie wurden die Neurone in einer Zelldichte von $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf Poly-D-Lysin beschichteten, sterilen Glasplättchen in 24-Lochplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte analog den 6-Lochplatten.

Kulturmedium Neurobasal Medium, 2 % B27-Supplement (mit / ohne Antioxidantien), 1% Glutamin 200 mM, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung

2.4.6.3 Immunzytochemie – Quantitative Kontrolle der Neuronenkultur

Im Unterschied zu permanenten Zelllinien muss bei primären Zellkulturen der gewünschte Zelltyp erst isoliert werden. Die Reinheit der isolierten Kultur ist von großer Bedeutung, um biochemische Ergebnisse richtig deuten zu können. Neben der Reinheit der Zellkulturen muss auch ihre Identität bestätigt werden. Dazu werden Färbungen mit

Antikörpern gegen spezifische Markerproteine der Zellen durchgeführten und die Zellen dann fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

Die auf Glasplättchen kultivierten Neurone wurden einmal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PB) gespült und anschließend in 4% Paraformaldehyd in 0,1 M PB für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 0,1 M PB für 10 Minuten gewaschen und dann für 30 Minuten mit 10 % normalem Ziegeserum (NGS) oder Eselsserum (DS) in 0,1 M PB und Zusatz von 0,5 % Triton X-100 unspezifische Bindungen geblockt und die Zellmembranen permeabilisiert. Das Blockieren der unspezifischen Bindungen erfolgte mit Serum aus dem Tier, in welchem der Sekundärantikörper gebildet wurde. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten mit 0,1 M PB gewaschen und der Primärantikörper in der in Tabelle 2.4-1 angegebenen Konzentration in Blockiermedium aufgetragen (AK in 0,1 M PB mit 1 % Serum; 200 µl je Deckgläschen). Die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden und wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M PB für je 10 Minuten beendet. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in der ebenfalls in Tabelle 2.4-1 angegebenen Konzentration in Blockiermedium aufgetragen (AK in 0,1 M PB mit 1 % Serum; 100 µl je Objektträger). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Präparate dreimal 5 Minuten mit 0,1 M PB gewaschen und es erfolgte das Eindeckeln der Präparate. Dazu wurden kleine Tropfen Immu-Mount auf Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der Kultur nach unten aufgelegt.

Tabelle 2.4-1 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Konz.	Sekundärantikörper	Farbe	Konz.	Serum
Ziege anti-Maus Neurofilament (NF)	5 µg/ml	Esel anti-Ziege FITC	grün	7,5 µg/ml	Esel
Maus anti- Tau-1	5 µg/ml	Ziege anti-Maus AlexaFluor 488	grün	8 µg/ml	Ziege
Kaninchen anti-Maus GFAP	5 µg/ml	Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 568	rot	8 µg/ml	Ziege
GFS-IB4 FITC	2 µg/ml	--	grün	--	Ziege

Bei Doppelfärbungen erfolgten beide Einzelfärbungen nacheinander, bevor abschließend eingedeckelt wurde. Die Objektträger wurden dann über Nacht im Dunkeln getrocknet und konnten am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

Zum Nachweis der Neurone wurden die Antikörper Neurofilament (NF) und TAU-1 verwendet. TAU-1 erkennt alle unphosphorylierten Isoformen des Tau-Proteins und Neurofilament ist ein neuronenspezifisches Protein. GFAP erkennt astrozytenspezifisches gliäres fibrilläres saures Protein und GFS-IB4 färbt spezifisch Mikrogliazellen an. Als Kontrolle wurde den auf Glasplättchen kultivierten Neurone kein Primärantikörper zugesetzt, aber sonst auf gleiche Weise behandelt.

Blockiermedium 5 % Serum des Tieres, aus dem der Sekundärantikörper gewonnen wurde
0,5 % Triton X-100

In der neuronalen, primären Zellkultur (siehe Abb. 2.4-4) konnten mit den spezifischen Markern weniger als 5% Astrozyten (anti-GFAP) und Mikrogliazellen (GFS-IB4) nachgewiesen werden.

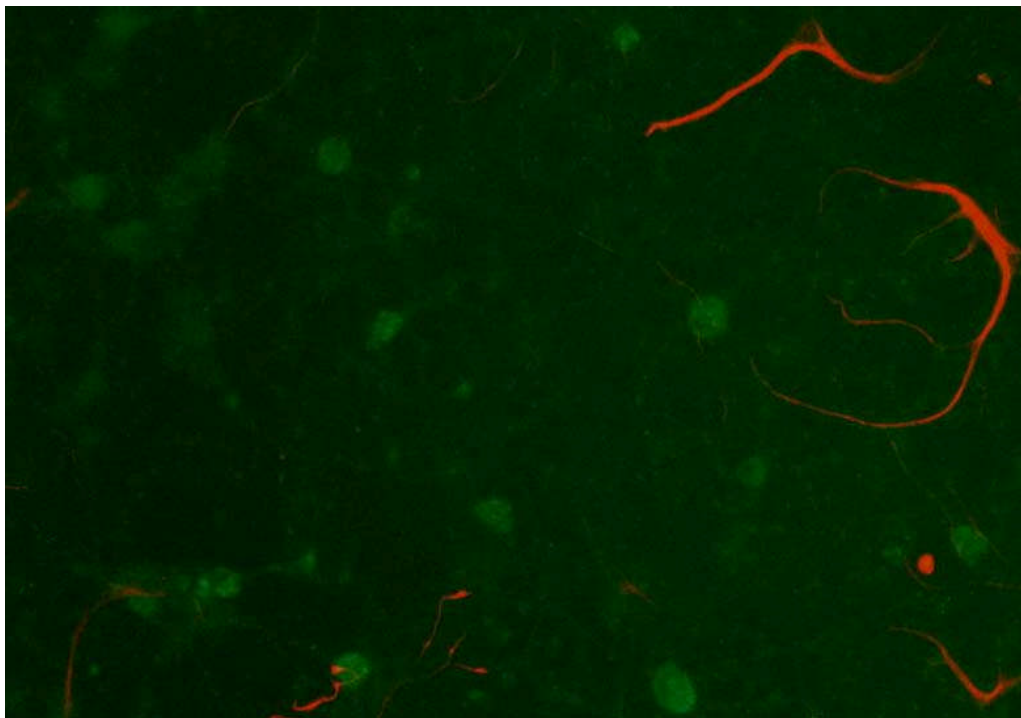


Abbildung 2.4-4 Färbung einer Neuronenkultur mit Tau-1 für Neurone (grün) und GFAP für Astrozyten (rot).

2.4.7 Organotypisch hippocampale Schnittkulturen

Im Unterschied zu Hirngewebe fehlen kultivierten Zellen die natürliche extrazelluläre Matrix, neuronale Konnektivität, neuronale-gliale Interaktionen und die normale neuronale Proteinexpression (Gong, Lidsky *et al.* 2001). Um diesem Manko zu begegnen, wurden ergänzend zu den reinen *In-vitro*-Untersuchungen an kultivierten primären Neuronen zusätzlich *in vivo*-ähnliche Versuche mit organotypisch hippocampalen Schnittkulturen (OHSK) durchgeführt. Organotypische Schnittkulturen repräsentieren ein komplexes *In-vitro*-Modell, und bewahren weitestgehend die morphologischen und physiologischen Eigenschaften der *in vivo*-Situation (Hailer, Jarhult *et al.* 1996).

2.4.7.1 Präparation und Kultivierung organotypisch hippocampaler Schnittkulturen

Organotypisch hippocampalen Schnittkulturen wurden nach einer Methode beschrieben von M. Frotscher präpariert (Frotscher, Zafirov *et al.* 1995). Zur Präparation wurden 10 Tage alte Mäuse (P10) dekapitiert und die Hirne unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Box entnommen. Dazu wurde der Schädel entlang der Fontanelle geöffnet und das Gehirn mit einem Löffel heraus gelöst. Dann wurde der Hirnteil, der den Hippocampus und den entorhinalen Cortex enthielt, so isoliert, indem nach rostral vom restlichen Neocortex und nach kaudal von Hirnstamm und Kleinhirn präpariert wurde. Die Gewebstücke wurden dann sofort in eiskaltes Präparationsmedium überführt und gesammelt

Anschließend wurden die Hirngewebstücke auf einen Sektionsblock aufgeklebt und mit einem Vibratom 350 µm dicke Koronarschnitte angefertigt, wobei Sektionsblock und Hirngewebe mit Präparationsmedium bedeckt waren. Die Schnitte wurden mit einer Pasteurpipette in Petrischalen mit eiskaltem Präparationsmedium überführt und dann wurden mit Skalpell unter einem Binokular der Hippocampus und der entorhinale Cortex frei präpariert. Drei bis vier Schnitte wurden danach mit einer Pasteurpipette auf einen Filtermembraneinsatz (Porengröße 0,1 µm) transferiert und in die Vertiefung einer 6-Loch-Kulturschale mit auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium eingehängt, wobei das Medium nur von unten direkten Kontakt mit dem hippocampalen Gewebe hatte. Die Inkubation der Schnittkulturen erfolgte bei 35 °C, 5 % CO₂ und 95 % Raumluft im Brutschrank zunächst für 9 Tage.

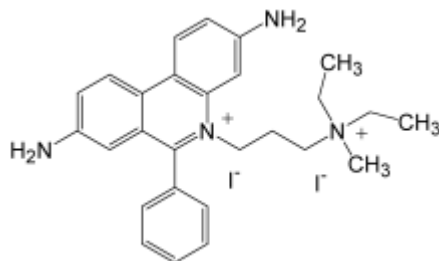
Diese Vorinkubation war notwendig, da in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass es zu einer Wiederherstellung organotypischer Bedingungen kommt und die hippocampalen Schnitte sich dann wieder nahezu wie unverletztes Gewebe verhalten und alle Zellkompartimente in ihrer ursprünglichen Architektur und teilweisen Funktionalität vorliegen (Hailer, Jarhult *et al.* 1996). Der Mediumwechsel der Schnittkulturen erfolgte direkt einen Tag nach der Präparation und anschließend jeden zweiten Tag.

Präpariermedium (steril): HBSS, 10 % FK

Kulturmedium (steril): 1,0 ml Penicillin /Streptomycin (0,1 mg/ml), 1,2 ml Glucose 20 (200 mg/ml), 2 ml L-Glutamin 200 mM, 0,8 g MEM 25 mM HEPES, 580 µl Natriumbikarbonat (0,075 %/ml), 500 µl Tris-Base 1 M, 80 µl Vitamin C (1 µg/ml), 100 µl Insulin (1 mg/ml), 25 ml Pferdeserum, 25 ml HBSS, Aqua bidest. ad 100 ml

2.4.7.2 Färben von Schnittkulturen mit Propidiumjodid

Propidiumjodid (PI) ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der durch die geschädigten Membranen toter Zellen eindringt. Er interkaliert mit den Basenpaaren der DNA und färbt auf diese Weise die Zellen rot an. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich die toten Zellen dann bildlich darstellen.



PI (3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethyl-ammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium-dijodid)

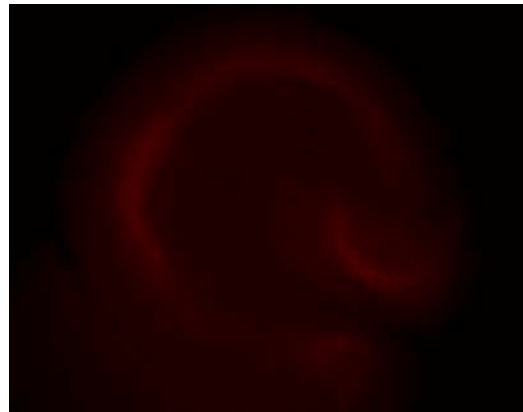


Abbildung 2.4-5 Strukturformel von PI und Färbung im Hirnschnitt

PI wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml direkt in das Kulturmedium unter die Membran, auf der die Hirnschnitte kultiviert worden waren, gegeben und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Jeder Zellkultureinsatz wurde dann dreimal in frisches Kulturmedium, das sich in Petrischalen befand, eingetaucht, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Kultureinsätze in eine neue 6-Lochplatte mit frischem Kulturmedium überführt und so zweimal für 10 Minuten im Inkubator gewaschen. Anschließend wurden die Hirnschnitte unter dem inversen Fluoreszenz- und

Durchlichtmikroskop betrachtet und die kompletten, lebenden Schnitte digital dokumentiert.

2.4.7.3 Ko-Kultivierung von Mikrogliazellen auf Schnittkulturen

Für die Untersuchungen des Einfluss von aktivierten Mikrogliazellen auf den Tau-Turnover in Neuronen wurden sowohl aktivierte native BV-2 Zellen als auch aktivierte asPARP-BV-2 Zellen, die mit dem antisense PARP-1-Vektor stabil transfiziert worden waren, eingesetzt (Ullrich, Diestel *et al.* 2001). Die Stimulation der Zellen erfolgte 24 Stunden zuvor mittels LPS. Für die Ko-Kultur wurden dann 1×10^5 Zellen in 5 μ l Medium auf die Oberfläche der hippocampalen Schnittkulturen transferiert, die unbehandelt oder zuvor mit H₂O₂, OA oder den in Tabelle 2.5-2 genannten Reagenzien vorinkubiert worden waren. Die Ko-Kultur wurde für 30 Minuten, 2 oder 24 Stunden weiter in Slice-Medium inkubiert und anschließend geerntet und die Hirnschnitte lysiert.

2.4.7.4 Ernte und Lyse von organotypisch hippocampalen Schnittkulturen

Zur Ernte der hippocampalen Hirnschnitte wurden die Schnitte einzeln mit einem sehr feinem Haarpinsel von dem Zellkultureinsatz abgehoben, in ein Reaktionsgefäß mit 150 μ l Lysepuffer (s. 3.3.1.1.) überführt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels einer Insulinspritze homogenisiert und die unlöslichen Proteinfragmente durch 10 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

2.5 Inkubationsschemata

HT22-Zellen wurden alleine oder im Kombination mit den Reagenzien Wasserstoffperoxid, Okadaische Säure, MG132, SNP inkubiert und mit BV2-Zellen kultiviert. Über den Stichprobenumfang und die Inkubationsdauer im einzelnen gibt die nachfolgende Tabelle Aufschluss.

Tabelle 2.5-1 Stichprobenumfang n und Inkubationsdauer der Versuche mit HT22-Zellen

Zeitwert		0 h	30 min	2 h	24 h
PBS	n =	6	3	4	4
H ₂ O ₂	n =	6	3	4	3
OA	n =	6	3	4	4
OA + H ₂ O ₂	n =	6	4	4	4
MG132	n =	4	3	3	3
SNP	n =	6	2	2	2
BV-2	n =	6	2	2	2

Organotypisch hippocampale Schnittkulturen (OHSK, Slices) wurde mit Ausnahme von MG132 mit den gleichen Reagenzien inkubiert wie HT22-Zellen. Slices, die eine Vorinkubation über Nacht erhalten hatten, wiesen alle einen Stichprobenumfang von $n = 3$ auf. Für die Versuche mit kürzeren Vorinkubationszeiten sind Stichprobenumfang und Inkubationsdauer in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 2.5-2 Stichprobenumfang n und Inkubationsdauer der Versuche mit OHSK

Zeitwert		0 h	30 min	2 h	24 h
PBS	n =	5	3	4	4
H ₂ O ₂	n =	5	3	4	4
OA	n =	5	3	5	5
OA + H ₂ O ₂	n =	5	3	5	5
SNP	n =	5	-	2	2
BV-2	n =	5	-	2	2

2.6 Vitalitätstests und Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen, der Vitalität, gibt es vielfältige Methoden. Insbesondere haben sich einfache kolorimetrische Tests bewährt, die das unterschiedliche Aufnahmeverhalten von Farbstoffen durch tote und vitale Zellen kennzeichnen. Darüber hinaus gibt es auch Tests mit Farbstoffen, die durch Permeabilisation in die Zellen gelangen. In vitalen Zellen wird dann durch aktive Metabolisierung der Farbstoff chemisch verändert, was sich in einer Farbänderung zeigt. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein bestimmtes Volumen einer Zellsuspension in eine Zählkammer (Haemocytometer) gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Unterscheidung toter und vitaler Zellen bei der Zellzählung hat die sich das Anfärben mit Trypanblau bewährt.

2.6.1 Trypanblaufärbung

Die Färbung mit Trypanblau beruht auf der Integrität der Plasmamembran vitaler Zellen. Bei lebenden Zellen können bestimmte Farbstoffe nicht ins Zellinnere gelangen, während sich bei toten Zellen das Zytoplasma anfärben lassen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Tote Zellen färben sich blau, während vitale Zellen ungefärbt bleiben und sich gut zählen lassen.

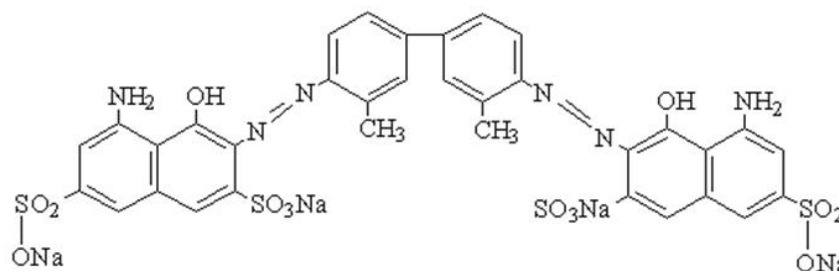


Abbildung 2.6–1 Strukturformal von Trypanblau

Die zu bestimmenden Zellen wurden in einem fixen Volumen PBS oder Medium geerntet und vereinzelt. Dann wurden gleiche Volumina der Zellsuspension und der Trypanblaulösung in einem Reaktionsgefäß gemischt und in einem Haemocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer gezählt. Die Zahl der Zellen wurde in den äußeren vier Quadraten bestimmt und die Zellkonzentration je Milliliter durch folgende Berechnung

bestimmt: $\text{Zellzahl} \times 2$ (Verdünnungsfaktor bei Trypanblaufärbung) $\times 10^4$. Der Prozentsatz vitaler Zellen errechnet sich aus der Anzahl ungefärbter Zellen, dividiert durch die Gesamtzellzahl und dann mit Hundert multipliziert.

2.6.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein nicht-radioaktiver, kolorimetrischer Test, der auf der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen beruht. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird dabei in vitalen Zellen zu unlöslichem lila Formazan reduziert. Nach Lyse der Zellen wird die Absorption des freigesetzten Formazan spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 – 600 nm gemessen, bei der MTT nicht absorbiert (Mosmann 1983).

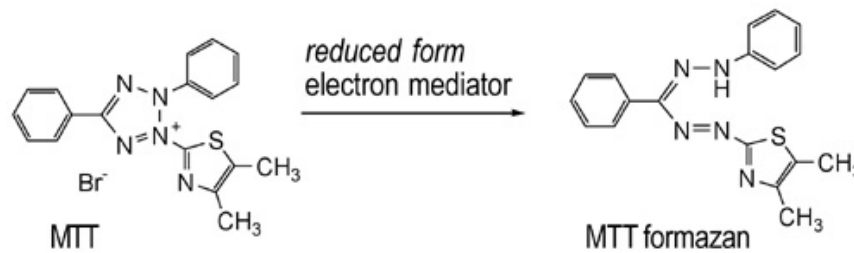


Abbildung 2.6–2 Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses zu lila Formazan durch aktive Dehydrogenasen

Zu 100 μl Mediums der zu bestimmenden Zellen wurden 10 μl einer MTT-Lösung gegeben. Die Zellen wurden dann für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend das Medium aspiriert. Pro Loch wurden je nach Größe 100 – 500 μl Lyse-Lösung zu den Zellen gegeben und dann für 20 Minuten bei RT auf einem Orbitalschüttler lysiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 563nm / 630 nm in einem Plattenreader. Die Vitalität wurde in % von unbehandelten Kontrollzellen angegeben.

MTT-Lösung 5 mg / ml in PBS

Lyse-Lösung Mischung 99 Teile Isopropanol / 1 Teil HCl

2.7 Carbonyl-ELISA

Der Proteincarbonyl-Gehalt der Lysate wurde mit einer modifizierten ELISA-Methode ermittelt (Buss, Chan *et al.* 1997; Sitte, Merker *et al.* 1998). Diese beruht auf der Umsetzung von Dinitrophenylhydrazin (DNPH) mit Carbonylen zu einem Hydrazone (DNP) und der anschließenden Detektion mittels anti-DNP-Antikörper.

HT22-Zellen wurden mit einem Zellschaber in 1 mM Butylhydroxytoluen (BHT) geerntet, zweimal gewaschen und mittels Frieren-Tauen-Zyklen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 Minuten wurde die Proteinkonzentration des Überstandes mittels BCA-Messung bestimmt und mit BHT auf 1 mg / ml eingestellt. Der Proteincarbonyl-Gehalt des Lysats wurde dann mit der modifizierten ELISA-Methode ermittelt. Die Detektion der Carbonyle erfolgte mit Kaninchen-Antiserum Anti-dinitrophenyl-IgG als Primärantikörper und einem monoklonalen Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase als Sekundärantikörper. Als Entwicklungsreagenz wurden *o*-Phenylendiamin und H₂O₂ verwendet und die Absorption bei 492 nm gemessen. Diese Arbeiten wurden im Labor von PD T. Grune im NWFZ der Charité durchgeführt.

2.8 Griess-Assay – Nachweis auf NO

Das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidationsreaktion von L-Arginin zu L-Citrullin. Dabei entsteht NO, das mit Sauerstoff sofort weiter zu Nitrit reagiert. Die Akkumulation der NO₂⁻-Ionen im Medium werden im Griess-Assay mit Hilfe einer chemischen Reaktion zu Azofarbstoffen gemessen. Die Griess-Reaktion beruht auf der Umsetzung von Nitrit mit Sulfanilamid und N-(1-naphtyl)-ethylendiamin (Griess-Reagenz) im sauren Milieu zu einem Diazonium-Produkt, welches photometrisch nachgewiesen werden kann (Griess 1879; Green, Wagner *et al.* 1982). Die Absorption des Diazofarbstoffs liegt im sichtbaren Bereich bei 540 - 595 nm Wellenlänge und ist proportional zur Nitrit- und somit auch zur NO-Konzentration.

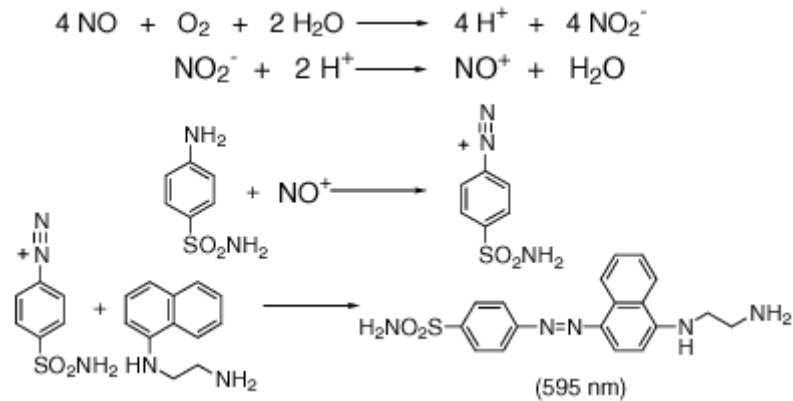


Abbildung 2.8–1 Indirekter Nachweis von NO durch Bildung eines Diazofarbstoffs

Zur Bestimmung der NO-Ausschüttung wurden in doppeltem Ansatz 100 µl Medium der inkubierten Zellen in eine 96-Lochplatte transferiert und mit 100 µl Griess Reagenz vermischt. Der Ansatz wurde dann für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend in einem Plattenreader die Absorption bei 540 nm und 630 nm als Referenzfilter gemessen. Als Standardreihe wurden Dreifachwerte einer Natriumnitrit-Lösung in PBS von 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 40 und 60 µM mitgeführt.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel und dem Add-In WinStat. Zunächst wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Daten gebildet und anschließend die Standardabweichungen, Varianzen sowie die Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Die Standardabweichung wird hierbei als Maß für die Messwertstreuung durch zufällige Fehler angegeben. Der Standardfehler beschreibt die Standardabweichungen der Mittelwerte und wird auch als SEM abgekürzt (standard error of the mean, Hüsler and Zimmermann 2001).

Um zu berechnen, ob sich zwei Datenmengen (Grundgesamtheiten) signifikant voneinander unterscheiden, wurde zuerst anhand des *Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variable* berechnet, ob die Daten normalverteilt waren, da hiervon das zu verwendende Test-Verfahren abhing. Der Test ergab, dass alle Grundgesamtheiten normalverteilt waren. Da es sich bei den Daten um kleine Umfänge und voneinander unabhängige (ungepaarte) Stichproben handelte, konnte aufgrund der Normalverteilung der Student-*t*-Test angewendet werden. Der *t*-Test vergleicht zwei Populationsmittelwerte

miteinander. Bei Excel werden dabei zwei Typen unterschieden: Typ 2 ist ein homoskedastischer t -Test, der bei Mittelwerten mit gleichen Varianzen Verwendung findet und Typ 3 ist ein heteroskedastischer t -Test, der bei unterschiedlichen Varianzen angewendet wird (Typ 1 wird bei gepaarten Stichproben verwendet). Zur Bestimmung der Unterschiedlichkeit der Varianzen der Daten wurde der F -Test verwendet. Er beschreibt die einseitige Wahrscheinlichkeit, dass sich Varianzen von Matrix 1 und Matrix 2 nicht signifikant unterscheiden. Ein großer F -Wert deutet somit darauf hin, dass die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Variabilität innerhalb der Gruppen (Hüsler and Zimmermann 2001). Anhand der Berechnung wurde dann der entsprechende t -Test angewendet.

Ausgegangen wurde von der Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben gab. War der mit dem Programm errechnete Signifikanzwert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$), so bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben und die Nullhypothese konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % abgelehnt werden. Ergab sich ein Wert größer als 0,05, so bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben und die Nullhypothese wurde angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionen zwischen dem Proteasom und spezifischen Modifikationen des Tau-Proteins in *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimerpatienten

In Studien an *post mortem* Gehirnen von Alzheimerpatienten wurden eine geringere Aktivität des Proteasoms gemessen (Keller, Hanni *et al.* 2000; Lam, Pickart *et al.* 2000; McNaught, Olanow *et al.* 2001). Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten Aufschluss darüber geben, ob eine gestörte Funktion des 20S Proteasoms als mögliche Ursache für die Zellschädigung bei der Alzheimer Erkrankung in Betracht gezogen werden könnte. Denn die Ursache der verminderten Proteasomaktivität in Alzheimergewebe ist unklar. Es galt zu klären ob, *weniger Proteasom vorhanden ist oder es durch alzheimerspezifische intrazelluläre Tau-Modifikationen gehemmt wird.*

3.1.1 Untersuchungen zum Proteasom in Alzheimerhirngewebe

Zu Beginn der Arbeit wurde die Funktionalität des Proteasoms in *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimer- und Kontrollpatienten untersucht, um die Frage der verminderten Aktivität bzw. Expression des Proteasoms in Alzheimergewebe zu klären.

3.1.1.1 Bestimmung der Proteasomaktivität in *post mortem* Alzheimergewebe

Untersucht wurden je vier verschiedene Gehirnregionen von zwölf unterschiedlichen Alzheimerpatienten (Braak-Stadium I) und sechs Kontrollpatienten (Braak-Stadium VI). Die Gewebeproben wurden homogenisiert und gleiche Proteinmengen der Gehirnhomogenate auf ihre Aktivität des 20S Proteasoms hin untersucht. Dazu wurden alle Alzheimer- und Kontrollproben mit dem fluorogenen Peptid suc-LLVY-MCA versetzt und nach anschließender Inkubation die durch aktives Proteasom freigesetzte Fluoreszenz gemessen.

Die endogene Proteasomaktivität im Gyrus rectus der Alzheimergehirne (Braak-Stadium VI) war auf 56 % der Aktivität reduziert im Vergleich zu altersgleichen Kontrollgehirnen (Braak-Stadium I) [Mittelwert \pm SEM: $159,8 \pm 10,2$ pmol/mg/min (n =12) vs. $284,8 \pm 9,4$ pmol/mg/min (n = 6)]. Die Proteasomaktivität in Temporallappen, Occipitallappen und im Striatum war in Alzheimergehirnen ebenfalls erniedrigt verglichen mit Kontrollgehirnen

(siehe Abb. 3-1). Jedoch nur im Gyrus rectus zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteasomaktivität ($p < 0,01$) und nicht in den anderen Gehirnregionen, was durch die intraregionalen Unterschiede der individuellen Patienten bedingt war.

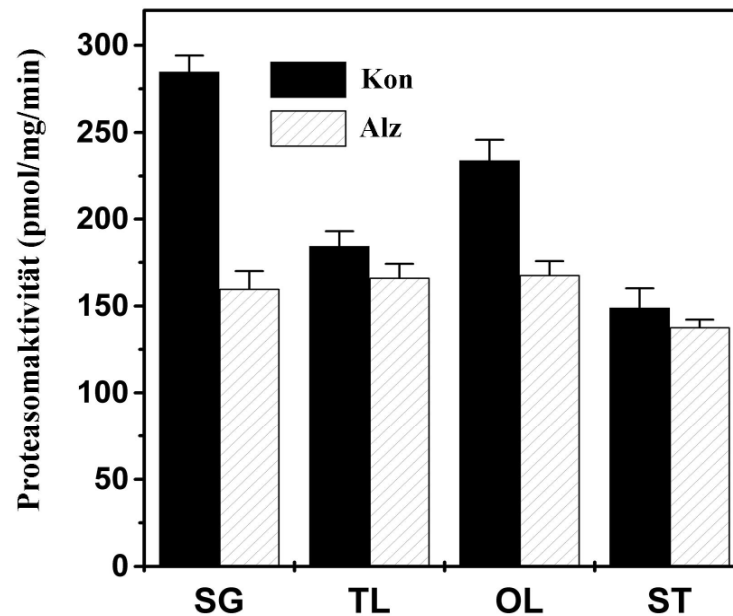


Abbildung 3.1–1 Bestimmung der Proteasomaktivität in Hirngewebe von Alzheimerpatienten Proben von Kontrollpatienten (Kon) und Patienten mit Alzheimer (Alz) aus unterschiedlichen Gehirnregionen wurden mittels suc-LLVY-MCA-Abbau auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht [Gyrus rectus (SG), Temporallappen (TL), Occipitallappen (OL) und Striatum (ST)]. Es zeigte sich eine erniedrigte Proteasomaktivität in Hirngewebe von Patienten mit Alzheimer.

Die Proteasomaktivität im Gyrus rectus der Alzheimerpatienten war deutlich auf weniger als die Hälfte der Durchschnittsaktivität aller Proben der Kontrollpatienten gleichen Alters reduziert. In allen Proben des Kontrollgewebes betrug die Proteasomaktivität mehr als ein Drittel der Durchschnittsaktivität der Alzheimerproben, während einige Proben von 6 der 12 Alzheimerpatienten eine Aktivität weit unterhalb diesen Niveaus zeigten oder sogar gegen Null ging. Diese Daten bestätigten somit die Beobachtungen von Keller *et al.* der reduzierten Proteasomaktivität in Alzheimergehirnen und heben als zusätzliche Lokalisation den Gyrus rectus hervor.

3.1.1.2 Vergleich des Proteasomgehalts in Alzheimerproben und altersgleichen Kontrollen

Eine verminderte Proteasomaktivität kann in einer verminderten Expression des Proteasoms begründet sein oder aber durch dessen eingeschränkte Funktion. Um zu überprüfen, ob *weniger Proteasom vorhanden ist*, also ob in allen Proben gleiche Konzentrationen des Proteasomproteins vorlagen, wurden die Proben mittels Immunoblot auf ihren Proteasomgehalt hin untersucht.

Der Proteasom-Komplex besteht aus zwei Einheiten mit je 14 Untereinheiten, die sich in einer SDS-PAGE typischerweise als ein Muster von mehreren Banden zwischen 20 und 30 kDa darstellen. Sie bilden einen Satz von zwei bis drei Hauptbanden, die mehrere Untereinheiten repräsentieren. Um die relative Proteinkonzentration des Proteasoms abzuschätzen, wurden diese zwei Hauptbanden miteinander verglichen. Die Western Blots zeigten keine signifikanten Unterschiede im Proteasomgehalt der Gehirnproben, auch nicht zwischen den Kontroll- und den Alzheimergehirnen. Ein typischer Immunoblot ist in Abbildung 3.1-2 dargestellt.

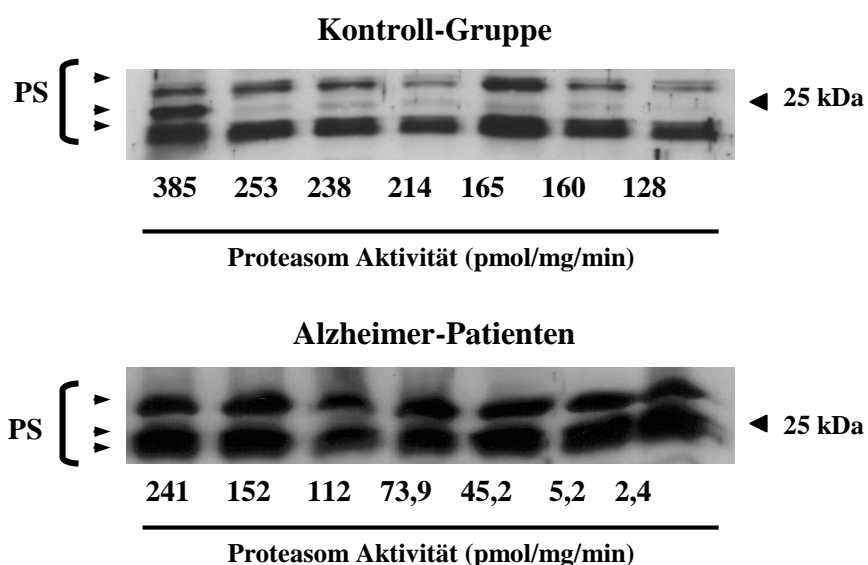


Abbildung 3.1–2: Vergleich des Proteasomgehalts in Alzheimer- und Kontrollproben unterschiedlicher Proteasomaktivität mittels Western Blot Die Proteasomproteinkonzentration wurde in allen Gehirnproben mittels Western Blot mit einem Anti-Proteasom-Antikörper optisch verglichen. Sieben repräsentative Proben von Kontrollgewebe (oben) und Alzheimergewebe (unten) sind zusammen mit der mittleren Proteasomaktivität dargestellt (Standardabweichung < 10%, n = 3 für jede einzelne Probe). Die gezeigten Proben wurden nach ihren unterschiedlichen Proteasomaktivitäten ausgewählt. Die Pfeile auf der linken Seite verweisen auf drei Signalbanden, die die Untereinheiten des Proteasoms repräsentieren. Zur Bestimmung der relativen Proteasomkonzentration wurden die zwei Hauptbanden verglichen. Die Gewebeproben von Alzheimerpatienten zeigten klare Unterschiede in der Proteasomaktivität (Zahlen als Mittelwerte dargestellt, n = 4), aber nicht in der Konzentration des Proteasomproteins.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die reduzierte Proteasomaktivität in den Alzheimergehirnen weder auf eine verminderte Proteasomexpression zurückzuführen ist, noch auf eine postmortale Zerlegung des Proteasoms im Zuge des allgemeinen autolytischen Gewebeuntergangs. Sie bestätigen ebenfalls die Experimente von Keller *et al.*, wonach in Alzheimer- und Kontrollgewebe der Proteasomgehalt unverändert gleich ist (Keller, Hanni *et al.* 2000). Somit scheint die erniedrigte Proteasomaktivität eher die Folge einer Funktionsbeeinträchtigung zu sein.

3.1.1.3 Bestimmung des Proteasom-Komplexes in *post mortem* Alzheimergewebe

In den ersten Messungen der proteasomalen Aktivität der Gehirnhomogenate wurde nur die Aktivität des 20S Proteasoms untersucht. Da es sich bei dem 20S Partikel aber auch gleichzeitig um den Kernkomplex des 26S Proteasoms handelt, wurden die Homogenate zusätzlich noch auf eine mögliche Aktivität der 26S Protease hin untersucht (siehe Abb. 3.1-3). Diese benötigt ATP zur Stimulation und daher wurde der Versuch wie in Kapitel 3.1.1.1. beschreiben unter Zusatz von ATP erneut durchgeführt.

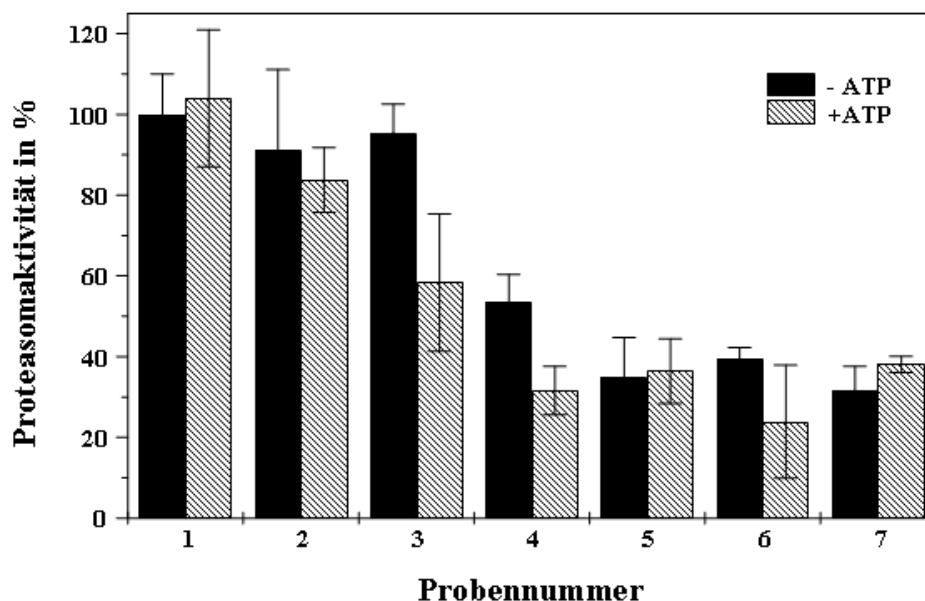


Abbildung 3.1–3: Aktivität des 20S und 26S Proteasoms in postmortem Gehirnhomogenaten. Durch Zusatz von ATP traten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität des 20S Proteasoms (- ATP, schwarz) und des 26S Proteasoms (+ ATP, gemustert) auf.

Durch Zusatz von ATP zum Proteolyseansatz ließ sich die Aktivität des 20S Proteasoms nicht signifikant steigern. Somit lag nur die Aktivität des 20S Kernkomplexes vor und eine

Einheit mit dem 19S Kappenkomplex schien nicht mehr gegeben zu sein. Dies kann auf eine postmortem Zerlegung des Proteasoms im Zuge des allgemeinen autolytischen Gewebsuntergangs zurückzuführen sein.

3.1.2 Korrelation der Proteasomaktivität mit alzheimerspezifischen Tau-Modifikationen

Als nächstes stellte sich die Frage, welcher inhibitorische Weg für die gefundene Reduktion und die teilweise Aufhebung der Proteasomaktivität in Alzheimergehirnen verantwortlich sein könnte. Es sollte untersucht werden, ob die Proteasomaktivität *durch alzheimerspezifische Tau-Modifikationen gehemmt wird*.

3.1.2.1 Korrelation der Proteasomaktivität mit dem Hyperphosphorylierungsstatus des Tau-Proteins

Zuerst wurde die Hypothese untersucht, ob unterschiedliche Proteasomaktivitäten mit der alzheimerspezifischen Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins korrelieren könnten. Dazu wurden die in den vorangegangenen Experimenten ausgewählten sieben Proben unterschiedlicher Proteasomaktivität in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit verschiedenen phosphorylierungssensitiven Tau-Antikörpern inkubiert (AT8, AT100, PHF-1). Der Tau-Antikörper Tau-5 markierte den Tau-Gehalt der Proben unabhängig der Phosphorylierung der Epitope.

In Gehirngewebe von Patienten mit Alzheimer war ein Muster von drei AT100-positiven Banden zwischen 50 und 65 kDa zu erkennen, wie auch bereits durch Matsuo *et al.* beschrieben (Matsuo, Shin *et al.* 1994). Große Mengen hochmolekularen Proteins, phosphoryliert an Ser212/Thr214, konnten ebenfalls durch den AT100-Antikörper im Gehirngewebe detektiert werden. Diese hochmolekularen Protein waren auch AT8 positiv (Phosphorylierung Ser202), zeigten jedoch ein schwächeres Signal als das für die Phosphorylierung des Tau-Proteins an dem Epitop Ser212/Thr214 mit AT100.

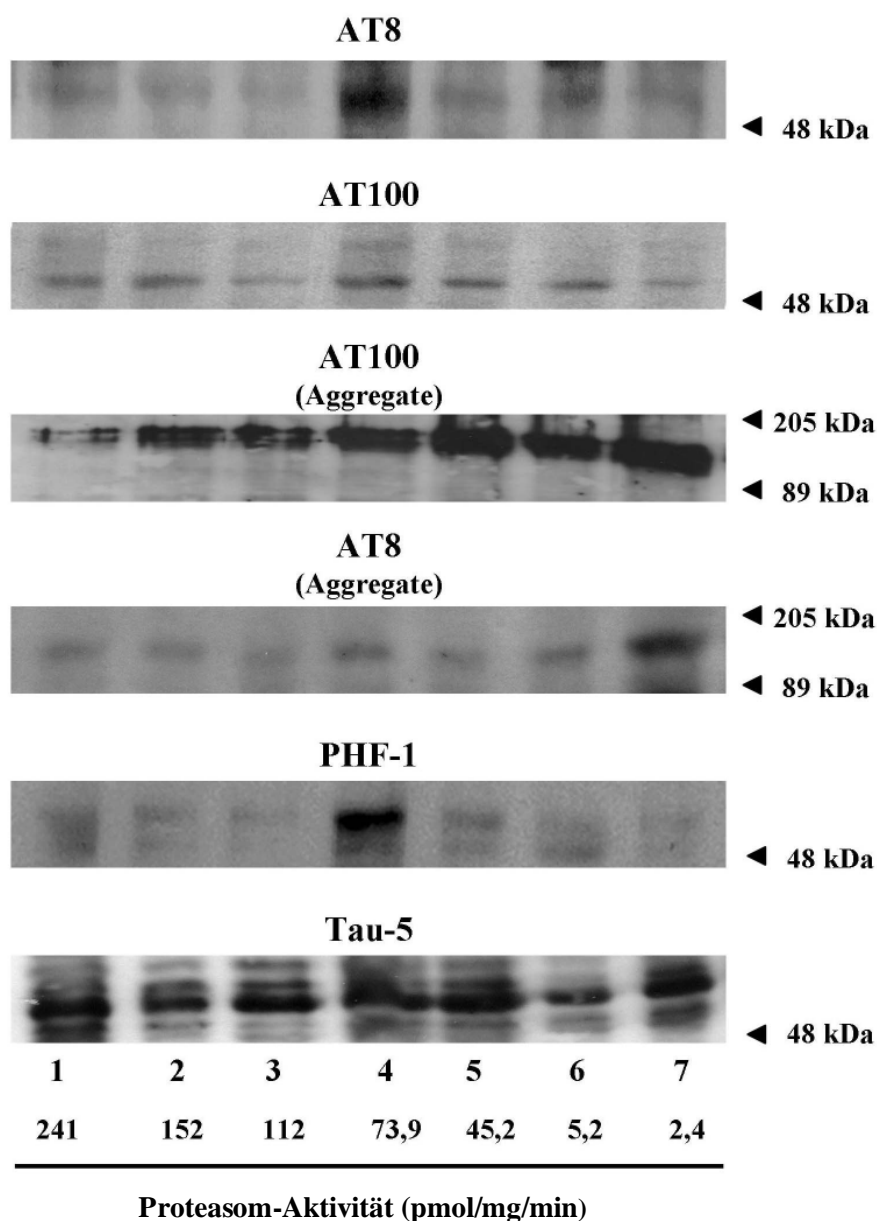


Abbildung 3.1-4: Immunoblots der Alzheimergehirnproben unterschiedlicher Proteasomaktivitäten mit phosphorylierungssensitiven Tau-Antikörpern Die verwendeten Antikörper waren gegen unterschiedliche Phosphorylierungsseiten gerichtet (AT8: Ser202; AT100: Ser212/Thr214; PHF-1: Ser396/Ser404). Die Menge des Gesamt-Tauproteins, phosphoryliert und unphosphoryliert, wurde durch den TAU-5-Antikörper nachgewiesen. Die mittlere Proteasomaktivität ist unterhalb der Blots dargestellt (SD < 10%, n = 3 für jede einzelne Gehirnprobe). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Hyperphosphorylierung der einzelnen Epitope und der erniedrigten Proteasomaktivität festgestellt werden.

Der Tau-5-Antikörper detektierte für alle Proben einen nahezu identischen Gehalt des Tau-Proteins. Es zeigte sich jedoch, dass die Stärke der Phosphorylierung um Ser202 (AT8) oder Ser396/Ser404 (PHF-1) nicht mit der erniedrigten Proteasomaktivität korrelierte. Zudem korrelierte auch nicht die Stärke des Signals für PHF-Tau, das durch den AT100-

Antikörper detektiert wird, der das phosphorylierte Epitop Ser212/Thr214 erkennt. Dieses Experiment also zeigte, dass die erniedrigte Proteasomaktivität in den Alzheimerproben nicht mit der Menge hyperphosphorylierten Tau-Proteins in Alzheimerhirngewebe korrelierte. Das alzheimertypische Merkmal der Tau-Hyperphosphorylierung ist somit nicht Ursache der verringerten Proteasomaktivität.

3.1.2.2 Korrelation der Proteasomaktivität mit Tau-Aggregaten - Untersuchungen zur Interaktion zwischen PHFs und Proteasom

Proteinaggregate werden als starke Inhibitoren der Proteasomaktivität erachtet (Giulivi, Pacifici *et al.* 1994; Grune, Reinheckel *et al.* 1997; Lasch, Petras *et al.* 2001) und als neuropathologisches Hauptmerkmal in Alzheimergehirnen. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob *alheimerspezifisches intrazellulär aggregiertes Tau-Protein in der Lage ist mit Proteasom zu interagieren und ob eine solche Interaktion hemmend wirkt*. Als Nachweis wurde die Immunopräzipitation gewählt.

Es wurden wie in den vorherigen Experimenten jene Alzheimergehirnproben gewählt, die eine maximale Spannweite unterschiedlicher Proteasomaktivität aufzeigten (dennoch von verschiedenen Patienten und Hirnregionen stammten) und zur Immunopräzipitation verwendet. Zuerst wurde das 20S Proteasom mit dem entsprechenden Antikörper aus den Gehirnlysaten immunopräzipitiert und anschließend durch Immunoblotting detektiert. Wie schon im vorherigen Versuchen beschrieben, war der Gehalt an Proteasomprotein in allen Gehirnproben vergleichbar trotz unterschiedlicher Proteasomaktivitäten.

Überraschenderweise wurde in diesem Versuch eine Ko-Präzipitation von hyperphosphoryliertem Tau (AT100) und von hochmolekularen PHF-Tau-Aggregaten beobachtet, die an das präzipitierte Proteasomprotein gebunden waren. Diese Ko-Präzipitation war verstärkt in jenen Proben, die eine erniedrigte Proteasomaktivität aufwiesen (siehe Abb. 3.1-5). Bei Verwendung eines höher auflösenden Gels konnten mehr als drei AT100-positive Hauptbanden detektiert werden, wie auch bei Matsuo *et al.* für humanes Autopsie PHF-Tau beschrieben (Matsuo, Shin *et al.* 1994).

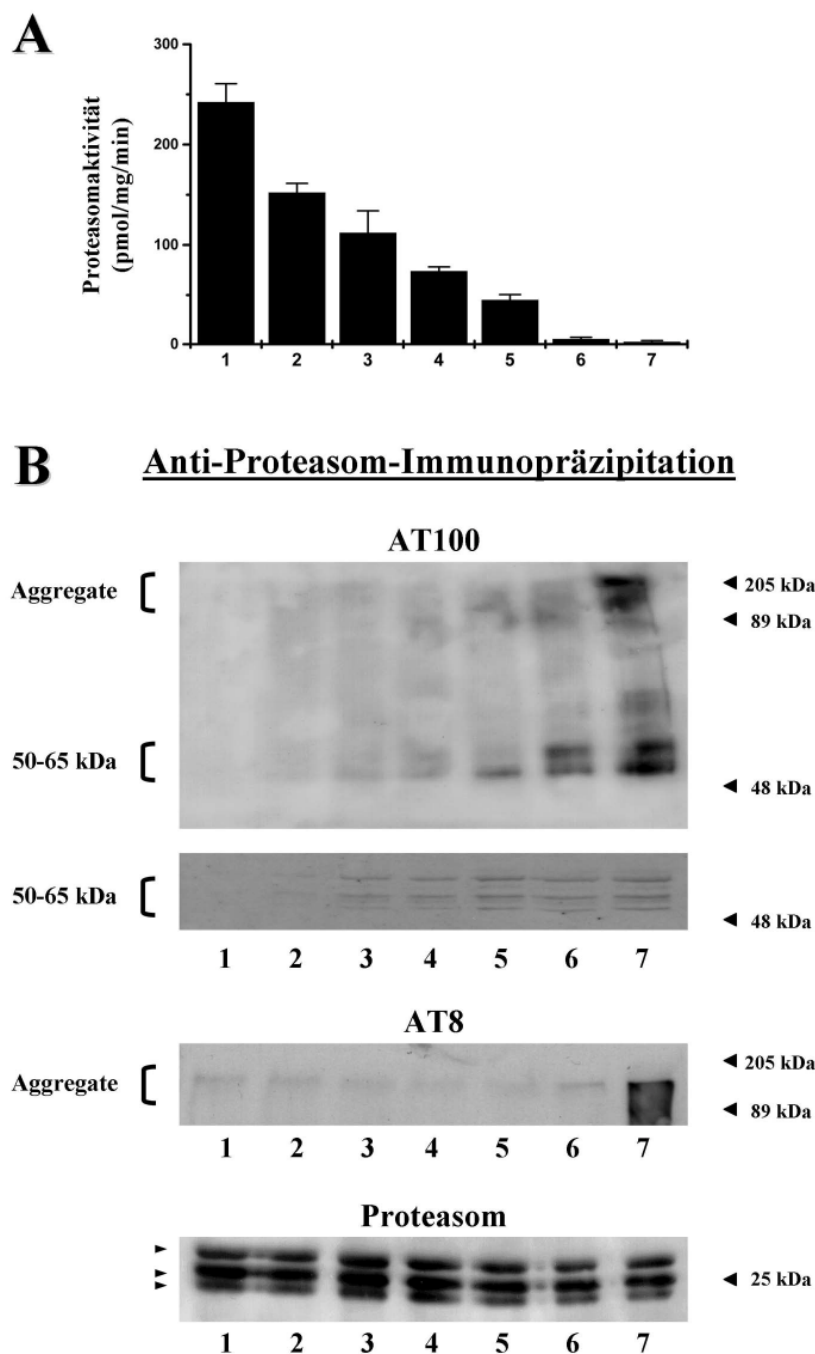


Abbildung 3.1–5: Anti-Proteasom-Immunopräzipitation aus Gehirnhomogenaten und Detektion des Präzipitâts im Western Blot Die Proteasomaktivität in den Gehirnllysaten der Proben 1-7 (Abbildung A) wurde durch den Lactacystin empfindlichen Abbau des suc-LLVY-MCA bestimmt. Die Immunoblots (Abbildung B) zeigen Immunopräzipitate des Proteasomproteins aus 100 µg Lysat der Proben 1-7, die mit den Antikörpern anti-Proteasom (20S) und anti-PHF (AT8, AT100) analysiert wurden. Der obere Blot zeigt die Ko-Präzipitation von PHF-Tau und langsam wandernden Aggregaten, die durch den AT100-Antikörper detektiert wurden. Der AT100-Blot darunter verdeutlicht das Bandenmuster PHF-Taus durch stärkere Auflösung (10%ige PAGE, längere Laufzeit). Der AT8 Blot demonstriert, dass die Aggregate für das AT8 Epitop (Hyperphosphorylierung Ser202) ebenfalls positiv waren. Der unterste Blot bestätigt erneut, dass die Menge des präzipitierten Proteasoms jeder Probe gleich war und keinen Bezug zur Proteasomaktivität hatte. Das Muster der 20S Proteasomuntereinheiten ist durch die seitlichen Pfeile angedeutet.

Die ko-präzipitierten PHF-Tau-Aggregate waren ebenfalls positiv für phosphoryliertes Ser202 (AT8). Der Anstieg der Ko-Präzipitation verlief parallel zu der Abnahme der Proteasomaktivität. Dies ließ eine direkte hemmende Interaktion des PHF-Taus mit Proteasom in Alzheimerhirnen vermuten. Interessanterweise war die Proteasomaktivität signifikant erniedrigt in jenen Proben, in denen auch erste Signale für ko-präzipitiertes PHF-Tau zu erkennen waren (ab Probe 3). In den Proben mit sehr geringer Proteasomaktivität waren große Mengen kovalenten, hochmolekularen PHF-Taus zu detektieren, was darauf hindeutete, dass diese Aggregate die Aktivität des Proteasoms am stärksten beeinträchtigten.

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion zwischen PHF-Tau und dem Proteasom wurde die Beweisführung umgekehrt und eine Immunopräzipitation gegen PHF-Tau mit anschließendem Immunoblotting durchgeführt. Es bestätigte sich, dass in den Proben mit sinkender Proteasomaktivität erhöhte Mengen PHF-Tau immunopräzipitiert werden konnten.

Wie in der nachfolgenden Abbildung 3.1-6 dargestellt, wurden bei Immunopräzipitation mit dem PHF-Tau-Antikörper AT100 auch 20S Proteasomuntereinheiten in ansteigender Menge ko-präzipitiert, während die Proteasomaktivität in den Proben dabei gleichzeitig abnahm. Beim Vergleich des Bandenmusters der Proteasomuntereinheiten, die mit dem Anti-Proteasom-Antikörper direkt präzipitiert wurden (Abbildung B) und dem Bandenmuster, das durch die Ko-Präzipitation mit dem Anti-PHF-Antikörper AT100 entstand (Abbildung C), fiel auf, dass die 20S Proteasomuntereinheiten nicht gleichmäßig an das PHF-Tau binden. So zum Beispiel wurde die mittlere Proteasombande mit Molekulargewicht um 25 kDa weniger stark durch den AT100-Antikörper ko-präzipitiert als direkt durch den Proteasomantikörper.

Darüber hinaus konnte aber nicht nur eine Ko-Präzipitation des 20S Proteasoms nachgewiesen werden. In einer erneuten Detektion des Immunoblots mit dem MSS1-Antikörper, der den 19S Kappenkomplex des 26S Proteasoms erkennt, zeigte sich, dass in den PHF-Immunopräzipitaten mit AT100 auch MSS1-positives Protein ko-präzipitiert wurde. Ansteigende Mengen des 19S Komplexes wurden mit PHF-Tau ko-präzipitiert, während parallel eine Abnahme der Proteasomaktivität vorlag. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sowohl das 20S als auch das 26S Proteasom durch Bindung von PHF-Tau gehemmt werden könnten.

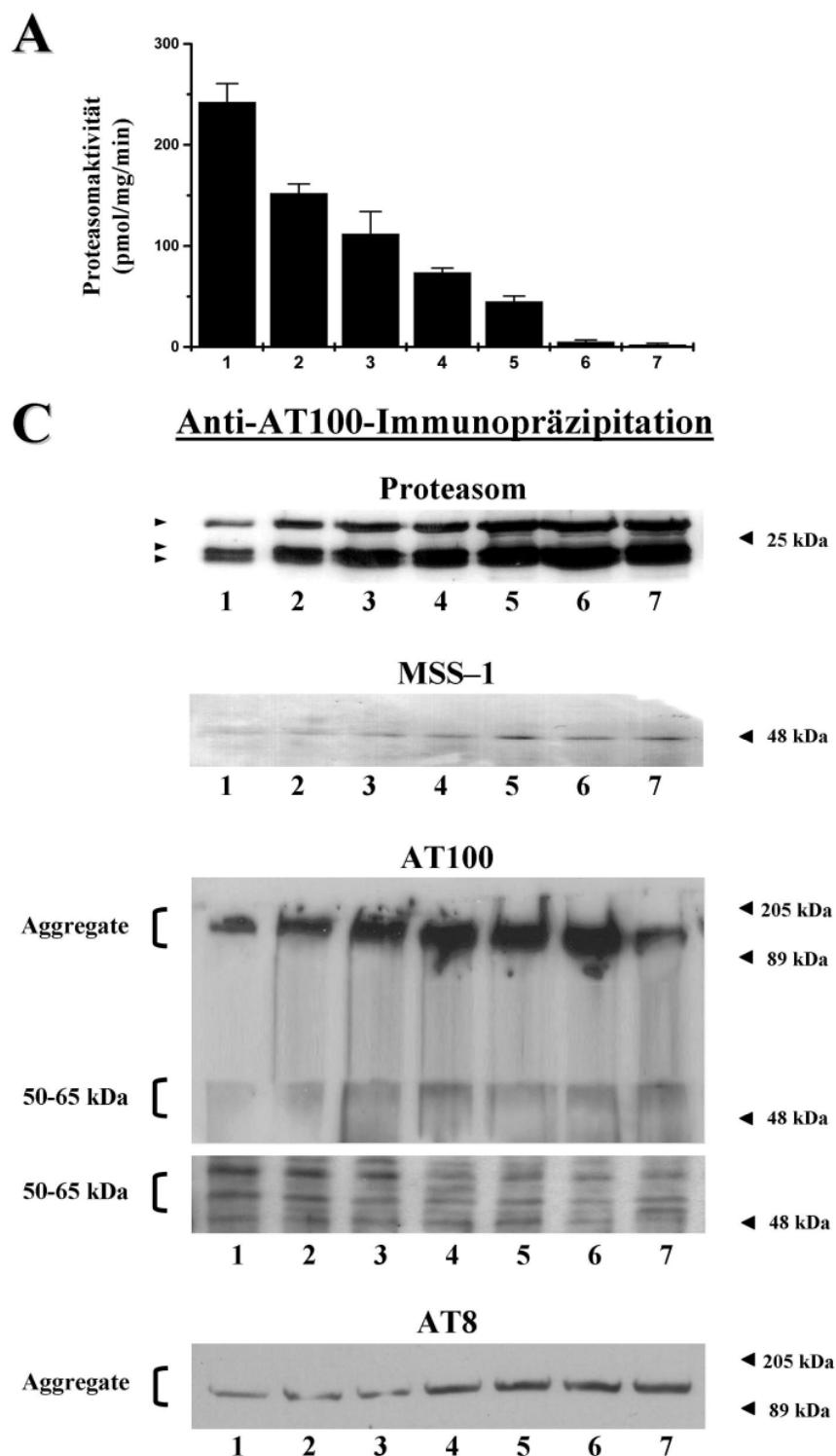


Abbildung 3.1–6: Anti-Tau-Immunopräzipitation aus Gehirnhomogenaten und Detektion des Präzipitats im Western Blot Es wurden die selben Gehirnllysate wie zuvor verwendet und nach abfallender Proteasomaktivität angeordnet (Abbildung A). Die Immunoblots zeigen Immunpräzipitate des PHF-Taus aus 100 µg Lysat der Proben 1-7, die mit den Antikörpern anti-Proteasom (20S und MSS1) und anti-PHF (AT8, AT100) analysiert wurden. Die Proteasom-Blots zeigen die ansteigende Menge an ko-präzipitierten 20S und 19S Proteasom. Das Muster der 20S Proteasomuntereinheiten ist durch die seitlichen Pfeile angedeutet. Der AT100 Blot zeigt die Präzipitation von PHF-Tau und langsam wandernden Aggregaten. Der Blot darunter verdeutlicht das Bandenmuster PHF-Taus durch stärkere Auflösung (12 %ige PAGE, längere Laufzeit). Der AT8 Blot demonstriert, dass die Aggregate für das AT8 Epitop (Hyperphosphorylierung Ser202) ebenfalls positiv waren.

Trotz der nachgewiesenen 19S Kappenkomplexe des Proteasoms mit dem MSS-1-Antikörper konnte keine ATP-abhängige 26S Proteasomaktivität in den Gehirnhomogenaten detektiert werden. Das 26S Proteasom zerfällt leicht in den 19S Kappenkomplex und das 20S Proteasom (Reinheckel, Sitte *et al.* 1998), auch unter Bedingungen des zellulären Stress wie zum Beispiel Oxidation oder Energiedepletion. Daher ist es nicht überraschend, dass in energieverarmtem, totem und autolytischem Gehirngewebe ein postmortaler Zerfall des 26S Proteasoms stattfindet.

In allen Proben konnten hochmolekulare PHF-Tau-Aggregate präzipitiert werden, die Menge der ko-präzipitierten Proteasomuntereinheiten variierten jedoch beträchtlich. Dieses läßt vermuten, dass intraneuronal akkumuliertes PHF-Tau nicht automatisch an Proteasom bindet. Des weiteren können Faktoren wie unterschiedliche Kompartimentierung von PHF-Tau und Proteasom den Grad der Interaktion beeinflussen. Diese Ergebnisse zeigten jedoch erstmalig, dass PHF-Tau mit Proteasom assoziiert sein kann und mit eingeschränkter Proteasomaktivität korreliert.

3.1.2.3 Korrelation der Proteasomaktivität mit der PHF-Konzentration

In den vorangegangenen Experimenten hatte sich gezeigt, dass in Gehirngewebe von Alzheimerpatienten die Zunahme der PHF-Tau-Aggregate mit dem Verlust der Proteasomaktivität korrelierte. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen den Aggregaten und dem Aktivitätsverlust bestand.

Dazu wurden PHF-Tau und normales Tau-Protein aus Alzheimergehirngewebe und aus Kontrollproben mittels Ultrazentrifugation in mehreren Schritten isoliert und die Proteinkonzentration mit der BCA-Methode bestimmt. *In vitro* wurde dann isoliertes PHF-Tau in ansteigender Konzentration mit gleichen Mengen isolierten 20S Proteasoms inkubiert und die Aktivität des Proteasoms gemessen. Entgegen den Erwartungen, dass eine Zunahme der PHF-Tau Konzentration die Aktivität des 20S Proteasoms hemmen würde, war ein Anstieg der Aktivität um über 100 % gegenüber der Kontrolle zu beobachten ($6,16 \pm 0,54$ nmol/mg/min, MW \pm SEM) wie in Abbildung 3.1-7 dargestellt. Dieses Resultat widersprach den vorherigen Ergebnissen, in denen eine Zunahme der PHF-Tau-Konzentration mit der Abnahme der Proteasomaktivität korrelierte. Allerdings hatten die vorherigen Immunopräzipitationsexperimente auch eine Ko-Präzipitation des 20S Proteasoms mit PHF-Tau erwiesen.

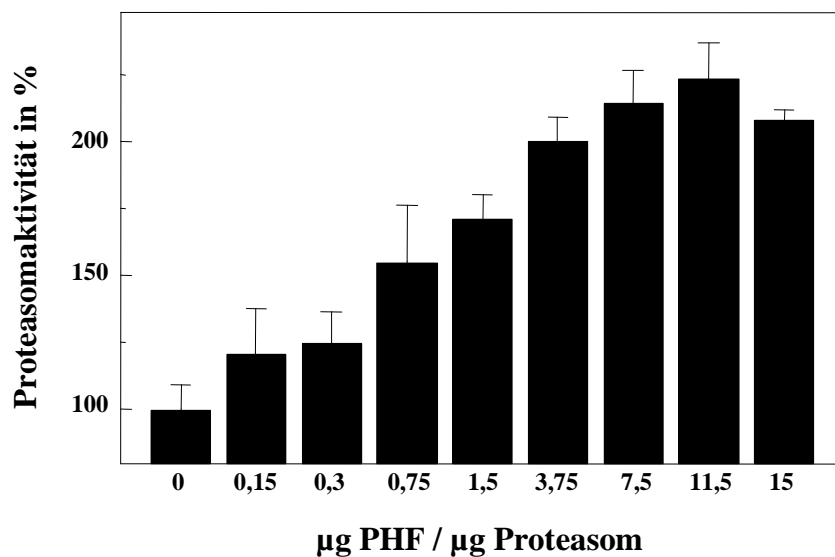


Abbildung 3.1-7: *In-vitro*-Inkubation von isoliertem PHF-Tau und konstanter Menge isolierten 20S Proteasoms Ansteigende Konzentrationen PHF-taus wurden mit einer konstanten Konzentration an isoliertem 20S Proteasom *in vitro* inkubiert. Die Proteasomaktivität wurde als der Abbau des fluorogenen Peptids suc-LLVY-MCA bestimmt und in Prozent zur Kontrolle angegeben.

Um eine mögliche Aktivität endogenen, ko-isolierten Proteasoms auszuschließen, wurde das Experiment wiederholt und die PHF-Tau-Isolate zuvor mit dem irreversiblen Proteasominhibitor Lactacystin vorinkubiert (siehe Abb. 3.1-8).

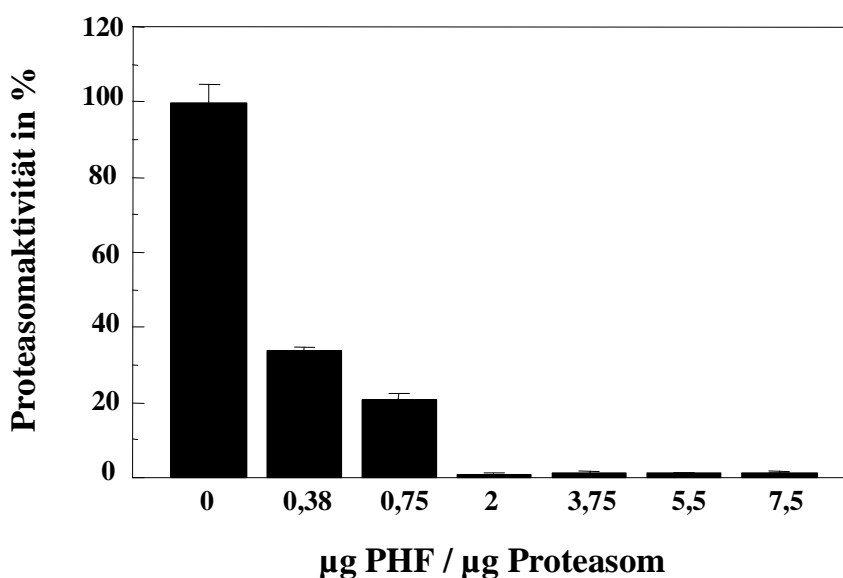


Abbildung 3.1-8: *In-vitro*-Inkubation von isoliertem, Lactacystin-behandeltem PHF-Tau und 20S Proteasoms Ansteigende Konzentrationen PHF-Taus wurden mit einer konstanten Konzentration an isoliertem 20S Proteasom *in vitro* inkubiert. Die Proteasomaktivität wurde als der Abbau des fluorogenen Peptids suc-LLVY-MCA bestimmt und in Prozent zur Kontrolle angegeben. Der PHF-Tau enthaltende Puffer selber zeigte keine messbare Hemmung isolierten Proteasoms.

Zur Entfernung überschüssigen Lactacystins wurden die Isolate gegen Puffer dialysiert und anschließend mit exogenem, isolierten 20S Proteasom *in vitro* inkubiert. Es trat eine starke Hemmung des 20S Proteasoms bereits bei 0,38 µg PHF-tau / µg Proteasom ein.

Dieser Versuch zeigte, dass PHF-Tau von Alzheimerpatienten in der Lage ist 20S Proteasom *in vitro* zu hemmen und dass bei der Isolation des PHF-Taus auch endogenes Proteasom ko-isoliert wurde, was auf eine starke Interaktion zwischen den Proteasomuntereinheiten und dem PHF-Tau deutet.

Wenn man das erhaltene PHF-Tau-Isolat (im weiteren Verlauf „PHF-A“ genannt) durch Gradientenultrazentrifugation stärker aufreinigte, dissoziierte das PHF-gebundene Proteasom ab und konnte nicht länger in der hoch aufgereinigten PHF-Fraktion (PHF-B) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1-9).

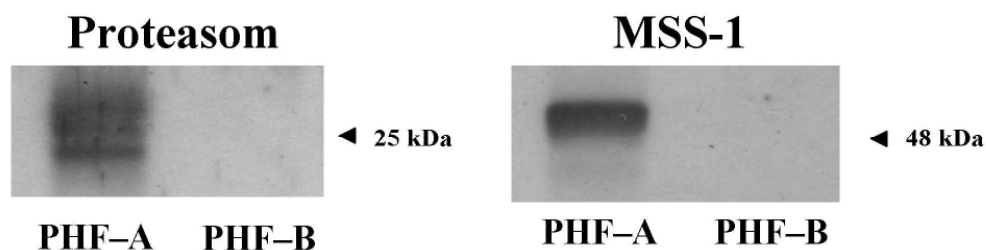


Abbildung 3.1-9: Immunoblots der Proteasomuntereinheiten in den isolierten PHF-Tau Fraktionen
Während in der PHF-A-Fraktion Proteasomuntereinheiten ko-isoliert wurden, konnte nach weiterer Aufreinigung mittels Gradientenultrazentrifugation kein ko-isoliertes Protein mehr detektiert werden.

Eine Inkubation der PHF-B-Fraktion mit isoliertem Proteasom und anschließender Aktivitätsmessung ergab eine proteolytische Aktivität von $0,02 \pm 0,01$ nmol/mg/min (MW \pm STAW). Immunoblottingexperimente ergaben eine Ko-isolation von circa 30 ng/µg Proteasomprotein zusammen mit dem grob isolierten PHF-Tau (PHF-A), während in dem PHF-B-Isolat nach der Gradientenultrazentrifugation keine Proteasomuntereinheiten mehr detektiert werden konnten. Diese Experimente bestätigten somit die Ko-isolierung von 20S Proteasomuntereinheiten während der Isolierung von PHF-Tau aus dem Gehirngewebe von Alzheimerpatienten.

3.1.3 Inkubation isolierten Proteasoms mit PHF-Tau *in vitro*

Zum Abschluss der Untersuchungen sollte noch einmal bestätigt werden, dass die Hemmung des Proteasoms durch aggregierte Tau-Proteine, wie sie bei der Alzheimer-Erkrankung anzutreffen sind, verursacht werden kann.

3.1.3.1 Inkubation mit isolierten PHF-Tau aus Alzheimergehirnen

Um herauszufinden, ob die verringerte Proteasomaktivität in Alzheimergehirnen nur auf die PHFs zurückzuführen ist, wurden die *In-vitro*-Experimente zur Inhibition isolierten humanen Proteasoms auch mit Isolaten von unaggregiertem Tau-Protein aus Alzheimer- und Kontrollproben durchgeführt und verglichen (siehe Abb. 3.1-10).

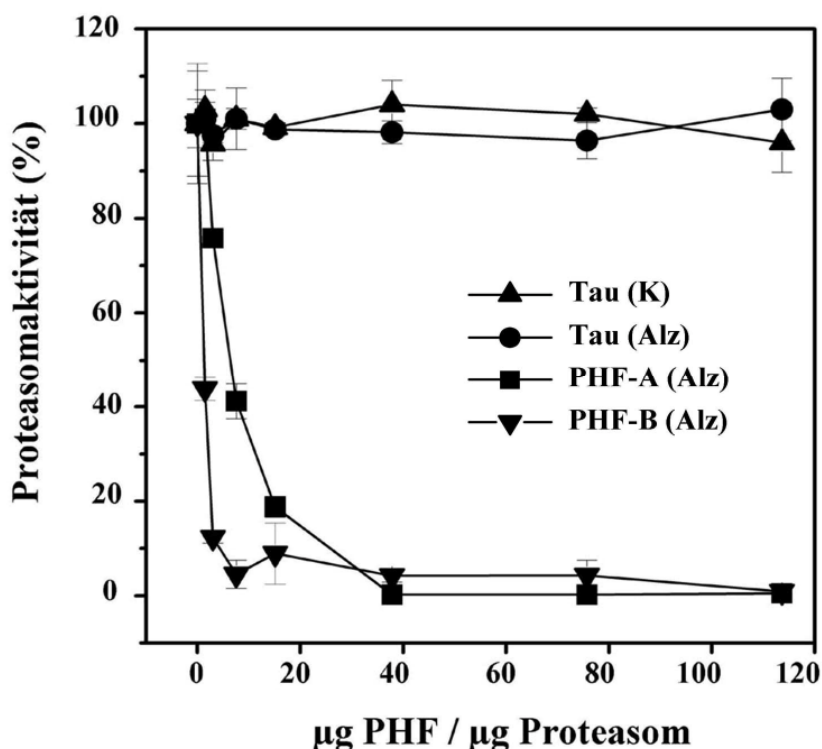


Abbildung 3.1-10 Inhibition der Aktivität isolierten Proteasoms durch isoliertes PHF-Tau aus Alzheimer Gehirngewebe PHF-Tau (PHF-A + PHF-B) und Tau Protein wurde aus den Gehirngeweben von Alzheimerpatienten (Alz) und Kontroll-Tau (K) aus Gewebe von altersgleichen Kontrollpatienten isoliert. Ko-isoliertes endogenes Proteasom in der PHF-A-Fraktion wurde in seiner Aktivität durch Inkubation des Isolats mit 10 µM Lactacystin irreversibel inhibiert und anschließend durch Dialyse entfernt. PHF-B-Isolat wurde ohne Inkubation mit dem Inhibitor verwendet. Die Isolate der Gehirngewebe wurden anschließend mit einer isolierten Proteasompräparation *in vitro* inkubiert.

Es zeigte sich, dass humanes, nicht aggregiertes Tau aus Kontrollgewebe und aus Alzheimergewebe auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage war, humanes isoliertes Proteasom *in vitro* in seiner Aktivität zu beeinträchtigen. Isoliertes PHF-Tau

jedoch inhibierte das Proteasom mit zunehmender Konzentration (PHF-A). Die inhibitorische Konzentration (IC) betrug circa 4,5 $\mu\text{g/ml}$. Ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ PHF-A trat eine komplette Hemmung des Proteasoms ein. Hoch aufgereinigtes PHF-Tau (PHF-B) war ebenfalls in der Lage, isoliertes humanes Proteasom zu hemmen.

3.1.3.2 Inkubation mit *in vitro* assemblierten PHF-Tau aus rekombinantem humanem Tau-Protein

Aus Alzheimergewebe isoliertes PHF-Tau vermag isoliertes Proteasom *in vitro* zu hemmen. Da allerdings auch endogenes Proteasom ko-isoliert wurde, war es denkbar, dass die beobachtete Inhibition des Proteasoms durch andere unbekannte, ebenfalls ko-isolierte Inhibitoren verursacht wurde. Um zu zeigen, dass die Inhibition auf dem PHF-Tau beruht, wurde humanes rekombinantes Tau-Protein künstlich zu PHF-Tau assembliert (Friedhoff, Schneider *et al.* 1998) und die Polymerisation mit dem Thioflavin-S-Assay überprüft. Verschiedene Konzentrationen des künstlichen und des isolierten Taus sowie des Monomers als Kontrolle wurden erneut mit isoliertem Proteasom *in vitro* inkubiert.

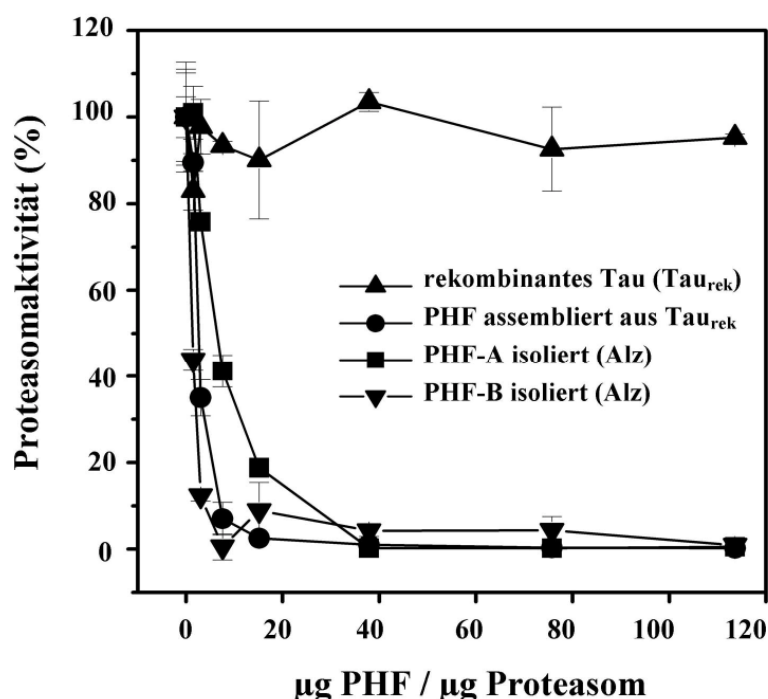


Abbildung 3.1-11 Inhibition der Aktivität isolierten Proteasoms durch *in vitro* assembliertes PHF-Tau aus rekombinantem humanem Tau-Protein Rekombinantes humanes Tau Protein wurde *in vitro* künstlich zu PHFs assembliert und wie im vorherigen Experiment mit isoliertem Proteasom inkubiert. Die Inkubation nicht-assemblierten, rekombinanten humanen Taus (Tau_{rek}) ist als Kontrolle dargestellt.

Künstlich hergestellte PHFs hemmten die Aktivität des Proteasom stärker als isoliertes PHF-Tau aus Alzheimerhirngewebe (PHF-A und PHF-B (Alz)). Die inhibitorische Konzentration lag bei circa 1,5 µg/ml und eine totale Hemmung trat bereits bei 10 µg/ml ein (siehe Abb. 3.1-11). Im Vergleich zum isolierten Tau war die Konzentration, die bereits zu einer Hemmung führte, um den Faktor 2,5 - 3 kleiner. Rekombinantes, nicht-assembliertes Tau-Protein führte zu keiner Beeinträchtigung der Aktivität des Proteasoms.

Ein Vergleich der Hemmungskurven der isolierten und der künstlichen PHFs lässt vermuten, dass in der grob isolierten PHF-Fraktion (PHF-A) möglicherweise ein unbekannter Proteasomaktivator ko-isoliert wurde oder andere post-translationale Modifikationen vorliegen, die in *in vitro* aggregierten PHFs nicht vorzufinden sind.

3.1.4 Zusammenfassung I

Mit den hier dargestellten Experimenten zur Interaktionen zwischen dem Proteasom und spezifischen Modifikationen des Tau-Proteins in *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimerpatienten konnte gezeigt werden, dass

- die Abnahme der 20S Proteasomaktivität mit der Zunahme an PHF-Aggregaten korreliert
- eine Interaktion zwischen PHF-Tau und Proteasom besteht
- und dass isoliertes PHF-Tau isoliertes Proteasom *in vitro* hemmen kann.

3.2 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Tau-Turnovers in neuronalen HT22-Zellen

Die Ergebnisse der Untersuchungen an humanem Gewebe in Kapitel 3.1 und die Ergebnisse von Keller *et al.* zeigten eine deutliche Funktionsbeeinträchtigung des Proteasoms bei der Alzheimer Erkrankung (Keller, Hanni *et al.* 2000). Unklar ist jedoch, ob diese Funktionsuntüchtigkeit die Folge oder die Ursache der Ansammlung der Tau-Aggregate ist. Ob es sich dabei also um eine „abnorme“ Konformation oder ein Unvermögen der proteasomalen Proteolyse-Kaskade handelt, ist ungewiss. Es wird auch diskutiert, dass es sich um eine physiologische Antwort auf ein Übermaß an fehlgefalteten Proteinen handelt, die dann absichtlich unschädlich „zwischenlagert“ werden (Kopito 2000) bzw. dass es sich um protektive Maßnahmen handeln könnte, um dadurch Toxizität durch Monomere zu unterbinden (Sisodia 1998; Bucciantini, Giannoni *et al.* 2002). Es ist also unklar, ob das Proteasom überhaupt in die Tau-Pathologie involviert ist oder ob es sich eher um parallele Prozesse handelt, die unabhängig voneinander auftreten und nur zugleich beobachtet werden.

Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob PHFs bzw. das Tau-Protein generell ein Substrat für das Proteasom darstellt. David und Kollegen zeigten bereits 2002, dass Tau in stabil transfizierten SH-SY5Y Zellen wie jedes andere ungefaltete Protein durch das 20S Proteasom in einer Ubiquitin-unabhängigen Weise abgebaut werden konnte und dass eine induzierte Konformationsänderung von Tau durch Behandlung mit SDS einen proteasomalen Abbau unterband (David, Layfield *et al.* 2002). *In vitro* wurde beobachtet, dass der Tau-Abbau durch das 20S Proteasom bidirektional statt fand, also sowohl vom N- zum C-Terminus als auch vom C- zum N-Terminus und dabei ein Muster an Intermediaten auftrat. Ein andere Veröffentlichung bestätigte den nicht-prozessiven Abbau und die Anhäufung von 28 -50 kDa großen Intermediaten (Cardozo and Michaud 2002). Beide Untersuchungen wurden jedoch nur semi-quantitativ durchgeführt und es wurden keine posttranslationalen Modifikationen einbezogen.

Wenig ist also bekannt über die physiologische Regulation des Tau-Proteins. Welche Protease ist verantwortlich für den Tau-Turnover oder ist Tau ein Substrat für mehrere Proteasen? Erfolgt der Abbau des Taus in Abhängigkeit des Modifizierungsgrades und

sind eventuell unterschiedliche Proteasen für unterschiedliche posttranslationale Tau-Modifikationen „zuständig“ ? Und wie lang ist eigentlich die Lebensdauer eines durchschnittlichen Tau-Proteins? Die zunehmende Zahl unstrukturierter oder nahezu ungefalteter Proteine, die Ubiquitin-unabhängig von Proteasomen abgebaut werden, ließen die Frage aufkommen, ob das Tau-Protein auf ähnliche Art und Weise prozessiert werden könnte. Es sollte daher untersucht werden, ob ***das Tau-Protein generell auch ein Substrat des Proteasom darstellt und ob bestimmte Modifikationen wie Oxidation oder Hyperphosphorylierung bevorzugt erkannt werden.***

Um diesen Fragen nachzugehen, musste zuerst eine Methode entwickelt werden, um die Lebensdauer, also Abbau und Turnover, der Tau-Proteine in Neuronen beobachten und messen zu können. In der Veröffentlichung von David *et al.* (David, Layfield *et al.* 2002) wurde die Messung semi-quantitativ mittels Western-Blot und Densitometrie durchgeführt. Für diese Arbeit sollte der Turnover des Tau-Proteins quantitativ bestimmt werden. Dazu ist es üblich das zu beobachtende Protein bei der Proteinsynthese zu markieren, um es anschliessend quantifizieren zu können. Zur Markierung können verschieden Ansätze gewählt werden, wie z. Bsp. Fluoreszenzmarkierung mit Farbstoffen oder die radioaktive Markierung mit Radioisotopen. In der vorliegenden Arbeit wurde die radioaktive Markierung mit Radioisotopen gewählt, um das Ziel-Protein zu quantifizieren. Als Modell für die Untersuchung der physiologischen Halbwertszeit des Tau-Proteins wurde die neuronale, hippocampale Mauszelllinie HT22 gewählt, wie unter 2.4.4 beschrieben.

Zur Quantifizierung des Tau-Proteins sollte das Schwefel-Radioisotop ^{35}S gekoppelt an Methionin/Cystein in die Zellen aufgenommen und zu bestimmten Zeitpunkten das verbliebene initial markierte Protein bestimmt werden. Dazu sollte es immunpräzipitiert werden, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend densitometrisch mittels Autoradiographie und Phosphoimager quantifiziert werden. Zu allererst wurde die optimale Markierungszeit der Zellen bestimmt, um eine größtmögliche Aufnahme der Radioaktivität bei geringstmöglichem Vitalitätsverlust zu erhalten (siehe Abb. 3.2-1).

Dieser Versuch ergab eine optimale Markierungszeit von 72 Stunden. Eine Vitalitätsbestimmung mittels Neutralrot bestätigte das. In der Immunpräzipitation (IP) waren radioaktive Signale bei 50 kDa, ca. 68 kDa und 75 kDa zu sehen, während in den Kontrollproben (K) in diesen Bereichen keine radioaktiven Proteine aufgetrennt worden waren.

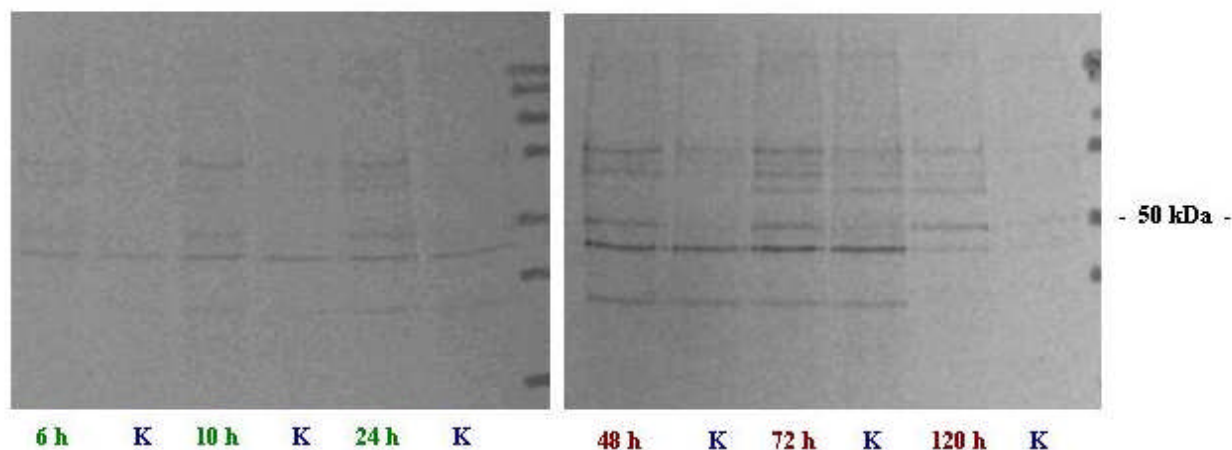


Abbildung 3.2–1 Autoradiogramm einer Tau-5 IP von HT22-Zellen radioaktiv mit S_{35} markiert

In weiteren Immunopräzipitationen konnte das Ergebnis jedoch nicht wiederholt werden, im Vergleich zur Kontrolle traten in den Tau-Präzipitaten keine zusätzlichen Banden mehr auf und die Unterschiede zwischen Probe und Kontrolle waren nicht mehr sichtbar. Ebenso bei szintigraphischer Messung ergaben die Kontrollproben ohne Primärantikörper höhere Radioaktivitäten als das Tau-Präzipitat.

Eine Analyse der Aminosäuresequenz des murinen Tau-Proteins der Länge 372 (AAH14748; Strausberg, Feingold *et al.* 2002), wie in Abbildung 3.2-2 dargestellt, zeigt, dass die Aminosäure Cystein zu 0,54 % und die Aminosäure Methionin zu 1,35 % in dem Protein vorkommen.

```

1  madprqefdt medhagdyt l qdqegdm dh glkaeeagig dtpnqedqaa ghvtqarvas
61  kdrtgndekk akgadgktga kiatprgaas paqkgtsnat ripakttpsp ktppgsgepp
121 ksgersgyss pgsptpgsr srtps lptpp trepkkvavv rtpkpspsas ksr lqtapvp
181 mpd lknvgsk igsten lkhq pgggkvqiin kkl d lsnvqs ksgskdnikh vpgggsvqiv
241 ykpvdl skvt sksgs lgnih hkpgggqvev ksek ldfkdr vqskigs ldn ithvpgggnk
301 kiethk l tfr enakaktdhg aeivykspvv sgdt sprh l s nvsstgsid m vdspq lat l a
361 devsas lakq gl

```

Abbildung 3.2–2 Aminosäuresequenz des Tau-Proteins mit 372 Aminosäuren Länge

Cystein-Reste = 2; Methionin-Reste = 5; Lysin-Reste = 19

Ein anderes häufig verwendetes Radioisotop ist Tritium [^3H]. Im Handel ist es erhältlich als an die Aminosäure Lysin gekoppeltes Nuklid und Lysin ist zu 5,1 % Bestandteil des murinen Tau-Proteins. Da es 3,8 bzw. 9,4 mal häufiger im Tau-Protein eingebaut ist als die

Aminosäuren Methionin und Cystein, wurde eine radioaktive Markierung mit ^3H -Lysin vorgenommen, um zu testen, ob sich mittels dieses Nuklids das Tau-Protein quantitativ ermitteln und im Verlauf beobachten lassen konnte. Allerdings handelt es sich bei Tritium im Vergleich zu [^{35}S] um einen β -Strahler mit geringerer Reichweite. Somit war eine Autoradiographie mit [^3H] nicht möglich. Um die Proteinbanden nach der Gelelektrophorese dennoch quantitativ erfassen zu können, wurden die Banden statt im Phosphoimager diesmal mit Coomassieblue sichtbar gemacht.

Zur Markierung des Tau-Proteins wurde den Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden die radioaktiv markierte Aminosäure ^3H -Lysin ins Medium dazu gegeben. Anschließend wurde das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde das Tau-Protein mit dem Tau-spezifischem Antikörper Tau-5 aus dem Lysat immunpräzipitiert. Da es sich bei dem Tau-5-Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt, sollte das resultierende Präzipitat nur Tau-Protein enthalten. Um jedoch mögliche Kreuzreaktionen und Kontaminationen auszuschließen, wurde das Sepharose-Pellet zuvor auf eine SDS-PAGE aufgetragen, die präzipitierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt. Anschließend wurden die Bahnen mit einem Skalpell zerteilt, und die gefärbten von den ungefärbten Bereichen abgetrennt. Abbildung 3.2-3 stellt dar, wie die Gele unterteilt wurden und wo die Banden ausgeschnitten wurden.

Das erhaltene Bandenmuster zeigte ausschließlich Proteine in den Proben der Immunpräzipitate (IP), während in den Kontrollproben (K) keine Banden zu sehen waren. Somit wurden nur Proteine gefällt, die mit dem Tau-5-Antikörper reagierten, während der Sekundäntikörper und die Sepharose keine unspezifische Reaktion mit Proteinen eingingen. Die Intensität der Banden nahm mit der Menge des verwendeten Primäntikörpers zu. Probe 4 mit 8 μg Tau-5-Antikörper zeigte jedoch keine stärkere Intensität der Coomassie-Färbung im Vergleich zu Probe 3 mit 4 μg Tau-5-Antikörper. Daher wurde davon ausgegangen, dass mit einer Konzentration von 4 μg Tau-5-Antikörper pro 100 μg Gesamtprotein das Tauprotein des Lysats quantitativ und vollständig gefällt werden konnte.

Allerdings zeigte sich bei der Auftrennung der Immunpräzipitate nicht nur eine einzelne Bande für das Tau-Protein auf der Höhe von 50 kDa, sondern drei weitere Banden bei 25 kDa, 75 kDa, 150 kDa und eine Doppelbande bei 50 kDa (siehe Abb. 3.2-3).

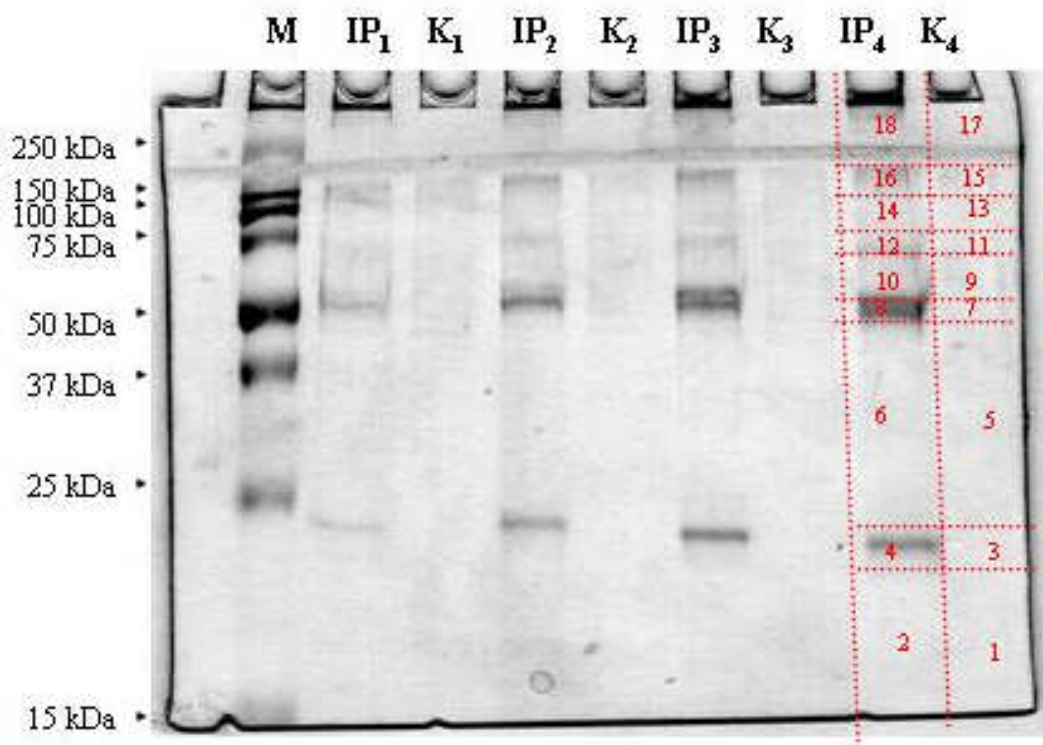


Abbildung 3.2–3 Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Immunopräzipitate Zelllysate von radioaktiv markierten HT22-Zellen wurden mit (IP) oder ohne (K) Tau-5-Antikörper als monoklonalem Maus anti-Tau Primär-Antikörper inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit einem anti-Maus-Sekundärantikörper gekoppelt und mit Protein-A-Sepharose aus dem Lysat gefällt. Um die optimale Konzentration zu bestimmen, mit der sich das Tau-Protein quantitativ präzipitieren lässt, wurden verschiedene Konzentrationen an Tau-5 eingesetzt (1 = 1 μ g, 2 = 2 μ g, 3 = 4 μ g, 4 = 8 μ g).

Bei den Proteinfractionen bestand die Möglichkeit, dass es sich um andere Proteine als Tau handelte oder Fragmente des Tau-Proteins. Um das zu untersuchen, wurde die Radioaktivität der einzelnen Banden gemessen. Dazu wurde das Gel in 70 verschiedene Bereiche unterteilt, nach Proben getrennt und innerhalb der Proben nach Bande und ungefärbter Bereich getrennt, und mit einem Skalpell zertrennt. Die einzelnen Gelstücke wurden dann in einem Szintillationscounter auf ihre Radioaktivität hin untersucht.

Die Messung ergab eine hohe Radioaktivität von 37.896 cpm für die Gelstücke, die die Doppelbande bei ca. 50 kDa der IP-Proben enthielten. Die entsprechende Messung der Kontrollen im selben Molekulargewichtsbereich ergab keine oder nur eine sehr schwache Radioaktivität von 17 cpm (siehe Abb. 3.2-4). Alle anderen Bereich des Gels wiesen keine Radioaktivität auf. Somit schien es sich bei dem präzipitierte Protein um das Tau-Protein zu handeln. Die Doppelbande auf Höhe des Tau-Proteins und die Bande bei ca. 25 kDa waren vermutlich die leichte und schwere Kette des Antikörpers, die durch das enthaltene SDS ebenfalls von der Sepharose abgetrennt und mit Coomassie gefärbt wurden.

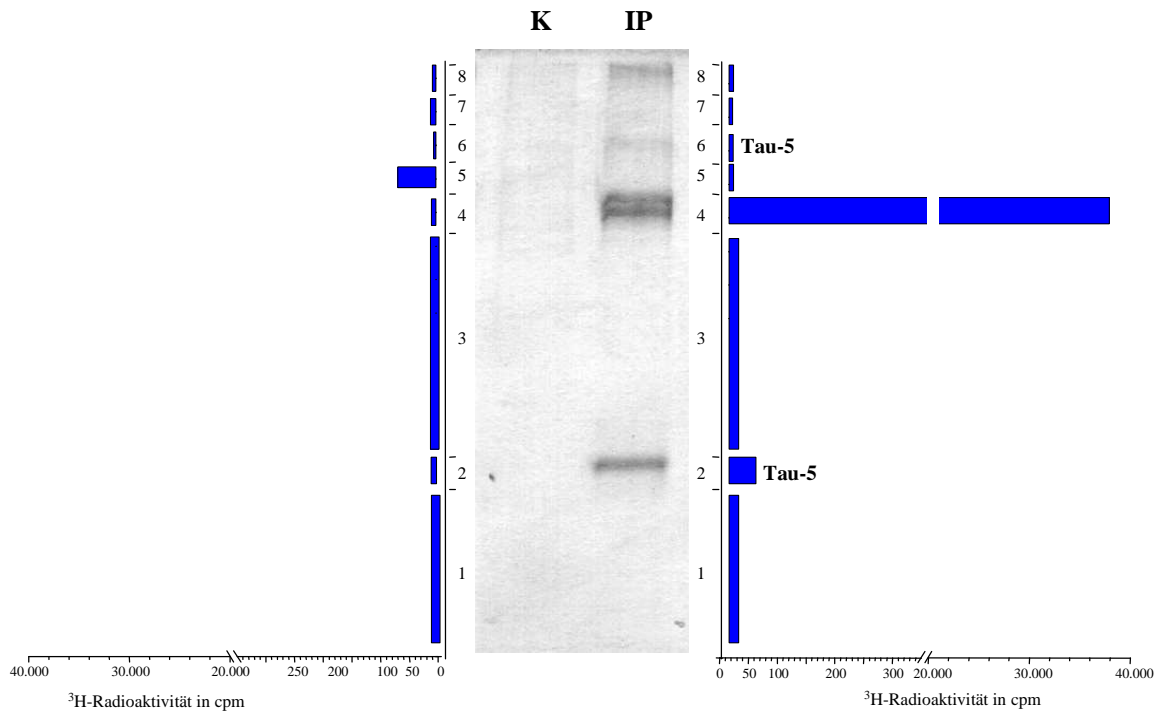


Abbildung 3.2-4 Radioaktivität der einzelnen Banden bzw. Bereiche der SDS-PAGE der Immunopräzipitation Die elektrophoretisch aufgetrennte und mit Coomassie gefärbte IP-Probe wurde zusammen mit der entsprechenden Kontrolle (K) in je 8 Bereiche unterteilt, ausgeschnitten und im Szintillationscounter gemessen. Nur für den Bereich Nr. 4 der IP konnte eine Radioaktivität von 37.896 cpm gemessen werden. Für alle anderen Bereich ergab sich keine oder nur eine sehr schwache Radioaktivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erfolgreich eine Methode zur quantitativen Messung des Turnovers von Tau-Proteinen in HT22-Zellen entwickelt wurde. Es zeigte sich, dass ^3H -Lysin das Isotop der Wahl zur radioaktiven Markierung von Tau in HT22-Zellen war. In allen folgenden Experimenten wurde zur Bestimmung des Abbaus des Tau-Proteins also folgende Methode verwendet:

- radioaktive Markierung der Proteine *in vivo* mit ^3H -Lysin vor Versuchsbeginn für drei Stunden
- Immunopräzipitation der Tau-Proteine mittels TAU-5-Antikörper aus den Zelllysaten nach Versuchsende
- Gelelektrophoretische Trennung der Präzipitate mittels SDS-PAGE
- Coomassie Blue-Färbung des Gels
- Ausschneiden der zu analysierenden Banden mittels Skalpell
- Quantitative Bestimmung der Radioaktivität im Szintillationscounter
- graphische Darstellung des radioaktiven Taus in % zu verschiedenen Zeitpunkten

3.2.1 Physiologischer Tau-Turnover - Bestimmung der Halbwertszeit des Tau-Proteins in HT22-Zellen

Um Aussagen über einen veränderten Abbau und Wiedereinbau (= engl. Turnover) des Tau-Proteins machen zu können, galt es zuerst die physiologische Halbwertszeit des Tau-Proteins in neuronalen HT22-Zellen ohne jeglichen Zusatz von Reagenzien (wie H_2O_2 oder Okadaic Acid) zu bestimmen. Dazu wurden HT22-Zellen mit ^3H -Lysin über 72 Stunden inkubiert und danach entweder gleich geerntet (= Zeitpunkt 0 Stunden) oder mit PBS bzw. Medium gewaschen und in DMEM-Medium weiter kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 30 Minuten, 2, 24, 48 oder 72 Stunden. Die Zellen wurden lysiert, das Tau-Protein wie beschrieben analysiert und die gemessene Radioaktivität graphisch dargestellt (siehe Abbildung 3.2–5).

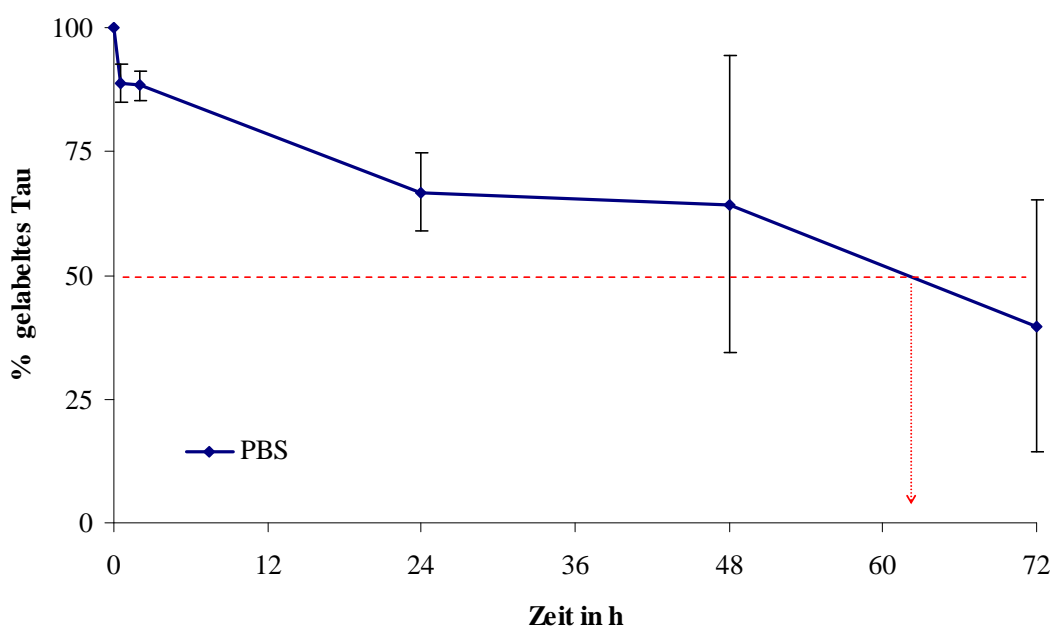


Abbildung 3.2–5 Bestimmung der Halbwertszeit radioaktiv markierten Taus in HT22-Zellen unter physiologischen Bedingungen Mit ^3H -Lysin markierte HT22-Zellen wurden nach 30 min, 2, 24, 48 und 72 Stunden geerntet und das verbliebene radioaktive Tau gemessen.

Im Mittel zeigte sich, dass der Zeitpunkt, zu dem 50 % radioaktiv markiertes Tau abgebaut waren, bei ca. 62,3 Stunden lag. Die Vitalität der Zellen lag bei durchschnittlich 94,3 %. Der Stichprobenumfang n für die Zeitwerte ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.2-1

Zeitwert	0 h	30 min	2 h	24 h	48 h	72 h
n =	10	5	4	7	2	2

3.2.2 Tau-Turnover unter Einwirkung von oxidativem Stress und Untersuchungen zur Rolle des Proteasoms

Oxidativer Stress kann neuronalen und glialen Zelltod induzieren (Whittemore, Loo *et al.* 1994; Richter-Landsberg and Vollgraf 1998) und ist vermutlich an einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen und Alterungsprozessen beteiligt (Jesberger and Richardson 1991; Halliwell 1992; Bains and Shaw 1997). Oxidationsprozesse zerstören die Tertiärstruktur der Proteine und führen dadurch zu einer partiellen Entfaltung. Dadurch werden hydrophobe Gruppen zugänglich gemacht, die ein bevorzugtes Substrat für das Proteasom darstellen (Pacifci, Kono *et al.* 1993; Chao, Ma *et al.* 1997). In den weiteren Versuchen wurde der Einfluss von oxidativem Stress auf den Tau-Turnover und eine mögliche Rolle des Proteasoms untersucht.

3.2.2.1 Tau-Turnover und Vitalität von HT22-Zellen unter oxidativen Bedingungen

Es wurde der gleiche Versuch wie in 3.2.1 durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Zellen zum Zeitpunkt 0 Stunden für 30 Minuten mit 1 mM H₂O₂-Lösung belastet wurden und die Kontrollzellen für die entsprechende Zeit in PBS inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden sie entweder geerntet oder gewaschen und weitere Zeit mit DMEM-Medium inkubiert. Das Pellet der nachfolgenden IP wurde dann wieder auf eine SDS-PAGE aufgetragen, die Banden gefärbt, separiert und die verbliebene Radioaktivität gemessen. Tabelle 3.2-2 stellt den Stichprobenumfang *n* der Experimente dar.

Tabelle 3.2-2 Stichprobenumfang *n*

Zeitwert	0 h	30 min	2 h	24 h	48 h	72 h
PBS n =	10	5	4	7	2	2
H ₂ O ₂ n =	12	5	3	8	3	1

Bei der Belastung von HT22-Zellen mit 1 mM H₂O₂-Lösung zeigte sich ein verstärkter Abbau initial radioaktiv markierten Taus. Die Halbwertszeit des Tau-Proteins sank von ca. 62,3 Stunden auf 8 Stunden. Dieser signifikante und fast 8-fach schnellere Turnover des Tau-Proteins fand vor allem in den ersten 120 Minuten des Versuches statt. 88,8 % markiertes Tau wurden nach 30 Minuten in dem Präzipitat der mit PBS inkubierten Zellen detektiert, aber nur noch 66,4 % in den mit H₂O₂ belasteten Zellen (siehe Abb. 3.2-6).

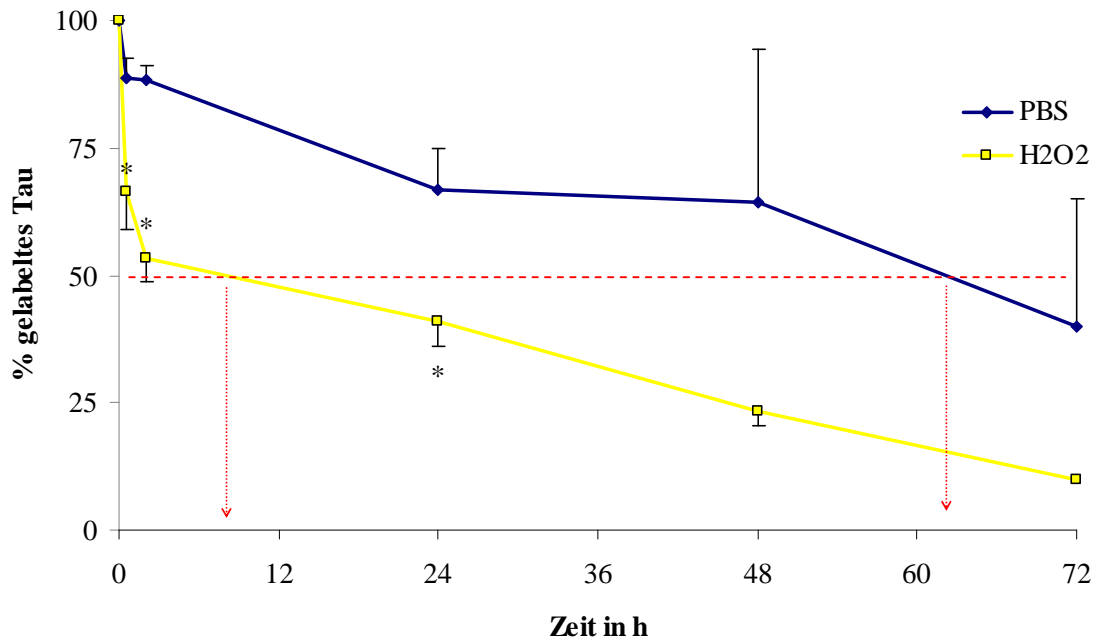


Abbildung 3.2–6 Bestimmung der Halbwertszeit radioaktiv markierten Taus in HT22-Zellen nach 30 Minuten oxidativer Belastung Zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden die Zellen entweder mit PBS oder 1 mM H₂O₂-Lösung belastet und wie unter 3.2.1 aufgearbeitet. Die H₂O₂ behandelten Zellen (gelbe Kurve) zeigten eine deutliche Abnahme initial gelabelten Taus im Vergleich zu den PBS behandelten Zellen (blaue Kurve). Die mit Stern gekennzeichneten Datenpunkte markieren eine signifikante Abweichung ($p < 0,05$).

Der 2-Stunden-Wert ergab nahezu unveränderte 88,4 % (s.e. \pm 2,9 %) radioaktives Tau-Protein in den PBS behandelten Zellen, aber mit 53,4 % (s.e. \pm 4,6 %) einen andauernden Turnover nach H₂O₂-Behandlung. Nach 24 Stunden unter „physiologischen“ Bedingungen lagen noch 66,8 % (s.e. \pm 8 %) radioaktives Tau vor, während in den belasteten Zellen mit 41 % (s.e. \pm 5,1 %) verbliebenes Tau schon über die Hälfte verstoffwechselt war. Die Halbwertszeit des Tau-Proteins in den PBS behandelten Zellen lag zwischen 48 und 72 Stunden, in denen der Gehalt an radioaktivem Tau von 64,4 % (s.e. \pm 30 %) auf 39,8 % (s.e. \pm 25,4 %) sank. Im gleichen Zeitraum wurde in dem Präzipitat der H₂O₂ behandelten Zellen eine Verringerung von 23,4 % (s.e. \pm 2,9 %) auf 9,8 % (n = 1) gemessen. 90 % des anfänglich vorhandenen Tau-Proteins waren metabolisiert worden; 30 % mehr als in der Kontrollgruppe. Ab dem Zeitpunkt 2 Stunden verliefen die Turnover-Kurven nahezu parallel und der Turnover nach oxidativer Belastung war jeweils 25-40 % größer. Daher wurde in allen weiteren Versuchen das Zeitfenster auf die ersten 24 Stunden beschränkt. Die oxidative Belastung der Zellen mit 1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung beeinträchtigte die Vitalität der Zellen kaum wie in Abbildung 3.2-7 gezeigt.

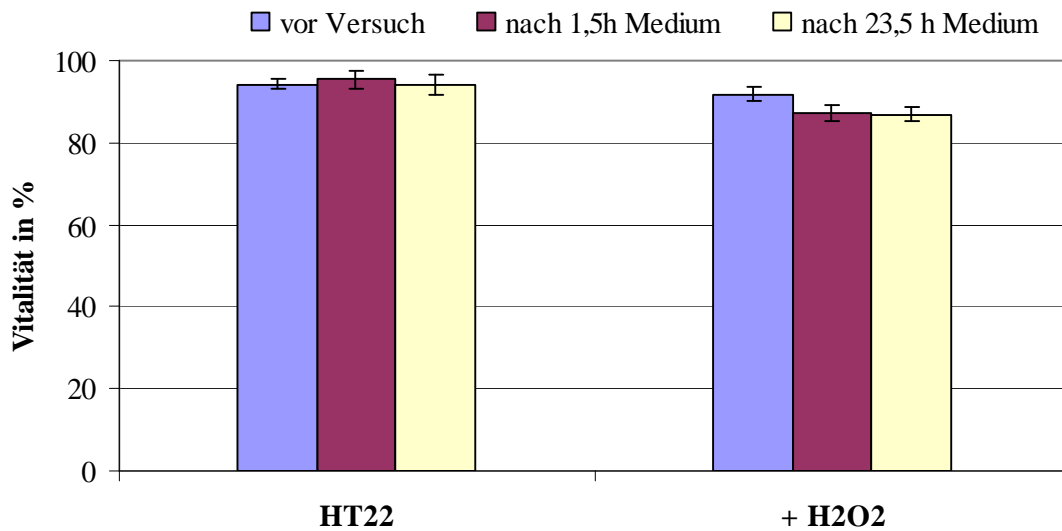


Abbildung 3.2-7 Vitalität HT22-Zellen mit und ohne oxidative Belastung Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau vor dem Versuch (blau), nach 30 minütiger Belastung mit H₂O₂ oder PBS und anschließender Inkubation in Medium fuer 1,5 Stunden (lila, 2 h-Wert) bzw. für 23,5 Stunden (beige, 24 h - Wert) bestimmt.

Eine Färbung der Zellen mit Trypanblau und anschließender Zählung ergab eine durchschnittliche Vitalität von 94,3 % bzw. 91,9 % für die unbelasteten Zellen vor den Versuchen. Eine 30-minütige Inkubation mit PBS mit anschließender Kultivierung für 1,5 Stunden in DMEM-Medium beeinträchtigte die Vitalität nicht (95,4 %), während eine Belastung mit 1 mM H₂O₂-Lösung die Vitalität auf 87,3 % reduzierte. Eine Messung der Vitalität nach Belastung mit anschließender Inkubation in DMEM-Medium für 23,5 Stunden (= 24 h-Wert), ergab zu 94,2 % vitale Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation mit PBS und zu 87,0 % vitale Zellen nach oxidativer Belastung. Diese Methode der Induktion von oxidativen Stress beeinträchtigte die Vitalität der HT22-Zellen also maximal zu 5,4 % im Verlauf von 24 Stunden.

Ein anschließender Westernblot der HT22-Lysate und Detektion mittels Tau-5-Antikörper, der alle Tau-Proteine unabhängig des Phosphorylierungszustandes erkennt, zeigte, dass der Gehalt an Tau-Protein sich während der Dauer des Versuches nicht änderte (siehe Abb. 3.2-8).

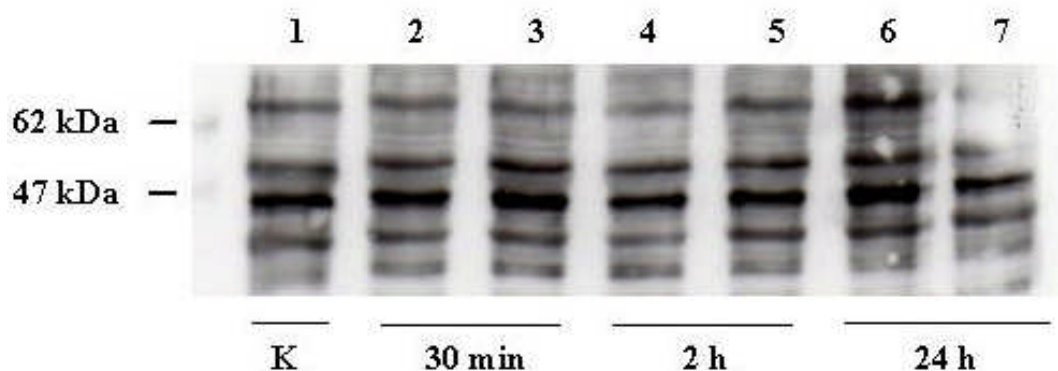


Abbildung 3.2–8 Western Blot der HT22-Lysate mit und ohne oxidative Belastung Detektion des Tau-Proteins in den Lysaten erfolgte mit dem Tau-5-Antikörper. Die Proben wurden direkt nach 30 Minuten Belastung gewonnen oder nach zusätzlicher Inkubation in Medium. Die Bahnen 2, 4 und 6 repräsentieren die mit PBS inkubierten Proben und die Bahnen 3, 5 und 7 die mit H₂O₂ belasteten Proben.

Eine quantitative Messung des Tau-Turnovers ergab also, dass oxidativer Streß den Tau-Turnover erhöhte, den Gesamt-Tau-Spiegel aber nicht beeinträchtigte.

3.2.2.2 Tau-Turnover unter Hemmung des Proteasoms

Um eine mögliche Rolle des 20S Proteasoms bei einem gesteigerten Tau-Turnover unter oxidativen Bedingungen zu untersuchen, wurde der gleiche Versuch unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 durchgeführt. Der Inhibitor wurde für 1 Stunde vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 0,5 µM zu den Zellen dazu gegeben, dann entfernt, der Versuch unter normalen und oxidativen Bedingungen durchgeführt und anschließend der Tau-Turnover bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2-9 dargestellt und der Stichprobenumfang in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle 3.2-3 Stichprobenumfang *n*

Zeitwert		0 h	30 min	2 h	24 h
	PBS n =	10	5	4	7
	H ₂ O ₂ n =	12	5	3	8
MG132	PBS n =	2	2	2	2
	H ₂ O ₂ n =	4	3	3	3

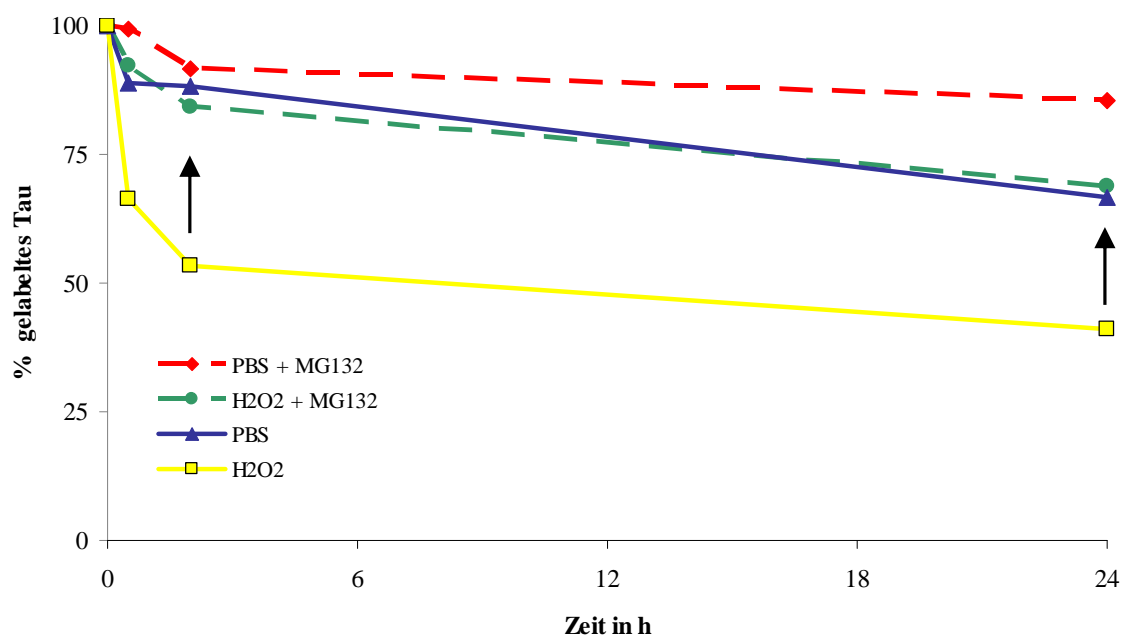


Abbildung 3.2-9 Bestimmung der Halbwertszeit radioaktiv markierten Taus in HT22-Zellen nach 30 Minuten oxidativer Belastung unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 Vor der Belastung mit PBS oder 1 mM H₂O₂-Lösung wurde die Hälfte der Zellen für 1 Stunde mit 0,5 µM MG132 vorinkubiert. Die H₂O₂-behandelten Zellen (gelbe Kurve) zeigten eine deutliche Abnahme initial gelabelten Taus im Vergleich zu den PBS-behandelten Zellen (blaue Kurve). Zugabe von MG132 zeigte einen geringen Effekt auf den Abbau unbelasteten Taus (rote Kurve), während der durch H₂O₂ initiierte verstärkte Abbau des Tau wieder aufgehoben wurde (Pfeile und grüne Kurve).

Die Zugabe von MG132 (rote Kurve) zeigte einen Effekt auf den Abbau des Tau-Proteins in unbelasteten Zellen (blaue Kurve) und erhöhte die Menge des verbleibenden initial gelabelten Taus von 66,8 % (± 17,9 %) auf 85,4 % (± 6,8 %) zum Zeitpunkt 24 Stunden. Zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Proteasomhemmung waren 99,3 % (± 7,9 %) gelabeltes Tau detektierbar (88,8 % ± 5,3 % ohne MG132) und zum Zeitpunkt 2 Stunden 91,7 % (± 6,5%) im Vergleich zu 88,4 % (± 4,1 %) ohne Proteasomhemmung. Die mit H₂O₂ behandelten Zellen (gelbe Kurve) zeigten eine deutliche Abnahme initial gelabelten Taus im Vergleich zu den PBS behandelten Zellen (blaue Kurve). Durch Vorinkubation mit MG132 wurde der durch H₂O₂ initiierte verstärkte Abbau des Taus wieder aufgehoben (Pfeile und grüne Kurve). Der Anteil nicht abgebauten oxidierten Taus zum Zeitpunkt 30 Minuten vergrößerte sich von 66,4 % (± 12,6 %) auf 92,3 % (± 0,2 %), zum Zeitpunkt 2 Stunden von 53,4 % (± 6,5 %) auf 84,2 % (± 2,5 %) und zum Zeitpunkt 24 Stunden ging das verbleibende Tau von 41,0 % (± 12,4 %) auf 68,7 % (± 2,5 %) zurück. Eine Hemmung des Proteasoms vor Versuchsbeginn mit MG132 verringerte somit den durch oxidativen Stress induzierten Tau-Turnover.

3.2.3 Optimierung der Proteasomhemmung durch Veränderung der Konzentration und Inkubationsdauer des Inhibitors

3.2.3.1 Messung der Aktivität des 20S und 26S Proteasoms

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Tau-Turnover und dem 20S Proteasom als beteiligter Protease zu ermitteln, war es als nächstes nötig zu untersuchen, ob das Proteasom unter den gegebenen Bedingungen aktiv war oder sich Veränderungen in der Aktivität zeigte. Dazu wurden die Versuche nicht-radioaktiv wiederholt, die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und die Zelllysate auf ihre proteasomale Aktivität hin untersucht (siehe Abb. 3.2-10). Zur Aktivitätsbestimmung wurde das fluorogene Substrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC verwendet, das die chymotryptische Aktivität des 20S Proteasom-Kernkomplexes erfordert. Um die Aktivität des 26S zu untersuchen, wurde das Assay unter ATP-Zusatz durchgeführt.

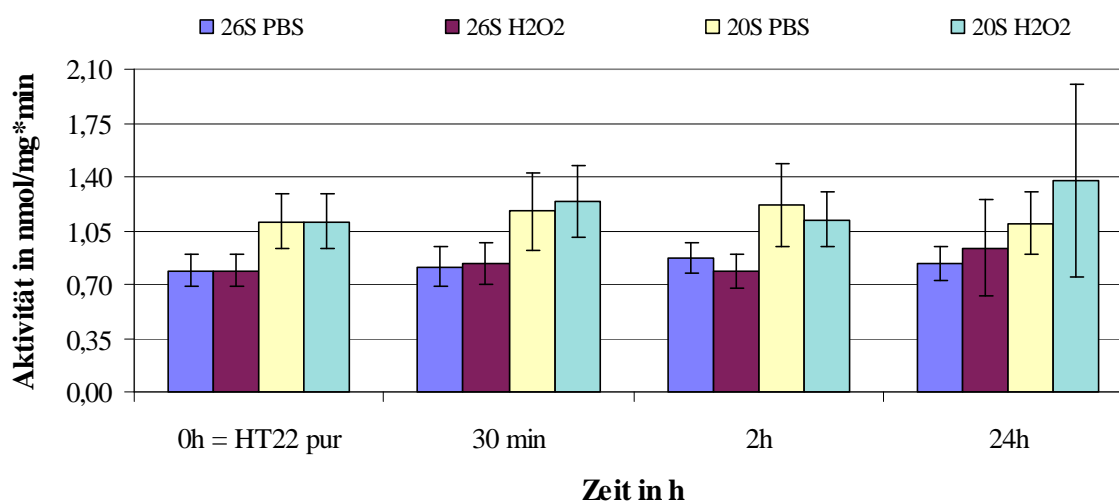


Abbildung 3.2–10 Bestimmung der Aktivität des 20S und 26S Proteasoms bei oxidativem Stress zu unterschiedlichen Zeitpunkten HT22-Zellen mit 30 Minuten Inkubation von PBS oder 1 mM H₂O₂-Lösung und nachfolgender Inkubation in DMEM-Medium wurden geerntet und die Aktivität der Proteasomen in nmol/mg*min berechnet.

Für das 26S Proteasom zeigte sich keine Aktivitätsveränderung über einen Zeitraum von 24 Stunden (blauer Graph). Eine Belastung mit 1 mM H₂O₂-Lösung (lila Graph) führte zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust nach 2 Stunden (9,5 %), während nach 24 Stunden eine leicht erhöhte Aktivität zu messen war (12,8 %). Das 20S Proteasom zeigte ebenfalls kaum Veränderung der Aktivität über 24 Stunden (gelber Graph). Die oxidative Belastung (grüner Graph) führte eine gering verminderte Aktivität nach 2 Stunden (7,4 %) herbei, während nach 30 Minuten eine gesteigerte Aktivität von 3,4 % und nach 24 Stunden von

25,4 % gemessen wurde. Insgesamt zeigt das 20S Proteasom eine stärkere Aktivität als das 26S Proteasom, es war im Mittel um ca. 42 % aktiver.

Als nächstes galt es zu untersuchen, ob eine 1-stündige Vorinkubation mit 0,5 μM MG132 eine ausreichende Hemmung des Proteasoms bewirkte. Dazu wurden die Inhibitionsversuche mit MG132 nicht-radioaktiv wiederholt und die behandelten Zelllysate auf ihre (verbleibende) proteasomale 20S Aktivität hin gemessen.

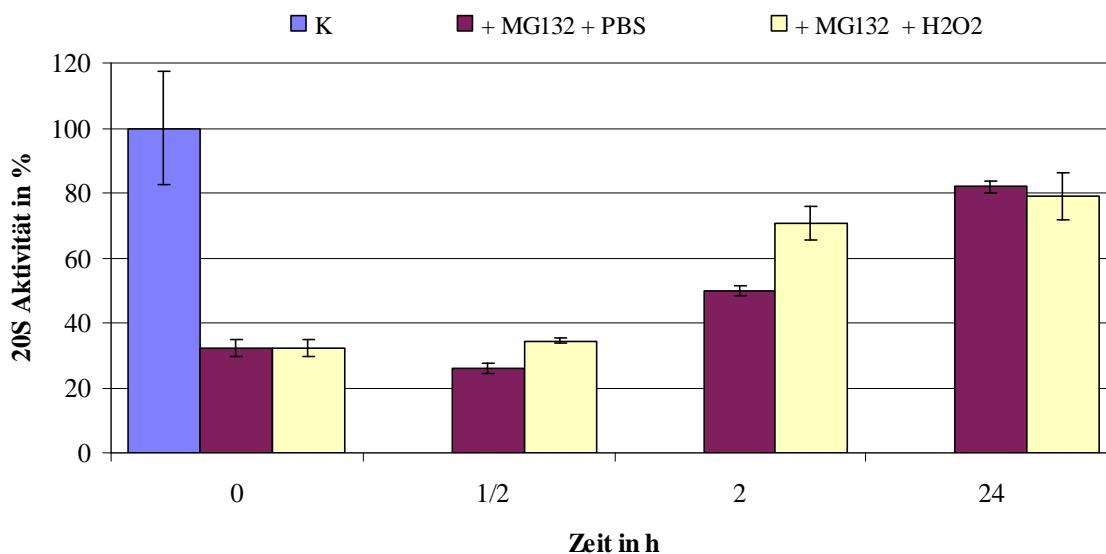


Abbildung 3.2–11 Bestimmung der Aktivität des 20S Proteasoms bei oxidativem Stress nach Vorinkubation mit MG132 HT22-Zellen wurden 1 Stunde mit MG132 vorbehandelt, dann mit von PBS oder 1 mM H_2O_2 -Lösung 30 Minuten inkubiert und nachfolgend in DMEM-Medium kultiviert oder geerntet und die verbleibende Aktivität des 20S Proteasom gemessen und in % berechnet ($n = 3$).

Es zeigte sich, dass eine 1-stündige Inkubation mit 0,5 μM MG132-Lösung eine Reduktion der 20S Proteasomaktivität (4,123 nmol/mg*min) auf 32 % bewirkte (lila Graph; 1,321 nmol/mg*min). 30 Minuten nach Entfernen des Inhibitors und Behandlung der Zellen mit PBS oder H_2O_2 betrug die Aktivität 26 % bzw. 34,4 %. Zum Zeitpunkt 2 Stunden (= 1,5 Stunden in DMEM) steigerte sich die Aktivität auf 50 % bzw. unter oxidativer Belastung auf 70,6 % der anfänglichen Aktivität. Der 24 Stunden-Wert ergab eine Aktivität von 81,9 % für PBS behandelte Zellen und 78,9 % der Ausgangsaktivität für belastete Zellen.

3.2.3.2 Unterschiedliche Inkubationsdauer des Proteasominhibitors MG132

Eine Hemmung des Proteasoms war also erfolgreich, aber während der Versuchsdurchführung nicht konstant. Um eine anhaltende Inhibition des Proteasoms zu erreichen, musste also die Inkubationsdauer verlängert werden. Deshalb sollten die Zellen in einem erneuten Versuch für 1 Stunde vorher und zusätzlich über die gesamte

Versuchsdauer hinweg mit 0,5 μM MG132 inkubiert werden. Dazu wurden die radioaktiven Abbau-Versuche wiederholt und die Turnoverrate des Tau-Proteins bestimmt.

Tabelle 3.2-4 Stichprobenumfang n zu den verschiedenen Zeitpunkten

MG132 \ Zeitwert		0 h	30 min	2 h	24 h
		1 h	PBS $n =$ 10 H ₂ O ₂ $n =$ 12	5	5
24 h	PBS $n =$ 2 H ₂ O ₂ $n =$ 4	2	3	3	3

Eine Inkubation mit 0,5 μM MG132 für nur 1 Stunde führte in allen Versuchen zu einem geringeren Abbau gelabelten Taus als bei einer Inkubation mit dem Inhibitor bei gleicher Konzentration über 24 Stunden (siehe Abb. 3.2-12) bzw. eine Proteasomhemmung über 24 Stunden führte NICHT zu stärkerer Hemmung des Abbaus. Im Vergleich zu dem Abbau unter oxidativen Stress und ohne MG132 fand allerdings nach wie vor ein verminderter Abbau statt.

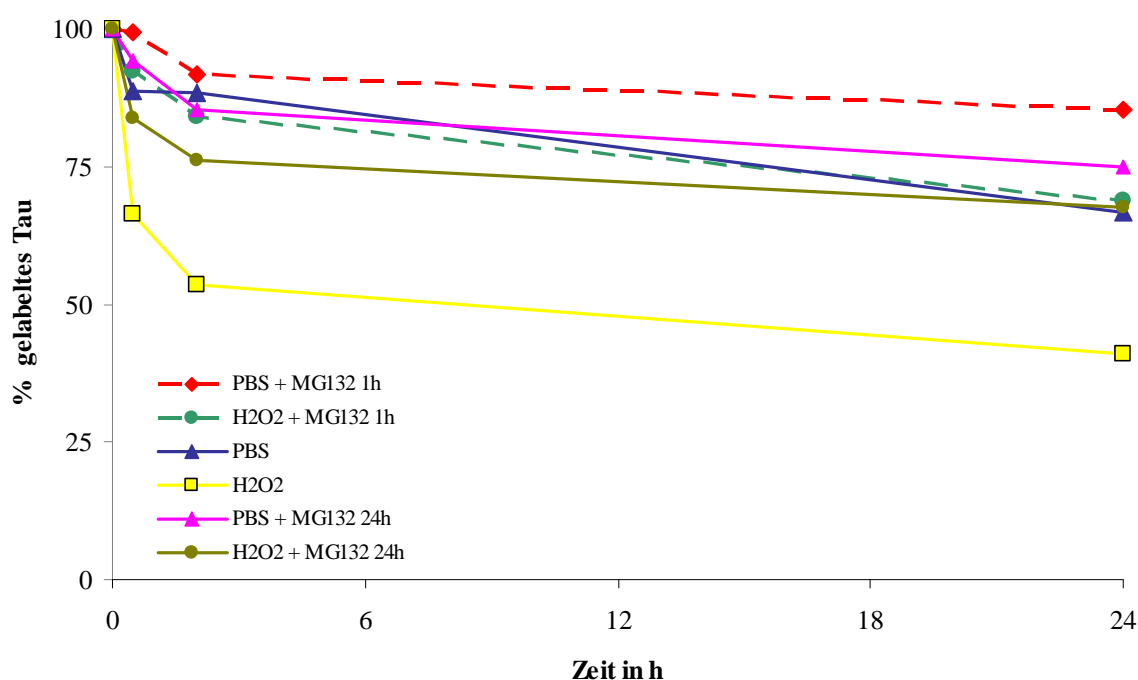


Abbildung 3.2–12 Bestimmung des Turnovers radioaktiv markierten Taus in HT22-Zellen nach 30 Minuten oxidativer Belastung unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132. Vor der Belastung mit PBS bzw. 1 mM H₂O₂-Lösung wurde die Hälfte der Zellen für eine Stunde mit 0,5 μM MG132 vorinkubiert und die Hälfte davon über 24 Stunden hinweg inkubiert. Die H₂O₂ behandelten Zellen (gelbe Kurve) zeigten eine deutliche Abnahme initial gelabelten Taus im Vergleich zu den PBS behandelten Zellen (blaue Kurve). Zugabe von MG132 zeigte einen geringen Effekt auf den Abbau unbelasteten Taus (rote/rosa Kurve), während der durch H₂O₂ initiierte verstärkte Abbaus des Tau aufgehoben wurde (grüne/braune Kurve).

Im Vergleich zu Abbildung 3.2-9 zeigte eine 24-stündige Inkubation (rosa Dreiecke) mit MG132 keine verstärkte Inhibition des physiologischen Tau-Abbaus verglichen mit der 1-stündigen Inkubation (rote Quader). Bei zeitgleicher Belastung mit H₂O₂ führt die 1-stündige Inkubation mit MG132 zu einem stärkeren Rückgang des Abbaus während des Versuchsverlaufes (grüne Punkte), zum Zeitpunkt 24 Stunden war der Abbau oxidierten Taus aber bei beiden Inhibitionszeiten gleich (olivgrüne Punkte).

3.2.3.3 Variation der Konzentration zur Hemmung des Proteasoms

Bei Verwendung von MG132 in einer Konzentration von 0,5 μ M betrug die Reduktion der proteasomalen Aktivität in den Kontrollzellen 68 % und somit bestand noch 32 % Restaktivität. Es stellte sich die Frage, ob eine stärkere Hemmung des Proteasoms bei ausreichender Vitalität der Zellen möglich war. Dazu erfolgte eine Inkubation von HT22-Zellen über 24 Stunden hinweg mit MG132-Konzentrationen von 0,5 μ M, 1, 10 und 20 μ M. Danach wurde die proteasomale Aktivität wie zuvor beschrieben gemessen (siehe Abb. 3.2-13).

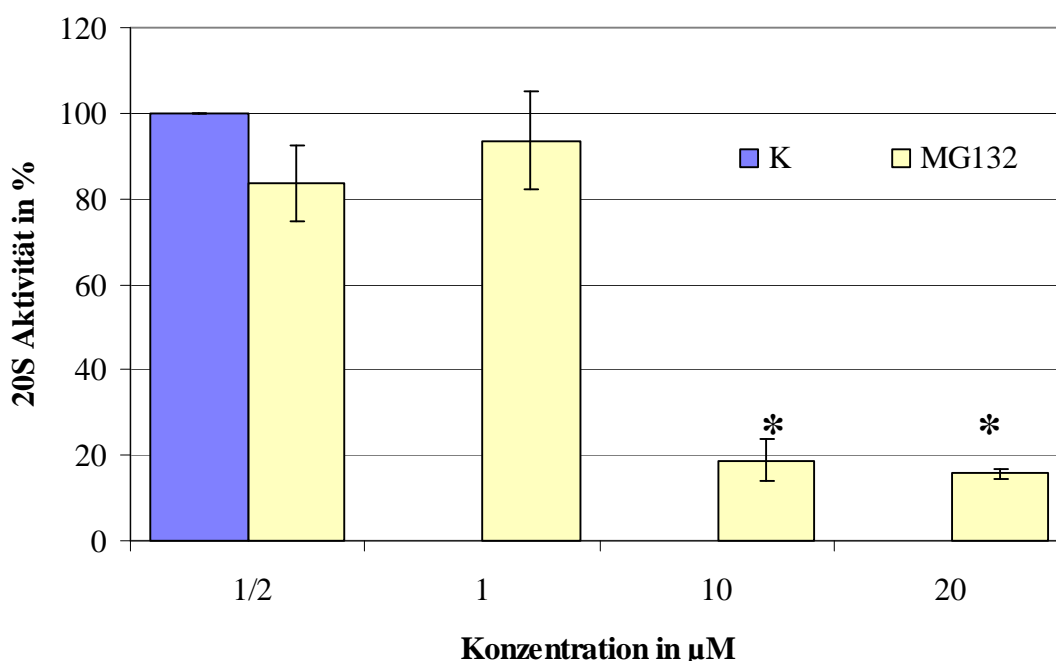


Abbildung 3.2–13 Bestimmung der Aktivität des 20S Proteasoms nach 24 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen MG132. Eine Steigerung der MG132-Konzentration auf 10 μ M bzw. 20 μ M führte zu einer hoch signifikanten Reduktion der 20S-Aktivität ($p < 0,01$).

Im Vergleich zu den Kontrollzellen (blauer Graph) zeigte eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit 0,5 μ M bzw 1 μ M MG132-Lösung lediglich eine Hemmung der 20S

Proteasomaktivität auf 83,5 % bzw. 93,6 % der Ausgangsaktivität (gelber Graph). Erst eine deutliche Konzentrationsteigerung auf 10 μM und 20 μM erzielte einen hoch signifikanten Rückgang der Aktivität auf 18,8 % bzw. 15,7 % ($p < 0,01$). Eine vollständige Hemmung konnte jedoch nicht gemessen werden. Die Vitalität der Zellen wurde durch die verwendeten Konzentrationen des Inhibitors nicht beeinträchtigt, sie lag bei jeder Konzentration bei ca. 90 %.

Eine Inkubation von HT22-Zellen mit 0,5 μM MG132-Lösung verhinderte den Tau-Abbau H_2O_2 -behandelter Zellen, während der physiologische Turnover wenig beeinträchtigt zu sein schien (siehe 3.2.2.2 und 3.2.3.2). Da die Vitalität der Zellen durch eine erhöhte Konzentration des Inhibitors nicht beeinträchtigt war und sich die Proteasomen-Hemmung ab einer Konzentration von 10 μM nur noch wenig änderte, sollte getestet werden, ob eine 10 μM MG132-Lösung den Tau-Turnover im gleichen Maße beeinträchtigen würde. Dazu wurden HT22-Zellen für eine Stunde vorinkubiert und dann über 24 Stunden hinweg mit dem Inhibitor inkubiert. Die Zellen wurden die ersten 30 Minuten mit PBS oder 1 mM H_2O_2 -Lösung belastet und anschließend in DMEM-Medium weiter kultiviert. Danach erfolgte eine Bestimmung des Tau-Turnovers wie unter 3.2.1 beschrieben. Tabelle 3.2-5 beschreibt den Stichprobenumfang n des Experiments.

Tabelle 3.2-5 Stichprobenumfang n

Zeitwert		MG132	0 μM	0,5 μM	10 μM
0 h	PBS	n =	6	6	1
	H_2O_2	n =	6	6	1
24 h	PBS	n =	3	3	2
	H_2O_2	n =	3	3	2

Eine Erhöhung der Konzentration des Inhibitors reduziert die Menge abgebauten Taus unter physiologischen Bedingungen ebenso wie unter oxidativer Belastung; zum Zeitpunkt 24 Stunden lag mehr radioaktiv markiertes Tau vor (siehe Abb. 3.2-14). Eine Konzentration von 0,5 μM reduzierte den Abbau bereits um 8 % unter physiologischen Bedingungen von 66,8 % auf 74,8 % initial markiertes Tau und der Abbau „oxidierten“ Taus verminderte sich um 26,6 % von 41 % auf 67,6 % radioaktives „Rest“-Tau.

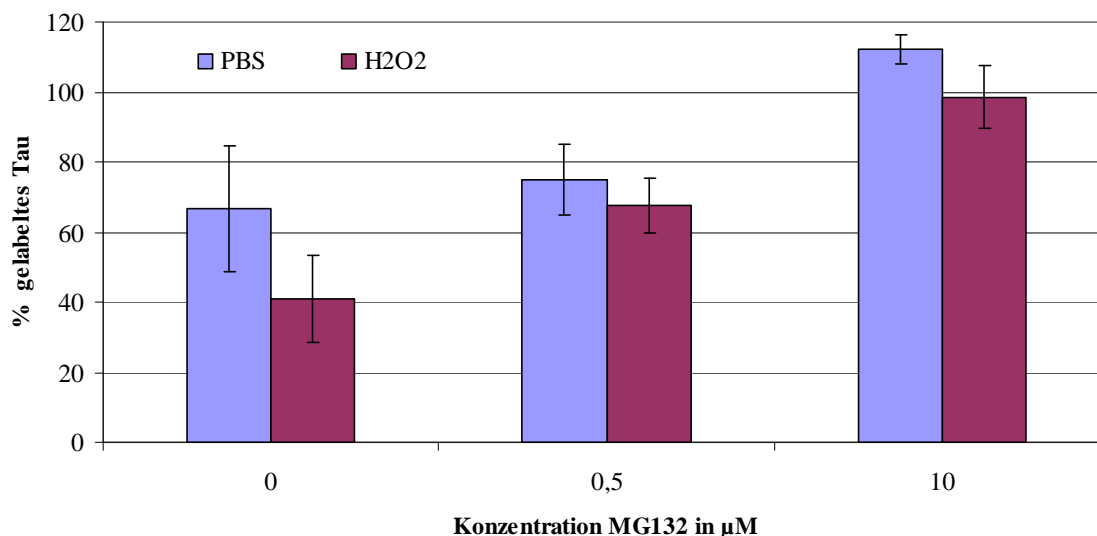


Abbildung 3.2–14 Tau-Turnover in HT22-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit MG132 in unterschiedlichen Konzentrationen Zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten entweder mit PBS (blauer Graph) oder H₂O₂ (lila Graph) belastet und anschließend in DMEM-Medium weiter kultiviert und zum Zeitpunkt 24 Stunden die Turnoverrate bestimmt.

Bei beiden Versuchsbedingungen war ein Abbau radioaktiv markierten Taus bei einer Konzentration von 10 μM MG132 nahezu vollständig unterbunden. Der Abbau unter oxidativer Belastung war jedoch stets verstärkt im Vergleich zu der physiologischen Versuchsbedingung. Nach 24 Stunden Hemmung des Proteasoms fand also eine fast vollständige Hemmung statt und Tau-Protein wurde fast gar nicht mehr abgebaut. Somit scheint in HT22-Zellen das *Tau-Protein generell auch ein Substrat des Proteasom darzustellen. Eine posttranslationale Modifikation wie Oxidation wurden bevorzugt erkannt.*

3.2.4 Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung

Neben den extrazellulären Plaques sind die intrazellulären Veränderungen des Tau-Proteins das Hauptmerkmal der Alzheimer-Krankheit. Die pathologischen Modifikationen sind durch Hyperphosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten charakterisiert. Hyperphosphoryliertes Tau kann *in vitro* durch Potentierung der Kinase-Aktivität oder Inhibition der Phosphatase-Aktivität induziert werden. Drei Arten von Proteinphosphatasen sind an der Dephosphorylierung des Tau-Proteins beteiligt: Proteinphosphatase 1, 2A und 2B (PP1, PP2A/B). Ein in der Zellkultur häufig verwendeter und spezifischer Inhibitor der Proteinphosphatase 1 und 2A ist Okadaic Acid (engl. Okadaic Acid, OA) (Bialojan and Takai 1988; Arias, Sharma *et al.* 1993). Die verwendeten Konzentrationen von OA, um eine Hyperphosphorylierung zu induzieren, variieren in der Literatur sehr stark. So werden neuronale hippocampale Primärkulturen zum Beispiel mit 10 nM OA bis zu 24 Stunden inkubiert (Kerokoski, Suuronen *et al.* 2001), humane Neuroblastomazellen SH-SY5Y mit 0,25 μ M über 45 Minuten (Perez, Hernandez *et al.* 2002) und Rattenhirnschnitte mit 10 nM, 1,0 μ M bzw. 5,0 μ M über 3 Stunden hinweg (Gong, Lidsky *et al.* 2001).

3.2.4.1 Bestimmung der Parameter zur Inkubation mit Okadaic Acid

Um eine geeignete Konzentration zur Inkubation von OA für HT22-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit unterschiedlichen OA-Konzentrationen und in verschieden langen Zeitintervallen inkubiert (siehe Tabelle 3.2-6).

Tabelle 3.2-6 Verwendete Konzentrationen und Zeitintervalle

Zeitintervall in Stunden	Konzentration OA in nM					
	10	50	100	250	500	1000
3					✓	✓
16	✓	✓	✓	✓		
24	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins mittels WesternBlot und verschiedenen phospho-sensitiven Antikörpern bestimmt (siehe Abb. 3.2-15).

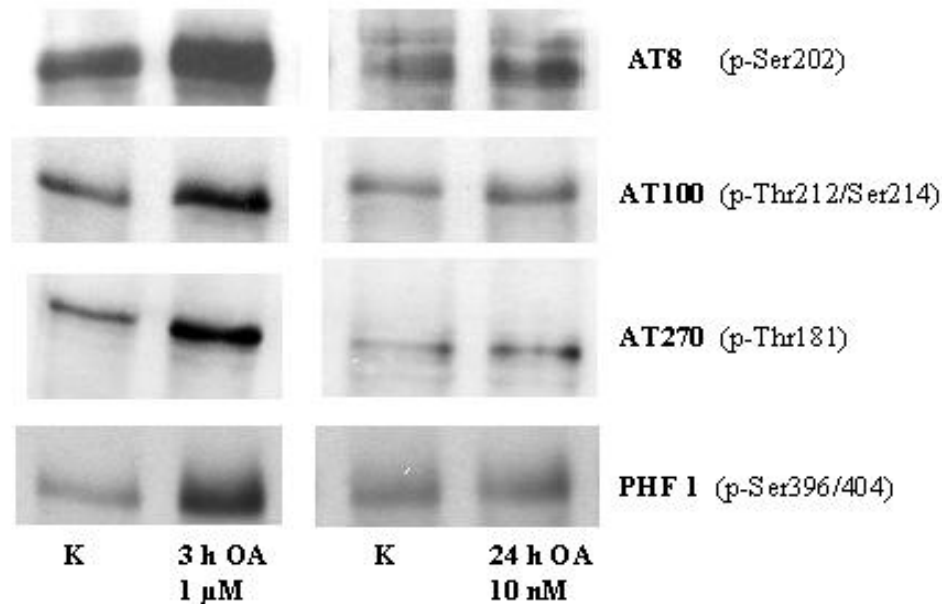


Abbildung 3.2–15 Phosphorylierungsstatus von Tau nach Inkubation von HT22-Zellen mit Okadaic Acid in unterschiedlicher Konzentration und Dauer HT22-Zellen wurden für 3 Stunden mit PBS (K) bzw. 1 μM Okadaic Acid (OA) oder für 24 Stunden mit 10 nM OA inkubiert, anschließend lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus mit verschiedenen Antikörpern überprüft. AT8 detektiert phosphoryliertes Serin 202, AT100 phosphoryliertes Threonin 212 und Serin 214, AT270 phosphoryliertes Threonin 181 und PHF-1 phosphoryliertes Serin 396 und 404.

Nach Inkubation der HT22-Zellen mit OA in einer Konzentration von 1 μM und einer Dauer von 3 Stunden zeigten alle vier phospho-sensitiven Tau-Antikörper AT8, AT100, PHF-1 und AT270 ein deutliches Signal auf Höhe der Tau-Bande im Vergleich zu unbelasteten Kontrollzellen. Eine Inkubation der Zellen mit 10 nM Okadainsäure über 24 Stunden hinweg zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine verstärkte Phosphorylierung des Tau-Proteins. Eine Inkubation von HT22-Zellen mit einer Konzentration von nur 500 nM OA (nicht abgebildet) ergab im Western Blot eine unwesentlich geringere Intensität der Signale für phosphoryliertes Tau. Daher wurden alle weiteren Versuche mit einer Konzentration von 500 nM Okadaic Acid und einer Inkubationsdauer von 3 Stunden durchgeführt.

Mikroskopisch zeigten sich nach Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Okadaic Acid morphologische Zellveränderungen. Die Ausläufer der HT22-Zellen bildeten sich zurück und die Zellen nahmen eine runde Form an (siehe Abb. 3.2-16).

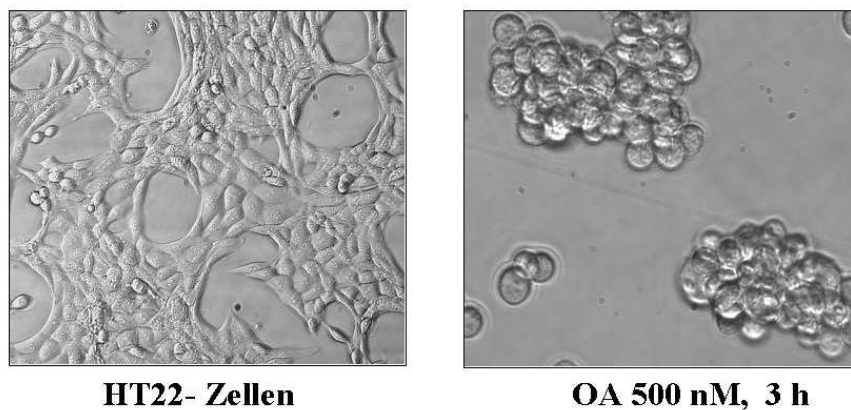


Abbildung 3.2–16 Morphologie von HT22-Zellen vor und nach Inkubation mit Okadaic Acid
 Behandlung von HT22-Zellen mit 500 nM OA über 3 Stunden führte zu einem Verlust der bipolaren Form; die Ausläufer bildeten sich zurück und die Zellen nahmen eine kugelige Gestalt an.

3.2.4.2 Vitalität

Die Vitalität der Zellen wurde durch die Behandlung mit 500 nM OA nicht beeinträchtigt. Färbungen mit Trypanblau und anschließender Zellzählung ergaben kaum eine Veränderung der Vitalität. 24 Stunden nach Inkubation mit OA war die Vitalität lediglich zu 6 % erniedrigt und betrug immer noch 89,5 % (siehe Abb. 3.2-17).

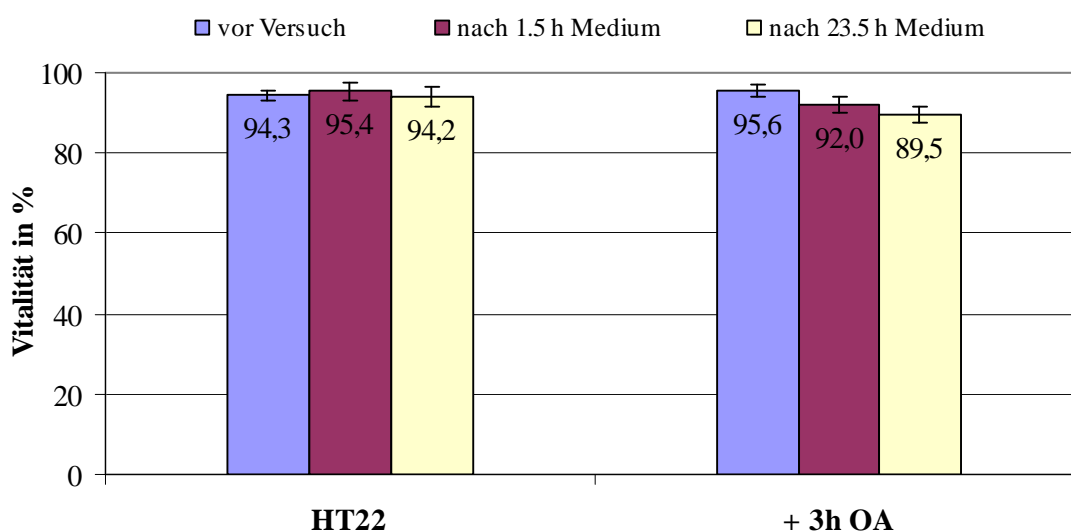


Abbildung 3.2–17 Vitalitätsbestimmung der HT22-Zellen nach OA-Inkubation mit Trypanblau

3.2.4.3 Turnover

Nachdem die Konzentration und das Zeitintervall zur Inkubation mit Okadaic Acid ermittelt waren, wurden analog zu Kapitel 3.2.1 Untersuchungen zum Turnover des Tau-Proteins nach Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A durchgeführt, die eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins simulieren sollte. Die radioaktiv markierten Zellen wurden für 3 Stunden mit oder ohne 500 nM OA behandelt und anschließend direkt geerntet (0 Stunden) oder mit Medium weitere 2 bzw. 24 Stunden vor Ernte inkubiert. Die Daten der Proben ohne Okadaic Acid-Behandlung (- OA) entsprechen denen, die in den Versuchen zuvor mit PBS durchgeführt und als „physiologischer Verlauf“ bezeichnet wurden. Der Stichprobenumfang n ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.2-7 Stichprobenumfang n

Zeitwert	0 h	30 min	2 h	24 h
- OA $n =$	10	5	4	7
+ OA $n =$	11	7	7	7

Es zeigte sich, dass zu allen Zeitpunkten die Turnoverrate in OA-vorbehandelten Zellen geringer war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (siehe Abb. 3.2-18).

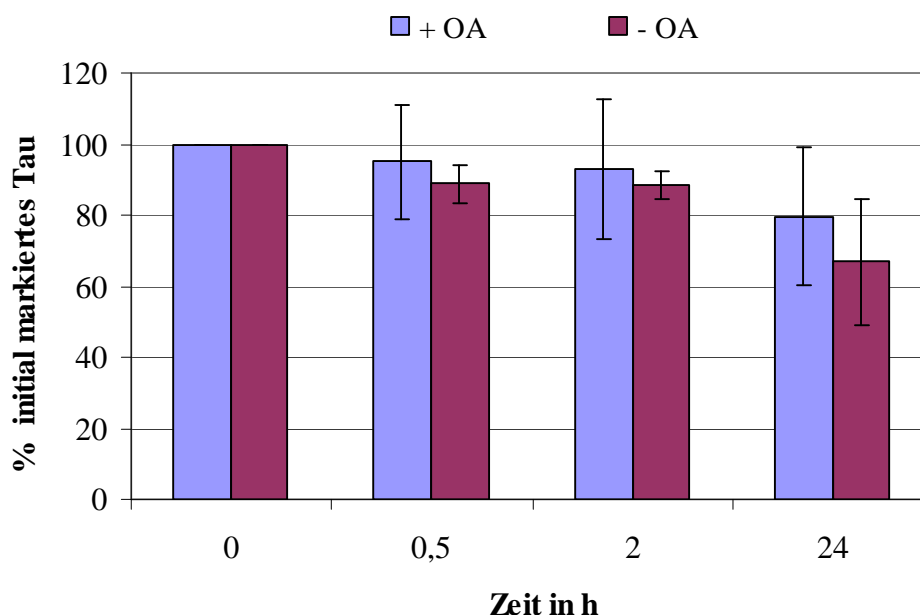


Abbildung 3.2-18 Tau-Turnover in HT22-Zellen nach Hyperphosphorylierung mit Okadaic Acid Zum Zeitpunkt 0 Stunden waren die Zellen entweder mit 500 nM OA oder DMEM-Medium vorinkubiert worden, bevor sie zu den entsprechenden Zeitpunkten aufbereitet und analysiert wurden.

Eine Hemmung der Proteinphosphatase 1 und 2A/B verzögerte den Abbau des Tau-Proteins nach 30 Minuten um 6,2 % von 88,8 % auf 95,0 % initial markiertes Tau. Nach 2 Stunden war der Turnover zu 4,5 % vermindert und um bis zu 12,8 % auf 79,6 % nach 24 Stunden im Vergleich zur physiologischen Turnoverrate von 66,8 %. Es zeigte sich also, dass „hyperphosphoryliertes“ Tau-Protein in HT22-Zellen langsamer verstoffwechselt wurde und die Turnoverrate dadurch um bis zu 12 % sinken kann.

3.2.4.4 Aktivität 20S Proteasom

Nachfolgend wurde die Messung der Aktivität des 20S Proteasoms, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, durchgeführt (siehe Abb. 3.2-19).

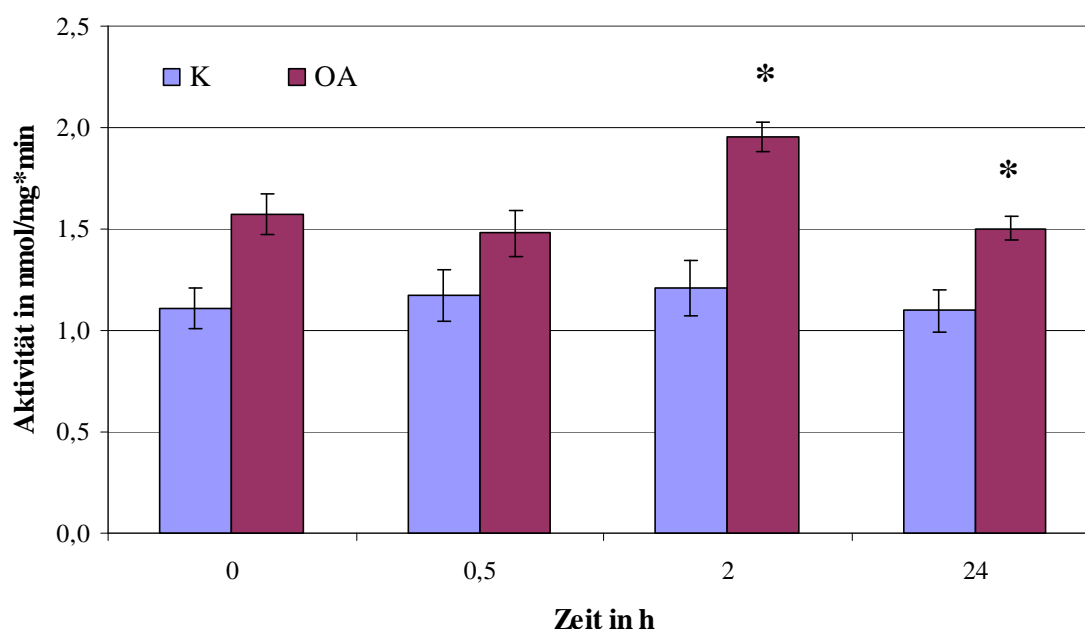


Abbildung 3.2–19 Aktivität des 20S Proteasoms nach 3-stündiger Inkubation mit 500 nm Okadaic Acid HT22-Zellen wurden 3 Stunden lang mit (OA) oder ohne (K) Okadaic Acid in Medium inkubiert und anschließend gleich geerntet oder für weitere 30 Minuten, 2 bzw. 24 Stunden in Medium inkubiert (n = 3).

Eine 3-stündige Vorinkubation mit 500 nm Okadaic Acid führte nicht zu einer Beeinträchtigung des 20S Proteasoms, sondern steigerte dessen Aktivität um 41,6 % auf 1,572 nmol/mg*min in HT22-Zellen. 2 Stunden und 24 Stunden nach Inkubationsende war die Aktivität in OA-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht und lag bei 1,955 nmol/mg*min bzw. 1,504 nmol/mg*min ($p < 0,05$).

Eine Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A mit Okadaic Acid führte nicht zu einer Hemmung des Proteasoms, sondern steigerte die Aktivität. Trotzdem konnte kein

verstärkter Abbau gemessen werden. Eine Untersuchung der Turnoverrate unter gleichzeitiger Hemmung der Proteinphosphatase durch OA und Hemmung des Proteasoms mit MG132 hätte klären können, ob der dennoch erfolgte geringe Turnover „hyperphosphorylierten“ Tau-Proteins ebenfalls durch das Proteasom erfolgte. Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Okadaic Acid, einem Inhibitor der Proteinphosphatase 1/2A, erfolgreich eine „Hyperphosphorylierung“ der Alzheimer-typischen Epitope erzielt wurde, also den Aminosäuren Serin 202, 214, 396, 404 und Threonin 181 und 212 des Tau-Proteins. Im Western Blot wurden Signale mit den phospho-spezifischen Antikörpern AT8, AT100, AT270 und PHF-1 erzeugt.

Eine Inkubation von HT22-Zellen mit OA in einer Konzentration von 1 μM und einer Dauer von 3 Stunden zeigte für alle vier phospho-sensitiven Tau-Antikörper ein deutliches Signal auf Höhe der Tau-Bande im Vergleich zu unbelasteten Kontrollzellen bei ausreichender Vitalität. Eine Konzentration von 500 nM erzielte die gleichen Effekte und wurde für die Durchführung der Tau-Turnover-Experimente eingesetzt. Es zeigte sich, dass posttranslationale Hyperphosphorylierung im Gegensatz zu Oxidation nicht zu einer bevorzugten Erkennung und nachfolgendem Abbau durch das Proteasom führte, sondern den Tau-Turnover in HT22-Zellen verlangsamte.

3.2.5 Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung und oxidativem Stress

Wie in Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.4.3 beschrieben, war unter oxidativer Belastung ein verstärkter Abbau des Tau-Proteins zu beobachten, während stark phosphoryliertes Tau nicht mehr so gut metabolisiert wurde. Es stellte sich nun die Frage, ob eine nachträgliche oxidative Modifizierung abnorm phosphorylierten Taus wieder zu einer normalen bzw. gesteigerten Abbaurrate führen würde. Es galt also zu untersuchen, wie und ob sich der Tau-Turnover verändert, wenn hyperphosphoryliertes Tau nachträglich oxidiert wird und ob eine nachgeschaltete Oxidation überhaupt noch Auswirkungen hat.

Um dies zu untersuchen wurden die Versuche aus Kapitel 3.2.2 und 3.2.4 miteinander kombiniert. Dazu wurden HT22-Zellen zuerst für drei Stunden mit 500 nM Okadaic Acid vorinkubiert und dann zum Zeitpunkt 0 Stunden entweder mit PBS oder 1 mM H_2O_2 -

Lösung für 30 Minuten belastet, geerntet oder in Medium weiter inkubiert und zu den üblichen Zeitpunkten geerntet (1/2, 2 und 24 Stunden).

3.2.5.1 Vitalität

Untersuchungen zur Vitalität zeigten, dass eine Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A mit anschließendem oxidativen Stress in HT22-Zellen in den ersten 2 Stunden gut vertragen wurden (Vitalität 83,0 %), während nach 24 Stunden ein Abfall der Vitalität auf 52,1 % zu verzeichnen war (siehe Abb. 3.2-20).

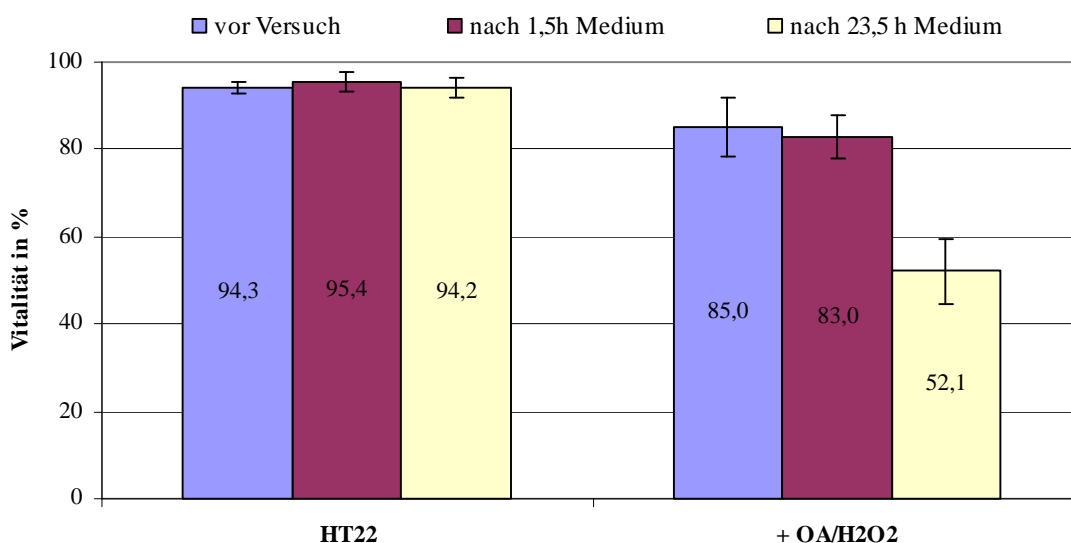


Abbildung 3.2-20 Vitalität von HT22-Zellen nach 3 Stunden Okadaic Acid und anschließender H₂O₂-Behandlung.

3.2.5.2 Turnover

Im Anschluss daran wurden Untersuchungen zum Tau-Turnover des Tau-Proteins vorgenommen. HT22-Zellen wurden wie in den Experimenten zuvor radioaktiv markiert, dann für 3 Stunden mit Okadaic Acid vorbehandelt und anschließend entweder geerntet, für 30 Minuten mit PBS oder H₂O₂ belastet, in Medium weiter inkubiert oder geerntet. Der Stichprobenumfang *n* unter oxidativer Belastung ist in Tabelle 3.2-8 aufgeführt.

Tabelle 3.2-8 Stichprobenumfang *n*

Zeitwert		0 h	30 min	2 h	24 h
+ H ₂ O ₂	- OA n =	12	5	3	8
	+ OA n =	13	7	7	7

Es zeigte sich, dass eine einer Hyperphosphorylierung nachgeschaltete Oxidation des Tau-Proteins keinen Verstärkten Abbau, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, bewirkte. Vielmehr konnte gar kein Abbau beobachtet werden, denn nach 24 Stunden waren statistisch 102,6 % des markierten Tau-Proteins noch detektierbar, während ohne OA-Behandlung nur noch 41 % gemessen wurden (siehe Abb. 3.2-21).

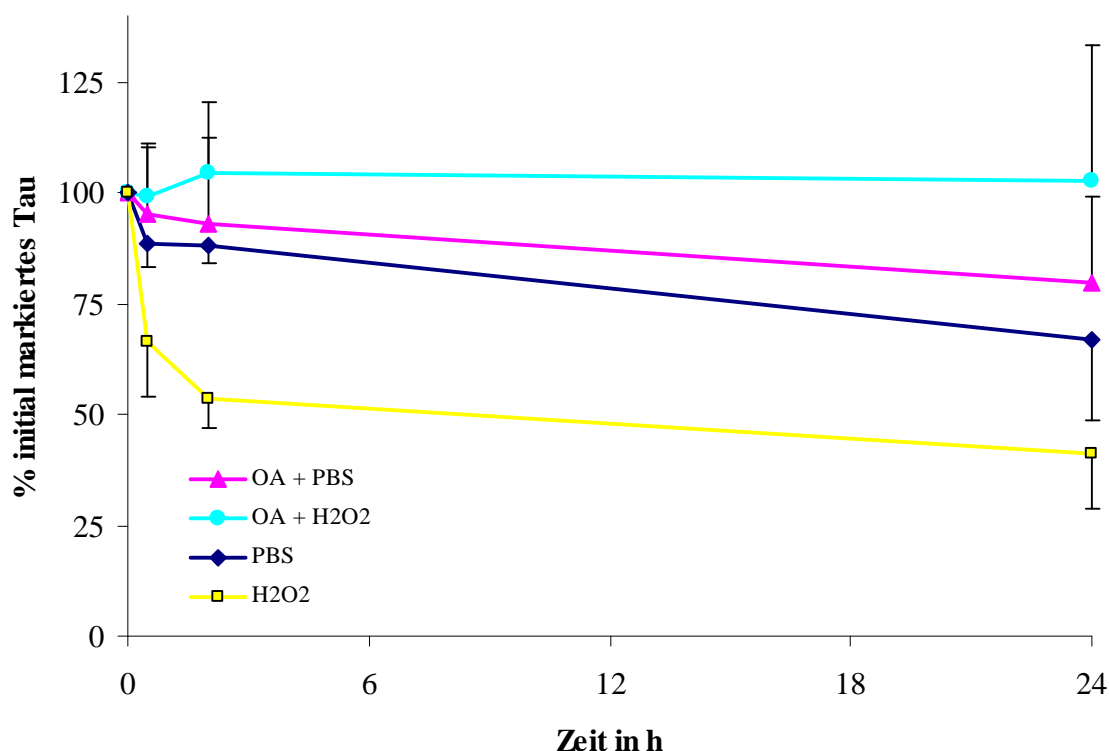


Abbildung 3.2–21 Tau-Turnover mit und ohne oxidativem Stress nach Hyperphosphorylierung

Im Vergleich zu den Versuchen aus den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.4, in denen keine Oxidation bzw. Hyperphosphorylierung erfolgte, zeigte sich, dass eine Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A unabhängig von oxidativer Modifikation zu einem verminderten Abbau des Tau-Proteins führte. 24 Stunden nach Behandlung mit OA wurden in HT22-Zellen lediglich 21,4 % statt 33,2 % markierten Taus abgebaut. Eine nachträgliche Oxidation verstärkte diesen Effekt noch und in mit OA und H₂O₂ behandelten Zellen fand gar kein Abbau mehr statt. Einen den Turnover des Tau-Proteins beschleunigenden Effekt, fand unter oxidativen Bedingungen nicht mehr statt, wenn zuvor die Proteinphosphatase durch Okadaic Acid gehemmt war.

In Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, dass ein verstärkter Abbau des Tau-Proteins in oxidativ belasteten HT22-Zellen zu beobachten war und der Effekt durch Hemmung des 20S Proteasoms aufgehoben werden konnten. In diesem Versuch hat oxidativer Stress die durch OA-Behandlung verursachte Hemmung des Tau-Abbaus jedoch noch verstärkt. Da unter vorheriger Hyperphosphorylierung gar kein Abbau mehr gemessen werden konnte, wenn die Zellen mit H_2O_2 belastet wurden, wurde erneut die Aktivität des 20S Proteasoms unter diesen Bedingungen untersucht.

3.2.5.3 Aktivität des 20S Proteasoms

Nachfolgend wurde die Messung der Aktivität des 20S Proteasoms, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, durchgeführt (siehe Abb. 3.2-22).

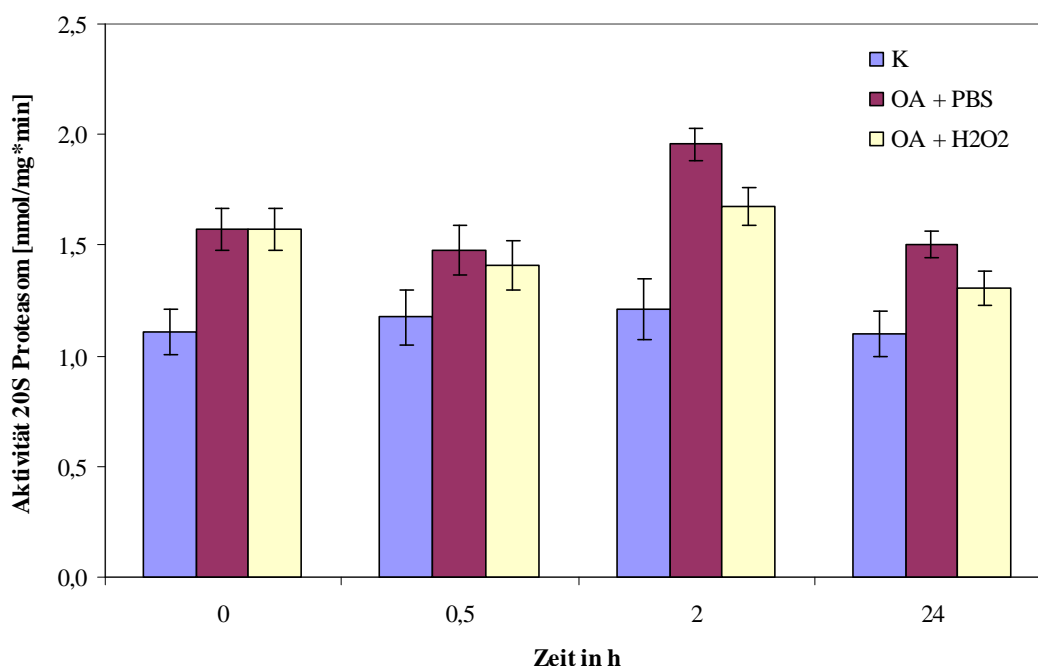


Abbildung 3.2–22 Aktivität des 20S Proteasoms nach 3-stündiger OA-Inkubation mit oder ohne H_2O_2 -Belastung

Es zeigte sich, dass, wie auch in den Untersuchungen mit ausschließlicher OA-Behandlung, eine Hyperphosphorylierung mit anschließender oxidativer Belastung die Aktivität des 20S Proteasoms in HT22-Zellen nicht beeinträchtigte. Wie auch unter alleiniger OA-Behandlung war die proteasomale 20S Aktivität durchweg erhöht im Vergleich zu Kontrollzellen, lag jedoch ca. 5 % bis 14,3 % unter der Aktivität der OA-behandelten Zellen (die immer noch 26,2 % - 61,3 % höher war im Vergleich zur

Kontrolle). Eine Hemmung der Proteinphosphatase PP1/2A mit nachfolgender oxidativer Belastung führte nicht zu einer Beeinträchtigung der 20S Proteasomaktivität in HT22-Zellen.

3.2.5.4 Oxidationsstatus des Tau-Proteins

Zur Untersuchung der erfolgreichen Oxidation des Tau-Proteins wurden zwei Methoden durchgeführt, die auf dem Nachweis von Carbonylen beruhen. Zum einen sollten in einem speziellen Western Blot-Verfahren vorhandene Carbonyle semi-quantitativ nachgewiesen werden und zum anderen sollten die bei der Oxidation entstandenen Carbonyle mittels eines ELISAs quantifiziert werden.

Beide Methoden beruhen auf der Reaktion von Carbonylen mit zugefügtem Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu Hydrazone (DNP) und der anschließenden Detektion mittels anti-DNP-Antikörper. Die Versuche zur Messung der Carbonyle wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Tilman Grune, NWFZ der Charité Berlin in seinem Labor durchgeführt.

Beim Carbonyl-Immunoblot wurden die Proteinproben vor der Elektrophorese mittels Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert und das dabei entstandene Hydrazone (DNP) wurde nach dem Blotten mit einem anti-DNP-Antikörper detektiert. Leider ergaben diese Untersuchungen keine Aussagen und deshalb wurde die Quantifizierung mittels ELISA durchgeführt, wie in Kapitel 2.7 beschrieben.

Die Messung der Carbonyl-Konzentration der Lysate von HT22-Zellen ergab, dass die Proben, die mit Okadaic Acid vorbehandelt und anschließend für 30 Minuten mit H₂O₂ behandelt wurden, die höchsten Carbonyl-Werte ergaben, während eine alleinige Behandlung mit OA nicht zu verstärkter Carbonyl-Bildung führte im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise war zwischen den Lysaten, die mit H₂O₂ behandelt wurden, und derer nur mit OA-Behandlung kaum ein Unterschied in der detektierbaren Menge an Carbonylen zu verzeichnen.

Während der 30-minütigen Inkubation mit Wasserstoffperoxid sank der Gesamtcarbonylspiegel im Vergleich zur Kontrolle von 7,075 auf 6,26 pmol/mg Protein ab. Innerhalb der folgenden eineinhalb Stunden nach Entfernen des Oxidationsmittels allerdings erfolgte ein signifikanter Anstieg der Carbonylkonzentration ($p < 0,05$) auf 8,93

pmol/mg (siehe Abb. 3.2-23). 24 Stunden nach Versuchsbeginn hatte sich der Gesamtcarbonylspiegel wieder auf das Niveau der Kontrolle verringert (7,10 pmol/mg).

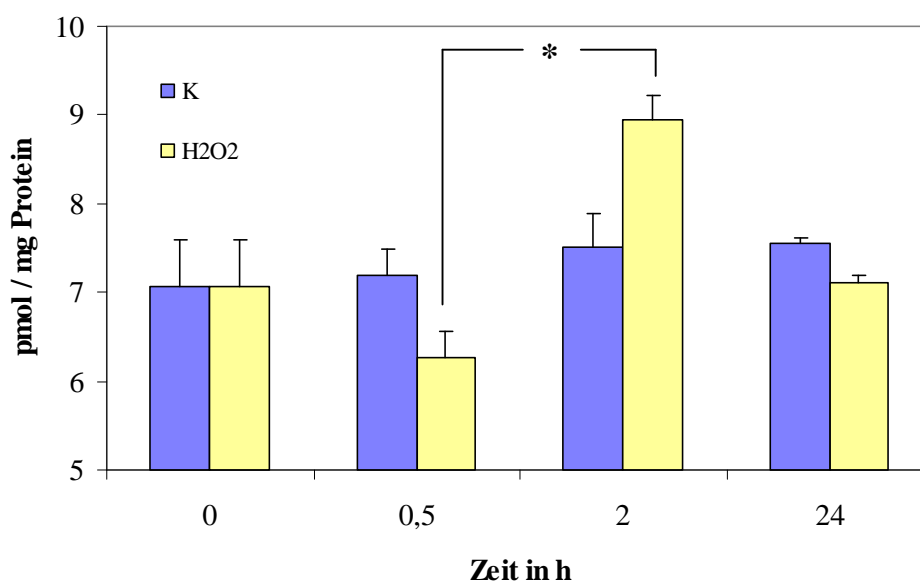


Abbildung 3.2–23 Bestimmung der Carbonyl-Konzentration im Gesamtlysate von HT22-Zellen.

Die Messung der Carbonyl-Konzentrationen von Tau-Isolaten ergab ein anderes Bild. Eine 30-minütige Behandlung mit H_2O_2 allein führte zu einem Anstieg der Carbonyl-Konzentration um das 12-fache von 0,061 pmol/mg vor Belastung auf 0,76 pmol/mg Tau-Protein nach 30 Minuten oxidativer Belastung (siehe Abb. 3.2-24).

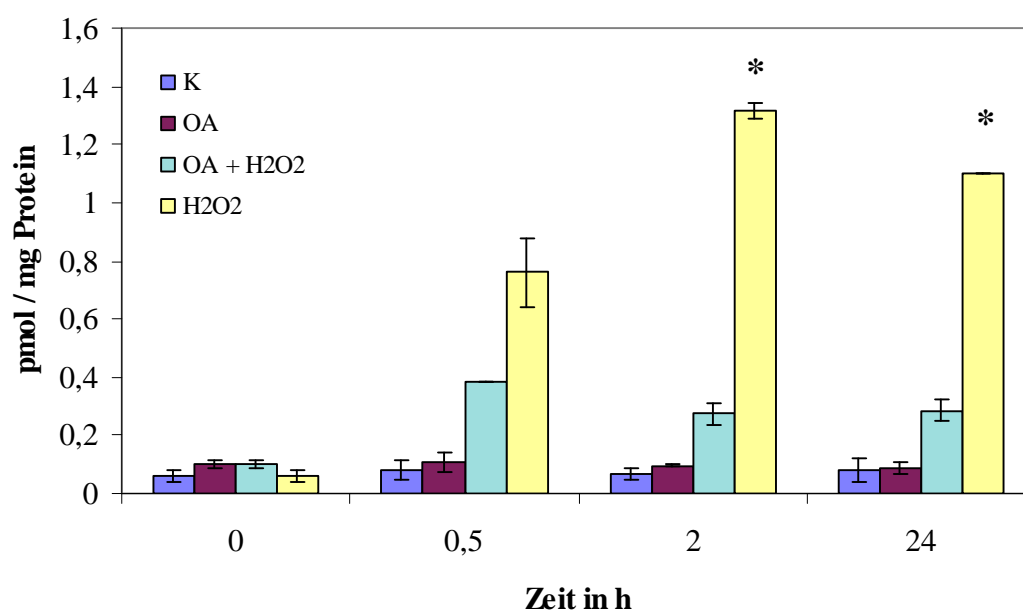


Abbildung 3.2–24 Bestimmung der Carbonyl-Konzentration im Tau-Isolat nach Inkubation mit Okadaic Acid und H_2O_2

Nach Entfernen des Oxidationsmittels wurde nach 2 Stunden ein hoch signifikanter Anstieg auf 1,318 pmol/mg Protein beobachtet ($p < 0,01$) im Vergleich zur Carbonyl-Konzentration in Kontrollzellen. Sogar 23,5 Stunden nach Entfernen des H_2O_2 war der Carbonylspiegel in dem Tau-Isolat noch signifikant erhöht ($p < 0,05$). Eine 3-stündige Vorinkubation mit OA erhöhte den Basiswert von 0,061 pmol/mg nur geringfügig auf durchschnittlich 0,099 pmol/mg. Eine anschließende oxidative Belastung gipfelte nach 30 Minuten in 0,385 pmol Carbonylen pro Milligramm Tau-Protein und sank dann wieder auf 0,274 pmol/mg. Eine Vorinkubation mit Okadaic Acid unterband somit eine nachträgliche Modifikation des Tau-Proteins durch oxidative Belastung. Ein Anstieg der Carbonyl-Konzentration fand nach 2 Stunden nur um Faktor 1,6 im Vergleich zu Faktor 12 ohne OA-Behandlung statt.

Mit der ELISA-Technik wurde eine Aufoxidation zu Carbonylen untersucht. Eine Behandlung mit H_2O_2 resultierte erwartungsgemäß in einem starken Anstieg der Carbonyl-Konzentration im Tau-Isolat. Eine vorherige „Hyperphosphorylierung“ mit OA allerdings verhinderte eine Oxidation zu Carbonylen am Tau-Protein. Eine Belastung von HT22-Zellen mit oxidativem Stress resultierte also in einer Oxidation des Tau-Proteins.

3.2.6 Zusammenfassung II: Tau-Turnover in HT22-Zellen

Die Untersuchungen zum Turnover des Tau-Proteins in HT22-Zellen wurden nach den folgenden Parametern unterteilt:

- oxidativer Stress durch H_2O_2
- Einfluss der Hemmung des 20S Proteasoms
- Hyperphosphorylierung durch Okadaic Acid und
- Hyperphosphorylierung mit nachträglichem oxidativen Stress

Tabelle 3.2-9 stellt die Ergebnisse aus den Tau-Turnover-Experimenten unter den beschriebenen Bedingungen zusammen.

Tabelle 3.2-9 Tau-Turnover in HT22-Zellen

Zellen inkubiert mit ----- Menge Tau-Protein nach Abbau von	PBS +			H ₂ O ₂ +		
	--	MG132	+OA	--	MG132	+ OA
30 Minuten	88,8 %	94,2 %	95,0 %	66,4 %	83,9 %	99,0 %
2 Stunden	88,4 %	85,4 %	92,9 %	53,4 %	76,1 %	104,4 %
24 Stunden	66,8 %	74,8 %	79,6 %	41,0 %	67,6 %	102,6 %
48 Stunden	64,4 %			23,4 %		
72 Stunden	39,8 %			9,8 %		
Halbwertszeit	62,3 h	> 24 h	> 24 h	8 h	> 24 h	Abbau ?

Eine Hemmung des 20S Proteasoms mittels MG132 hob den verstärkten Abbau-Effekt durch H₂O₂ auf. Eine Behandlung mit OA verzögerte den Turnover stärker als die Hemmung des Proteasoms. Die Halbwertszeit des Tau-Proteins lag physiologisch bei 62,3 Stunden und verkürzte sich unter oxidativem Einfluss auf 8 Stunden. Bei der Behandlung mit MG132 und OA wurden keine exakten Daten ermittelt, aber die Halbwertszeit betrug mehr als 24 Stunden. Bei einer Inkubation mit OA und nachfolgend mit H₂O₂ war kein Abbau zu messen und folglich auch keine Halbwertszeit.

Die Aktivität des 20S Proteasoms unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ist in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.2-10 Proteasomaktivität in HT22-Zellen

Zellen inkubiert mit	PBS +				H ₂ O ₂ +		
	--	MG132 1 h	MG132 24 h	OA	--	MG132 1 h	OA
Zeitpunkt 0	100,0	32,0	100,0	100,0	100,0	32,0	100,0
30 Minuten	105,8	26,0	o. A.	94,2	111,8	34,4	89,6
2 Stunden	109,2	50,0	o. A.	124,4	101,1	70,6	106,6
24 Stunden	98,9	81,9	22,0	95,7	124,1	78,9	83,1

Eine 1-stündige Vorinkubation mit 0,5 µM MG132 erzielte keine anhaltende Hemmung des 20S Proteasoms, während eine Inkubation über die Versuchsdauer hinweg die Aktivität um 78 % erniedrigte. Eine Konzentration von 10 µM hemmte das 20S Proteasom noch

effektiver, so dass 24 Stunden nach Versuchsbeginn kein Abbau des Tau-Proteins mehr gemessen werden konnte. Im Vergleich zeigte sich das 20S Proteasom aktiver als das 26S Proteasom.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

- erfolgreich eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Tau-Turnovers in kultivierten HT22-Zellen entwickelt wurde.
- unter allen Versuchsbedingungen die Zellen ausreichend vital waren. Lediglich der 24-Stunden-Wert der Inkubation mit 500 nM Okadaic Acid und nachfolgender 1 mM H₂O₂-Behandlung beeinträchtigte die Überlebensrate von HT22-Zellen.
- bei Verwendung von 500 nM OA die alzheimerspezifischen Epitope des Tau-Proteins in HT22-Zellen „hyperphosphoryliert“ wurden. Als Folge davon wurde der Tau-Turnover annähernd komplett gehemmt bei gleich bleibender Tau-Konzentration in den Zellen.
- oxidative Belastung von HT22-Zellen zur Carbonyl-Bildung am Tau-Protein führte, eine vorherige Behandlung mit OA zur Phosphorylierung des Tau-Proteins allerdings die Auroxidation zu Carbonylen unterband.
- oxidative Belastung von HT22-Zellen in einem signifikant gesteigerten Tau-Turnover resultierte, der durch Hemmung des Proteasoms aufgehoben werden konnte. Die Tau-Konzentration in den Zellen blieb dabei unverändert.
- die Aktivität des 20S Proteasoms lediglich durch Verwendung des Inhibitors MG132 beeinflusst wurde, nicht aber durch oxidativen Stress oder „Hyperphosphorylierung“.
- anhand des Tau-5-Antikörpers gezeigt werden konnte, dass sich der Gehalt an Tau-Protein während der Versuche nicht änderte.

3.3 Turnover und Phosphorylierung des Tau-Proteins in primären Neuronen und organotypisch hippocampalen Schnittkulturen

3.3.1 Vergleich HT22-Zellen und primäre Neurone

In den nachfolgenden Versuchen sollte der Tau-Turnover in primären, ausdifferenzierten Neuronenkulturen und auch im komplexen Gewebeverband der Schnittkultur untersucht werden.

Da es sich bei HT22-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelte, wurde zuerst untersucht ob und wie sich der Turnover des Tau-Proteins *in vitro* unter „physiologischen“ Bedingungen von dem Turnover in einer ausdifferenzierten Primärkultur unterschied. Dazu wurden beide Kulturen für 72 Stunden mit [³H]-Lysin angereichertem Medium inkubiert und die Zellen anschließend zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 30 Minuten, 2 und 24 Stunden geerntet und analysiert. Beide Kulturen zeigten über einen Zeitraum von 24 Stunden eine Vitalität von > 90 % (siehe Abb. 3.3.-1).

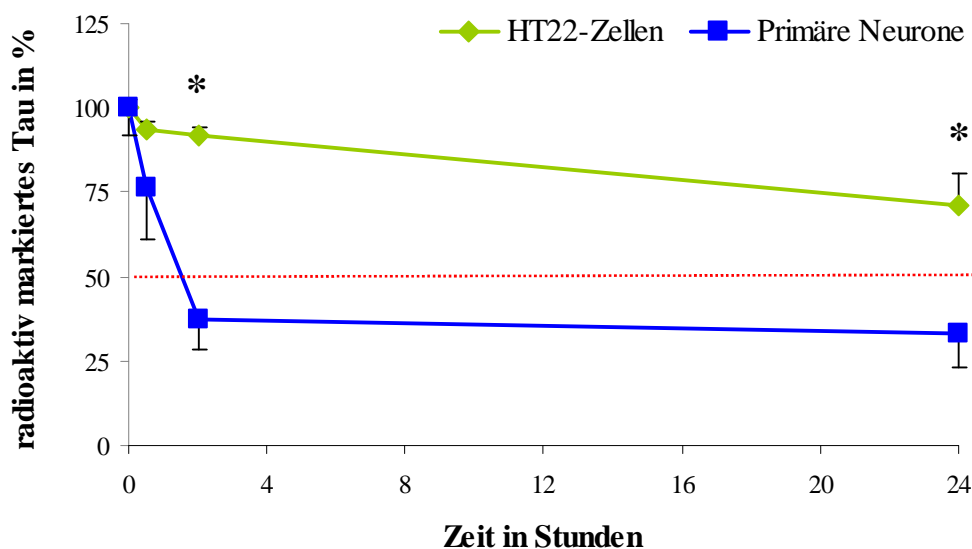


Abbildung 3.3–1 Vergleich des Tau-Turnovers in HT22-Zellen und primären Neuronen Der Turnover des markierten Tau-Proteins erfolgte in primären Neuronen (blauer Graph) wesentlich schneller als in HT22-Zellen (grüner Graph). Die Halbwertszeit lag bei 1,5 Stunden im Vergleich zu 62,1 Stunden in der Zelllinie. Die gemessenen Radioaktivität der Zeitwerte 2 und 24 Stunden war in primären Neuronen signifikant niedriger als in HT22-Zellen ($p < 0,05$).

Ein Vergleich des Abbaus von radioaktiv markiertem Tau-Protein in HT22-Zellen und primären Neuronen ergab, dass in der primären Zellkultur der Turnover signifikant schneller erfolgte. Bereits nach 30 Minuten waren nur noch 76,3 % (s.e. \pm 15,2 %) des initial gelabelten Taus zu detektieren im Vergleich zu 93,6 % (s.e. \pm 2,5 %) in HT22-Zellen. 2 Stunden nach Entfernen des radioaktiven Mediums und Beginn der Zeitmessung war bereits ein hoch signifikanter Unterschied im Turnover zwischen der primären kortikalen Neuronenkultur und der neuronalen hippocampalen Zelllinie zu erkennen ($p < 0,01$). 37,5 % (s.e. \pm 8,9 %) Radioaktivität im Tau-Isolat der Primärkultur wurden im Szintillator gemessen gegenüber 92,1 % (s.e. \pm 1,9 %) im Tau-Präzipitat der Zelllinie. Die nachfolgenden 24-Stundenwerte der Inkubation ergaben nur geringfügige Veränderungen. In der Primärkultur wurden in den folgenden 22 Stunden nur weitere 4 % des anfänglichen Tau-Proteins metabolisiert, so dass noch 33,4 % (s.e. \pm 10,1 %) radioaktives Tau detektiert werden konnten. In den HT22-Zellen wurden 21,6 % zusätzlich verstoffwechselt, aber dennoch war der 24-Stundenwert mit 70,8 % (s.e. \pm 9,6 %) signifikant größer als der, in der Primärkultur ($p < 0,05$). Die Berechnung der Halbwertszeit des Tau-Proteins in primären Neuronen ergab 90 Minuten und war somit um den Faktor 41,4 kleiner als in HT22-Zellen.

3.3.1.1 Primäre Neurone und oxidative Belastung

Wie auch in HT22-Zellen sollte der Einfluss oxidativer Belastung auf den Tau-Turnover in primären Neuronen gemessen werden. Dazu wurden die Zellen analog zu 3.2.2 mit 1mM Wasserstoffperoxid-Lösung für die ersten 30 Minuten nach Entfernen des radioaktiven Mediums belastet und die Kontrollzellen mit PBS. Danach erfolgte entweder die Ernte oder eine Weiterinkubation in Neurobasalmedium (siehe Abb. 3.3-2).

Da Primärkulturen empfindlicher sind als immortalisierte Zelllinien, verringerte eine Inkubation mit PBS die Vitalität der Zellen um ca. 15 % und mit Wasserstoffperoxid um ca. 40-50 %.

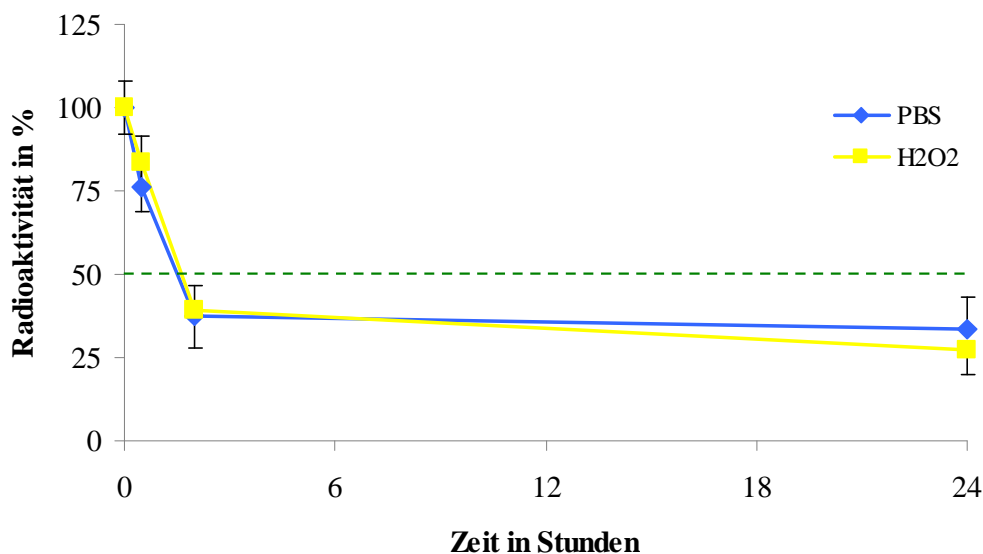


Abbildung 3.3–2 Inkubation primärer Neurone mit PBS oder 1 mM H₂O₂-Lösung für 30 Minuten Eine 30-minütige Belastung der Zellen und anschließender Inkubation in Medium führte zu keiner Änderung des Tau-Turnovers (gelber Graph) in primären Neuronen.

In primären Neuronen ergab eine 30 minütige Belastung der Zellen mit 1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung keine signifikante Änderung des Tau-Turnovers wie dies in HT22-Zellen zu beobachten war (siehe Kapitel 3.2.2.1). Die rechnerische Halbwertszeit des Turnovers in den Primärzellen nach Belastung lag bei 98 Minuten im Vergleich zu 90 Minuten in der Kontrolle.

3.3.1.2 Hemmung des 20S Proteasoms

In HT22-Zellen hatte sich gezeigt, dass das 20S Proteasom an dem Turnover des markierten Tau-Proteins beteiligt war (siehe Kapitel 3.2.2.2, 3.2.3.2 und 3.2.3.3). Um zu klären, ob das 20S Proteasom in primären Neuronen eine vergleichbare Funktion erfüllt, wurden die Zellen vor Beginn des Experiments mit 10 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 für 1 Stunde vorinkubiert und der Gehalt radioaktiven Taus wie in den vorherigen Experimenten bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde dabei nicht beeinträchtigt.

Eine Vorinkubation mit 10 μ M MG132 bewirkte, dass zum Zeitpunkt 0 Stunden der Ausgangswert radioaktiv markierten Tau-Proteins bereits 18,9 % (s.e. \pm 4,9 %) höher lag als in den Kontrollzellen. In den ersten 30 Minuten verringerte sich dieser Wert um 38,7 % auf 80,2 % (s.e. \pm 17,6 %) im Vergleich zu 76,3 % in den unbehandelten Zellen. Nach 2 Stunden war in diesen Zellen bereits die Halbwertszeit überschritten, es wurden nur noch

37,5 % radioaktives Tau-Protein gemessen und 33,4 % Radioaktivität nach 24 Stunden (siehe Abb. 3.3-3).

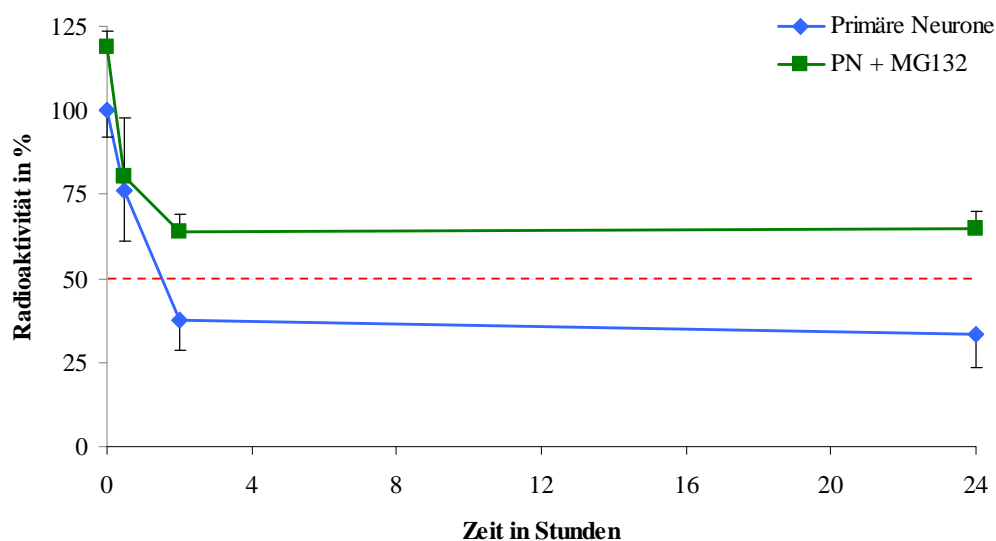


Abbildung 3.3-3 Tau-Turnover in primären Neuronen nach 60 Minuten Vorinkubation mit 10 μ M MG132 Eine Vorinkubation der Zellen führte zu einer Verminderung des Tau-Turnovers und mehr radioaktivem Tau-Protein (grüner Graph) in primären Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen.

In den MG132-behandelten Zellen konnte für die ersten 24 Stunden keine Halbwertszeit berechnet werden, da nach 2 Stunden noch 63,7 % (s.e. \pm 5,4 %) und nach 24 Stunden 64,8 % (s.e. \pm 5,4 %) Radioaktivität im Tau-Präzipitat detektiert wurden. Abgesehen von dem Messwert 30 Minuten, bei dem der Standardfehler etwas größer ausfiel, lagen die Meßwerte der mit MG132 inkubierten Zellen 18,9 % - 31,4 % höher und der Tau-Turnover war also im Schnitt um 25,5 % verringert. Somit wurde der Effekt des verminderten Tau-Turnovers durch Hemmung des 20S Proteasoms wie auch in HT22-Zellen bestätigt (siehe Kapitel 3.2.2.2).

In HT22-Zellen zeigte sich ein starker Effekt der Proteasomhemmung vor allem in den mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen. In primären Neuronen jedoch konnte kaum eine Veränderung des Tau-Turnovers mit und ohne oxidativer Belastung gemessen werden. Auch eine Vorinkubation mit MG132 veränderte nicht den gemessenen Turnover unter Wasserstoffperoxid-Behandlung, lediglich den in den Kontrollzellen wie oben dargestellt.

3.3.1.3 Hyperphosphorylierung mit Okadaic Acid

Eine Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A bewirkte in HT22-Zellen, dass „hyperphosphoryliertes“ Tau-Protein kaum noch abgebaut wurde. Auch in der Primärkultur wurde der Turnover nach 3-stündiger Vorinkubation mit 500 nM Okadaic Acid und anschließender Kultivierung in Neurobasalmedium untersucht. Wie auch die Inkubation mit PBS beeinträchtigte die Inkubation mit OA die Vitalität der Zellen um bis zu 50 % nach 24 Stunden.

Wurden die primären Neurone vor dem Experiment für 3 Stunden mit 500 nM Okadaic Acid vorbehandelt, so erhöhte sich die Halbwertszeit geringfügig um 18 Minuten auf 108 Minuten gegenüber den Kontrollzellen. Da aber nach der Vorinkubation zum Zeitpunkt 0 des Experiments nur 83,4 % (s.e. \pm 16,9 %) radioaktives Tau detektiert wurden, lag die Halbwertszeit für diese Probe eigentlich bei 41,7 % auf der Prozentskala. Dieser Wert wurde aber nicht gemessen, weshalb die Halbwertszeit größer als 24 Stunden zu sein schien. Zum Zeitpunkt 2 Stunden wurden 46,9 % (s.e. \pm 9,1 %) und somit 9,4 % mehr markiertes Tau gegenüber den unbehandelten Zellen gemessen (siehe Abb. 3.3-4).

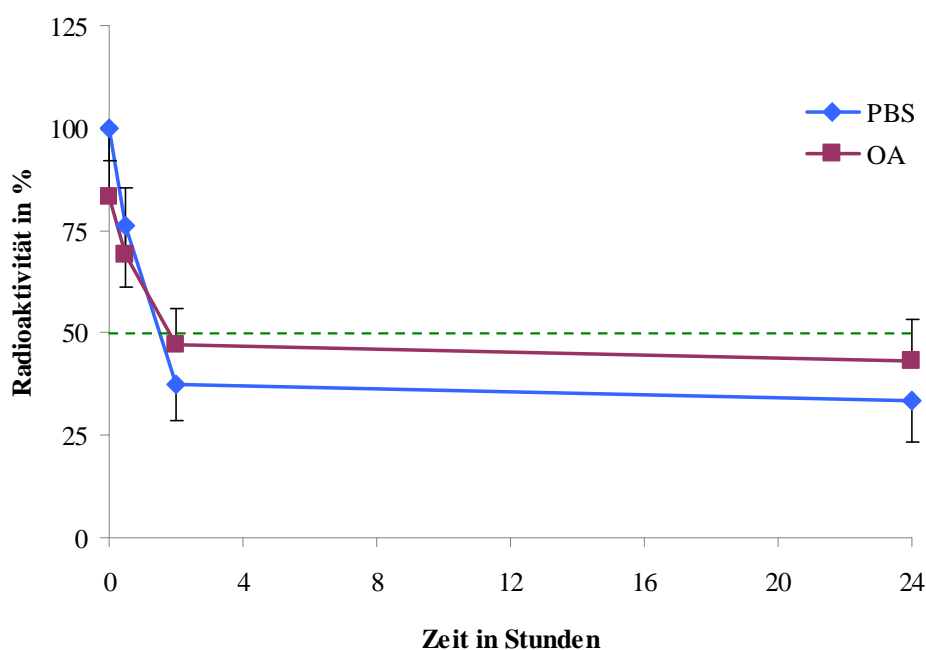


Abbildung 3.3-4 Turnover des Tau-Proteins nach Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A Eine Behandlung mit Okadaic Acid führte zu einem verminderten Turnover des Tau-Proteins (lila Graph).

Nach 24 Stunden war mit 43,2 % (s.e. \pm 9,9 %) der Gehalt an radioaktivem Tau-Protein immer noch um 9,8 % höher als in den Zellen ohne Okadaic Acid Vorinkubation. Der Proteinphosphatase-Inhibitor erniedrigte also die Turnover-Rate des Tau-Proteins um fast

die Hälfte. In den ersten zwei Stunden des Experiments wurden in unbehandelten Zellen 62,5 % markiertes Tau metabolisiert, in OA behandelten Zellen dagegen nur 36,5 %. Dies entsprach einer Verlangsamung des Tau-Turnovers um 58,4 %.

3.3.1.4 Hyperphosphorylierung und oxidativer Stress

In primären Neuronen zeigte eine H_2O_2 -Inkubation keinerlei Effekt auf den Tau-Turnover im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe 3.3.1.1). In HT22-Zellen war der verstärkte Tau-Turnover durch H_2O_2 nicht zu beobachten, wenn die Zellen zuvor mit OA behandelt wurden (siehe 3.2.5.2). Eine Vorinkubation mit Okadaic Acid ohne oxidativen Stress beeinflusste aber den Turnover in unbehandelten primären Neuronen wie auch in HT22-Zellen. Im folgenden wurde nun untersucht, ob in primären Neuronen eine nachträgliche oxidative Belastung den durch OA modifizierten Turnover beeinflusste. Wie auch unter H_2O_2 -Belastung alleine, hatte die nachträgliche Inkubation mit Wasserstoffperoxid eine bis zu 60 % letale Wirkung auf die Zellen nach 24 Stunden.

Im Vergleich zu Neuronen, die nur mit H_2O_2 belastet worden waren, waren der 30-Minuten- und der 2-Stunden-Wert nahezu identisch und nach 24 Stunden wurde in mit OA und H_2O_2 behandelten Zellen mit 36,0 % (s.e. $\pm 8,5$ %) geringfügig weniger radioaktives Tau detektiert (siehe Abb. 3.3-5).

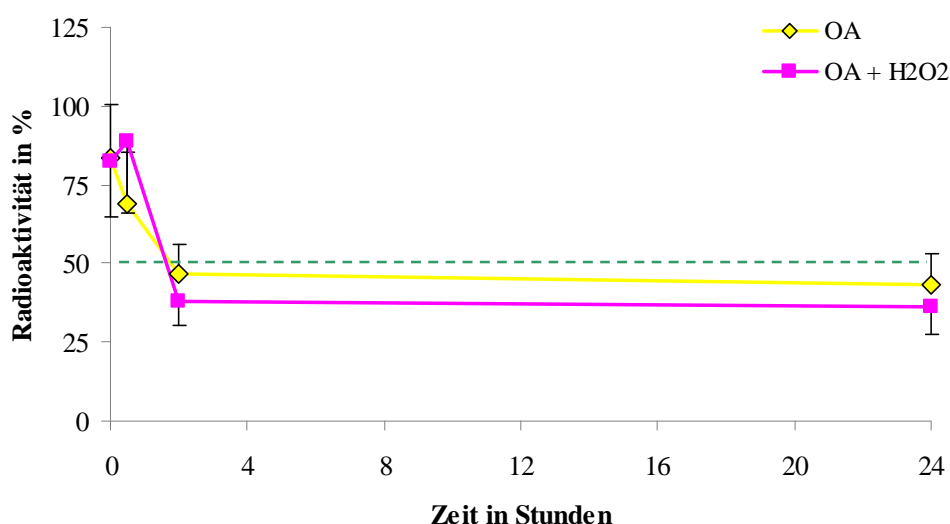


Abbildung 3.3-5 Vergleich des Tau-Turnover in primären Neuronen nach Behandlung mit Okadaic Acid und H_2O_2 .

Im Vergleich zu der Tau-Turnoverkurve nur mit Okadaic Acid, zeigte sich, dass der 2-Stunden- und der 24-Stunden-Wert um 8,7 % bzw. 7,2 % gesteigert waren. Somit wurden die gemessenen 9,7 % und 9,4 % Verringerung des Tau-Turnovers unter OA-Behandlung wieder nivelliert. Die Halbwertszeit verringerte sich wieder von 108 auf 99 Minuten. Eine nachträgliche Inkubation mit Wasserstoffperoxid hob den Effekt einer OA-Vorinkubation also wieder auf.

3.3.1.5 Nitrosativer Stress durch SNP

Ein weiteres Oxidanz, das von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzt wird, ist Stickstoffmonoxid (NO). Dabei wird NO enzymatisch über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gebildet, die durch LPS und andere inflammatorische Mediatoren während der Zellaktivierung induziert wird. In der Einzelzellkultur wurde NO durch Natriumnitroprussid (SNP) generiert. Der NO-Donator SNP wurde dazu in einer Konzentration von 20 μM zu den Zellen ins Medium gegeben und der Tau-Turnover beobachtet (siehe Abb. 3.3-6). Die Vitalität der Neurone blieb unbeeinträchtigt.

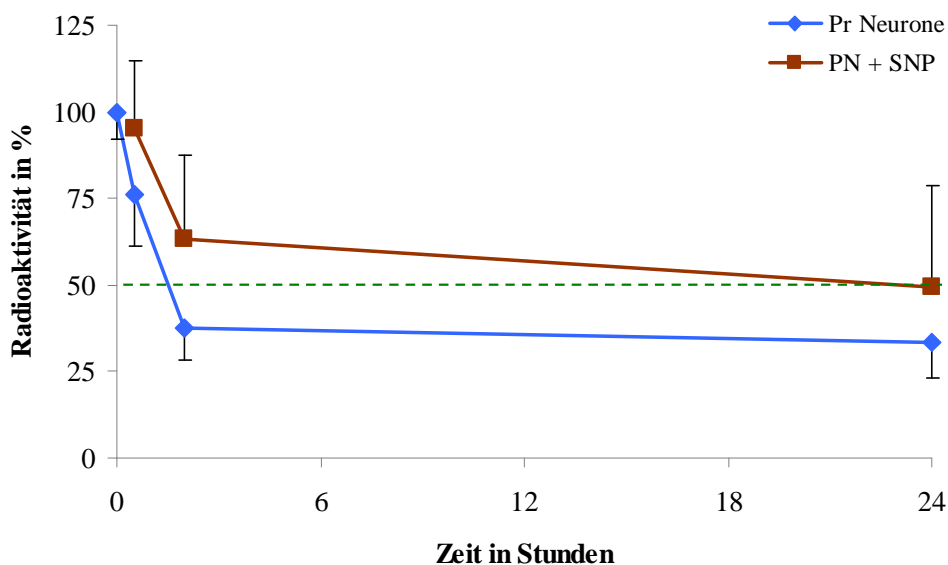


Abbildung 3.3-6 Tau-Turnover in primären Neuronen nach Inkubation mit 20 μM SNP.

Eine Inkubation primärer Neurone mit SNP verringerte den Turnover des Tau-Proteins im Vergleich zu Kontrollzellen. Nach 30 Minuten konnten statt 76 % (s.e. \pm 15,2 %) in den Kontrollzellen noch 94,9 % (s.e. \pm 19,7 %) des radioaktiv markierten Taus detektiert werden. Nach 2 Stunden war mehr als die Hälfte des unbehandelten Tau-Proteins bereits umgesetzt (37 % detektierbar, s.e. \pm 8,9 %), während in den mit SNP behandelten Zellen

noch 63,0 % (s.e. \pm 24,5 %) nachgewiesen werden konnten. 24 Stunden nach Beginn des Experimentes war erst gut die Hälfte (49,3 %; s.e. \pm 29,6 %) des Tau-Proteins in den mit SNP behandelten Zellen metabolisiert im Vergleich zu 33 % (s.e. \pm 10,1 %) in Kontrollzellen. Dies entsprach einer theoretischen Halbwertszeit von 23,5 Stunden. Somit hätte eine Inkubation primärer Neurone mit 20 μ M SNP eine 15-fach längere Halbwertszeit und einen verringerten Turnover des Tau-Proteins zur Folge im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

3.3.1.6 Zusammenfassung Tau-Turnover in primären Neuronen

- Generell verläuft der Turnover des Tau-Proteins in kortikalen primären Neuronen signifikant anders als in der hippocampalen Zelllinie HT22. Die Turnover-Rate war wesentlich höher und die berechnete Halbwertszeit des Tau-Proteins verringerte sich von 62,1 Stunden in der Zelllinie auf 90 Minuten in der Primärkultur.
- Eine oxidative Belastung mit Wasserstoffperoxid führte in primären Neuronen nicht zu einer zusätzlichen Steigerung des Turnovers. Die Kurve ähnelte der unter „physiologischen“ Bedingungen.
- Die Hemmung des 20S Proteasoms mit MG132 bewirkte wie auch in HT22-Zellen eine Verringerung des Tau-Turnovers, die Halbwertszeit vergrößerte sich auf $>$ 24 Stunden. Die Metabolisierung wurde jedoch nicht vollständig aufgehoben wie das in der Zelllinie zu beobachten war.
- Eine Inhibition der Proteinphosphatase 1/2A durch Okadaic Acid verringerte den Tau-Turnover in primären Neuronen, unterband ihn aber nicht gänzlich wie das in den HT22-Zellen beobachtet wurde. Dennoch war die Halbwertszeit des überphosphorylierten Tau-Proteins größer als 24 Stunden.
- Die nacheinander erfolgte „Hyperphosphorylierung“ und Oxidation des Tau-Proteins zeigte in der Primärkultur eine Aufhebung des OA-Effektes. Der Turnover war wieder leicht gesteigert und ergab Werte wie unter PBS-Inkubation. In HT22-Zellen jedoch hatte die nachträgliche Oxidation des überphosphorylierten Taus keine Turnover-steigernde Wirkung. Die beobachteten Effekte waren somit gegensätzlich.
- Die Behandlung mit dem NO-Donator SNP verringerte ebenfalls den Turnover des Tau-Proteins und vergrößerte die Halbwertszeit um Faktor 15 auf 23,5 Stunden.

3.3.2 Tau-Turnover in organotypisch hippocampalen Schnittkulturen

Die radioaktiven Experimente in primären Neuronen zeigten, dass der Turnover des Tau-Proteins in primären Neuronen sich vom dem Tau-Turnover in HT22-Zellen unterscheidet. Da beide Zellkultursysteme allerdings eine *In-vitro*-Situation darstellten, sollte abschließend der Turnover im komplexen Gewebeverband lebender Gehirnschnitte, also *ex vivo*, untersucht werden. Von den drei verwendeten Modellen, kommt dieses der *In-vivo*-Situation am nächsten.

Dazu wurden die wie unter Material und Methoden beschriebenen 9 Tage alten und in Slice-Medium inkubierten Hippocampuschnitte verwendet (siehe Kapitel 2.4.7). Die Untersuchungen an den Gehirnschnitten erfolgten analog denen in den voran gegangenen Experimenten. Am Tag 6 in Kultur wurde dem Slice-Medium [³H]-Lysin zugegeben und für 72 Stunden weiter inkubiert. Am Tag 9 erfolgten dann die Experimente.

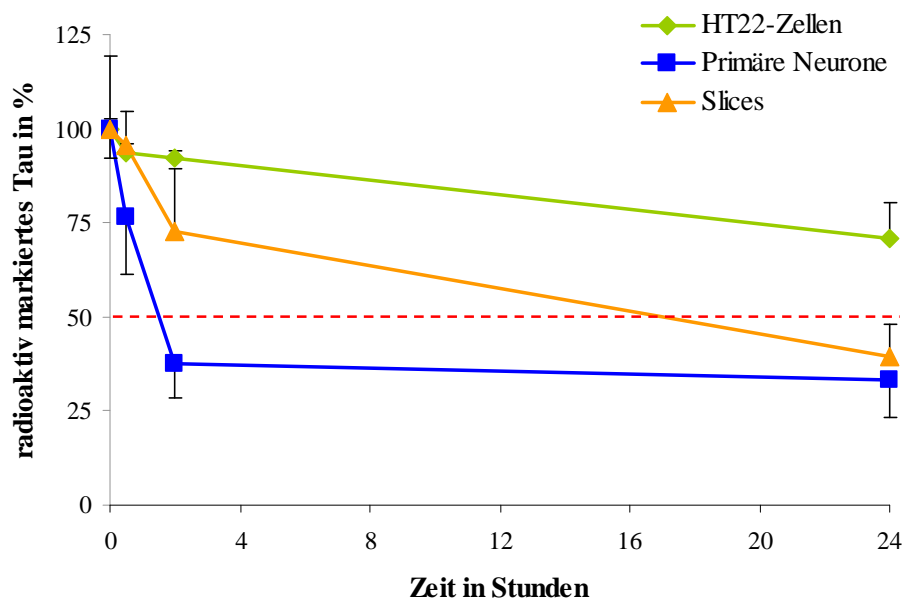


Abbildung 3.3–7 Übersicht des Tau-Turnovers in den drei unterschiedlichen Modellsystemen Der Turnover des markierten Tau-Proteins erfolgte in den Schnittkulturen (oranger Graph) schneller als in HT22-Zellen (grün) jedoch deutlich langsamer als in der neuronalen Primärkultur (blau). Die Halbwertszeit in den Schnittkulturen betrug 17,1 Stunden.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich 30 Minuten nach Entfernen des radioaktiven Mediums noch 95,6 % (s.e. \pm 9,2 %) des markierten Tau-Proteins in den OHSK detektieren ließen, 2 % mehr als in als der Zelllinie und 19,3 % mehr als in der primären Einzelzellkultur (siehe Abb. 3.3-7). 2 Stunden nach Versuchsbeginn wurden 72,5 % (s.e. \pm 16,6 %) Radioaktivität in dem Tau-Isolat der Hirnschnitte gemessen, 19,6 % weniger als in

HT22-Zellen, aber immer noch 35 % mehr als zum gleichen Zeitpunkt in der Primärkultur. Zum Zeitpunkt 24 Stunden waren noch 39,7 % (s.e. \pm 8,4 %) radioaktives Tau-Protein in den OHSK verblieben, 31,1 % weniger als in der Zelllinie und nur noch 6,3 % mehr als in primären Neuronen. Die errechnete Halbwertszeit des Tau-Proteins in der Gewebekultur betrug 17,1 Stunden und war somit um Faktor 11,4 größer als in der primären Einzelzellkultur und um den Faktor 3,6 kleiner als in der Zelllinie.

3.3.2.1 Tau-Turnover nach oxidativer oder nitrosativer Belastung

Analog zu den Versuchen in den neuronalen Primärzellen wurden auch die hippocampalen Schnittkulturen für 30 Minuten mit 1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung, 1,5 Stunden in einer 20 μ M SNP-Lösung oder zur Kontrolle mit PBS inkubiert und der Turnover des markierten Tau-Proteins gemessen (siehe Abb. 3.3-8).

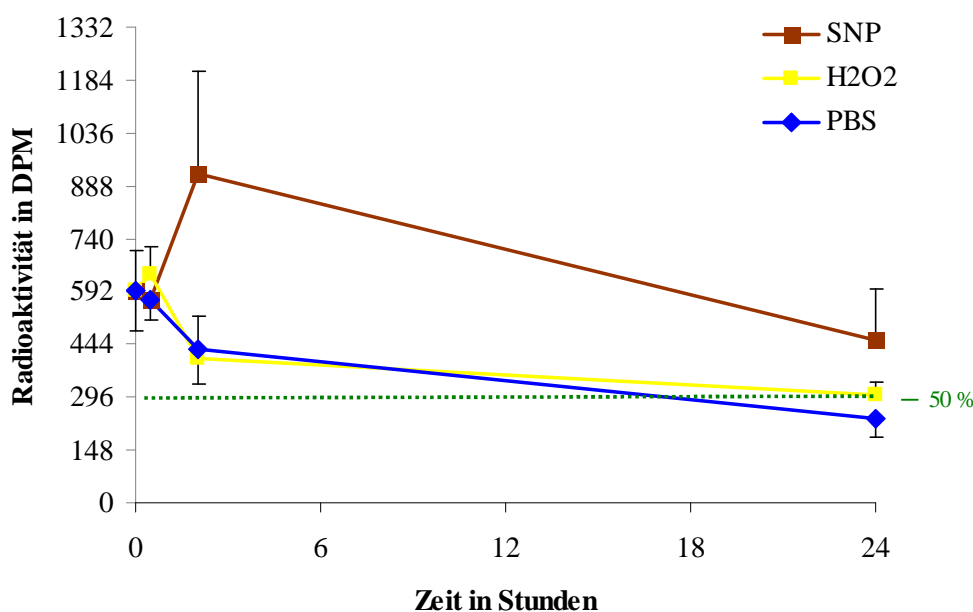


Abbildung 3.3-8 Tau-Turnover in OHSK nach oxidativem oder nitrosativem Stress Eine 30-minütige Inkubation mit H₂O₂ ergab keine signifikante Änderung des Tau-Turnovers (gelber Graph) gegenüber den unbelasteten Kontrollen (blauer Graph). Eine Inkubation mit SNP dagegen (brauner Graph) verlangsamte den Turnover.

Wie auch in den neuronalen Primärzellen beeinflusste eine oxidative Belastung den Tau-Turnover in den hippocampalen Hirnschnitten nicht. Somit konnte der Effekt, der durch Wasserstoffperoxid in HT22-Zellen beobachtet worden war, nicht bestätigt werden.

Nitrosativer Stress dagegen, erzeugt durch SNP, verringerte den Tau-Turnover, wie es auch in den primären Neuronen zu beobachten war. Zum Zeitpunkt 2 Stunden wurde fast doppelt soviel Radioaktivität in dem Tau-Isolat gemessen. Allerdings lag der

Stichprobenumfang nur bei $n = 2$ wodurch ein großer Standardfehler entstand. Nach 24 Stunden wurden 37,5 % mehr radioaktives Tau in den SNP-behandelten OHSK detektiert als in den unbehandelten Kontrollen. Eine Halbwertszeit für das Tau-Protein unter SNP-Einfluss konnte nicht errechnet werden, da binnen der ersten 24 Stunden die Tau-Konzentration nicht unter 50 % sank. Somit schien eine Inkubation SNP die Halbwertszeit des Tau-Proteins in OHSK von ca. 17 Stunden auf über 24 Stunden zu vergrößern.

3.3.2.2 Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung

Der Einsatz von Okadaic Acid zur Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A bewirkte in HT22-Zellen eine fast vollständige Hemmung des Tau-Turnovers und in primären Neuronen eine Reduktion um 58,4 %. Nun sollte untersucht werden, wie sich diese Behandlung in lebenden Gehirnschnitten auswirkte. Dazu wurden die Gewebeschnitte wie zuvor beschrieben vorbereitet und dann ebenfalls für 3 Stunden mit 500 nM OA inkubiert und anschließend der Turnover des Tau-Proteins gemessen (siehe Abb. 3.3-9).

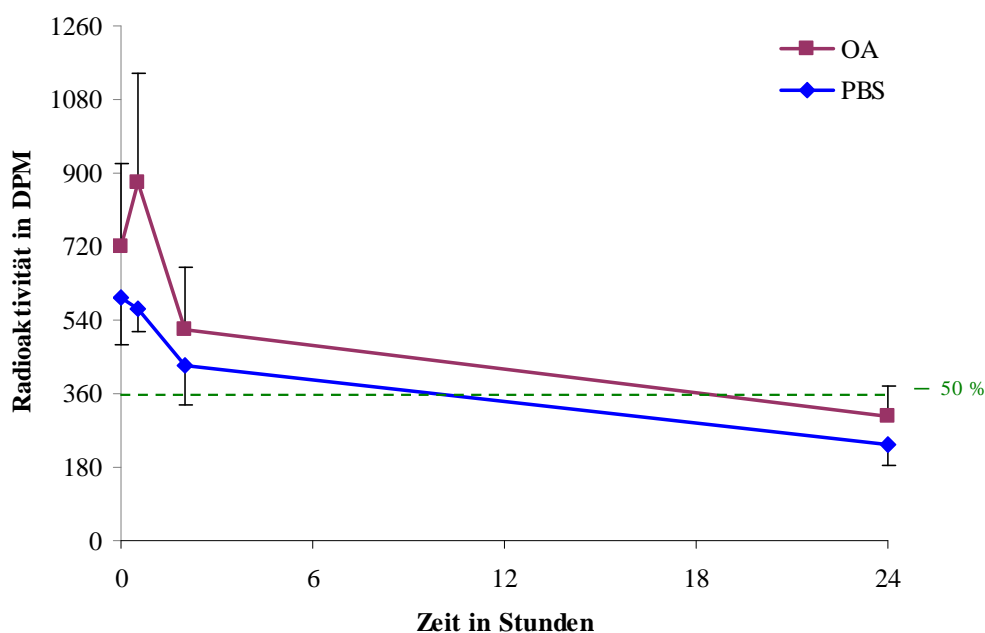


Abbildung 3.3-9 Tau-Turnover nach OA-Behandlung in Hirnschnitten Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollschnitten (blauer Graph) wurde Tau nach OA-Inkubation etwas langsamer metabolisiert (lila Graph).

Im Gegensatz zu den Messungen in primären Neuronen war in den Gewebeschnitten die Menge an radioaktivem Tau-Protein zum Zeitpunkt 0 Stunden mit 720 DPM um fast 21 % höher als in den Kontrollproben und nicht erniedrigt. Nach 30 Minuten wurde eine Zunahme der Radioaktivität mit großer Streuung verzeichnet und 2 Stunden nach Beginn

der Messung wurden 14,9 % mehr radioaktives Tau in den OA-behandelten Proben als in den Kontrollen detektiert. In beiden Versuchen wurde das Tau-Protein im weiteren Zeitverlauf in annähernd gleichen Raten metabolisiert, so dass nach 24 Stunden in den OA-inkubierten Schnitten mit 51,4 % immer noch 11,7 % mehr radioaktivtes Tau gemessen wurde. Die Halbwertszeit für „hyperphosphoryliertes“ Tau-Protein wurde bei 18,4 Stunden errechnet und war somit nur etwas länger als die berechneten 17,1 Stunden für Tau unter normalen Bedingungen. In den ersten zwei Stunden wurden nach OA-Behandlung 33,9 % des markierten Taus umgesetzt im Vergleich zu 27,5 %. Eine Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A bewirkte also eine geringere Steigerung des Turnovers phosphorylierten Tau-Proteins, obwohl in den OA-Proben stets mehr Radioaktivität gemessen wurde.

Wurden die Gehirnschnitte nach der 3-stündigen Inkubation mit OA auch zusätzlich für 30 Minuten mit oxidativem Streß belastet, so lagen der 30 Minuten- und der 2 Stunden-Wert zwar 18,1 % bzw. 16,7 % niedriger als in den OA-Proben, dennoch wurde zwischen den Werten ein Tau-Turnover-Rate von 60,5 % gegenüber 59,1 % in den nur mit OA behandelten Proben gemessen. Nach 24 Stunden lag der Turnover bei beiden Proben bei ca. 69 %. Somit zeigte sich, dass eine nachträgliche Oxidation keinen Effekt auf den Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung ausübte.

3.3.2.3 Ko-Kultivierung von organisch hippocampalen Schnittkulturen mit aktivierten Mikrogliazellen

Bei Schadensprozessen im Gehirn migrieren aktivierte Mikrogliazellen zum Schadensort. Im nachfolgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie sich aktivierte Mikrogliazellen auf den Turnover des Tau-Proteins nach unterschiedlichen Modifikation auswirken.

Dazu wurden OHSK wie oben beschrieben behandelt und zum Zeitpunkt 30 Minuten 1×10^5 aktivierte BV-2-Mikrogliazellen pro Schnitt dazu gegeben. Zu den Zeitpunkten 2 und 24 Stunden wurden die Kulturen geerntet und die Radioaktivität in den Tau-Isolaten bestimmt (siehe Abb. 3.3-10).

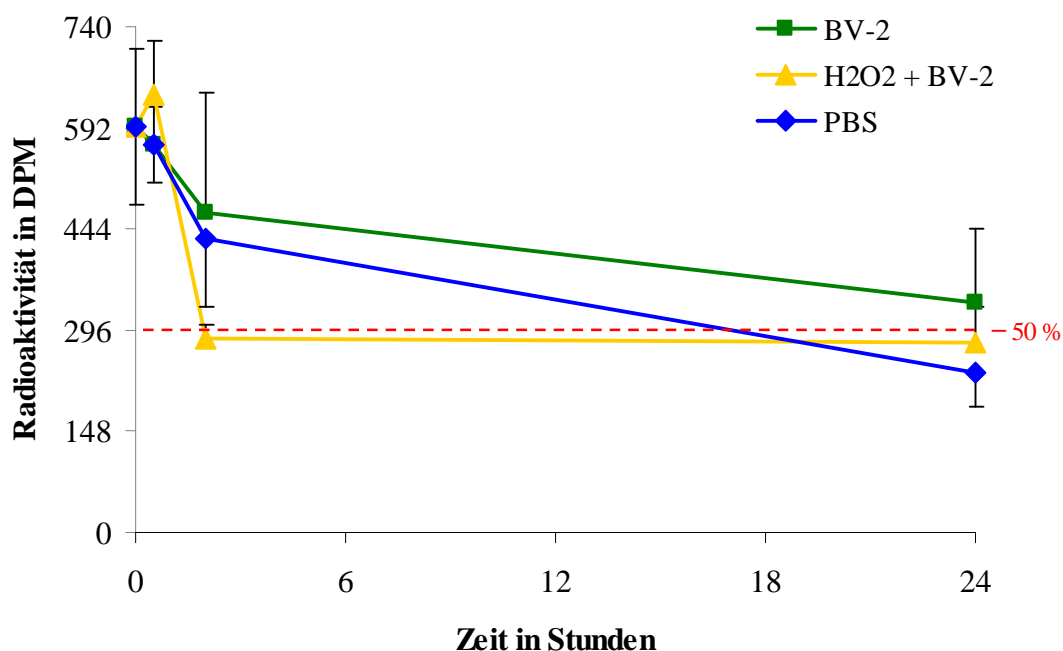


Abbildung 3.3–10 Tau-Turnover in OHSK nach oxidativem Stress und in Ko-Kultur mit BV-2 Zellen.

Unter normalen Bedingungen zeigte eine Kokultivierung mit aktivierten BV-2 Mikrogliazellen nur einen geringen Einfluss. Zum Zeitpunkt 2 Stunden waren nach Kokultivierung mit den Makrophagen 6,6 % weniger markiertes Tau-Protein metabolisiert, nach 24 Stunden waren es 17,1 %. Allerdings wiesen die Werte eine große Streuung auf und der Stichprobenumfang lag auch nur bei $n = 2$. Nach diesen Messungen hätte sich somit die Halbwertszeit des Tau-Proteins von 17,1 Stunden auf über 24 Stunden vergrößert und die BV-2 Zellen den Tau-Turnover verlangsamt.

Waren die Schnittkulturen zuvor jedoch für 30 Minuten mit Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt worden, verringerte sich die Halbwertszeit stark von über 24 Stunden auf nur noch ca. 2 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Menge des radioaktiven Tau-Proteins unter BV-2-Kokultivierung bereits rapide um 52,1 % auf 284 DPM verringert. Im Vergleich zu den Werten mit BV-2 Zellen alleine von gemittelt 469 DPM war der Wert um 31,1 % kleiner. Zum Zeitpunkt 24 Stunden wurden im Mittel 278 DPM gemessen, also hatte nahezu kein Turnover des markierten Tau-Proteins mehr statt gefunden.

Eine Kokultivierung der Gehirnschnitte mit aktivierten BV-2-Zellen wurde auch nach voran gegangener Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A durch Okadaic Acid untersucht. Die Behandlung mit OA allein hatte dazu geführt, dass zu allen Zeitpunkten mehr radioaktives Tau-Protein gemessen wurde (siehe Abb. 3.3-11).

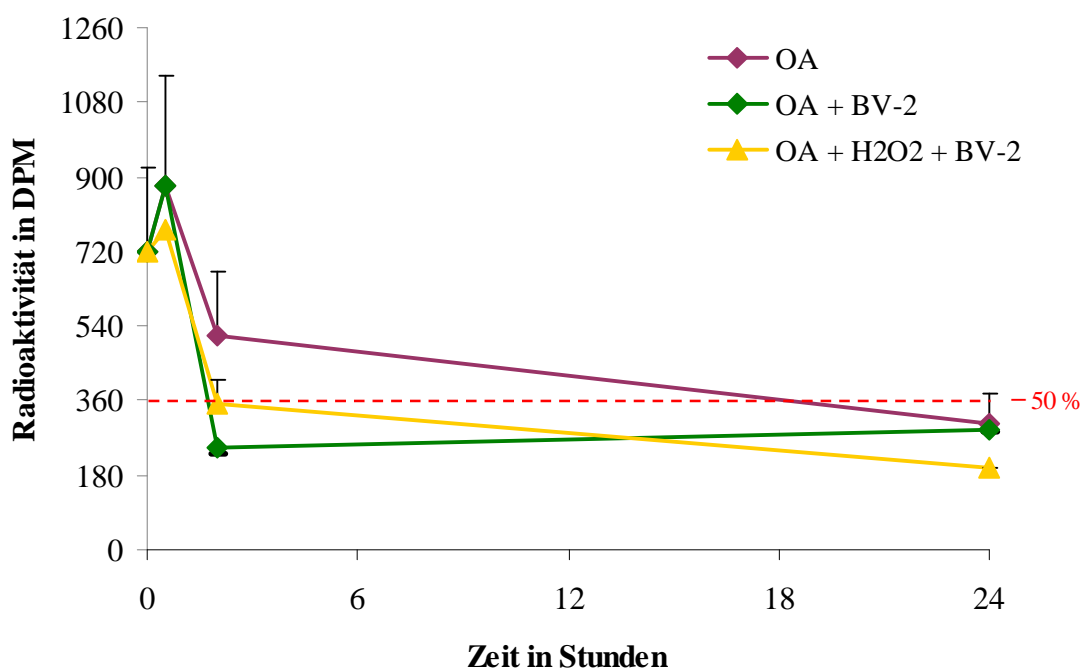


Abbildung 3.3–11 Tau-Turnover nach Hyperphosphorylierung und in Ko-Kultur mit BV-2 Zellen.

Die Kokultivierung mit BV-2-Zellen nach Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins ergab, dass zum Zeitpunkt zwei Stunden wesentlich mehr Tau-Protein metabolisiert worden war. Die Radioaktivität des OA-Tau-Isolats mit BV-2-Kokultivierung war um 274 DPM geringer, also 38 % weniger als ohne BV-2 Zellen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert stammten, lag bei $p = 0,07$ und die zwei Grundgesamtheiten waren somit beinahe signifikant verschieden. Die errechnete Halbwertszeit von 18,4 Stunden nach PP1/2A-Hemmung verkürzte sich auf 1,7 Stunden in Anwesenheit von aktivierten BV-2 Zellen.

Wurden die Gehirnschnitte nach der OA-Behandlung noch zusätzlich für 30 Minuten mit H_2O_2 behandelt bevor die aktivierten Mikrogliazellen hinzu gegeben wurden, so konnte keine weitere Steigerung des Tau-Turnovers beobachtet werden. Im Gegenteil, es wurden 14,6 % weniger Protein umgesetzt. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment war nach Hyperphosphorylierung und oxidativer Belastung kein verstärkter Turnover durch H_2O_2 bewirkt worden.

3.3.2.4 Tau-Turnover nach Inkubation mit verminderter Konzentration über einen längeren Zeitraum

Viele Prozesse im Gehirn finden langsam statt, also über einen längeren Zeitraum und in geringen Konzentrationen. In den bisherigen Experimenten handelte es sich ausschließlich um kurzzeitige Inkubationen. In dem nachfolgenden Abschnitt wurde untersucht, wie sich der Turnover des Tau-Proteins in hippocampalen Gehirnschnitten darstellt, wenn die Inkubationen über einen Tag, also 24 Stunden lang, in geringeren Konzentrationen erfolgten. Inkubiert wurde mit 10 nM Okadaic Acid und/oder 10 μ M MG132. Eine anschließende oxidative Belastung wurde wieder für 30 Minuten mit 1 mM Wasserstoffperoxid-Lösung durchgeführt und eine Kokultivierung mit aktivierten BV-2 Zellen mit 1×10^5 Zellen pro Schnitt ad 24 Stunden (siehe Abb. 3.3-12).

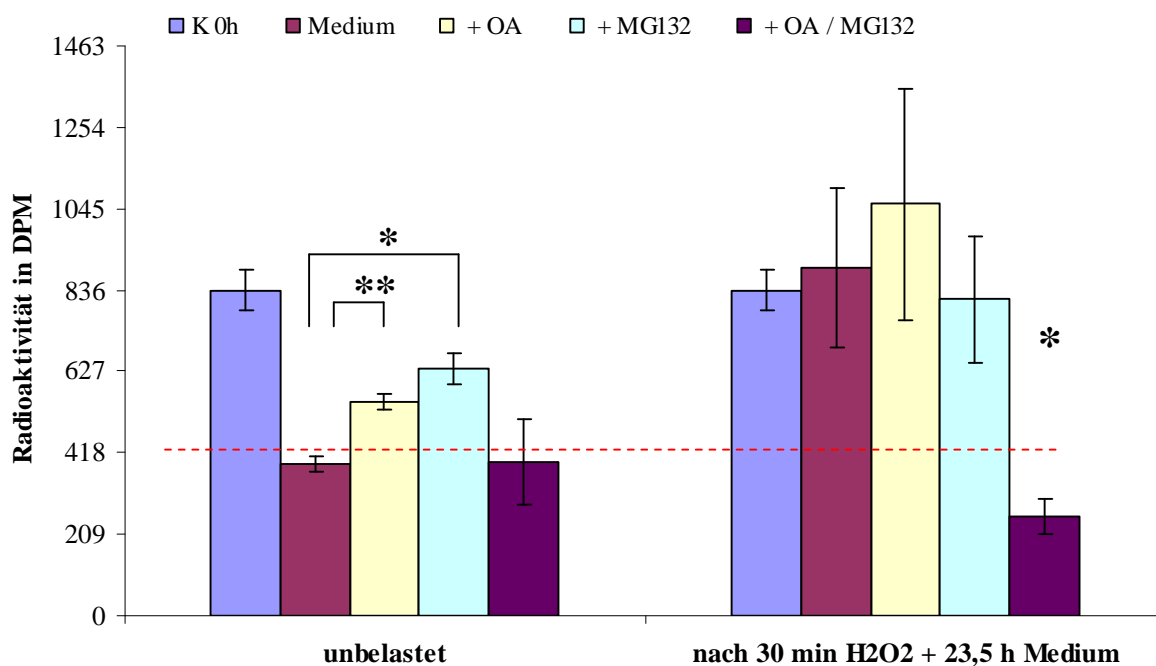


Abbildung 3.3–12 Tau-Turnover in OHSK nach 24-stündiger Inkubation mit niedrigen Konzentrationen.

In den unbehandelten Gewebeschnitten betrug die messbare Radioaktivität im Tau-Isolat nach 24 Stunden Inkubation statt 835 DPM nur noch 389 DPM (46,6 %; s.e. \pm 2,6 %) und die Halbwertszeit lag bei ca. 22,5 Stunden. Wurden die Proben über den gleichen Zeitraum mit 10 nM OA inkubiert, verringerte sich der Turnover und es wurden noch 550 DPM, also 65,8 % (s.e. \pm 2,3 %) markiertes Tau-Protein detektiert. Dies entsprach einer hoch signifikanten Verzögerung mit $p < 0,01$. Wurden die Schnitte mit dem Proteasom-Hemmer MG132 inkubiert, konnte ein noch stärker verringerter Turnover gemessen werden. Es

verblieben mit 635 DPM 76,1 % (s.e. \pm 4,9 %) initial markierten Taus. Auch dieses Ergebnis war signifikant verschieden ($p < 0,05$) von dem Turnover in den Kontrollgeweben. Eine Kombination des Protease- und des Proteasom-Inhibitors zeigte allerdings keine synergistische Wirkung. Die beiden Einzeleffekte schienen eher aufgehoben und der Turnover erreichte mit 396 DPM und 47,4 % (s.e. \pm 13,1 %) verbliebener Radioaktivität eine ähnliche Rate wie unter Kontrollbedingungen.

Wurden die Hirnschnitte nach den 24-stündigen Vorinkubation für die ersten 30 Minuten der Zeitmessung zusätzlich mit Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, so traten folgende Veränderungen auf: die gemessene Radioaktivität in den Tau-Isolaten der Medium-, Okadaic Acid- und MG132-Proben ergaben allesamt höhere Werte als in den Versuchen ohne oxidative Belastung. In den nicht vorinkubierten Proben nahm die Radioaktivität um 60,0 % (s.e. \pm 24,5 %) zu, in den OA-Proben um 60,8 % (s.e. \pm 35,7 %) und in den Proben, die mit MG132 vorinkubiert waren, wurde eine Zunahme von 21,1 % (s.e. \pm 19,3 %) gemessen. Lediglich die Belastung der ko-inkubierten Proben mit OA und MG132 zeigten eine Abnahme der Radioaktivität um 16,8% (s.e. \pm 5,5 %). Dieser Wert waren signifikant verschieden von dem der Proben, die nur mit MG132 vorinkubiert worden waren ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den Versuchen mit kurzer Vorinkubation, in denen eine oxidative Belastung keinerlei Effekt zeigte, wurde nach langer Vorinkubation eine enorme Zunahme der Radioaktivität nach oxidativer Belastung beobachtet.

Auch in diesen Versuchen mit langer Vorinkubation in geringerer Konzentration der Gewebeschnitte, sollte der Einfluss aktivierter BV-2 Mikrogliazellen auf den Turnover des Tau-Proteins untersucht werden. Dazu wurden wie in den voran gegangenen Versuchen mit OHSK 1×10^5 Zellen pro Schnitt ab dem Zeitpunkt 30 Minuten dazugegeben und bis zu 24 Stunden ko-kultiviert (siehe Abb. 3.3-13).

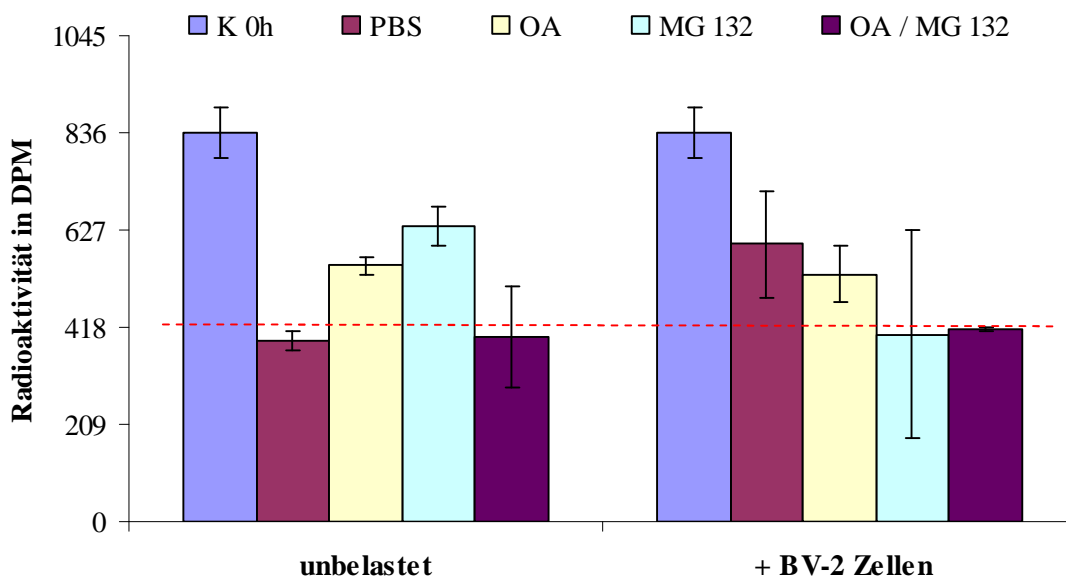


Abbildung 3.3–13 Inkubation Slices über Nacht

Wie auch in den vorherigen Ergebnissen mit kurzen Inkubationszeiten beschrieben, verlangsamte eine Kokultivierung der Gehirnschnitte mit aktivierten BV-2-Zellen den Tau-Turnover unter Normalbedingungen. 24 Stunden nach Zugabe der Zellen wurden 207 DPM (24,7 %, s.e. \pm 13,8 %) mehr Radioaktivität gemessen und die Halbwertszeit verlängerte sich von 22,5 Stunden auf über 24 Stunden. Bei den mit Okadaic Acid vorinkubierten Zellen wurde eine minimale Reduktion um ca. 17 DPM (2,1 %; s.e. \pm 7,4 %) beobachtet und bei den mit MG132 vorinkubierten Zellen wurde im Mittel eine Reduktion von 232 DPM (27,8 %; s.e. \pm 26,9 %) gemessen. Eine gemeinsame Vorinkubation von OA und MG132 zeigte keine Veränderungen und ergab mit 412,3 DPM (49,4 %; s.e. \pm 0,6 %) einen ähnlichen Wert wie ohne Kokultivierung mit den aktiven Makrophagen. Insgesamt zeigten die Werte starke Schwankungen und daher konnte kein direkter Effekt der aktivierten BV-2 Zellen festgestellt werden.

Eine Hemmung des 20S Proteasoms mit MG132 und der Proteinphosphatase 1/2A mit Okadaic Acid hatten also keinen Effekt auf einen möglichen Mikroglia-vermittelten Einfluss auf den Turnover des Tau-Proteins. Anders dagegen gestalteten sich die Ergebnisse, wenn vor der Zugabe der aktivierten Makrophagen die Gehirnschnitte oxidativ mit Wasserstoffperoxid belastet worden waren (siehe Abb. 3.3-14).

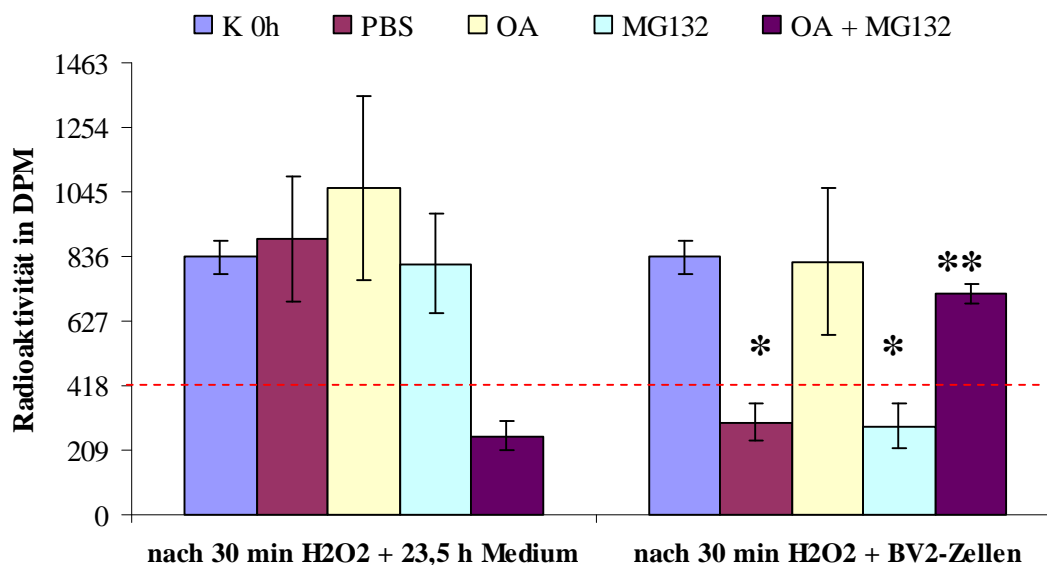


Abbildung 3.3–14 Slices nach Behandlung mit H₂O₂ und aktivierten BV2-Zellen

Wurden organotypisch hippocampale Schnittkulturen für 30 Minuten oxidativ belastet und dann mit aktivierten BV-2 Mikrogliazellen kokultiviert, so fand eine rapide Steigerung des Tau-Turnovers statt. Mit 300 DPM gegenüber 893 DPM direkt nach H₂O₂-Belastung war die gemessene Radioaktivität nach zusätzlicher BV-2-Kultivierung mit verbleibenden 36 % (s.e. ± 7,0 %) deutlich erniedrigt und signifikant verschieden ($p < 0,05$). Die Halbwertszeit reduzierte sich auf 18,7 Stunden. Waren die Hirnschnitte zuvor mit Okadaic Acid vorinkubiert worden, so verringerte sich der Radioaktivität um 238 DPM auf 819 DPM, was 98% (s.e. ± 28,5 %) der Ausgangsradioaktivität entsprach. Nach Vorinkubation mit MG132 und anschließender oxidativer Belastung erfolgte durch aktivierte BV-2 Zellen ebenfalls ein signifikant erhöhter Tau-Turnover ($p < 0,05$). Die gemessenen Radioaktivität im Tau-Isolat war mit 288 DPM um 62,8 % (s.e. ± 8,7 %) erniedrigt und in MG132-behandelten Proben konnte erstmals eine Halbwertszeit berechnet werden. Sie betrug mit 18,3 Stunden eine ähnliche Zeitspanne wie nicht vorinkubierte Gewebeschnitte. Ein hoch signifikant erhöhter radioaktiver Wert von 713 DPM und somit 85,9 % ($p < 0,01$; s.e. ± 3,7 %) der Ausgangsradioaktivität wurde nach gemeinsamer Vorinkubation von Okadaic Acid und MG132 gemessen. Die oxidative Belastung und die nachfolgende Inkubation mit den aktivierten Makrophagen führte zu einer Zunahme von 55,3 % und einer Verlängerung der Halbwertszeit von ca. 17,3 Stunden auf über 24 Stunden.

3.3.2.5 Zusammenfassung Tau-Turnover in OHSK

Tabelle 3.3-1 stellt die Ergebnisse aus den Versuchen mit den organisch hippocampalen Schnittkulturen übersichtlich dar.

Tabelle 3.3-1

	Kurzzeit – hohe Konzentration		Langzeit – niedrige Konzentration	
	HWZ Tau	Turnover Tau	HWZ Tau	Turnover Tau
Medium	17,1 h		22,5 h	
	+ SNP: > 24 h	↓	+ MG132: > 24 h	↓↓
OA	18,4 Stunden	↑	> 24 Stunden	↓↓↓
	höhere Radioaktivität zu Beginn		geringere Radioaktivität zu Beginn	
H₂O₂	ca. 17 h	→	> 24 h	∅ eher Einbau ???
			+ MG132: > 24 h	∅
H₂O₂ nach OA	wie OA, gleiche Turnover-Rate, H ₂ O ₂ keinen Effekt		> 24 h	∅ OA Effekt weg
			+ MG132: 17,3 h	↑↑
BV-2	> 24 h	↓	> 24 h	↓
BV-2 nach OA	1,7 h	↑	kein Effekt	→
			+ H ₂ O ₂ kein Effekt	→
BV-2 nach H₂O₂	ca. 2 h	↑	18,7 h	↑↑
			+ MG132: 18,3 h	↑↑

Turnover: ↑ erhöht, ↑↑ signifikant erhöht, ↓ erniedrigt, ↓↓ signifikant erniedrigt, ↓↓↓ hoch signifikant erniedrigt, → unverändert, ∅ kein Turnover,

- Ohne äußeren Einfluss wurde in organisch hippocampalen Schnittkulturen (OHSK) das Tau-Protein binnen 17,1 – 22,5 Stunden zu 50 % verstoffwechselt.
- Eine Belastung mit H₂O₂ führte kaum zu Veränderungen des Tau-Turnovers im Kurzzeit- und Langzeitversuch. Die signifikanten Ergebnisse der HT22-Versuche ließen sich nicht bestätigen.

- Die Messungen des Tau-Turnovers zeigten jedoch gegensätzliche Effekte für Kurzzeit- und Langzeitinkubationen mit Okadaic Acid. Im Kurzzeitversuch resultierte die erhöhte Konzentration in einer leichten Steigerung des Turnovers. Eine Langzeitinkubation mit einer sehr geringen Konzentration dagegen führte zu einer signifikanten Hemmung des Tau-Turnovers.
- Eine Hemmung des 20S Proteasoms mit MG132 allerdings führte im Langzeitversuch zu einer Verringerung des Tau-Turnovers. Waren die Zellen in den Versuchen mit niedrigen Konzentrationen jedoch nachträglich durch H₂O₂ oder OA geschädigt worden, so resultierte die Proteasomhemmung in einem gesteigerten Turnover des Tau-Proteins.
- Die nacheinander erfolgte „Hyperphosphorylierung“ des Tau-Proteins und oxidative Belastung der Zellen führte im Kurzzeitversuch nicht zu einer nachträglichen Steigerung des durch OA gehemmten Tau-Turnovers. Bei einer Langzeitinkubation jedoch führte eine nachgelagerte Oxidation zur Aufhebung der OA-induzierten Hemmung des Tau-Turnovers und resultierte in einer annähernd physiologischen Turnover-Rate.
- Eine Ko-Kultivierung von OHSK mit BV2-Zellen führte zu einer Verlangsamung des Tau-Turnovers. Nach Inkubation der OHSK mit OA im Kurzzeitversuch allerdings resultierte die Ko-Kultivierung mit BV2-Zellen in einem erhöhten Tau-Turnover. Im Langzeitversuch wurde die OA-induzierte Hemmung des Turnovers wieder aufgehoben. Oxidativer Stress verursachte im Ko-Kulturmodell mit BV2-Zellen eine signifikante Steigerung des Tau-Turnovers.

3.3.3 Phosphorylierung des Tau-Proteins in primären Zellen – optische Detektion

Um den Effekt aktivierter Mikrogliazellen und ihrer Ausscheidungsprodukte auf das Tau-Protein besser zu verstehen, wurde die Phosphorylierung von Tau in Western Blots analysiert. Experimente wurden wieder in primären Neuronen als auch in organotypisch hippocampalen Schnittkulturen durchgeführt.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins wurden verschiedene phosphorylierungsabhängige und -unabhängige Antikörper gegen diverse Epitope verwendet. Tau 1 erkennt das Epitop Ser202/Ser205 nur dephosphoryliert, sein Gegenspieler AT8 dasselbe Epitop nur phosphoryliert. AT100 ist ebenfalls ein phosphorylierungsabhängiger Antikörper gegen Epitop Thr212/Ser214 und Tau 5 ist phosphorylierungsunabhängig und erkennt die Region der Aminosäuren 210 bis 241 sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert.

3.3.3.1 Primäre Neurone mit Okadaic Acid - Bestimmung der Konzentration von OA zur Tau-Phosphorylierung per Western Blot

Zuerst wurde eine „Hyperphosphorylierung“ durch Okadaic Acid untersucht. Dazu wurden primäre Neurone über 24 Stunden mit dem Hemmer der Proteinphosphatase 1/2A in unterschiedlich niedrigen Konzentrationen von 10 – 50 nM inkubiert. Die Proben wurden anschließend lysiert und mittels Western Blot analysiert (siehe Abb. 3.3-15). Die Vitalität der Zellen unterschied sich bei den einzelnen Konzentrationen kaum und lag im Mittel bei 90,3 % (s.e. \pm 3,1 %)

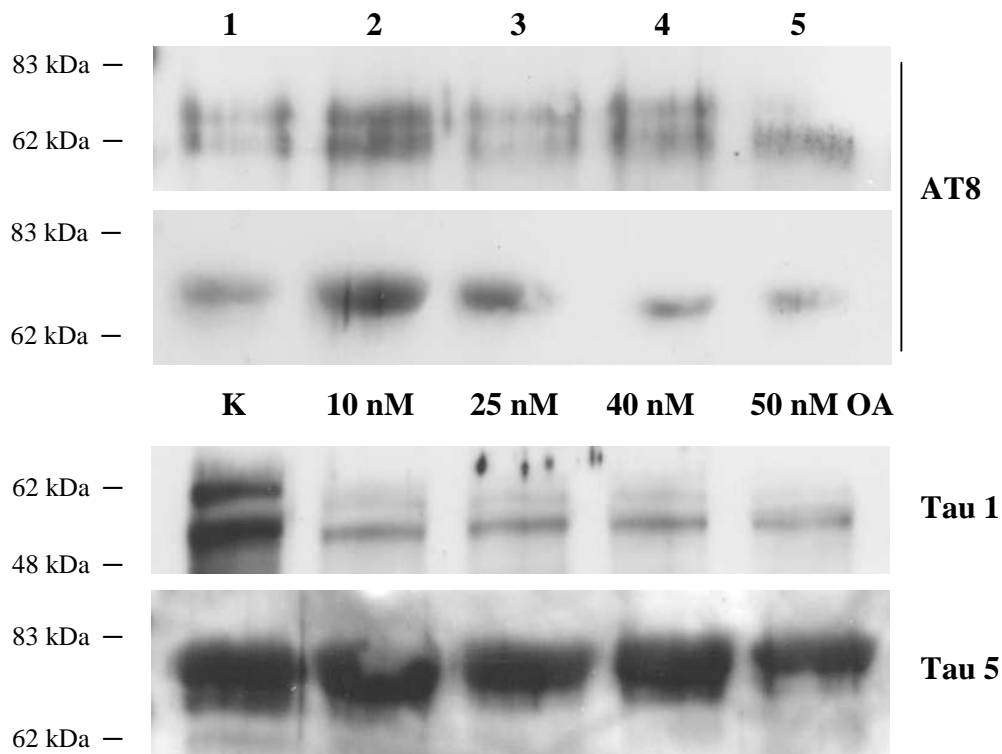


Abbildung 3.3–15 Inkubation primärer Neurone über 24 Stunden mit Okadaic Acid in unterschiedlichen Konzentrationen.

Der phosphorylierungs-abhängige Antikörper AT8 entwickelte das stärkste Signal bei den Proben, die mit 10 nM OA behandelt wurden (Bahn 2). Im obersten Blot zeigte die zweite Bahn die größte Intensität der Doppelbande bei 62 kDa und ca. 72 kDa. Im unteren AT8-Blot ließ sich nur die obere der beiden Banden bei ca. 72 kDa detektieren. Alle Banden waren intensiver als die Kontrolle auf Bahn 1 und auch hier zeigte die zweite Bahn mit 10 nM OA die stärkste Intensität.

Der Antikörper Tau 1, der das unphosphorylierte Tau-Epitop 189-207 erkennt, zeigte bei allen OA-behandelten Proben ein schwächeres Signal als bei der Kontrolle. In der Kontrolle war eine Doppelbande zu erkennen auf Höhe der Molekulargewichte 62 kDa und ca. 55 kDa. In den OA-Proben konnte die 55 kDa-Bande wesentlich schwächer detektiert werden und die Bande bei 62 kDa war fast ganz verschwunden, was auf eine Phosphorylierung des Tau-Epitops 189-207 schließen ließ. Bei den mit OA inkubierten Proben konnte also weniger unphosphoryliertes Ser202/205 detektiert werden als in der unbehandelten Kontrolle. Der Antikörper Tau 5, der an das Epitop 210-241 unabhängig des Phosphorylierungszustandes bindet, zeigte unveränderte Mengen des Tau-Proteins in allen Proben, auch nach Phosphorylierung. Somit schien eine Inkubation mit Okadaic Acid

nicht den Gehalt des Tau-Proteins in den Zellen zu beeinflussen. Da die zweite Bahn jeweils die stärkste Phosphorylierung zeigte, wurde für alle weiteren Versuche Okadaic Acid in einer Konzentration von 10 nM verwendet.

3.3.3.2 Inkubation mit SNP über 16 Stunden

Wie in den Turnover-Versuchen sollte nun auch untersucht werden, ob auch nitrosativer Stress die Phosphorylierung des Tau-Proteins in primären Neuronen beeinflusste. Dazu wurde über einen längeren Zeitraum von 16 Stunden zu den Zellen Konzentrationen von 1–20 μM SNP hinzu gegeben und die Zelllysate anschließend analysiert.

Bezüglich der Vitalität der Zellen zeigte eine Inkubation primärer Neuronen mit SNP über 16 Stunden in der Konzentration 1 μM bzw. 2 μM immer noch eine Vitalität von nahezu 100 % (s.e. \pm 4,9 %), eine Inkubation mit den Konzentrationen 5 μM , 10 μM und 20 μM dagegen verringerte die Vitalität leicht im Mittel auf 85,9 % (s.e. \pm 3,4 %).

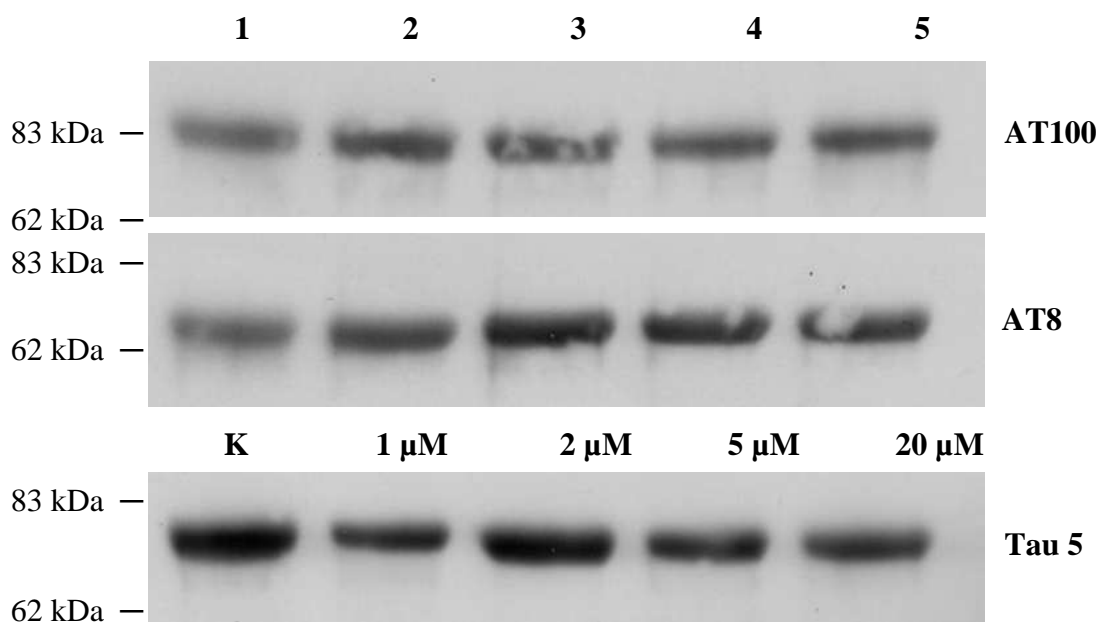


Abbildung 3.3–16 Inkubation primärer Neurone mit SNP 1 – 20 μM über 16 Stunden Detektion des Tau-Proteins im Western Blot mit phosphosensitiven Antikörpern.

Die Detektion der Proben mit dem phosphorylierungssensitiven Antikörper AT100 für phosphoryliertes Tau ergab im Vergleich zur Kontrolle bei allen Proben ein verstärktes Signal auf Höhe von 83 kDa (siehe Abb. 3.3-16). Das gleiche galt für Detektion mit dem AT8-Antikörper. Alle SNP-behandelten Proben zeigten oberhalb von 62 kDa ein verstärktes Signal und auf Bahn 3 wurde die größte Intensität beobachtet nach Behandlung

der Zellen mit 2 μM SNP. Im Blot mit Tau-5 war deutlich zu erkennen, dass die Kontrolle auf Bahn 1 verglichen mit Bahn 3 mit 2 μM SNP die gleiche Intensität aufzeigten und somit in beiden Proben gleiche Mengen Tau-Protein vorlagen. Eine Behandlung der Zellen mit 2 μM SNP führte also zu einer tendenziellen Phosphorylierung des Tau-Proteins bei gleich bleibendem Gehalt an Tau-Protein.

3.3.3.3 Inkubation mit SNP für 30 Minuten in erhöhter Konzentration

In primären Neuronen und auch in Gehirnschnitten hatte eine Inkubation mit 20 μM SNP eine Verzögerung des Tau-Turnovers verursacht. Nun sollte untersucht werden, ob sich auch eine vermehrte Phosphorylierung des Tau-Proteins zeigen würde. Dazu wurden Inkubationen mit SNP für nur kurze Zeit aber in höheren Konzentrationen durchgeführt. Primäre Zellen wurden für 30 Minuten mit SNP der Konzentrationen 25-500 μM belastet (siehe Abb. 3.3-17). Die Vitalität der Zellen betrug nach 30 Minuten SNP 25 μM 94,0 % (s.e. \pm 3,7 %) und bei Konzentrationen von 100 μM , 200 μM und 500 μM im Mittel 167,8 % (s.e. \pm 12,3 %). Da sich ausdifferenzierte primäre Neurone aber nicht mehr teilen und dadurch mehr MTT metabolisieren könnten, war die Zunahme der Vitalität nur auf Vermehrung nicht-neuronaler Zellen wie Astroglia- und Mikrogliazellen zurückzuführen.

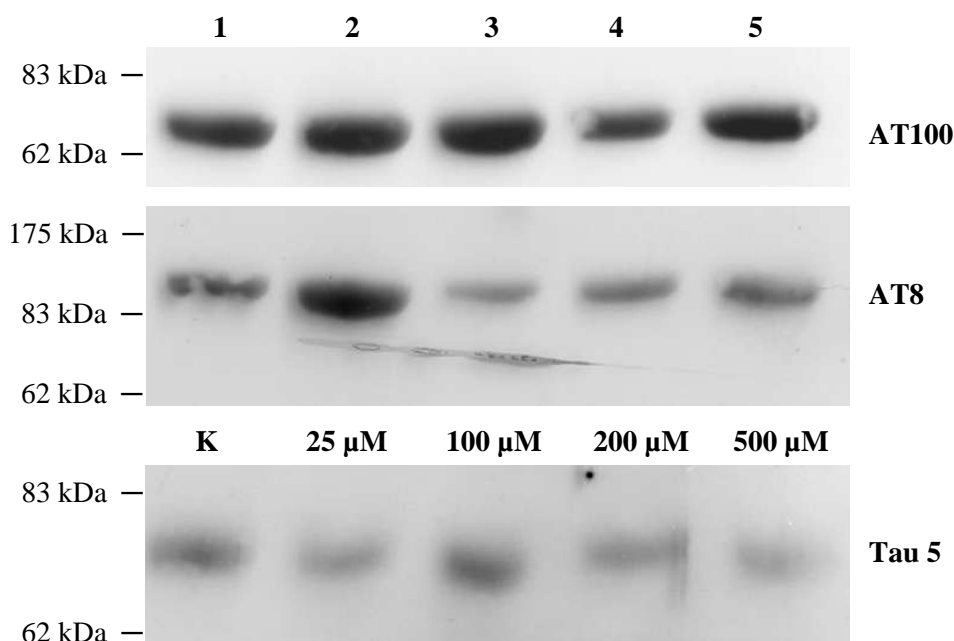


Abbildung 3.3-17 Inkubation primärer Neurone mit SNP 25 – 500 μM über 30 Minuten.

Wurden primäre Neurone mit SNP nur für kurze Zeit aber mit höheren Konzentrationen inkubiert, so zeigte sich im AT100-Blot eine geringe Zunahme der Signalstärke bei 25 μM , 100 μM und 500 μM im Vergleich zur Kontrolle. Im AT8-Blot dagegen zeigte sich nur ein deutliches Signal in Bahn 2 mit SNP 25 μM , während die höheren Konzentrationen keine Auswirkung auf die Phosphorylierung des Tau-Proteins hatten. Der Tau 5-Blot war etwas schwach und zeigte ein leicht stärkeres Signal in Bahn 3. In Bahn 2 allerdings ein leicht schwächeres Signal, was aber bestätigt, dass das starke Signal im AT8-Blot nicht durch ungleiche Proteinmengen sondern durch vermehrt phosphoryliertes Epitop zu erklären ist. Eine 30-minütige Inkubation mit 25 μM SNP führte also zu einer transienten Hyperphosphorylierung des AT8-Epitops.

3.3.3.4 Inkubation über 16 Stunden mit Okadaic Acid und SNP in Kombination

In einem Versuch mit langer Inkubationsdauer in geringen Konzentrationen sollte untersucht werden, ob eine gleichzeitige Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A mit Okadaic Acid und Einwirken von nitrosativem Stress durch SNP einen Einfluss haben würde, z.Bsp. eine Verstärkung, der Tau-Phosphorylierung. Dazu wurden die Zellen für 16 Stunden gleichzeitig mit 10 nM Okadaic Acid (wie in Versuch 3.3.5.1) und SNP 1-20 μM ko-inkubiert. Da im Langzeit-SNP-Versuch das Signal der 2 μM Konzentration nur wenig stärker war als die Signale der anderen Konzentrationen, wurden 10 nM mit verschiedenen Konzentrationen wie unter 3.3.5.1 versetzt und auf die Zellen gegeben.

Sowohl der AT8- als auch der AT100-Blot zeigten ähnliche Signal für Kontrolle und Zellen mit 10 nM + 1 μM SNP (Bahn 2) und somit keine Veränderung der Tau-Phosphorylierung (siehe Abb. 3.3-18). Allerdings zeigte der Tau-5-Blot bei dieser Kombination ein verstärktes Signal, was durch ungleichmäßiges Beladen des SDS-PAGE zu erklären wäre. Wenn dem so wäre, wäre allerdings die gleiche Signalstärke durch mehr Protein verursacht und somit sollte die Signalstärke für 10 nM + 1 μM SNP bei gleichen Proteinmengen geringer sein als in der Kontrolle.

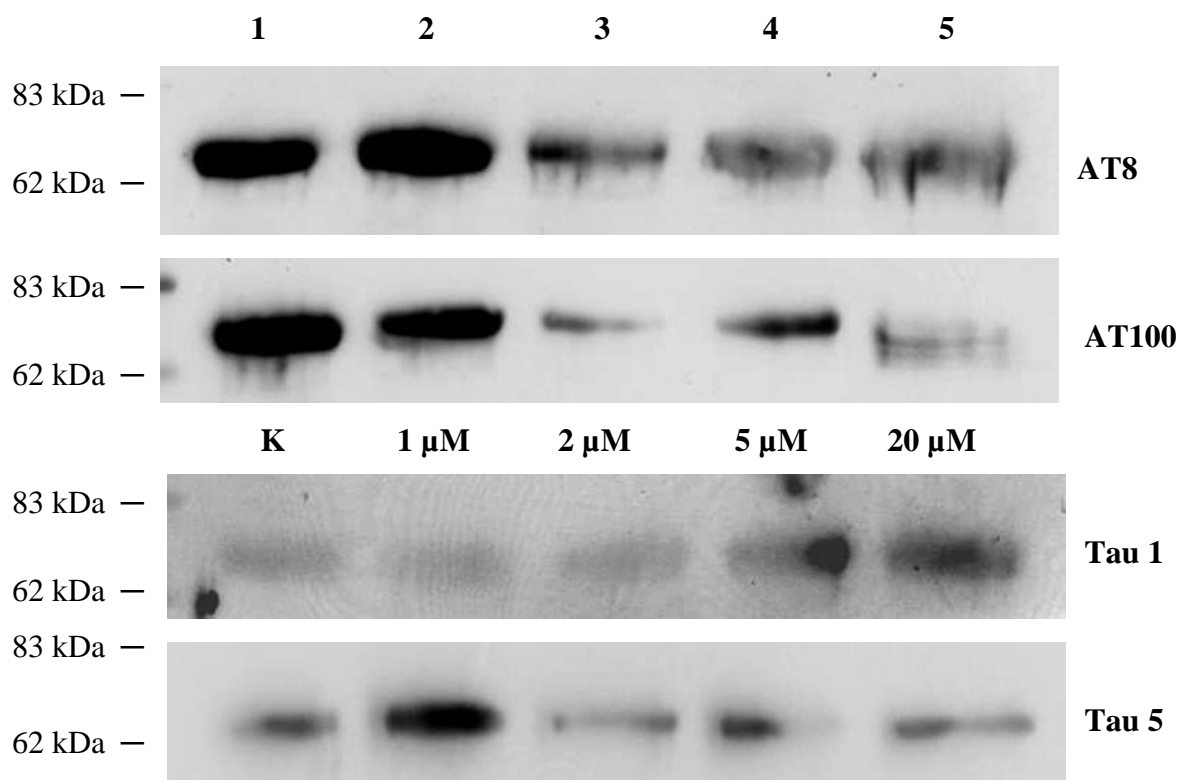


Abbildung 3.3–18 Inkubation primärer Neurone mit 10 nM OA und SNP 1-20 μ M über 16 Stunden

Mit zunehmender Konzentration von SNP ging die Intensität der Signale für phosphoryliertes Tau-Protein in beiden Blots (AT8 und AT100) allerdings stark zurück. Gleichzeitig wurden die Signale im Tau-1-Blot stärker, der unphosphoryliertes Tau-Protein aufzeigen sollte. Somit schien SNP mit zunehmender Konzentration in Kombination mit 10 nM die Phosphorylierung der spezifischen Epitope zu unterbinden, so dass mehr dephosphoryliertes Tau-Protein vorlag.

In einem weiteren Experiment wurden Proben primärer Neurone mit 10 nM OA, 1 μ M SNP und einer Kombination aus beiden noch einmal gegeneinander aufgetragen und anhand des AT8-Epitops untersucht (siehe Abb. 3.3-19).

Im AT8-Blot zeigten Zellen mit 10 nM Okadaic Acid inkubiert eine geringe Zunahme der Tau-Phosphorylierung (Bahn 2), während 1 μ M SNP ein starkes Signal erzeugte (Bahn 3). Eine Ko-Inkubation mit OA und SNP hatte einen additiven Effekt und erzeugte das stärkste Signal für eine Phosphorylierung des AT8-Epitops (Bahn 1).

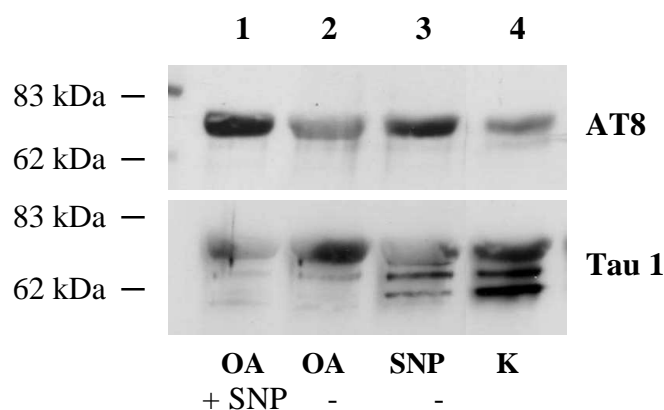


Abbildung 3.3–19 Primäre Neurone mit 10 nM OA und/oder 1 μ M SNP.

Im Tau-1-Blot wurden genau die gegenteiligen Signale beobachtet. Viel unphosphoryliertes Tau-Protein in der Kontrolle und Zunahme der Phosphorylierung durch Inkubation mit OA und SNP waren zu erkennen. Nitrosativer Stress mit SNP verursachte also eine Phosphorylierung am AT8-Epitop des Tau-Proteins und wurde durch Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A verstärkt.

3.3.3.5 Einfluss aktivierter BV-2 Zellen auf die Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen

Zum Abschluss der Untersuchungen der Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen sollte statt einzelner chemischer Substanzen die Auswirkungen einer Inkubation mit aktivierten BV-2 Mikrogliazellen untersucht werden, die im aktivierten Zustand einen ganzen Cocktail von Substanzen ausschütten.

Im nachfolgenden Versuch wurden primäre Neurone mit BV-2 Zellen auf Zellkultureinsätzen ko-kultiviert und die Makrophagen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Damit sollte untersucht werden, ob membrangängige phosphorylierungsauslösende Substanzen ausgeschüttet würden und ob die Stärke der Aktivierung eine mögliche Phosphorylierung beeinflusst. Dazu wurden 1×10^5 BV-2 Zellen für 24 Stunden zuvor auf Einsätzen in BV-2 Medium kultiviert und dann mit primären Neuronen in Neurobasalmedium für 24 bzw. 48 Stunden ko-kultiviert und mit LPS stimuliert. Die Neurone wurden anschließend per Western Blot analysiert (siehe Abb. 3.3-20).

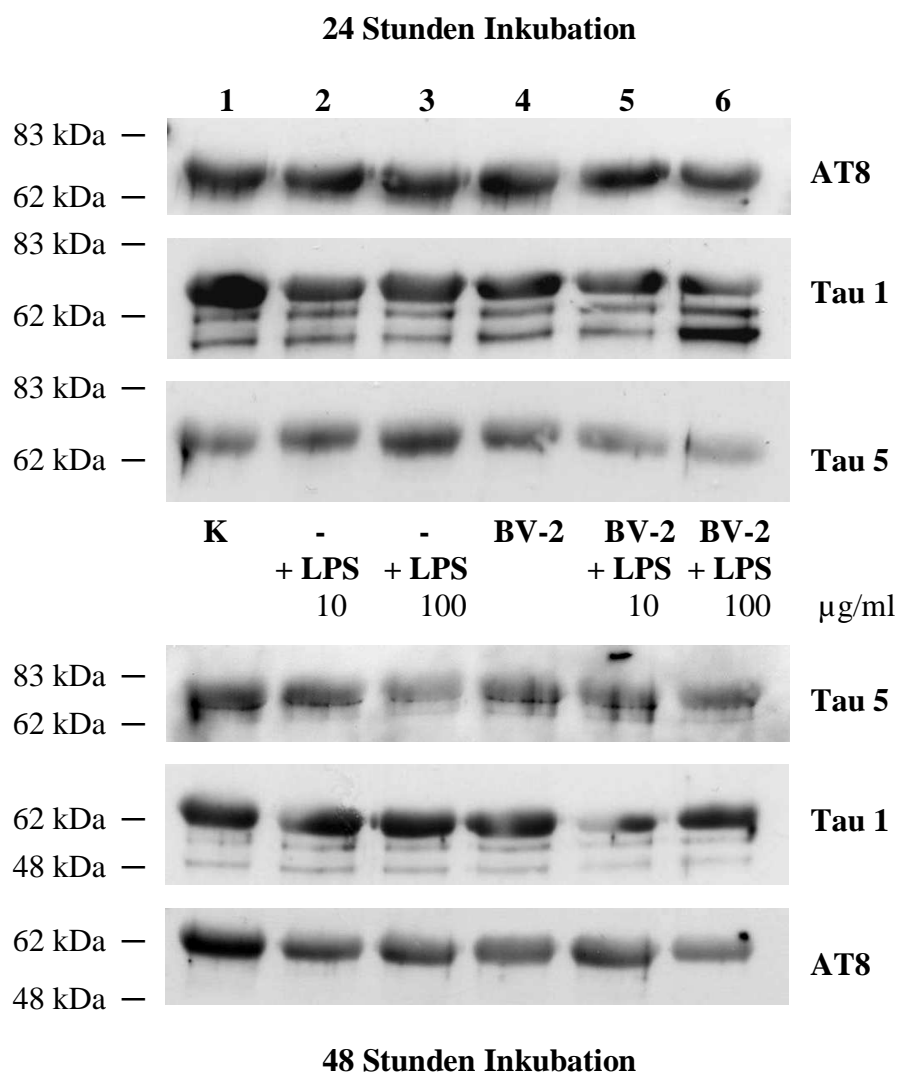


Abbildung 3.3–20 Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins nach Ko-Kultur von primären Neuronen mit aktivierten BV-2 Zellen Der obere Blot zeigt Kulturen nach 24 h LPS-Stimulation, der untere Blot Kulturen nach 48 h LPS-Stimulation.

Nach 24 Stunden LPS-Aktivierung (oberen drei Blots) zeigte sich im Tau-1-Blot das stärkste Signal für die Kontrolle. Geringere Intensitäten wurden nach Inkubation mit LPS (Bahn 2+3), unstimulierten BV-2 Zellen (Bahn 4) und aktivierten BV-2 Zellen (Bahn 5+6) detektiert, was auf eine Phosphorylierung des Tau-Proteins deutete. Im AT8-Blot ließ sich jedoch kein Anstieg der Phosphorylierung erkennen. Die Menge des Proteins war in allen Proben laut Tau-5-Blot konstant. Nach 48 Stunden LPS-Stimulation (unteren drei Blots) zeigten sich im AT8-Blot geringere Intensität der Proben gegenüber der Kontrolle, allerdings keine Veränderungen im Tau-1- und auch nicht im Tau-5-Blot. Eine Ko-Kultivierung primärer Neurone mit aktivierten BV-2 Zellen führte also nicht zu einer Phosphorylierung des Tau-Proteins am AT8-Epitop.

Bei der Ko-Kultivierung mit BV-2 Zellen auf Zellkultureinsätzen konnte allerdings nur der Effekt membrangängiger und löslicher Mediatoren untersucht werden. Um das ganze Spektrum an Substanzen zu erfassen, dass von aktivierten Mikrogliazellen ausgeschüttet wird, wurde der Versuch noch einmal wiederholt, allerdings nicht als Ko-Kultur sondern als Einzelkultur in konditioniertem BV-2 Medium. Primäre Neurone sollten in dem Medium inkubiert werden, in dem zuvor BV-2 Zellen aktiviert worden waren und dadurch alle freigesetzten Produkte enthielt. Als gemeinsames Kultivierungsmedium wurde das der organotypisch hippocampalen Schnittkulturen (kurz: Slice-Medium) verwendet, da primäre Neurone in BV-2 Medium (DMEM) keine ausreichende Vitalität aufwiesen und BV-2 Zellen in Slice-Medium eine höhere Aktivierbarkeit zeigten als in Neurobasalmedium.

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden 1×10^7 BV-2 Mikrogliazellen in Slice-Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS über 24 Stunden stimuliert. Dieses mit von aktivierten Makrophagen sezernierten Stoffen angereicherte Medium wurde dann von allen zellulären Bestandteilen abgetrennt und anschließend als Kultivierungsmedium für die primären Neuronen verwendet. Die Zellen wurden damit für 24 Stunden kultiviert und dann die Tau-Phosphorylierung mittels Western Blot untersucht (siehe Abb. 3.3-21). Als Kontrolle für eine Phosphorylierung wurden die Zellen auch mit 10 nM Okadaic Acid inkubiert.

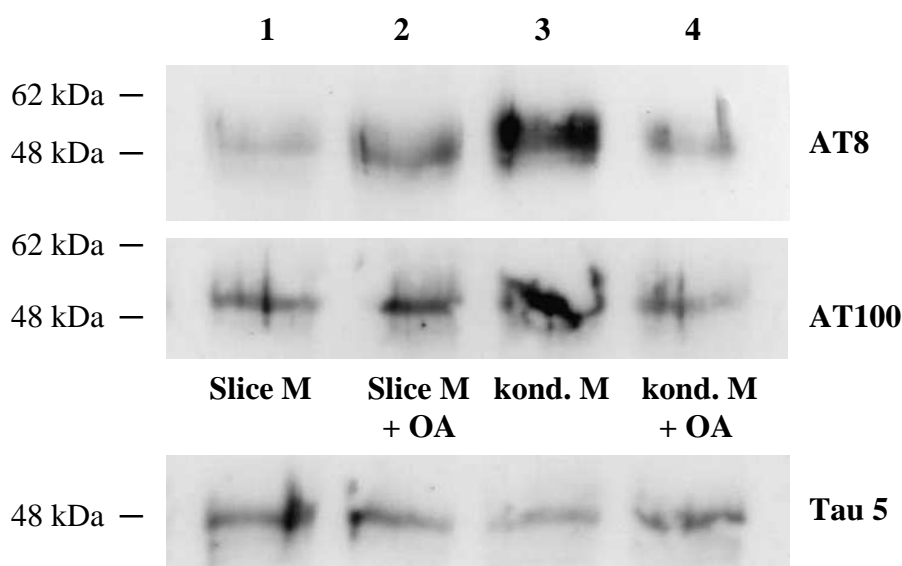


Abbildung 3.3–21 Inkubation primärer Neurone mit durch aktivierte BV-2 Zellen konditioniertes Medium Im Vergleich zu Kontrollzellen (Bahn 1) führte konditioniertes Medium (kond. M) zu einer starken Phosphorylierung des Tau-Proteins (Bahn 3), stärker noch als durch 10 nM Okadiac Acid (Bahn 2).

Im oberen Blot, der mit dem AT8-Antikörper auf phosphoryliertes Ser202/205 inkubiert wurde, zeigte sich ein verstärktes Signal nach Zugabe von 10 nM Okadaic Acid (Bahn 2 und 4) im Vergleich zu der Probe von Zellen ausschließlich in Slice-Medium inkubiert. Wurden die primären Neurone allerdings mit dem durch aktivierte BV-2 Zellen konditionierten Medium kultiviert, so war ein sehr viel stärkeres Signal zu erkennen (Bahn 3). Die Zugabe von OA zu dem konditionierten Medium hatte allerdings keinen additiven Effekt, sondern verminderte eher die Phosphorylierung. Eine Detektion mit dem phosphorylierungssensitiven Antikörper AT100 bestätigte die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch das konditionierte Medium. Der Gehalt des Tau-Proteins in den Proben schwankte leicht, wie im Blot mit Tau 5 zu erkennen war. Somit konnten aus aktivierten BV-2 Zellen freigesetzte Substanzen eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in primären Neuronen bewirken.

3.3.3.6 Phosphorylierung des Tau-Proteins in organisch hippocampalen Schnittkulturen

Wie in primären Neuronen wurde abschließend der Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins auch in organotypisch hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Die Kulturen wurden analog mit Okadaic Acid, SNP und aktivierten BV-2 Mikrogliazellen kultiviert. Zuerst erfolgte eine eintägige Inkubation der Schnitte mit den chemischen Substanzen Okadaic Acid und SNP und einer Kombination von beiden.

Eine 24-stündige Inkubation der Kulturen mit 10 nM Okadaic Acid zeigte im AT8-Blot ein Signal (Bahn 2) im Vergleich zur Kontroll-Kultur, am AT-100 Epitop erfolgte jedoch keine Phosphorylierung (siehe Abb. 3.3-22). 20 μ M SNP bewirkten ein sehr intensives Signal des AT8-Antikörpers und im AT100-Bot ebenfalls eine starke Intensität im Vergleich zur Kontrolle. Eine Kombination der beiden Substanzen (Bahn 4) hatte einen additiven Effekt am AT100-Epitop. Am AT8-Epitop jedoch war der Phosphorylierungsgrad geringer als bei den jeweiligen Einzelinkubationen.

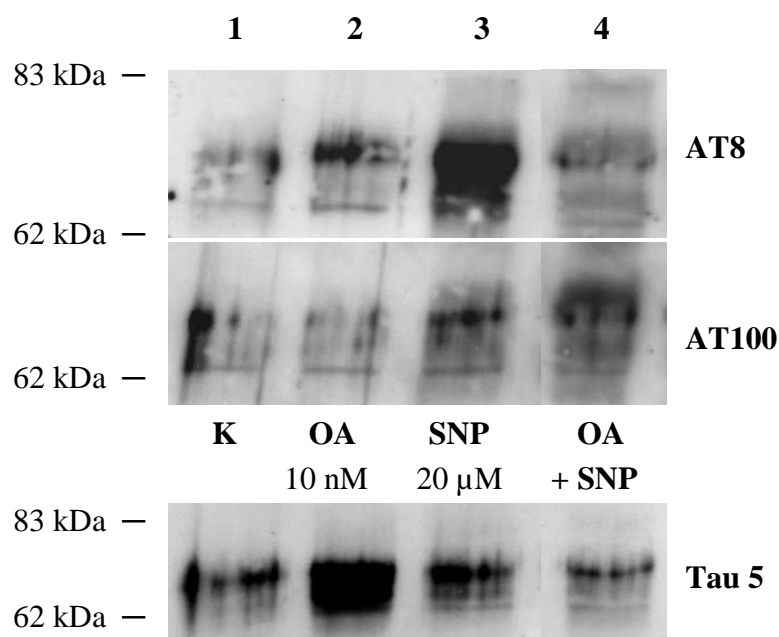


Abbildung 3.3–22 Tau-Phosphorylierung in OHSK nach Inkubation mit OA und SNP Am AT8-Epitop bewirkten sowohl OA als auch SNP eine Phosphorylierung, die Effekte waren aber nicht additiv (Bahn 4). Am AT100-Epitop zeigte sich eine additive Wirkung von OA und SNP (Bahn 4), Tau 5 zeigte Schwankungen im Tau-Gehalt.

Der Tau-Blot zeigte ein sehr intensives Signal nach OA-Inkubation, was entweder auf ungleichmäßiges Laden der Proben schließen ließ oder auf eine Zunahme des Tau-Gehalts in den Gehirnschnitten. Allerdings zeigte die Probe mit OA + SNP (Bahn 4) keine erhöhte Tau-Menge. Wie auch in primären Neuronen bewirkte nitrosativer Stress durch SNP eine verstärkte Phosphorylierung am AT8-Epitop des Tau-Proteins und wurde am AT100-Epitop durch die Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A mit OA verstärkt.

3.3.3.7 Einfluss aktivierter BV-2 Zellen auf die Tau-Phosphorylierung in OHSK

In Versuch 3.3.5.5 zeigte sich, dass konditioniertes Medium von aktivierten BV-2 Zellen in der Lage war, Tau-Protein in primären Neuronen zu phosphorylieren, während eine Ko-Kultivierung der Makrophagen auf Zellkultureinsätzen keine Effekte zeigte. In OHSK wurde der Einfluss aktivierter BV-2 Zellen auf die Tau-Phosphorylierung in Neuronen ebenfalls untersucht. Allerdings wurden in diesem Experiment die aktivierten Zellen direkt auf das lebende Hirngewebe gegeben, so dass neben einer Ausschüttung hochmolekularer Substanzen auch die Einwanderung der Zellen in das Gewebe ermöglicht war. Dazu wurden 1×10^5 aktivierte BV-2 Zellen auf jeden Hirnschnitt gegeben und die Ko-kultur nach drei Tagen geerntet und analysiert (siehe Abb. 3.3-23).

Im oberen AT8-Blot war nach Kultivierung mit BV-2 Zellen eine Verstärkung der Banden ober- und unterhalb von 50 kDa zu erkennen (Bahn 2 und 3), im unteren AT8-Blot zeigten aktivierte BV-2 Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung am AT8-Epitop auf Höhe von ca. 60 kDa.

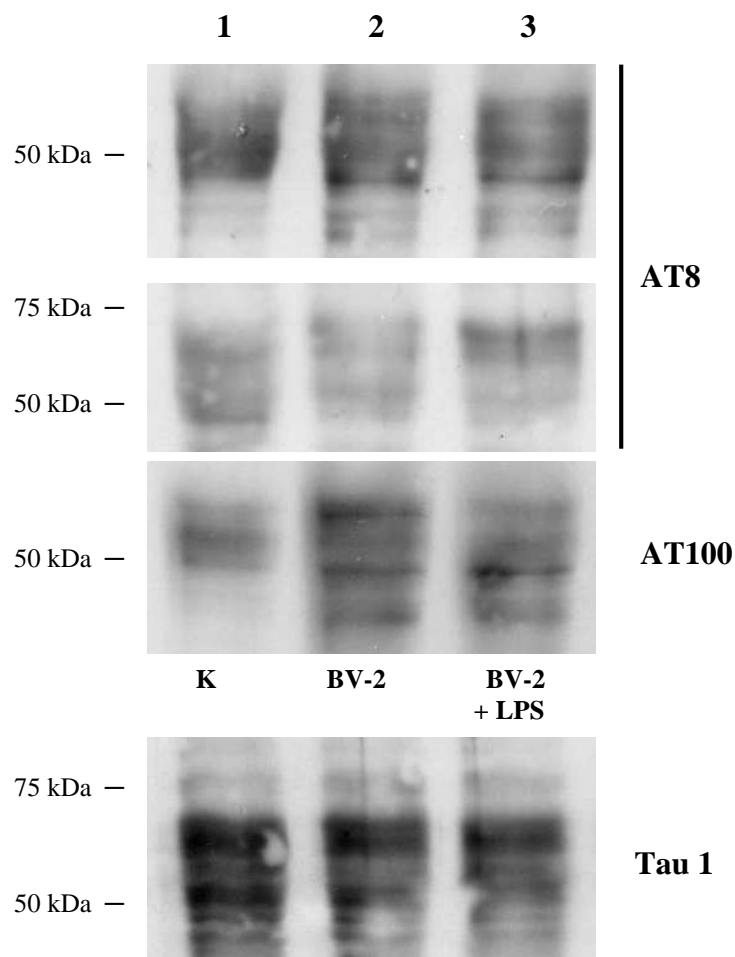


Abbildung 3.3–23 Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins nach Ko-Kultur von hippocampalen Schnittkulturen mit aktivierten BV-2 Zellen

Eine Detektion mit dem AT100-Antikörper zeigte ebenfalls verstärkte Signale nach Kultivierung mit den Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle in Bahn 1. Eine Detektion mit dem Tau 1-Antikörper gegen dephosphoryliertes Tau bestätigte die Ergebnisse der AT8-Blots; im Vergleich zur Kontrolle verringerte sich nach BV-2 Zugabe und Aktivierung die Menge des detektierbaren unphosphorylierten Tau-Proteins. BV-2 Mikrogliazellen übten somit einen milden Effekt auf die Tau-Phosphorylierung in lebenden Gehirnschnitten aus.

In einem abschließenden Versuch sollte eine mögliche Unterbindung schädlicher Effekte von Mikrogliazellen auf die Tau-Phosphorylierung untersucht werden. In Arbeiten von Ullrich et al. wurde gezeigt, dass ein neuronaler Sekundärschaden an Neuronen durch Mikrogliazellen dadurch unterbunden werden konnte, indem in den Mikrogliazellen das Enzym Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1) gehemmt wurde. Um einen möglichen Effekt einer PARP-1-Hemmung in BV-2 Zellen auf die Phosphorylierung des Tau-Proteins in Neuronen zu betrachten, wurde erneut eine Ko-Kultivierung von OHSK mit BV-2 Zellen durchgeführt. Die Mikrogliazellen wurden entweder unbehandelt gelassen, mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA behandelt oder als asPARP-BV-2 Zellen verwendet. In diesen Zellen war die PARP-1 spezifische durch Antisense-mRNA ausgeschaltet worden.

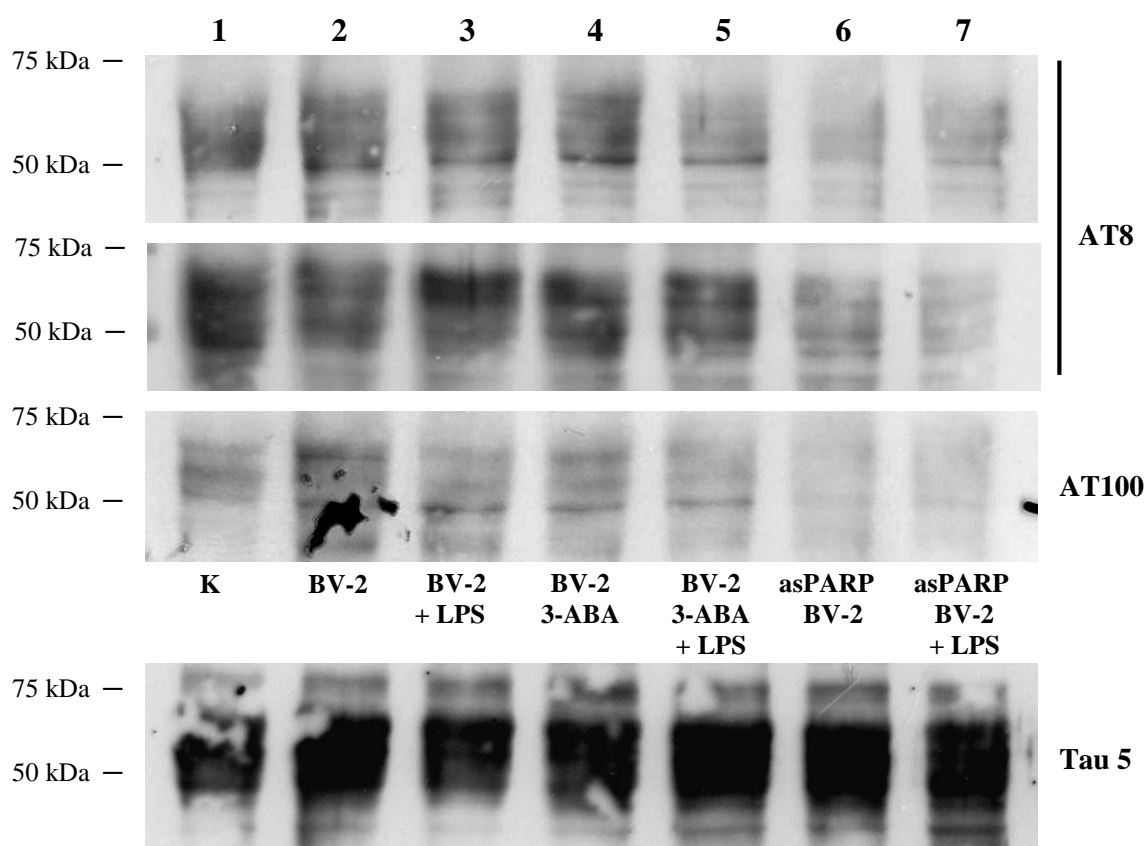


Abbildung 3.3-24 Reduzierte Tau-Phosphorylierung durch Ko-Kultivierung mit asPARP-BV-2 Mikrogliazellen PARP-1 gehemmte Zellen (Bahn 6 und 7) reduzierten die Signalstärke der phosphorylierungsabhängigen Antikörper AT8 und AT100 deutlich bei gleichbleibender Tau-Menge.

Eine Ko-Kultivierung mit BV-2 Zellen zeigte im oberen AT8-Blot und auch im AT100-Blot wieder ein verstärktes Hervortreten der Bande um ca. 50 kDa (Bahn 2-5) und in beiden AT8-Blots war auch die Bande bei ca. 65 kDa wieder intensiver als in der Kontrolle. Eine Hemmung der PARP durch 3-ABA (Bahn 4 und 5) zeigte keine Veränderung gegenüber unbehandelten BV-2 Zellen (Bahn 2 und 3). Wurden jedoch

asPARP-BV-2 Zellen mit spezifisch gehemmter PARP-1 verwendet, so konnten kaum noch Signale mit den phosphorylierungssensitiven Antikörper erzeugt werden bei unveränderten Gehalt des Tau-Proteins. Eine spezifische Hemmung der PARP-1 in BV-2 Mikrogliazellen unterband somit die phosphorylierende Aktivität der Makrophagen am Tau-Protein der Neurone.

3.3.3.8 Zusammenfassung Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen und OHSK

Die nachfolgende Tabelle führt die Ergebnisse der Tau-Phosphorylierung in primären Neuronen und organotypisch hippocampalen Schnittkulturen übersichtlich auf.

Tabelle 3.3-2

	Primäre Neurone	OHSK
OA 10 nM	AT8 ↑ Tau 1 ↓	AT8 ↑
SNP	2 μM 16 h AT8 ↑ 25 μM 0,5 h AT8 ↑ transient	AT8 ↑ AT100 ↑
OA + SNP	1 μM SNP: additiv AT8 ↑ hohe Konz. SNP: AT8 ↓	SNP 20 μM, 16 h AT100 ↑
BV-2	keine Veränderung ∅	AT8 ↑ Tau 1 ↓
konditioniertes BV-2 Medium	AT8 ↑ AT100 ↑	—
asPARP BV-2	—	AT8 ↓ At100 ↓

Phosphorylierung am Epitop: ↑ Zunahme / ↓ Abnahme der Signalstärke im Western Blot

Eine Inkubation mit 10 nM OA führte sowohl in primären Neuronen als auch in OHSK zu einer Phosphorylierung des AT8-Epitops. Nitrosativer Stress, vermittelt durch SNP, führte ebenfalls in beiden Zellmodellen zu einer Phosphorylierung alzheimerspezifischer Epitope. Geringe Konzentrationen von SNP steigerten die phosphorylierende Wirkung von OA in primären Neuronen, während hohe Konzentrationen einen gegenteiligen Effekt bewirkten.

In organisch hippocampalen Hirnschnitten verursachte 20 μM SNP dagegen eine Phosphorylierung des AT100-Epitops.

Konditioniertes Medium von BV2-Zellen führte in primären Neuronen zu einer Phosphorylierung des AT8- und des AT100-Epitops. Aktivierte BV2-Zellen, durch eine Membran von primären Neuronen getrennt, hatten keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins, während aktivierte BV2-Zellen in OHSK eine Phosphorylierung des AT8-Epitops bewirkten. Wurden jedoch BV2-Zellen mit inaktivem PARP-Enzym verwendet (asPARP BV2), so verringerte sich die Phosphorylierung am AT8/AT100-Epitop deutlich.

3.3.4 Zusammenfassung III: Tau-Turnover in primären Zellen

- Anders als in der Zelllinie HT22 verlief in primären Zellen der physiologische Turnover des Tau-Proteins wesentlich schneller. Ohne äußeren Einfluss wurde in organisch hippocampalen Schnittkulturen (OHSK) das Tau-Protein statt nach 62,1 Stunden bereits binnen 17,1 – 22,5 Stunden zu 50 % verstoffwechselt und in Einzelkulturen primärer Neuronen sogar innerhalb von 90 Minuten.
- Eine oxidative Belastung mit Wasserstoffperoxid führte weder in primären Neuronen noch in OHSK zu einer Steigerung des Tau-Turnovers. Die signifikanten Ergebnisse der HT22-Versuche ließen sich nicht bestätigen.
- Eine Hemmung des 20S Proteasoms mit MG132 allerdings führte in beiden Primärzellkulturen zu einer Verringerung des Tau-Turnovers wie es auch in der Zelllinie beobachtet worden war.
- Nitrosativer Stress ausgelöst durch SNP verlangsamte in primären Neuronen den Tau-Turnover. Eine Western-Blot Analyse der Zelllysate primärer Neurone und von OHSK zeigte bei beiden Zellmodellen eine Phosphorylierung des alzheimer-spezifischen Epitops AT8. In organisch hippocampalen Schnittkulturen wurde nach SNP-Behandlung zusätzlich auch eine Phosphorylierung des AT100-Epitops beobachtet.
- Eine „Hyperphosphorylierung“ des Tau-Proteins ausgelöst durch die Hemmung der Proteinphosphatase 1/2A mittels Okadaic Acid verlangsamte in primären Neuronen wie auch in HT22-Zellen den Tau-Turnover. In OHSK resultierte die gleiche

Konzentration in einer leichten Steigerung des Turnovers. Eine Langzeitinkubation mit einer sehr geringen Konzentration dagegen führte zu einer signifikanten Hemmung des Tau-Turnovers. Im Western-Blot war sowohl für primäre Neurone als auch für OHSK eine Phosphorylierung des AT8-Epitops zu detektieren. Waren die Zellen nacheinander mit OA und SNP inkubiert worden, so ließ sich ein additiver Effekt in der Phosphorylierung des AT8-Epitops erkennen.

- Die nacheinander erfolgte „Hyperphosphorylierung“ des Tau-Proteins und oxidative Belastung der Zellen führte in OHSK wie auch in HT22-Zellen nicht zu einer nachträglichen Steigerung des durch OA gehemmten Tau-Turnovers. Bei einer Langzeitinkubation der OHSK jedoch und auch in den Versuchen mit primären Neuronen führte eine nachgelagerte Oxidation zur Aufhebung der OA-induzierten Hemmung des Tau-Turnovers und resultierte in einer annähernd physiologischen Turnover-Rate.
- Nach Inkubation der OHSK mit OA im Kurzzeitversuch resultierte die Ko-Kultivierung mit BV2-Zellen in einem erhöhten Tau-Turnover und im Langzeitversuch wurde die OA-induzierte Hemmung des Turnovers wieder aufgehoben. Oxidativer Stress verursachte im Ko-Kulturmodell mit BV2-Zellen eine signifikante Steigerung des Tau-Turnovers.
- Eine Ko-Kultivierung von OHSK mit BV2-Zellen führte zu einer Verlangsamung des Tau-Turnovers. Im Western Blot ließ sich eine Phosphorylierung des AT8-Epitops erkennen. In primären Neuronen führte eine Inkubation mit konditioniertem BV2-Medium ebenfalls zu einem verstärkten AT8-Signal und zusätzlich zu einem AT100-Signal. BV2-Zellen mit inaktiviertem PARP-Enzym reduzierten in OHSK jedoch die Phosphorylierung des AT8- und AT100-Epitops.

4 Diskussion

4.1 Erniedrigte Proteasomaktivität durch Bindung von PHF-Tau

Aufgrund der Entdeckung Ubiquitin-positiver Proteinaggregate in verschiedenen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, ALS und Morbus Huntington (McNaught, Belizaire *et al.* 2003) wird vermutet, dass die Hemmung des Proteasoms eine wichtige Rolle in der Weiterleitung zellulärer Toxizität in neurodegenerativen Erkrankungen spielt (Halliwell 2002; McNaught and Olanow 2003). Ein Defizit der Proteasomaktivität in Gehirnen von Alzheimerpatienten war bereits zuvor berichtet worden (Keller, Hanni *et al.* 2000). Die signifikante Verringerung war hauptsächlich in Gehirnregionen zu messen, die starke degenerative Veränderungen aufzeigten (Braak and Braak 1991) wie Hippocampus, Gyrus parahippocampalis, Gyrus temporalis superior und medius sowie dem Lobus parietalis inferior. In der sporadischen Parkinson-Erkrankung wurde ebenfalls eine verminderte enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms in der Substantia nigra pars compacta gemessen. Zusätzlich war die Konzentration des Proteasom-Aktivators PA700 (= 19S Regulator) erniedrigt und der PA28 Aktivator (= 11S Regulator) fast nicht zu detektieren (McNaught, Belizaire *et al.* 2003). In Bezug auf die Ubiquitin-aktivierenden und -konjungierenden Enzyme E1 und E2 wurde in zerebralen Cortexproben von Alzheimerpatienten eine verringerte Aktivität dieser Enzyme gegenüber altersgleichen Kontrollproben festgestellt (Lopez Salon, Morelli *et al.* 2000). Ebenso wurde eine verminderte Trypsin-ähnliche Aktivität des 26S Proteasoms gemessen.

Als Marker für eine proteasomale Dysfunktion im Gehirn wird auch das mutante Protein UBB⁺¹ diskutiert (Fischer, De Vos *et al.* 2003). Dabei handelt es sich um eine anormale Form des Ubiquitin-B-Proteins (UBB), das durch eine Dinukleotid-Deletion (Δ GU) zu einer +1-Transkription führt und die anschließende Translation zu einem andersartigen C-Terminus. Dieses mutierte UBB⁺¹ akkumuliert in den neuropathologischen Erscheinungen der Alzheimer-Erkrankung und anderer Tauopathien. Es ist aber nicht nur ein Marker, sondern induziert auch die Bildung von Aggregaten und Zelltod in Polyglutamin-Erkrankungen (de Pril, Fischer *et al.* 2004). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Zelle und zeigen eine Hemmung des proteasomalen Abbaus als einen möglichen Ko-Faktor in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen auf.

Die Messung der Proteasom-Aktivität in grob aufgereinigtem Hirngewebe spiegelt die Aktivität des Proteasoms sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen wieder. Daher können Differenzen der Proteasomaktivität in Hirngewebe unter neuropathologischen Bedingungen auch durch Veränderungen der glialen Proteasomaktivität und der lokalen Dichte von Gliazellen verursacht sein. In diesem Zusammenhang bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch zuvor veröffentlichte Beobachtungen von reduzierter Proteasomaktivität in Gehirnen von Alzheimerpatienten (Keller, Hanni *et al.* 2000; Lopez Salon, Morelli *et al.* 2000). Darüber hinaus konnte mit den PHFs ein direkter intraneuronaler Verursacher identifiziert werden, der in der Lage war die Aktivität des Proteasoms sehr effizient zu hemmen. Die Untersuchungen ergaben eine Abnahme der Proteasomaktivität bei einhergehender Zunahme von Proteasom-gebundenem PHF-Tau in Alzheimer-Gehirnen. Isoliertes PHF-Tau aus diesen Gehirnen ebenso wie aus rekombinatem Tau *in vitro* aggregierte PHFs waren in der Lage isoliertes Proteasom zu hemmen. Diese Ergebnisse identifizieren gebundenes PHF-Tau als den Grund für verminderte Proteasomfunktionalität in Alzheimergehirnen (siehe Abb. 4.1-1).

In einer weiterführenden Studie von F. Gillardon wurde bestätigt, dass cytosolische Proteine das 20 S Proteasom *in situ* hemmen können (Gillardon, Kloß *et al.* 2007). In groben Extrakten aus Alzheimergehirnen wurde ebenfalls gezeigt, dass der Proteasom-Gehalt im Gehirngewebe unverändert ist und nicht durch die Erkrankung beeinflusst wird. Ebenso wurde in groben Alzheimerextrakten eine verminderte chymotryptischen Aktivität des 20S Proteasoms gemessen im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die groben Extrakte wurden dann chromatographisch aufgereinigt und gelfiltriert, was in einem Anstieg der spezifischen 20S Proteasomaktivitäten resultierte und höhere Aktivität zeigte als die Kontrollen. Dies wurde durch ein Entfernen der cytosolischen Proteine erklärt und die Autoren vermuten, dass posttranslationale Modifikationen der Untereinheiten des Proteasoms im Alzheimergehirn eine Steigerung der Proteasomaktivität bewirken.

Aber nicht nur PHFs inhibieren Proteasom, sondern auch β -Amyloid. Eine übermäßige Produktion von A β kann ebenfalls das Proteasomsystem schädigen, wie in einer Ko-Kultur von Astrozyten und Neuronen gezeigt wurde. Die Inkubation mit A β ₁₋₄₂ und des Fragmentes A β ₂₅₋₃₅ resultierte in einer Hemmung der 26S Proteasomaktivität (Lopez Salon, Pasquini *et al.* 2003). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass β -Amyloid ein Inhibitor des Ubiquitin-abhängigen Protein-Abbaus *in vitro* ist. Es konnte die Anhäufung von Ubiquitin-

Konjugaten fördern, da es signifikant die Abbaurrate der Ubiquitin-konjugierten Proteine reduzierte (Gregori, Fuchs *et al.* 1995). β -Amyloid selbst kann an dem katalytischen Kern des 20S Proteasoms binden und selektiv die chymotryptische Aktivität durch Bildung eines Proteasom-A β -Komplexes im Inneren des katalytischen Zentrums hemmen (Gregori, Hainfeld *et al.* 1997).

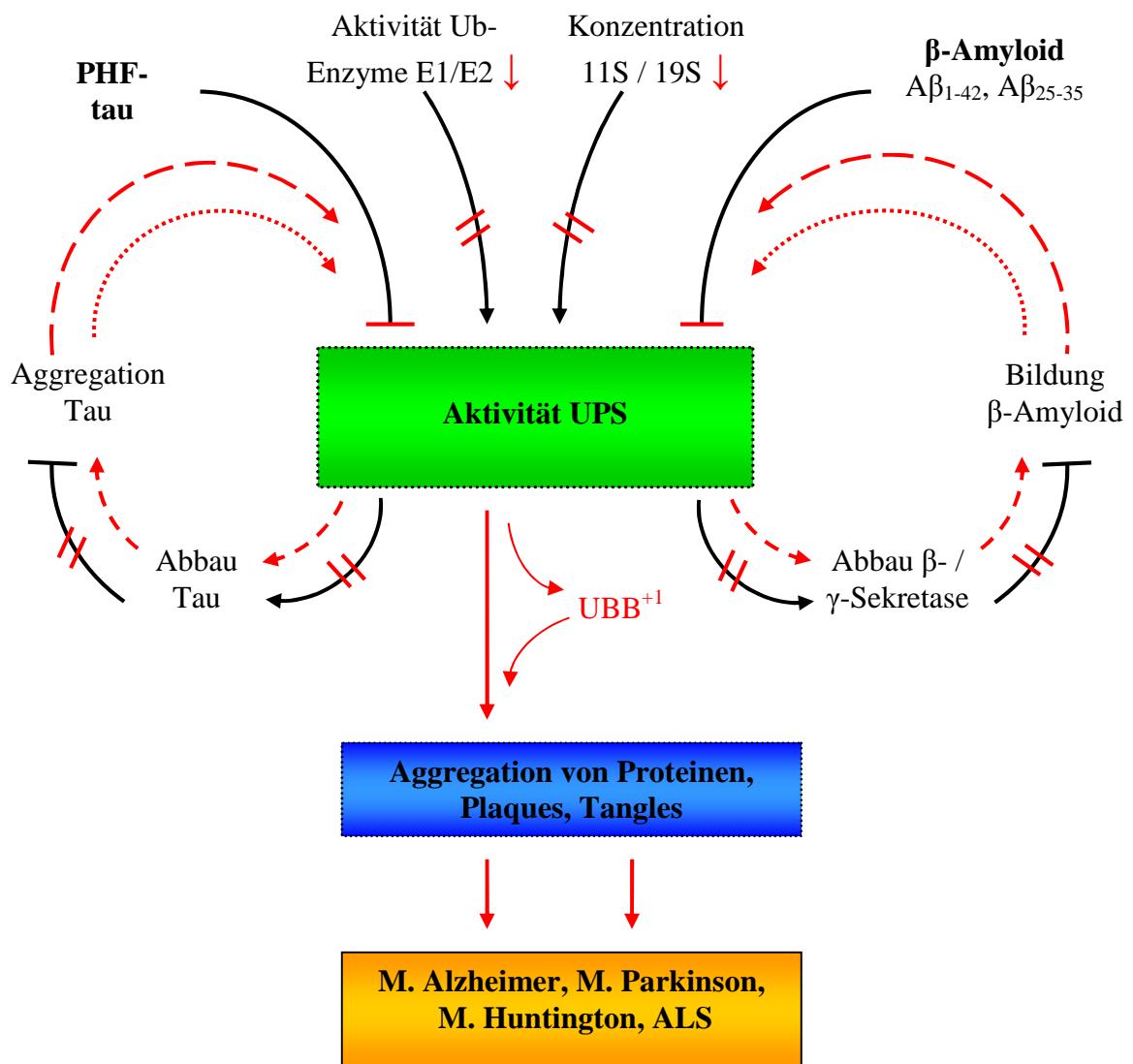


Abbildung 4.1–1 Mögliche Regulationskreise zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), β -Amyloid und Tau- Aggregaten Erniedrigte Aktivität des Ubiquitin (Ub) -aktivierenden Enzyms E1 und des Ub-konjugierenden Enzyms E2 sowie auch eine verminderte Konzentration der Proteasom-Regulatoren 11S und 19S können die Aktivität des UPS reduzieren. Ebenso kann β -Amyloid das UPS hemmen, was zu einem Verminderten Abbau der β - / γ -Sekretasen führt und dadurch indirekt die Bildung von β -Amyloid fördert, das wiederum das UPS hemmen kann. Ein ähnlicher Kreislauf kann durch Aggregate aus PHF-Tau entstehen, die ebenfalls das UPS hemmen, was den Tau-Abbau unterbindet und dadurch die Aggregation fördern kann. Aggregierte Proteine wie UBB+1, Plaques und Tangles können schließlich zu neurologischen Erkrankungen führen.

Aber nicht nur A β ist ein Substrat für das Proteasomsystem sondern auch die β -Sekretase BACE1 (Nunan, Williamson *et al.* 2003; Qing, Zhou *et al.* 2004) und drei der vier Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes: Presenilin (PS), „presenilin enhancer-2“ (PEN-2) und „anterior pharynx defective-1“ (APH-1) (He, Qing *et al.* 2006). Ob die vierte Komponente, das Nicastrin (NCT), und somit der gesamte Komplex durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert wird, ist noch nicht bekannt.

Diese Daten lassen vermuten, dass ein *circulus vitiosus* von Schädigung des Proteasomsystems und einer Tau-Hyperphosphorylierung bzw. β -Amyloidablagerung im Alzheimer-Gehirn stattfindet. So wäre es möglich, dass Tau-Hyperphosphorylierung und A β -Überproduktion das Proteasom inaktivieren und die verminderte Aktivität zu einem unzureichendem Abbau von Tau und A β führen und so letztendlich die Bildung von NFTs und senilen Plaques begünstigen.

4.2 PHF-Tau: direkte Toxizität durch Phosphorylierung oder indirekte Toxizität durch Aggregation?

Die Bildung von Tau zu PHFs findet in einem Zustand abnormer Phosphorylierung statt, und es wird vermutet, dass diese Phosphorylierung eine Rolle in der Entstehung der „pathologischen Konformation“ des Tau-Proteins spielt (Trojanowski and Lee 1995; Friedhoff, Schneider *et al.* 1998). Das Ergebnis, dass *in vitro* entstandene PHFs aus unphosphoryliertem, rekombinantem humanen Tau-Protein in der Lage waren die Aktivität isolierten Proteasoms zu hemmen, weist darauf hin, dass abnorme Tau-Phosphorylierung nicht zwingend nötig ist zur Proteasom-Hemmung bei Alzheimer. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass lösliches Tau-Protein, das aus Alzheimer-Gehirnen isoliert wurde, nicht in der Lage war isoliertes Proteasom zu hemmen. Eine Inhibition konnte nur durch hochmolekulare Tau-Komplexe, die aus unphosphoryliertem rekombinantem Tau assembliert worden waren, erreicht werden. Da weder unphosphoryliertes rekombinantes Tau noch phosphoryliertes isoliertes Tau die Aktivität des Proteasoms hemmen konnten, scheint eher der Aggregationszustand als die modifizierte Sekundärstruktur für die verminderte Proteasomaktivität verantwortlich zu sein.

Shimura, Schwartz *et al.* 2004). Alzheimer-gemäße Phosphorylierung des Tau-Proteins scheint das Erkennungssignal für die E3-Ligase zu sein, was in der nachfolgenden Markierung für das Proteasom resultiert. Obwohl Tau-Aggregate in CHIP-transduzierten Zellen gefunden wurden, verminderte eine Ubiquitinierung durch CHIP den durch Tau-Phosphorylierung induzierten Zelltod (siehe Abb. 4.2-1). Die Autoren vermuten, dass eher das lösliche abnorm phosphorylierte Tau-Protein und nicht das aggregierte Tau-Protein toxisch für die Zelle ist.

Ebenso könnte ein Defizit in der Ubiquitinierung des Tau-Proteins zu einer unzureichenden Proteolyse beitragen. Es wurde berichtet, dass in PHFs mehrheitlich monoubiquitiniertes denn polyubiquitiniertes Tau-Protein zu finden sei (Morishima-Kawashima, Hasegawa *et al.* 1993) und da monoubiquitinierte Proteine kein Abbausignal für das 26S Proteasom darstellen (Thrower, Hoffman *et al.* 2000) kann daher auch kein Abbau stattfinden. Kürzlich jedoch erst wurde über Polyubiquitin-Ketten am Tau-Protein berichtet, die an den Lysin-Resten Lys-254, -311 und -353 in der MT-Bindungsdomäne konjugiert sind. Die Ubiquitin-Ketten sind über die Lysin-Reste Lys-48, -11 oder Lys-6 des Ubiquitins verknüpft (Cripps, Thomas *et al.* 2006) und vor allem die Polyubiquitinierung von Proteinen durch Lys-48 markiert Proteine zum Abbau durch Proteasom. Wird die Polyubiquitin-Kette, die über einen Lys-6 Rest verknüpft ist, allerdings modifiziert durch z.B. Biotinylierung, dann wirkt diese Peptidkette als Inhibitor der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse (Shang, Deng *et al.* 2005).

Interessanterweise konnte isoliertes PHF-Tau die Proteasomfunktion sogar innerhalb eines Konzentrationsbereiches beeinträchtigen, der in voran gegangenen Studien als „physiologisch“ eingeschätzt wurde (Drubin, Feinstein *et al.* 1985; Drubin and Kirschner 1986; Friedhoff, Schneider *et al.* 1998). Die zelluläre Konzentration des Tau-Proteins wurde auf circa 1 μM oder weniger geschätzt. Im Falle des isolierten PHF-Taus lag die Konzentration zur 50%-igen Inhibition (IC_{50}) bei etwa 70 nM oder sogar bei nur 25 nM im Falle des *in vitro* assemblierten PHF-Taus. Eine komplette Unterbindung der Proteasomfunktion wurde mit 0,4 μM isoliertem und 0,15 μM *in vitro* assemblierten PHF-Tau erzielt. Das Verhältnis PHF-Tau / Proteasom lag bei 6 μg und 2 μg pro μg Proteasom beim IC_{50} der Proteasomaktivität. Dies deutet stark darauf hin, dass *in vivo* entstandenes PHF-Tau in der Lage ist das Proteasom-System zu beeinträchtigen. Darüber hinaus wurden zunehmende Mengen des 19S-Komplexes durch PHF-Tau absorbiert. Dies kann die

proteolytische Funktion des 26S Proteasoms stören, das ubiquitinierte Proteine ATP-abhängig abbaut.

Da Produkte einer Proteinschädigung wie AGEs (advanced glycation end products, (Smith, Taneda *et al.* 1994; Yan, Chen *et al.* 1994), aldehydische Modifikationen (Yan, Chen *et al.* 1994) und Carbonyle (Smith, Perry *et al.* 1996) in einer der wichtigsten intrazellulären neuropathologischen Erscheinung, den NFTs, akumulieren, kann eine Beeinträchtigung des Hauptproteolyseweges zum Abbau solcher Produkte, des proteasomalen Systems, diskutiert werden. In diesem Zusammenhang haben Publikationen die sporadische oder hereditäre primäre Disfunktion des Proteasom-Systems diskutiert (Bence, Sampat *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das proteasomale System des Alzheimergehirns nicht primär beeinträchtigt war, aber sekundär verändert wurde als eine Konsequenz durch Bindung der PHF-Tau-Proteine. Diese Beeinträchtigung trat sogar schon bei PHF-Tau-Konzentrationen weit unterhalb der physiologischen Tau-Konzentration auf. Dies deutet darauf hin, dass die Funktionsbeeinträchtigung des Proteasoms durch PHF-Tau möglicherweise ein früher und kritischer Punkt in der Entwicklung der Alzheimer-Pathologie sein könnte (Ingano, Lentini *et al.* 2000; Keller, Hanni *et al.* 2000). Daher sollte PHF-Tau als ein neurotoxisches Produkt während der Alzheimer-Pathogenese erachtet werden, das zu einem initialen Abfall der Proteasomaktivität und einer zunehmenden Produktion aggregierter Proteine beisteuert. Da Proteinaggregation ein zentraler auslösender Bestandteil des Zelltodes in Neurodegenerativen Erkrankungen zu sein scheint (Schulz and Dichgans 1999), könnte ein Eingriff in die molekularen Mechanismen der PHF-Tau-Bildung einen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Alzheimer Erkrankung darstellen.

4.3 Proteasom-abhängiger Turnover - stellt das Tau-Protein ein Substrat für das Proteasom dar?

Aus den Ergebnissen ergab sich die Frage, ob PHFs und/oder das Tau-Protein generell ein Substrat für das Proteasom darstellt. David und Kollegen zeigten bereits 2002, dass Tau in stabil transfizierten SH-SY5Y Zellen wie jedes andere ungefaltete Protein durch das 20S Proteasom in einer Ubiquitin-**un**abhängigen Weise abgebaut werden konnte und dass eine induzierte Konformationsänderung von Tau durch Behandlung mit SDS einen proteasomalen Abbau unterband (David, Layfield *et al.* 2002). *In vitro* wurde beobachtet, dass der Tau-Abbau durch das 20S Proteasom bidirektional statt fand, also sowohl vom N- zum C-Terminus als auch vom C- zum N-Terminus und dabei ein Muster an Intermediaten auftrat. Ein andere Veröffentlichung bestätigte den nicht-prozessiven Abbau und die Anhäufung von 28 -50 kDa großen Intermediaten (Cardozo and Michaud 2002). Beide Untersuchungen wurden jedoch nur semi-quantitativ durchgeführt und es wurden keine posttranslationalen Modifikationen einbezogen. QG Ren demonstrierte durch Einsatz von Lactacystin in HEK293/tau441-Zellen semi-quantitativ, dass überexprimiertes Tau-Protein durch das Proteasom proteolysiert wird und untersuchte auch phosphoryliertes Tau (Ren, Liao *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde natives, oxidiertes und phosphoryliertes Tau-Protein nicht nur qualitativ, sondern auch **quantitativ** auf seinen Turnover hin untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl in der neuronalen Zelllinie HT22 als auch in primären Neuronen das Tau-Protein ein Substrat des Proteasoms ist. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3 zeigten aber auch, dass das Proteasom nicht als einzige Protease am Turnover des Tau-Proteins beteiligt ist, da nur sehr hohe Konzentrationen des Inhibitors den Tau-Turnover vollständig unterbinden konnten. Zuvor schon wurde berichtet, dass Tau *in vitro* durch verschiedene Proteasen wie Cathepsine, Calpaine und Caspasen abgebaut wird (Bednarski and Lynch 1996; Litersky and Johnson 1992; Gamblin, Chen *et al.* 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden auch semi-quantitativ in dem Labor von L. Buée bestätigt, der zeigen konnte, dass nach Hemmung des Proteasoms noch Degradation des Tau-Proteins stattfand, und ebenfalls bidirektional, da die Immunreaktivität für den C- und den N-terminalen Antikörper verschwand (Delobel, Leroy *et al.* 2005). Durch Gabe einer Kombination eines Proteasomhemmers und des Translationshemmers Cycloheximid wurde der Tau-Abbau komplett unterbunden, was auf Proteinsynthese bzw. Aktivierung anderer

Proteasen hindeutete. Delobel et al. postuliert, dass eine Hemmung des Proteasoms zwar nicht mehr zum Abbau von Tau führt, aber stattdessen die Protease Calpain I durch indirekte Änderung der Menge des Inhibitors Calpastatin aktiviert wird.

Eine Hemmung des Proteasoms resultiert in der Anhäufung ungefalteter und oxidiertes Proteine, die eine weitere Störung der Funktion des Proteasoms bewirken. Gleichzeitig steigt der oxidative Stress und es bilden sich entzündliche Mediatoren wie COX-2, dessen Aktivität wiederum ROS und andere neurotoxische Prostaglandine produzieren und dadurch eine Rückkopplung entsteht (Halliwell 2002; Li, Jansen *et al.* 2003). Doch wurde bereits auch gezeigt, dass eine Hemmung des Proteasoms ebenfalls eine Induktion verschiedener Hitzeschock-Proteine (heat shock proteins, HSPs) veranlasst, die die Toleranzschwelle von Zellen gegenüber oxidativem Stress erhöhen und damit diesen Rückkopplungsmechanismus unterdrücken könnten (Bush, Goldberg *et al.* 1997). Diese Proteine können möglicherweise das Fehlfalten und Aggregieren von Proteinen nach Stress verhindern oder apoptotische Signale unterdrücken. Daher könnten pro-apoptotische Stimuli unterhalb eines Grenzbereiches in protektiven Antworten münden (Parcellier, Gurbuxani *et al.* 2003).

In einer Microarray-Studie wurden in neuronalen Primärzellen Gene identifiziert, die nach einer Hemmung des Proteasoms sowohl pro-apoptotische als auch neuroprotektive Antworten auf Transkriptionsebene hervor riefen (Yew, Cheung *et al.* 2005). Die Hochregulation verschiedener HSPs könnte die Zellen vor Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen schützen. Für HSP70 wurde anti-apoptotische Aktivität gezeigt durch Hemmung der aktivierten Caspase-3. Die Hochregulation von HSP22 scheint eine Reaktion spezifisch für den durch Proteasomhemmung vermittelten neuronalen Zelltod zu sein und zeigte neuroprotektive Effekte in Proteasom-gehemmten PC12-Zellen. Da eine Hemmung des Proteasom anscheinend nicht nur zur Neurodegeneration beiträgt sondern auch zur initialen Produktion neuroprotektiver Proteine, könnte eine Identifikation der Gene, die nach Proteasomhemmung unterschiedlich exprimiert werden, zu einem Verständnis pro-apoptotischer und anti-apoptotischer aktivierter Wege führen. Eine Studie zeigte, dass in murinen corticalen Zellkulturen eine Hemmung der Proteasomaktivität neuronale Zellapoptose sowohl induzieren als auch unterbinden kann durch Regulation Mitochondrien-vermittelter Apoptosewege und Hemmung des Abbaus inhibitorischer Apoptoseproteine (Suh, Lee *et al.* 2005).

4.3.1 Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins durch Phosphatase-Inhibition hemmt den Abbau durch das Proteasom

Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind entscheidend für die Regulation der Bindung des Tau-Proteins an Mikrotubuli. Eine übermäßige Phosphorylierung kann *in vitro* entweder aus vermehrte Aktivität einer Kinase, z.B. GSK-3 β oder Cdk5, oder verminderte Aktivität einer Phosphatase resultieren (Billingsley and Kincaid 1997; Lovestone and Reynolds 1997). Unter den Ser/Thr-Proteinphosphatasen wurde gezeigt, dass Proteinphosphatase-1, -2A und -2B (Calcineurin) die Dephosphorylierung hyperphosphorylierten Alzheimer-Taus katalysieren (Gong, Grundke-Iqbal *et al.* 1994; Wang, Gong *et al.* 1995). Untersuchungen der Phosphatase-Aktivität in Alzheimergehirnen zeigte, dass diese beeinträchtigt ist (Gong, Shaikh *et al.* 1995). Proteinphosphatase-2A (PP2A) scheint die hauptverantwortliche Phosphatase zur Regulation der Tau-Phosphorylierung zu sein; eine Downregulierung alleine führt in Mäusehirnen jedoch nicht zur Bildung von PHFs (Goedert, Jakes *et al.* 1995; Kins, Crameri *et al.* 2001).

Als potenter Inhibitor der PP2A wird häufig Okadiac Acid (OA) verwendet. In Versuchen an transgenen Mäusen führte es zur Hyperphosphorylierung der alzheimerspezifischen AT8-Epitope Ser202/Thr205, Bildung von Tau-Aggregaten im somatodendrischen Kompartimenten und Ko-Lokalisation mit Ubiquitin (Kins, Crameri *et al.* 2001). In der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y führte eine Inkubation mit OA in Anwesenheit von 4-Hydroxynonenal (HNE) zur Polymerisation von phosphoryliertem Tau und zu fibrillären Strukturen (Perez, Hernandez *et al.* 2002). Dennoch soll nicht unerwähnt bleiben, dass OA *in vivo* auch neurotoxische Eigenschaften besitzt, pro-inflammatorische und DNA/RNA-Synthese hemmende Eigenschaften beschrieben sind und daher nur eingeschränkt zur Tau-Hyperphosphorylierung genutzt werden sollte (Mudher and Perry 1998).

Hemmung der PP1/2A durch OA führte in HT22-Zellen zu einer Verringerung des zeitabhängigen Tau-Turnovers, aber nicht zu einer Abnahme der Aktivität des Proteasoms, die im Gegenteil in den ersten zwei Stunden um fast 60% zunahm. In den Primärkulturen wurden ähnliche Effekte beobachtet, dass der Turnover vermindert aber nicht vollständig unterbunden war. Bisher sind nur wenige Veröffentlichungen bekannt, die berichten, dass hyperphosphoryliertes Tau den Proteasom-Abbau hemmt. Litersky und Wang beschrieben den Abbau von Tau durch Calpaine und berichteten von einem inhibitorischen Effekt

durch Phosphorylierung (Litersky and Johnson 1992; Wang, Gong, Shaikh *et al.* 1995). Ren und Liao untersuchen ebenfalls den Effekt von phosphoryliertem Tau-Protein auf die Proteasomaktivität und vermuten, dass eine moderate Tau-Phosphorylierung zu einer Aktivierung des Proteasoms und eine weitere Hyperphosphorylierung/Akkumulation des Tau-Proteins zu einer Hemmung des Proteasoms führt (Ren, Liao *et al.* 2007)

Möglicherweise stellt die Tau-Phosphorylierung einen Mechanismus dar, um den Abbau durch verschiedene Proteasen zu verhindern. Eine kürzlich veröffentlichte Publikation mit Hemmung der Proteinphosphatase durch Calyculin A zeigte für das UPS, dass beide Phosphorylierungszustände degradiert werden, aber es zeigte auch dass unphosphoryliertes Tau dem Abbau zugänglicher ist als phosphoryliertes (Zhang, Liu *et al.* 2005).

Dass Tau normalerweise kein Substrat des Proteasoms ist, wurde in einer anderen Publikation vermutet. Eine Inkubation mit MG132 verringerte den Tau-Spiegel, und dadurch wurde das Proteasom stabilisiert bzw. andere Proteasen aktiviert. Eine Hyperphosphorylierung von exprimiertem fötalen Tau triggerte nicht den Abbau durch das Proteasom (Feuillette, Blard *et al.* 2005). In Oligodendrozyten wurde jedoch gezeigt, dass eine Hemmung der Proteasomaktivität zur Stabilisierung von Aggregaten aus hyperphosphoryliertem Tau beitragen kann (Goldbaum, Oppermann *et al.* 2003). Shimura und Kollagen haben von *In-vitro*-Ubiquitinierung von immunpräzipitiertem Tau aus Alzheimer- aber nicht Kontrollgehirnen berichtet, und dass überexprimiertes Tau hyperphosphoryliert sein muss, damit es ein Substrat für das Proteasom darstellt (Shimura, Schwartz *et al.* 2004). Ist Tau also nur Substrat für Proteasom unter „pathologischen“ Bedingungen? Eine andere Publikation geht davon aus, dass das Tau-Protein, egal ob phosphoryliert oder nicht phosphoryliert, ein Substrat des ATP/Mg²⁺-abhängigen Proteasom-Protease-Systems im Rattengehirn ist (Zhang, Liu *et al.* 2005).

Über den indirekten Effekt der Phosphorylierung auf den Ubiquitin-vermittelten Tau-Abbau durch das 26S Proteasom gibt es unterschiedliche Berichte. Shimura *et al.* zeigten verstärkte Ubiquitinierung von Tau nach Phosphorylierung auf, in der Annahme, dass CHIP Tau-Proteine phosphorylierungs-abhängig ubiquitinyliert. Petrucelli *et al.* aber zeigte, dass die Phosphorylierung von Tau die Ubiquitinierung verminderte und so auch den Abbau durch das 26S Proteasom (Petrucelli, Dickson *et al.* 2004; Shimura, Schwartz *et al.* 2004). Falls aber wirklich die Phosphorylierung den Abbau beeinträchtigt, der

hauptsächlich durch 20S Proteasom erfolgt, so sind die Effekte einer Hyperphosphorylierung auf den Abbau durch das 26S Proteasom von geringerer Bedeutung.

4.3.2 Oxidativer Stress erhöht den Tau-Turnover auf indirektem Wege

In mehreren Publikationen wurde berichtet, dass milder oxidativer Stress signifikant die Proteolyse vieler Proteine steigert und dadurch auch den Abbau durch das 20S Proteasom verstärkt (Grune, Reinheckel *et al.* 1995; Grune, Reinheckel *et al.* 1996; Reinheckel, Sitte *et al.* 1998; Shaw, Cohen *et al.* 1998). Ausnahmen bilden Proteine mit geringer oder keiner Sekundär- bzw. Tertiärstruktur (z.B. α -Casein), die keiner oxidationsbedingten Entfaltung unterlaufen. Verstärkte Erkennung und gesteigerter Abbau oxidativ modifizierter Proteine ist die Konsequenz eines oxidationsbedingten Entfaltungsprozesses, der die zuvor abgeschirmten hydrophoben Gruppen an die Oberfläche des entfalteten Proteins bringt (Pacifci, Kono *et al.* 1993; Grune, Merker *et al.* 2003). Solch hydrophobe Stellen bilden ein bevorzugtes Substrat für das 20S Proteasom. Da das Tau-Protein aber so gut wie keine Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt (Mandelkow, Song *et al.* 1995), war zu vermuten, dass eine Oxidation auch nur geringe Auswirkungen auf seinen Abbau bewirkte. Überraschenderweise jedoch wurde in HT22-Zellen der Tau-Turnover nach Wasserstoffperoxid-Behandlung signifikant erhöht. Dieser Effekt trat in den ersten zwei Stunden nach Versuchsbeginn auf und anschließend lag wieder die gleiche Abbaurate wie in Kontrollzellen vor. Die Proteasomaktivität war unverändert und der erhöhte Turnover konnte durch Verwendung des Proteasominhibitors MG132 komplett unterbunden werden.

Obwohl Wasserstoffperoxid-Behandlung nicht so stark zur Bildung von Oxidationsprodukten führt wie z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal (Rudeck, Volk *et al.* 2000; Takeda, Smith *et al.* 2000; Dozza, Smith *et al.* 2004; Santa-Maria, Hernandez *et al.* 2004; Liu, Smith *et al.* 2005), so verursacht es dennoch Carbonylbildung vieler Zellproteine und ist *in vivo* sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von großer Bedeutung (Rudeck, Volk *et al.* 2000; Lasch, Petras *et al.* 2001; Bota and Davies 2002). Die Gesamtmenge an Proteincarbonylen und die Konzentration an Tau-Carbonylen in HT22-Zellen waren signifikant erhöht. Wie in der Literatur berichtet (Ullrich and Grune 2001; Ernst, Stolzing *et al.* 2004; Liu, Smith *et al.* 2005), werden oxidierte Proteine im

intrazellulären Proteinpool vergleichsweise schnell proteolysiert und so wurden auch in HT22-Zellen 24 Stunden nach Wasserstoffperoxid-Behandlung kaum noch carbonyltragende Proteine detektiert. Im Gegensatz zu diesem allgemeinen Zellproteinpool wurde weniger als ein Drittel des oxidierten Tau-Proteins abgebaut. Die achtfach geringere Oxidation des Tau-Proteins gegenüber dem Gesamtproteinpool zeigte, dass das Tau-Protein generell weniger oxidationsempfindlich gegenüber H_2O_2 ist als andere Zellproteine.

In primären Neuronen und hippocampalen Hirnschnitten dagegen konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. In primären Neuronen wurde durch oxidativen Stress kein Einfluss auf den Tau-Turnover gemessen. In den Hirnschnitten dagegen sehr und so stark, dass gar kein Turnover mehr detektiert werden konnte und eine Zunahme radioaktiven Taus zu verzeichnen war. Die Ergebnisse ließen eher vermuten, dass oxidierte und radioaktiv markierte Proteine sehr schnell abgebaut und die radioaktive Aminosäure Lysin wieder eingebaut wurde. Eine Hemmung mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid könnte darüber Auskunft geben, ob tatsächlich der Tau-Turnover komplett unterbunden war oder durch eine sehr schnelle Syntheseleistung überdeckt wurde.

Obwohl in einer Studie mittels 2D-Oxyblot in Gehirnextrakten von Alzheimer- und Kontrollpatienten keine Carbonyl-Immunreaktivität für lösliches Tau-Protein gefunden wurde, so schlossen die Autoren dennoch nicht aus, dass oxidativ modifiziertes Tau in PHFs vorliegen kann. Sie vermuteten, dass oxidierte Modifikationen lediglich als Intermediate auftreten könnten und durch Cross-Linking dann zu unlöslichen Aggregaten weiter reagieren (Aksenov, Aksenova *et al.* 2001). So wurde bereits 1993 berichtet, dass eine Oxidation von Tau seine Dimerisation und Polymerisation in unlösliche Filamente induzieren könnte (Troncoso, Costello *et al.* 1993) und die Arbeitsgruppe von E. Mandelkow zeigte, dass eine Oxidation des Cysteins 322 in der Bindungsdomäne des Tau-Proteins *in vitro* zur Bildung von PHFs führt (Schweers, Mandelkow *et al.* 1995). In hippocampalen Rattenneuronen führte eine kurze Inkubation mit dem Oxidanz 4-Hydroxy-2-nonenal in niedriger Konzentration zu einer gesteigerten Tau-Phosphorylierung des AT8-Epitops und zu einer Resistenz gegen Dephosphorylierung (Mattson, Fu *et al.* 1997). In einer anderen Veröffentlichung dagegen bewirkte eine länger Inkubation mit HNE in höherer Konzentration ein Abnahme der Phosphorylierung an jenem Epitop (Kerokoski, Suuronen *et al.* 2001). Daher scheint der verstärkte Abbau des Tau-Proteins nach

Wasserstoffperoxid-Behandlung nicht auf eine Aufoxidation bzw. oxidative Modifikation zurückzuführen zu sein.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tau nur gering durch Oxidation modifiziert werden kann. Oxidativ modifiziertes Tau wurde *in vitro* nicht verstärkt proteolysiert, obwohl mit H₂O₂ belastete Zellen einen verstärkten Tau-Turnover erkennen ließen. Obwohl der Tau-Turnover während oxidativen Stress Proteasom-abhängig war, war es nicht das Resultat einer erhöhten Proteasom-Aktivität. Daher scheint der verstärkte Tau-Turnover während zellulären oxidativen Stress eher ein regulatorisches Phänomen zu sein als eine Konsequenz der Änderung der Tau-Konformation oder der Proteasom-Aktivität.

4.3.3 Einfluss oxidativen Stress auf PP1-vermittelte Tau-Phosphorylierung

In der Literatur liegen kontroverse Ansichten über den Effekt von oxidativem Stress auf den Phosphorylierungszustand des Tau-Proteins vor (Behl, Davis *et al.* 1994; Busciglio, Lorenzo *et al.* 1995; Davis, Anderton *et al.* 1997; Shea, Prabhakar *et al.* 1997; Xie and Johnson 1998; Hartigan and Johnson 1999). Dennoch scheint Einigkeit darüber zu herrschen, dass die Tau-Phosphorylierung durch Antwort auf zelluläre Schädigung modifiziert werden kann. In veröffentlichten Studie wurde eine Abnahme der Tau-Phosphorylierung während Belastung mit H₂O₂ beobachtet (Zambrano, Egana *et al.* 2004). Die Autoren erklären den Effekt durch einen Anstieg der Kinsase Cdk5, die den Inhibitor I-2 der Phosphatase PP1 phosphoryliert und zu dessen Abspaltung führt (siehe Abb. 4.3-1). PP1 würde dadurch aktiviert und zu einer Dephosphorylierung am Tau1-Epitop des Tau-Proteins führen (siehe Abb. 4.3-1). Adaption an oxidativen Stress scheint aber die Kinase GSK-3 β induzieren zu können, die die Tau-Phosphorylierung verstärkt (Hartigan and Johnson 1999).

Der Einfluss von H₂O₂ auf die *Phosphorylierung* des Tau-Proteins und Detektion per Western Blot wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Eine parallel angefertigte Arbeit einer Kollegin allerdings zeigte, dass durch H₂O₂ keine zusätzliche Phosphorylierung stattfand, eine Kombination aus H₂O₂ und Okadaic Acid allerdings ergab eine stärkere Phosphorylierung des Tau-Proteins als mit Okadaic Acid alleine (Poppek, Keck *et al.* 2006). Dieses Ergebnis beruhte auf der Adaption des PP2B-Regulators RCAN1 an oxidativen Stress und führte zur verstärkten Hemmung der Proteinphosphatase PP2B (siehe Abb. 4.3-1).

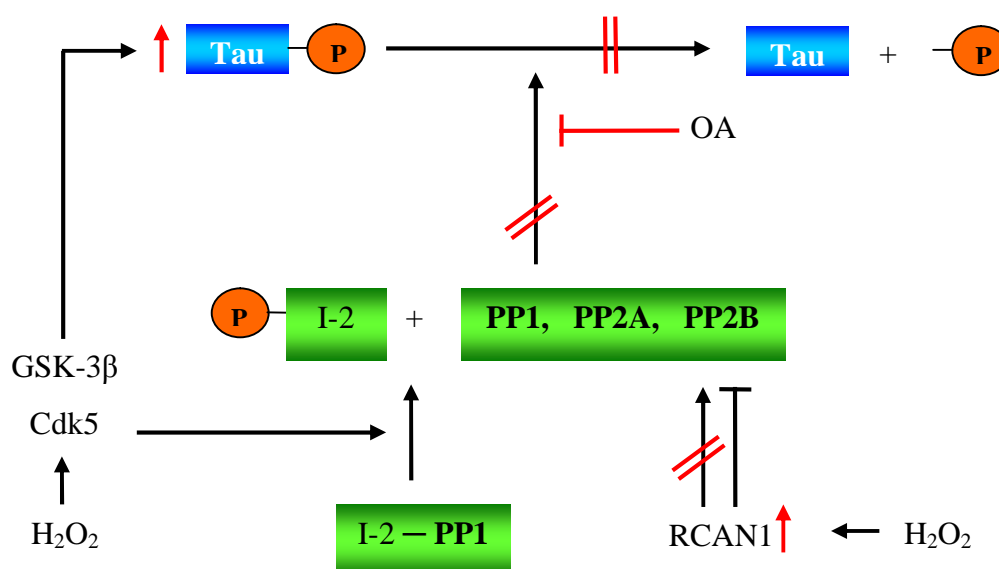


Abbildung 4.3–1 Einfluss oxidativer Stress auf die Tau-Phosphorylierung Die Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2B dephosphorylieren Tau-Proteine. Okadaic Acid und der Inhibitor I-2 können diesen Prozess unterbinden. H₂O₂ steigert die Expression des PP2B-Regulators (RCNA1) und hemmt somit PP2B und die Tau-Dephosphorylierung. H₂O₂ steigert ebenfalls die Aktivität der Kinasen GSK-3β und Cdk5, die Tau-Proteine phosphorylieren. Letztere führt durch Phosphorylierung von I-2 zur Aktivierung der Phosphatase PP1 und ist dadurch auch an der Dephosphorylierung indirekt beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde stattdessen der Einfluss von H₂O₂ auf den *Turnover* phosphorylierten Tau-Proteins untersucht. Dieser ergab in HT22-Zellen eine Verringerung des Turnovers im Vergleich zu Kontrollzellen, nur mit H₂O₂ behandelten Zellen und auch eine Verringerung im Vergleich zu OA-behandelten Zellen. Diese zusätzliche Hemmung wurde auch nicht durch ein gehemmtes Proteasom verursacht, da sich die proteasomale Aktivität nicht veränderte. Oxidiertes Tau-Protein also scheint ein gutes Substrat für das Proteasom zu sein, während Phosphorylierung dazu führt, dass es zum Abbau durch das Proteasom nicht mehr geeignet ist, möglicherweise weil es auch nur noch gering oxidiert werden kann, wie die Carbonyl-Daten zeigten. In primären Neuronen dagegen wurde ein eher gegenteiliger Effekt beobachtet und durch nachträgliche Oxidation der modifizierten Turnover nach OA wieder angeregt. In organisch hippocampalen Schnitten schien es abhängig von Dosis und Zeit zu sein, da nach mäßiger Phosphorylierung oxidativer Stress den Turnover wieder anregte wie in primären Neuronen und nach starker Phosphorylierung oxidativer Stress keinen Einfluss mehr auf den Tau-Turnover zu haben schien.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass ein Zusammenwirken von oxidativem Stress, wie er z.Bsp. durch Inflammation verursacht wird, und verstärkte Hyperphosphorylierung einen Abbau durch Proteasen unterbindet und somit zu Akkumulation, Aggregation und Pathologie der Alzheimer-Erkrankung beitragen kann. Pathologisch verstärkte Phosphorylierung des Tau-Proteins könnte somit ausreichend sein, um eine Akkumulation des Proteins in der Zelle auszulösen.

Die Vitalität der Zellen war stark beeinträchtigt nach kombinierter Inkubation mit H₂O₂ und OA. Dieses könnte auf eine erhöhte Toxizität durch phosphoryliertes Tau-Protein deuten, dass vom Mikrotubulus abdissoziiert und in freier Form toxisch für die Zelle ist (Mandelkow and Mandelkow 1998).

4.4 Nitrosativer Stress hemmt Tau-Turnover durch Phosphorylierung

In primären Neuronen bewirkte nitrosativer Stress durch den NO-Donator SNP eine Verlangsamung des Tau-Turnovers. Im Western Blot zeigte eine lange Inkubation mit SNP in niedriger Konzentration nur die Tendenz einer Phosphorylierung des Tau-Epitopes AT8. Eine kurze Inkubation mit höheren SNP-Konzentrationen resultierte in einer transienten Phosphorylierung des AT8-Epitops. Diese Ergebnisse bestätigen eine Studie, in der gezeigt wurde, dass NO aus SNP eine Tau-Phosphorylierung an den Epitopen Ser 396/404 (PHF-1) und Ser262 induzierte bei gleichzeitiger Aktivierung der Kinase GSK-3 β (Zhang, Xu *et al.* 2005). Eine andere Arbeit berichtete über Tau-Hyperphosphorylierung mit einhergehendem Anstieg der NOS-mRNA und -Protein-Spiegel in einer Ko-Kultur von A β -stimulierten Astrozyten und primären hippocampalen Neuronen und Hemmung der Hyperphosphorylierung durch einen NOS-Inhibitor (Saez, Pehar *et al.* 2004). In einer *In-vivo*-Studie am Rattengehirn wurde gezeigt, dass mit Peroxynitrit Nitrierung, Phosphorylierung und Akkumulation von Tau induziert werden kann. Gleichzeitig wurde eine Proteolyseresistenz nitrierten Tau-Proteins und verminderte Proteasomaktivität beobachtet (Zhang, Xu *et al.* 2006). Somit scheint nitrosativer Stress zur Phosphorylierung des Tau-Proteins beitragen und damit indirekt auch den Turnover des Tau-Proteins beeinflussen zu können.

4.5 Mikroglia-vermittelte Effekte

Die Summe einer enormen Literatur über die Rolle der Mikroglia-Aktivierung lässt vermuten, dass Mikrogliazellen eine gewisse Rolle bei der A β -Beseitigung spielt, dass allerdings die chronische Aktivierung unausweichlich weitere Zerstörung und neuropathologische Veränderungen im Alzheimergehirn bewirkt (Griffin, Stanley *et al.* 1989; Griffin, Sheng *et al.* 1998). Es wurde aber auch berichtet, dass aktivierte Mikroglia im Hippocampus von Alzheimerpatienten eher diffus verstreut waren und nicht mit den senilen Plaques korrelierten (DiPatre and Gelman 1997). Allerdings wurde eine große Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu NFT-enthaltenden Neuronen beobachtet. Dies ließ vermutet, dass Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Tau-Hyperphosphorylierung spielen könnten.

Eine Ausschüttung reaktiver Moleküle durch Mikroglia und Astrozyten scheint früher aufzutreten als die Entstehung von A β -Plaques, zumindest im Tiermodell. Erhöhte Expression von bestimmten Zytokinen wie IL-6, IL-12 und INF- γ wurden vor der extraneuronalen Plaque-Bildung in Tg2576-Mäusen gemessen (Tehrani, Hasanvan *et al.* 2001; Abbas, Bednar *et al.* 2002). Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass ramifizierte Mikroglia in der Lage sind mehr sekretorische Moleküle zu produzieren und diese physiologischen Veränderungen könnten zu einer kognitiven Beeinträchtigung führen, bevor eine Plaque-Entwicklung beobachtet werden kann, wie in möglichen Alzheimerpatienten berichtet (Cagnin, Brooks *et al.* 2001). So ist es weiterhin unklar, ob Mikrogliaaktivierung und/oder sezernierte Zytokine zu einer nachgeschalteten Pathologie bei der Alzheimer Erkrankung beitragen.

Keinerlei Daten liegen jedoch darüber vor, ob und wie aktivierte Mikrogliazellen den Turnover des Tau-Proteins in Neuronen beeinflussen könnten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach posttranslationalen Modifikationen des Tau-Proteins wie Oxidation oder Phosphorylierung aktivierte BV-2 Zellen den Turnover steigerten. Die Hemmung des Tau-Turnovers in primären Neuronen und OHSK durch Hyperphosphorylierung wurde wieder normalisiert und nach oxidativer Schädigung erfolgte eine Beschleunigung des Turnovers. Diese Ergebnisse deuten eher auf die regulierende und protektive Funktion aktivierter Mikrogliazellen hin (Streit 2005). Auf unbehandelte Zellen hatten aktivierte BV-2 Zellen dagegen einen hemmenden Effekt auf den Tau-Turnover. Diese Hemmung wurde jedoch

nicht unbedingt durch eine weitere Phosphorylierung von Tau verursacht, da in Western Blots keine eindeutigen Signale einer Hyperphosphorylierung zu detektieren waren.

Die hier vorgestellten Ergebnisse ergeben kein eindeutiges Bild, sie unterstreichen eher die Bifunktionalität dieser Zellen, der Mikroglia. Physiologisch bremsen aktivierte Mikrogliazellen den Turnover der Tau-Proteine und verlängern dadurch ihre Lebensdauer. Nach schädlicher Modifikation des Tau-Proteins beschleunigen aktivierte Mikrogliazellen den Turnover und unterstützen somit die Funktionalität des Mikrotubuliapparates in geschädigten Neuronen. Ob bei diesen Interaktionen zwischen aktivierter Mikroglia und Neuronen eher pro- oder anti-inflammatorische Zytokinmuster verantwortlich sind, bleibt offen, da in den Kulturen die Interleukin-Spiegel nicht gemessen wurden.

Mehrere Kinase werden im Zusammenhang mit der Tau-Phosphorylierung diskutiert, darunter auch Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5), Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und p38-mitogen-aktivierte Protein Kinase (p38-MAPK). Jede dieser Kinasen hat ihren speziellen Aktivierungsprozess, aber einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Mikrogliazellen Zytokine freisetzen, die diesen Aktivierungsprozess in Gang setzen könnten. Griffin und ihre Kollegen zeigten, dass Mikrogliaaktivierung durch sezerniertes Amyloid-Vorläuferprotein (APP) oder Lipopolysaccharid (LPS) einen erhöhten Gehalt an IL-1 α , IL-1 β und TNF α bewirkt und in dessen Folge Tau-Phosphorylierung und neuronaler Zellverlust auftreten (Li, Liu *et al.* 2003).

Am Tiermodell führte chronische Gabe von IL-1 zu Tau-Hyperphosphorylierung durch p38-MAPK (Sheng, Zhu *et al.* 2000) und in humanem Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten konnte in zahlreichen Neuronen eine Ko-Lokalisation von aktivierter p38-MAPK, AT8-reaktivem Tau-Protein als auch IL-1-immunoreaktive Mikrogliazellen detektiert werden (Sheng, Jones *et al.* 2001). Diese p38-MAPK-vermittelte Tau-Hyperphosphorylierung konnte auch in Gehirnen anderer neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Pick (Puig, Vinals *et al.* 2004) bestätigt werden und erhärtet somit die mögliche Assoziation zwischen Mikroglia und der Tau-Pathologie. Erhöhte IL-6-Spiegel in Gehirnen von Alzheimerpatienten wurden mehrfach berichtet (Bauer, Strauss *et al.* 1991; Jones, Horiuchi *et al.* 2001). Kürzlich wurde darüber berichtet, dass IL-6 die Kinase Cdk5 aktivieren kann (siehe Abb. 4.5-1), indem es den intrazellulären Spiegel des Ko-Faktors p35 erhöht und in primären hippocampalen Rattenneuronen dadurch Tau-

Hyperphosphorylierung bewirkt (Quintanilla, Orellana *et al.* 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Interleukine die Aktivität von Tau-Kinasen steigern können und dadurch die Bildung von NFTs begünstigen.

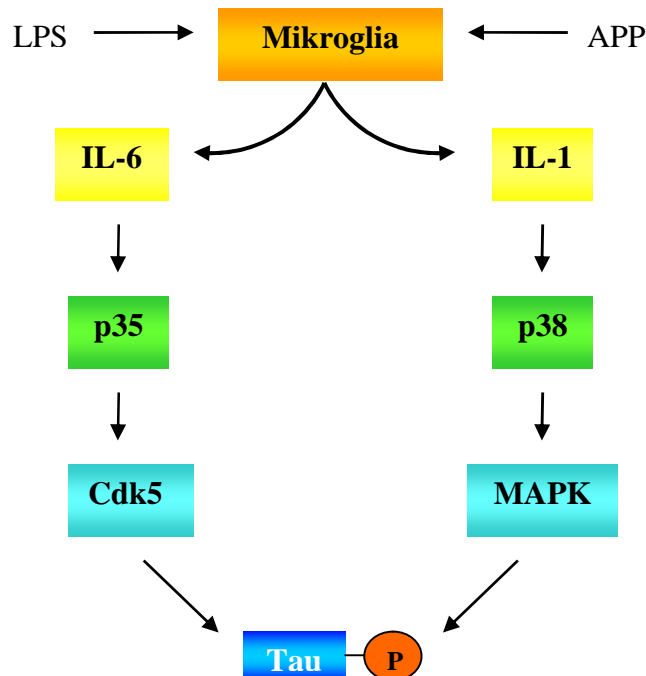


Abbildung 4.5–1 Mögliche Wege einer Mikroglia-induzierten Tau-Phosphorylierung Stimulation von Mikrogliazellen durch LPS oder APP führen zur Ausschüttung von Interleukinen (IL), die Tau-phosphorylierende Kinasen aktivieren können.

Eine Ko-Kultivierung primärer Neurone mit aktivierten BV-2 Zellen auf Zellkultureinsätzen führte nicht zu einer Phosphorylierung des Tau-Proteins am AT8-Epitop, eine Inkubation mit konditioniertem BV-2 Medium dagegen schon. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich um Mediatoren handeln könnte, die nicht membrangängig sind wie Lipide zum Beispiel. In OHSK allerdings wurde nach direktem Zellkontakt der aktivierten Mikrogliazellen mit dem Hirngewebe nur ein milder Effekt auf die Tau-Phosphorylierung beobachtet.

Was also triggert die Mikroglia-vermittelte Tau-Hyperphosphorylierung bzw. welche Mechanismen könnten der Induktion der Kinasen entgegenwirken? Eine bisher noch nicht betrachtete Zellpopulation im Gehirngewebe sind die Astrozyten. Astrozyten gehören ebenfalls zu den glialen Zellen und erfüllen im Gehirn wichtige Funktionen bei der Entwicklung, dem Metabolismus von Neurotransmittern und Aminosäuren, der

Unterstützung der synaptischen Funktion und bei der zerebrovaskulären Regulation (Maragakis and Rothstein 2006). Im Gehirn spielt die mikroglial-astrozytäre Kommunikation eine wichtige Rolle (Hansson and Ronnback 2003). Astrozyten scheinen dabei vor allem regulierend in den Prozess der Differenzierung und Deaktivierung von Mikrogliazellen einzugreifen. Astrozytär freigesetzte Faktoren wie der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β), Interleukin-10 (IL-10), der Makrophagen-Koloniestimulierende-Faktor (M-CSF) und der Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierende-Faktor (GM-CSF) können beispielsweise eine Ramifizierung und damit eine Deaktivierung von Mikrogliazellen induzieren (Vincent, Tilders *et al.* 1997; Aloisi 2001; Schilling, Nitsch *et al.* 2001). Astrozyten sind weiterhin in der Lage, die mikrogliale Phagozytose (DeWitt, Perry *et al.* 1998) und die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 zu unterdrücken (Aloisi, Penna *et al.* 1997). Therapeutisch bieten Astrozyten bereits einen Ansatz zur Neuroprotektion. Es wurde gezeigt, dass β -Laktam-Antibiotika die Expression und Funktionalität des Glutamattransporters GLT1 in Astrozyten erhöhen, dessen Disfunktion zu akuten und chronischen neurologischen Erkrankungen wie ALS führt. Durch Gabe der β -Laktam-Antibiotika konnte am Tiermodell der neuronale Verlust verringert werden (Rothstein, Patel *et al.* 2005).

Die verminderte Tau-Phosphorylierung durch BV-2 Mikrogliazellen im hippocampalen Hirnschnitt im Vergleich zur neuronalen Einzelkultur ließe sich somit durch die Anwesenheit von Astrozyten erklären. Eine Bestimmung der ausgeschütteten Zytokinmuster könnte hier zur Aufklärung beitragen, wurde allerdings nicht durchgeführt.

Eine Bestätigung einer möglichen Mikroglia-vermittelten Tau-Hyperphosphorylierung konnte durch die gezielte Hemmung der PARP-1 in Mikrogliazellen beobachtet werden. Eine spezifische Hemmung der PARP-1 in BV-2 Mikrogliazellen unterband die phosphorylierende Aktivität der Mikrogliazellen am Tau-Protein der Neurone. PARP-1 gehört zur Familie der Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen und es handelt sich dabei um ein nukläeres Enzym, das vor allem oxidativ geschädigte DNA wieder repariert. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer wurde eine erhöhte Poly(ADP-Ribosyl)ierung nukleärer Proteine in Neuronen beschrieben (Love, Barber *et al.* 1999). Immunhistochemisch wurden vermehrt PARP-positive Neuronen beobachtet und auch Astrozyten. Keine Poly(ADP-Ribose)-Akkumulation dagegen wurde in Mikroglia detektiert, in Neuronen jedoch eine Korrelation mit Tangles oder Plaques gefunden. Die PARP-1 ist wesentlich in die schnelle und

effiziente DNA-Reparatur involviert (Dantzer, Schreiber *et al.* 1999) und gerade in Neuronen weist sie eine außergewöhnlich hohe Aktivität auf (Pieper, Walles *et al.* 2000). Eben diese hohe PARP-1-Aktivität in Neuronen ist aber gerade wahrscheinlich sehr wichtig, um diesen postmitotischen Zellen wichtige Reparaturvorgänge und ein Überleben unter den Bedingungen einer Zellschädigung oder nach Invasion aktivierter Mikroglia zu ermöglichen (Colton and Gilbert 1993). Es wurde gezeigt, dass eine zellspezifische Hemmung der PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen deren Migration zum Ort eines Schadens hemmt und dadurch entstehende Sekundärschäden durch aktivierte Mikroglia im Parenchym verhindert (Ullrich, Diestel *et al.* 2001). Aus diesem Grunde scheint die zellspezifische Hemmung der PARP enorm wichtig zu sein. Dies erklärt auch, warum in der Ko-Kultur der OHSK mit aktivierten BV-2 Zellen der PARP-Inhibitor 3-ABA keinen Effekt zeigte, eine zellspezifische Hemmung nur in den Mikrogliazellen dagegen schon. Die mechanistische Rolle der PARP-1 wurde schon in der Regulation der LPS-induzierten Lungenentzündung demonstriert. In PARP Knock-Out-Mäusen (PARP-1^{-/-}) wurde nach einer Stimulation durch LPS im Lungengewebe unter anderem eine verminderte Ausschüttung von Chemokinen, der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α als auch eine verminderte NO-Produktion und Lipidperoxidation gemessen (Liaudet, Pacher *et al.* 2002). Bei der Induktion einer transienten fokalen zerebralen Ischämie in Mäusen wurde beobachtet, dass der PARP-Inhibitor PJ34 einen Anstieg der mRNA der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-6, E-Selectin und ICAM-1 verhinderte und somit zu einer Neuroprotektion beitrug (Haddad, Rhinn *et al.* 2006).

Inkubation primärer Neurone mit SNP als NO-Donator führte zu Hyperphosphorylierung und vermindertem Tau-Turnover und verschiedene Arbeiten zeigen als Mechanismus eine Aktivierung der Kinase GSK-3 β auf. Bei den Untersuchungen von GSK-3 β -Antagonisten zeigten sich zum einen Unterdrückung der pro-inflammatorischen Zytokin-Kaskade als auch eine Induktion anti-inflammatorischer Zytokine (Woodgett and Ohashi 2005). Eine spezifische Hemmung der PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen führt möglicherweise ebenfalls zu einer verminderten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Die Zytokin-vermittelte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins könnte somit einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bieten, um in die Pathologie der Alzheimer-Erkrankung einzugreifen.

Eine Veranschaulichung der in dieser Arbeit untersuchten Reaktionswege, Interaktionen und möglichen therapeutischen Ansatzpunkte ist in nachfolgenden Diagramm dargestellt.

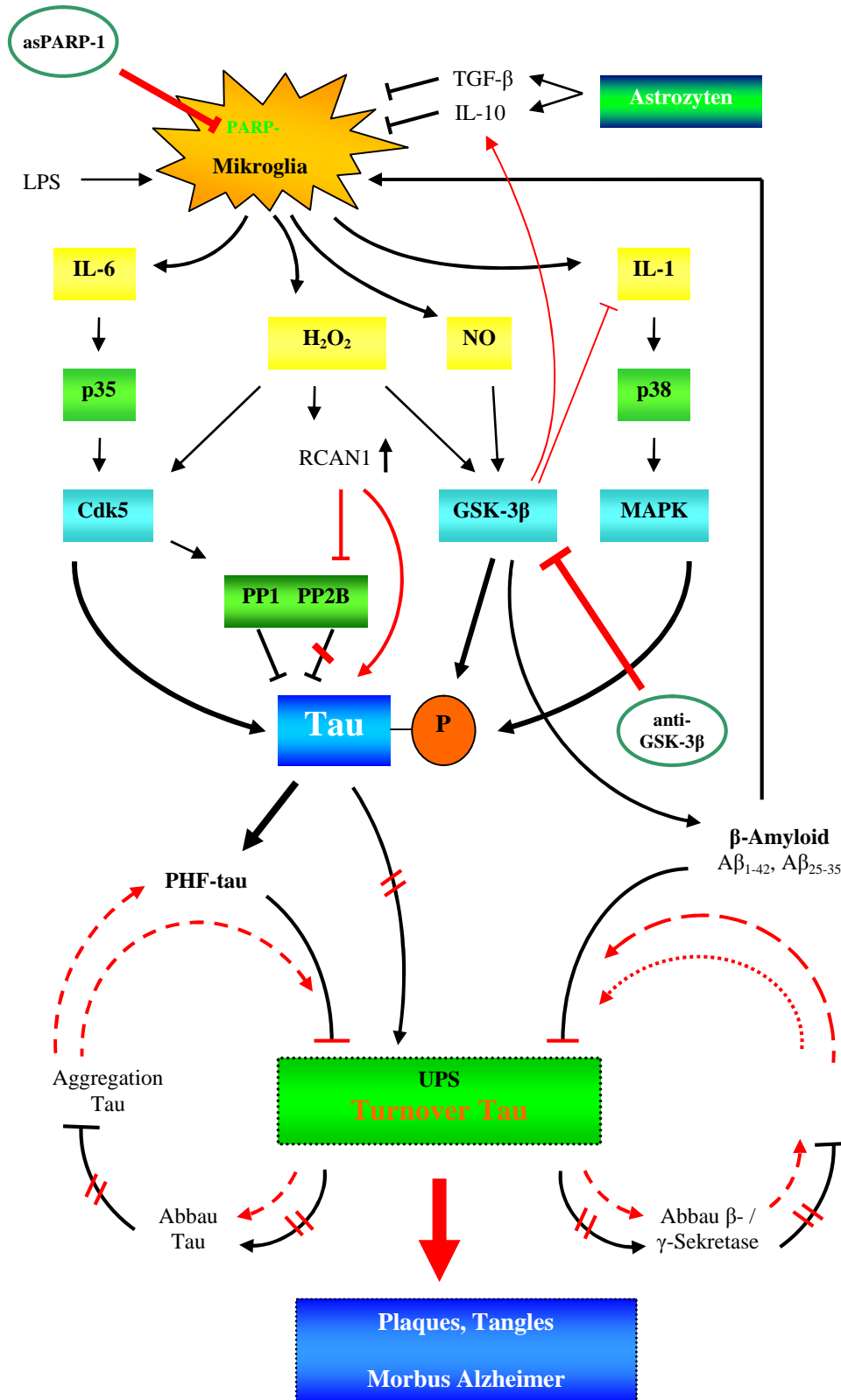


Abbildung 4.5–2 Übersicht über die möglichen Reaktionswege, Interaktionen und therapeutischen Ansatzpunkte bei der Alzheimer-Erkrankung. Grüne Kreise symbolisieren therapeutische Angriffspunkte, \rightarrow steht für Stimulation, \perp für Hemmung und \parallel für “physiologische Reaktion unterbunden”

5 Zusammenfassung / Summary

Morbus Alzheimer ist eine degenerative Erkrankung des Gehirns, die neuropathologisch durch extra- und intrazelluläre Ablagerungen, massiven Neuronenverlust und synaptische Dysfunktion gekennzeichnet ist. Die extrazellulären Ablagerungen treten als so genannte Plaques auf und bestehen aus aggregierten Amyloid- β -Peptiden. Intrazellulär befinden sich neurofibrilläre Bündel. Diese setzen sich aus dem Mikrotubulus-assoziierten Protein Tau zusammen, das sich zu paarig helikalen Filamenten (PHFs, *paired helical filaments*) zusammen gelagert hat. Wie auch andere Proteine unterliegt das Tau-Protein ebenfalls posttranslationalen Modifikationen wie zum Beispiel Oxidation oder Hyperphosphorylierung. Über den Auf- und Abbau - den so genannten Turnover - des Tau-Proteins, seiner Modifikationen und den daran beteiligten Proteasen ist jedoch wenig bekannt. Intrazellulär werden im gesunden Gehirn oxidierte und fehlgefaltete Proteine selektiv durch das komplexe Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Die Rolle dieser Protease in der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung ist bisher nicht geklärt. Extrazellulär werden Ablagerungen durch aktivierte Fresszellen des Gehirns, die so genannten Mikrogliazellen, entfernt. Ob diese Zellen durch Interaktion mit Neuronen auch zur Pathologie des Tau-Proteins beitragen, ist nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung folgende drei Aspekte untersucht: a) Interaktion von Tau-Protein und Proteasom in postmortem Alzheimer-Gehirngewebe, b) Turnover des Tau-Proteins und diverser posttranslationaler Modifikationen in verschiedenen Zellmodellen unter Berücksichtigung des Proteasoms und c) mögliche Auswirkungen der Interaktion von Mikrogliazellen und Neuronen auf die Tau-Pathologie.

Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung wurde über das Proteasom lediglich von dessen eingeschränkter Funktionalität berichtet. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestätigt zuvor veröffentlichte Beobachtungen von reduzierter Proteasomaktivität in postmortem Gehirnen von Alzheimerpatienten. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die erniedrigte Proteasomaktivität in postmortem Gehirnproben durch Bindung von PHF-Tau verursacht wurde. Die Untersuchungen ergaben eine verstärkte Reduktion der Proteasomaktivität bei Zunahme von Proteasom-gebundenem PHF-Tau und konstanter Konzentration des Proteasoms. Mit den PHFs konnte erstmals ein direkter intraneuronaler Verursacher identifiziert werden, der in der Lage war die Aktivität des

Proteasoms sehr effizient zu hemmen. Isoliertes PHF-Tau aus diesen Gehirnen ebenso wie *in vitro* aggregierte PHFs aus rekombinantem Tau-Protein waren in der Lage isoliertes Proteasom zu hemmen. Die funktionale Beeinträchtigung trat schon bei PHF-Tau-Konzentrationen weit unterhalb der physiologischen Tau-Konzentration auf. Diese Ergebnisse identifizierten gebundenes PHF-Tau als den Grund für verminderte Proteasomfunktionalität in Alzheimer-Gehirnen.

Über den Turnover des Tau-Proteins ist wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde natives, oxidiertes sowie phosphoryliertes Tau-Protein nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ auf seinen Turnover in verschiedenen Zellmodellen hin untersucht. Es zeigte sich, dass Modifikationen wie Hyperphosphorylierung und Oxidation den Tau-Turnover beeinflussten, allerdings in Abhängigkeit des verwendeten Zellmodells. Eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins wurde durch Inhibition der Proteinphosphatase PP1/2A erzielt. Es zeigte sich, dass diese Tau-Modifikation in HT22-Zellen zu einer Verringerung des zeitabhängigen Tau-Turnovers führte, nicht aber zu einer Abnahme der Proteasomaktivität. In den Primärkulturen wurden ähnliche Effekte beobachtet. Nitrosativer Stress verursachte einen verlangsamten Tau-Turnover in primären Neuronen und induzierte eine Phosphorylierung der alzheimerspezifischen Epitope. Oxidativer Stress steigerte in HT22-Zellen den Tau-Turnover signifikant, während in primären Zellen kaum eine Veränderung gemessen wurde. Carbonyl-Untersuchungen bestätigten, dass das Tau-Protein aufgrund seiner Struktur wenig oxidationsempfindlich ist. In den Zellen, die mit H₂O₂ belastet einen verstärkten Tau-Turnover erkennen ließen, konnte der Tau-Turnover als Proteasom-abhängig bestätigt werden. Dennoch war die Proteasomaktivität nicht erhöht. Oxidativer Stress schien sich nicht direkt auf den Tau-Turnover auszuwirken, weder durch Modifikation der Tau-Konformation noch durch Änderung der Proteasomaktivität, sondern indirekt durch regulierende Prozesse. Im zweiten Teil der Arbeit konnte in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden, dass das Tau-Protein sowohl in der neuronalen Zelllinie HT22 als auch in primären Neuronen generell ein Substrat des Proteasoms darstellt und dass das Proteasom eine Rolle beim Tau-Turnover spielt. Modifikationen des Tau-Proteins beeinflussten den Turnover durch das Proteasom, führten aber nicht zu einer Hemmung der Proteasomaktivität, wie dies durch Aggregation des Tau-Proteins im ersten Teil der Arbeit zu beobachten war.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde der Einfluss aktivierter Mikrogliazellen auf den Tau-Turnover und die Tau-Hyperphosphorylierung in primären neuronalen Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass aktivierte BV-2 Zellen den Tau-Turnover nach posttranslationaler Modifikation des Tau-Proteins durch Oxidation oder Phosphorylierung steigerten. Die Hemmung des Tau-Turnovers in primären Zellen durch Hyperphosphorylierung wurde durch Mikrogliazellen wieder normalisiert während nach oxidativer Schädigung eine Beschleunigung des Tau-Turnovers erfolgte. In unbehandelten Neuronen hatten aktivierte BV-2 Zellen dagegen einen hemmenden Effekt auf den Tau-Turnover. Diese Ergebnisse deuteten auf eine regulierende und protektive Funktion aktivierter Mikrogliazellen hin. Eine Bestätigung einer möglichen Mikroglia-vermittelten Tau-Hyperphosphorylierung konnte durch die gezielte Hemmung des PARP-Enzyms beobachtet werden. Eine spezifische Hemmung der PARP-1 in BV-2 Mikrogliazellen unterband die phosphorylierende Aktivität der Mikrogliazellen auf das Tau-Protein der Neurone. Eine Hemmung der PARP-1 führt möglicherweise ebenfalls zu einer verminderten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Die Zytokin-vermittelte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins könnte somit einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bieten, um in die Pathologie der Alzheimer-Erkrankung einzugreifen.

Summary

Alzheimer's Disease is characterized neuropathologically by intra- and extracellular deposits, severe loss of neurons and synaptic dysfunction. The extracellular deposits are so called „plaques“ and consist of aggregated β -amyloid peptides. Intracellularly there are neurofibrillary tangles. They are composed of the microtubule-associated protein tau that aggregated into paired helical filaments (PHFs). Like any other protein also the tau protein undergoes posttranslational modifications like oxidation or hyperphosphorylation. Only little is known about the turnover of the tau protein, its modifications and the participating proteases. In the healthy brain oxidized and misfolded proteins are degraded intracellularly by the complex ubiquitin-proteasome-system. The role of this protease within in the Alzheimer pathology is yet not known. Extracellularly deposits are degraded by activated phagocytes of the brain, the microglial cells. It is yet not known if these cells contribute to the Alzheimer pathology by interaction with neurons.

In this thesis the following three topics were examined: a) interaction of tau protein and proteasome in post mortem brain tissue of Alzheimers patients, b) turnover of tau protein and various posttranslational modifications in different cell models focusing on the role of the proteasome and c) possible effects of the interaction of microglial cells and neurons regarding the tau pathology.

In connection with Alzheimer's Disease all that has been reported about the proteasome is its impaired function. The first part of this thesis confirms previous publications about reduced proteasomal activity in brain tissue of Alzheimer patients. On top of that it was shown that the reduced proteasome activity was caused by binding of PHF-tau proteins. The experiments showed a decrease of proteasomal activity along with an increase in proteasome bound PHF-tau while the proteasome concentration remained the same. For the first time a direct neuronal culprit could be identified inhibiting the proteasome very efficiently. Isolated PHF-tau from brain tissue as much as *in vitro* assembled recombinant tau was able to inhibit isolated proteasomes. The functional impairment was detectable below physical concentrations. The results identify PHF-tau bound to proteasome as the cause for reduced proteasome activity in Alzheimer's Disease.

Little is known about the turnover of the tau protein. In this thesis the turnover of native, oxidized and phosphorylated tau proteins were not only examined qualitatively but also quantitatively. It was shown that modifications like oxidation or hyperphosphorylation influenced the tau turnover but dependently on the used cell model. Hyperphosphorylated tau proteins was yielded through inhibition of the protein phosphatase PP1/2A. This tau modification resulted in a decrease of the time dependent turnover in HT22 cells but not in a decrease of proteasome activity. Similar effects were observed in primary cell cultures.

Nitrosative stress caused a decreased tau turnover in primary neurons and induced phosphorylation of Alzheimer specific tau epitopes. Oxidative stress increased the tau turnover significantly in HT22 cells whereas hardly any change was observed in primary cells. Detection for carbonyls confirmed that due to its structure the tau protein is not susceptible to oxidation. Those cells which showed increased turnover after exposure to hydrogenperoxide also showed that the increased turnover was dependent of the proteasomal activity. But the overall proteasome activity was not elevated. Oxidative stress did not seem to influence tau turnover directly, neither through changes in tau conformation nor through changes in proteasomal activity, but it did seem to act indirectly through regulating processes. The second part of this thesis proved that the tau protein is a substrate of the proteasome in neural HT22 cells as well as in primary neurons and that the proteasome plays a role in the tau turnover. Modifications of the tau protein influenced the proteasome dependent tau turnover but did not result in proteasome inhibition as it was observed after tau aggregation shown in the first part of this work.

The final part examined the influence of activated microglial cells in terms of tau turnover and tau hyperphosphorylation in primary neuronal cells. It was shown that activated BV-2 cells increased the tau turnover after the protein had been posttranslationally modified by oxidation or phosphorylation. Decreased tau turnover after hyperphosphorylation was normalized and after oxidation increased tau turnover was observed. On contrary, Tau turnover in untreated cells was slowed down. These results indicated a regulating and protective function of activated microglial cells. A conformation of microglial induced hyperphosphorylation of tau protein was achieved by inhibition of the PARP enzyme. Specific inhibition of PARP-1 in BV-2 cells strongly reduced the tau phosphorylating activity of microglia in neurons. Inhibition of PARP-1 might lead to a decreased release of pro-inflammatory cytokines and so cytokine regulated hyperphosphorylation of tau protein might be a therapeutic target to fight Alzheimer's Disease.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, N., Bednar, I., Mix, E., Marie, S., Paterson, D., Ljungberg, A., Morris, C., Winblad, B., Nordberg, A. and Zhu, J. (2002). "Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice." *J Neuroimmunol* **126**(1-2): 50-7.
- Abraham, C. R. (1992). "The role of the acute-phase protein alpha 1-antichymotrypsin in brain dysfunction and injury." *Res Immunol* **143**(6): 631-6.
- Aisen, P. S., Schafer, K. A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K. L., Farlow, M. R., Jin, S., Thomas, R. G. and Thal, L. J. (2003). "Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial." *Jama* **289**(21): 2819-26.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. and Wyss-Coray, T. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **21**(3): 383-421.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W. and Markesbery, W. R. (2001). "Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease." *Neuroscience* **103**(2): 373-83.
- Alam, Z. I., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997). "A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease." *J Neurochem* **69**(3): 1326-9.
- Allain, H., Bentue-Ferrer, D., Tribut, O., Gauthier, S., Michel, B. F. and Drieu-La Rochelle, C. (2003). "Alzheimer's disease: the pharmacological pathway." *Fundam Clin Pharmacol* **17**(4): 419-28.
- Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." *Glia* **36**(2): 165-79.
- Aloisi, F., Penna, G., Cerase, J., Menendez Iglesias, B. and Adorini, L. (1997). "IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes." *J Immunol* **159**(4): 1604-12.
- Alvarez, G., Muñoz-Montañó, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogónez, E. and Diaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neuro-degeneration. *FEBS Lett.*, **453**, 260-264
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* **64**: 146-148.
- Andreadis, A., Brown, W. M. and Kosik, K. S. (1992). "Structure and novel exons of the human tau gene." *Biochemistry* **31**(43): 10626-33.
- Araujo, D. M. and Cotman, C. W. (1992). "Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease." *Brain Res* **569**(1): 141-5.

- Arias, C., Sharma, N., Davies, P. and Shafit-Zagardo, B. (1993). "Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons." J Neurochem **61**(2): 673-82.
- Bains, J. S. and Shaw, C. A. (1997). "Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death." Brain Res Brain Res Rev **25**(3): 335-58.
- Banati, R. B., Gehrman, J., Schubert, P. and Kreutzberg, G. W. (1993). "Cytotoxicity of microglia." Glia **7**(1): 111-8.
- Barron, K. D. (1995). "The microglial cell. A historical review." J Neurol Sci **134** Suppl: 57-68.
- Bauer, J., König, G., Strauss, S., Jonas, U., Ganter, U., Weidemann, A., Monning, U., Masters, C. L., Volk, B., Berger, M. and et al. (1991). "In-vitro matured human macrophages express Alzheimer's beta A4-amyloid precursor protein indicating synthesis in microglial cells." FEBS Lett **282**(2): 335-40.
- Bauer, J., Strauss, S., Volk, B. and Berger, M. (1991). "IL-6-mediated events in Alzheimer's disease pathology." Immunol Today **12**(11): 422.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L. and Pfeifer, G. (1988). "Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase." FEBS Lett **241**(1-2): 239-45.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell **92**(3): 367-80.
- Bednarski, E. and Lynch, G. (1996). "Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L." J Neurochem **67**(5): 1846-55.
- Behl, C. and Holsboer, F. (1998). "[Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection]." Fortschr Neurol Psychiatr **66**(3): 113-21.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-27.
- Benaroudj, N., Tarcsa, E., Cascio, P. and Goldberg, A. L. (2001). "The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes." Biochimie **83**(3-4): 311-8.
- Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. (2001). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation." Science **292**(5521): 1552-5.
- Benveniste, E. N. (1995). Cytokine production. Neuroglia. H. Kettenmann and B. R. Ransom. New York, Oxford, Oxford University Press: 700-713.
- Bertram, L. and Tanzi, R. E. (2005). "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease." J Clin Invest **115**(6): 1449-57.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988). "Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics." Biochem J **256**(1): 283-90.
- Bickel, H. (2000). "Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland." Gesundheitswesen **62**(4): 211-8.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1993). "Phosphorylation of serine 262 strongly reduces the binding of tau protein to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding." Neuron **11**: 153-163.

- Billingsley, M. L. and Kincaid, R. L. (1997). "Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration." Biochem J **323** (Pt 3): 577-91.
- Binder, L. I., Frankfurter, A. and Rebhun, L. I. (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." J Cell Biol **101**(4): 1371-8.
- Bishop, G. M. and Robinson, S. R. (2004). "Physiological roles of amyloid-beta and implications for its removal in Alzheimer's disease." Drugs Aging **21**(10): 621-30.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R. and Bistoni, F. (1990). "Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus." J Neuroimmunol **27**(2-3): 229-37.
- Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P. and Kettenmann, H. (1992). "An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells." J Neurosci Res **31**(4): 616-21.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999). "The proteasome." Annu Rev Biophys Biomol Struct **28**: 295-317.
- Bogdanovic, N. (2000). "Alzheimer's disease: plaques and tangles." J Cell Mol Med **4**(4): 304-305.
- Bota, D. A. and Davies, K. J. (2002). "Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism." Nat Cell Biol **4**(9): 674-80.
- Braak, E., Braak, H. & Mandelkow, E. (1994), 'A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and and neuropil threads', Acta Neuropathol. **87**, 554–567.
- Braak, H. & Braak, E. (1998), 'Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease', J. neural Transm. **105** (Suppl. 53), 127–140.
- Braak, H. and Braak, E. (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol (Berl) **82**(4): 239-59.
- Braak, H., E. Braak, J. Bohl, and R. Reintjes. 1996. Age, neurofibrillary changes, A betaamyloid and the onset of Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 210:87-90.
- Bramblett, G. T., J. Q. Trojanowski und V. M. Lee (1992). "Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins)." Lab. Invest. **66**(2): 212-222.
- Brandt, R., Leger, J. and Lee, G. (1995). "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain." J Cell Biol **131**(5): 1327-40.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999). "The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity." Nat Cell Biol **1**(4): 221-6.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. and Price, P. J. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-76.
- Brown, D. R. and Kretschmar, H. A. (1997). "Microglia and prion disease: a review." Histol Histopathol **12**(3): 883-92.

- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. and Stefani, M. (2002). "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." Nature **416**(6880): 507-11.
- Buee, L. und A. Delacourte (1999). "Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease." Brain Pathol **9**(4): 681-693.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. and Hof, P. R. (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. and Yankner, B. A. (1995). "beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding." Neuron **14**(4): 879-88.
- Bush, K. T., Goldberg, A. L. and Nigam, S. K. (1997). "Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance." J Biol Chem **272**(14): 9086-92.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. and Winterbourn, C. C. (1997). "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method." Free Radic Biol Med **23**(3): 361-6.
- Butner, K. A. and Kirschner, M. W. (1991). "Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites." J Cell Biol **115**(3): 717-30.
- Caceres, A. and Kosik, K. S. (1990). "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." Nature **343**(6257): 461-3.
- Cagnin, A., Brooks, D. J., Kennedy, A. M., Gunn, R. N., Myers, R., Turkheimer, F. E., Jones, T. and Banati, R. B. (2001). "In-vivo measurement of activated microglia in dementia." Lancet **358**(9280): 461-7.
- Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M. T., Brancolini, C., Rinaldi, A. M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A. and Calissano, P. (1998). "Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis." J Neurosci **18**(18): 7061-74.
- Cardozo, C. and Michaud, C. (2002). "Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a nonprocessive pathway." Arch Biochem Biophys **408**(1): 103-10.
- Chao, C. C., Ma, Y. S. and Stadtman, E. R. (1997). "Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2969-74.
- Check, E. (2003). "Battle of the mind." Nature **422**(6930): 370-2.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. and Hirokawa, N. (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." Nature **360**(6405): 674-7.
- Chiueh, C. C. (1999). "Neuroprotective properties of nitric oxide." Ann N Y Acad Sci **890**: 301-11.
- Christie, R. H., Freeman, M. and Hyman, B. T. (1996). "Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease." Am J Pathol **148**(2): 399-403.
- Ciechanover, A. (1994). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." Cell **79**(1): 13-21.

- Ciechanover, A. and Brundin, P. (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." *Neuron* **40**(2): 427-46.
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., Winblad, B., Venizelos, N., Lannfelt, L. & Selkoe, D. (1994), 'Excessive production of amyloid β -protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the swedish familial Alzheimer disease mutation', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11993–11997.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Selkoe, D. et al. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase the production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.*, **3**, 67-72
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977a). "Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin." *J Mol Biol* **116**(2): 207-25.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977b). "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly." *J Mol Biol* **116**(2): 227-47.
- Colton, C. A. and Gilbert, D. L. (1993). "Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain." *Adv Neurol* **59**: 321-6.
- Cotman, C. W., Tenner, A. J. and Cummings, B. J. (1996). "beta-Amyloid converts an acute phase injury response to chronic injury responses." *Neurobiol Aging* **17**(5): 723-31.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996). "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes." *Annu Rev Biochem* **65**: 801-47.
- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* **262**(5134): 689-95.
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P. and Yang, A. J. (2006). "Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation." *J Biol Chem* **281**(16): 10825-38.
- Crowther, R. A. (1991). "Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 2288-2292.
- Cunningham, C. C., N. Leclerc, L. A. Flanagan, M. Lu, P. A. Janmey und K. S. Kosik (1997). "Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line." *J. Cell Biol.* **136**(4): 845-857.
- Curnette J.T. and Babior B.M. (1987), 'Chronic granulomatous disease', *Adv. Hum. Genet.* **16**: 229–297
- D'Andrea, M. R. (2003). "Evidence linking neuronal cell death to autoimmunity in Alzheimer's disease." *Brain Res* **982**(1): 19-30.
- Dantzer, F., Schreiber, V., Niedergang, C., Trucco, C., Flatter, E., De La Rubia, G., Oliver, J., Rolli, V., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1999). "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair." *Biochimie* **81**(1-2): 69-75.
- David, D. C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2002). "Proteasomal degradation of tau protein." *Journal of Neurochemistry* **83**(1): 176-185.

- Davies, K. J. (2001). "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." Biochimie **83**(3-4): 301-10.
- Davies, K. J. and Goldberg, A. L. (1987). "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells." J Biol Chem **262**(17): 8227-34.
- Davies, P. and Maloney, A. J. (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8000): 1403.
- Davis, D. R., Anderton, B. H., Brion, J. P., Reynolds, C. H. and Hanger, D. P. (1997). "Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures." J Neurochem **68**(4): 1590-7.
- de Pril, R., Fischer, D. F., Maat-Schieman, M. L., Hobo, B., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Hol, E. M., Roos, R. A. and van Leeuwen, F. W. (2004). "Accumulation of aberrant ubiquitin induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases." Hum Mol Genet **13**(16): 1803-13.
- De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." Neuron **38**(1): 9-12.
- Delacourte, A., Y. Robitaille, N. Sergeant, L. Buee, P. R. Hof, A. Watzel, A. Laroche-Cholette, J. Mathieu, P. Chagnon und D. Gauvreau (1996). "Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease." J. Neuropathol. Exp. Neurol. **55**(2): 159-168.
- Delobel, P., Leroy, O., Hamdane, M., Sambo, A. V., Delacourte, A. and Buee, L. (2005). "Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation." FEBS Lett **579**(1): 1-5.
- DeWitt, D. A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C. and Silver, J. (1998). "Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease." Exp Neurol **149**(2): 329-40.
- DiPatre, P. L. and Gelman, B. B. (1997). "Microglial cell activation in aging and Alzheimer disease: partial linkage with neurofibrillary tangle burden in the hippocampus." J Neuropathol Exp Neurol **56**(2): 143-9.
- Dozza, B., Smith, M. A., Perry, G., Tabaton, M. and Stocchi, P. (2004). "Regulation of glycogen synthase kinase-3beta by products of lipid peroxidation in human neuroblastoma cells." J Neurochem **89**(5): 1224-32.
- Drewes, G., Ebnet, A. and Mandelkow, E. M. (1998). "MAPs, MARKs and microtubule dynamics." Trends Biochem Sci **23**(8): 307-11.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1995). "Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262." J Biol Chem **270**(13): 7679-88.
- Drubin, D. G. and Kirschner, M. W. (1986). "Tau protein function in living cells." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2739-46.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M. and Kirschner, M. W. (1985). "Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors." J Cell Biol **101**(5 Pt 1): 1799-807.

- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992). "Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease." *J Biol Chem* **267**(31): 22369-77.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-Tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Younkin, S. et al. (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, **383**, 710-713
- Duhamel, R. C. and Johnson, D. A. (1985). "Use of nonfat dry milk to block nonspecific nuclear and membrane staining by avidin conjugates." *J Histochem Cytochem* **33**(7): 711-4.
- Ebneth, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek und E. Mandelkow (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." *J. Cell Biol.* **143**(3): 777-794.
- Edmunds, T. and Pennington, R. J. (1982). "A high molecular weight peptide hydrolase in erythrocytes." *Int J Biochem* **14**(8): 701-3.
- Eikelenboom, P. and Veerhuis, R. (1996). "The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **17**(5): 673-80.
- El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C. and Loike, J. D. (1996). "Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils." *Nature* **382**(6593): 716-9.
- Ernst, A., Stolzing, A., Sandig, G. and Grune, T. (2004). "Protein oxidation and the degradation of oxidized proteins in the rat oligodendrocyte cell line OLN 93-antioxidative effect of the intracellular spin trapping agent PBN." *Brain Res Mol Brain Res* **122**(2): 126-32.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. and Ward, P. J. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." *Science* **248**(4959): 1122-4.
- Etminan, M., Gill, S. and Samii, A. (2003). "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies." *Bmj* **327**(7407): 128.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K. and Hartmann, T. (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5856-61.
- Feany, M. B. und D. W. Dickson (1996). "Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review." *Ann. Neurol.* **40**(2): 139-148.
- Feuillet, S., Blard, O., Lecourtois, M., Frebourg, T., Campion, D. and Dumanchin, C. (2005). "Tau is not normally degraded by the proteasome." *J Neurosci Res* **80**(3): 400-5.
- Finkel, T. (2000). "Redox-dependent signal transduction." *FEBS Lett* **476**(1-2): 52-4.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-47.
- Fischer, D. F., De Vos, R. A., Van Dijk, R., De Vrij, F. M., Proper, E. A., Sonnemans, M. A., Verhage, M. C., Sluijs, J. A., Hobo, B., Zouambia, M., Steur, E. N., Kamphorst, W., Hol, E. M. and Van Leeuwen, F. W. (2003). "Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain." *Faseb J* **17**(14): 2014-24.

- Flicker, L. and Grimley Evans, G. (2001). "Piracetam for dementia or cognitive impairment." Cochrane Database Syst Rev(2): CD001011.
- Frederiksen, K., Jat, P. S., Valtz, N., Levy, D. and McKay, R. (1988). "Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS." Neuron **1**(6): 439-48.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, E. M. Mandelkow, P. Davies und E. Mandelkow (1998). "A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(26): 15712-15717.
- Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1998). "Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution." Biochemistry **37**(28): 10223-30.
- Friguet, B. and Szweda, L. I. (1997). "Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein." FEBS Lett **405**(1): 21-5.
- Frotscher, M., Zafirov, S. and Heimrich, B. (1995). "Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus." Prog Neurobiol **45**(2): 143-64.
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M. and Mattson, M. P. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." J Neurochem **67**(5): 1882-96.
- Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I. and Cryns, V. L. (2003). "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 10032-7.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Soriano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B. & Zhao, J. (1995), 'Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717 -amyloid precursor protein', *Nature* **373**, 523–527.
- Georgieff, I. S., Liem, R. K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J. and Shelanski, M. L. (1993). "Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems." J Cell Sci **105 (Pt 3)**: 729-37.
- Giaccone, G., F. Tagliavini, G. Linoli, C. Bouras, L. Frigerio, B. Frangione, and O. Bugiani. 1989. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett.* **97**:232-8.
- Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2002). "The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases." Free Radic Biol Med **32**(12): 1264-75.
- Gilead, S. and Gazit, E. (2004). "Inhibition of amyloid fibril formation by peptide analogues modified with alpha-aminoisobutyric acid." Angew Chem Int Ed Engl **43**(31): 4041-4.
- Gillardon F, Kloß A, Berg M, Neumann M, Mechtler K, Hengerer B, Dahlmann B. (2007). "The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity." J Neurochem **101**(6):1483-90.

- Giulian, D. (1995). Microglia and neuronal dysfunction. Neuroglia. H. Kettenmann and B. R. Ransom. New York, Oxford, Oxford University Press: 671-684.
- Giulian, D. and Corpuz, M. (1993). "Microglial secretion products and their impact on the nervous system." Adv Neurol **59**: 315-20.
- Giulivi, C., Pacifici, R. E. and Davies, K. J. (1994). "Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome." Arch Biochem Biophys **311**(2): 329-41.
- Giurgea, C. E., Greindl, M. G. and Preat, S. (1983). "Nootropic drugs and aging." Acta Psychiatr Belg **83**(4): 349-58.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984a). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984b). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." Biochem Biophys Res Commun **122**(3): 1131-5.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome." Mol Cell Biol **18**(6): 3149-62.
- Goedert, M. and Jakes, R. (1990). "Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization." Embo J **9**(13): 4225-30.
- Goedert, M., G. Spillantini, N. J. Cairns und R. A. Crowther (1992). "Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms." Neuron **8**: 159-168.
- Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J. H. and Cohen, P. (1995). "Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase." J Neurochem **65**(6): 2804-7.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford und R. A. Crowther (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." Neuron **3**(4): 519-526.
- Goedert, M., R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Hasegawa, M. J. Smith und R. A. Crowther (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans." Nature **383**(6600): 550-553.
- Goldbaum, O., Oppermann, M., Handschuh, M., Dabir, D., Zhang, B., Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. and Richter-Landsberg, C. (2003). "Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid." J Neurosci **23**(26): 8872-80.
- Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1994). "Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A." Neuroscience **61**(4): 765-72.
- Gong, C. X., Shaikh, S., Wang, J. Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1995). "Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain." J Neurochem **65**(2): 732-8.

- Gong, C.-X., Lidsky, T., Wegiel, J., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2001). "Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain." Brain Research Protocols **6**(3): 134-140.
- Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W. and Perl, D. P. (1996). "Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease." Am J Pathol **149**(1): 21-8.
- Goode, B. L. and Feinstein, S. C. (1994). "Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau." J Cell Biol **124**(5): 769-82.
- Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E. and Feinstein, S. C. (2000). "Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease." J Biol Chem **275**(49): 38182-9.
- Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L. and Feinstein, S. C. (1997). "Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly." Mol Biol Cell **8**(2): 353-65.
- Goodwin, J. L., Uemura, E. and Cunnick, J. E. (1995). "Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of beta-amyloid and IFN-gamma." Brain Res **692**(1-2): 207-14.
- Gordon-Krajcer, W., Yang, L. and Ksiezak-Reding, H. (2000). "Conformation of paired helical filaments blocks dephosphorylation of epitopes shared with fetal tau except Ser199/202 and Ser202/Thr205." Brain Res **856**(1-2): 163-75.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J. & Nitsch, R. (2001), 'Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A_β 42 fibrils', *Science* **293**, 1491–1495.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-8.
- Greenberg, S. G. und P. Davies (1990). "A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**(15): 5827-5831.
- Greenberg, S. G., Davies, P., Schein, J. D. and Binder, L. I. (1992). "Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau." J Biol Chem **267**(1): 564-9.
- Greenwood, J.A., Scott, C.W., Spreen, R.C., Caputo, C.B., Johnson, G.V. (1994): Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as primary phosphate acceptor. J.Biol. Chem, **269**, 4373-4380.
- Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M. E., Van Nostrand, W. E. and Goldgaber, D. (1995). "Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro." J Biol Chem **270**(34): 19702-8.
- Gregori, L., Hainfeld, J. F., Simon, M. N. and Goldgaber, D. (1997). "Binding of amyloid beta protein to the 20 S proteasome." J Biol Chem **272**(1): 58-62.
- Griess, J. P. (1879). "Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt 'Über einige Azoverbindungen'." Ber. Deutsch. Chem. Ges. **12**: 426-428.
- Griffin, W. S., Sheng, J. G., Royston, M. C., Gentleman, S. M., McKenzie, J. E., Graham, D. I., Roberts, G. W. and Mrazek, R. E. (1998). "Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression." Brain Pathol **8**(1): 65-72.

- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd and Araoz, C. (1989). "Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7611-5.
- Grimaldi, L. M., Casadei, V. M., Ferri, C., Veglia, F., Licastro, F., Annoni, G., Biunno, I., De Bellis, G., Sorbi, S., Mariani, C., Canal, N., Griffin, W. S. and Franceschi, M. (2000). "Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism." Ann Neurol **47**(3): 361-5.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. and Finley, D. (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." Nat Struct Biol **7**(11): 1062-7.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. Tung, M. Quinlan, H. Wisniewski und L. Binder (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**: 4913-4917.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G. and Davies, K. J. (2003). "Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 709-18.
- Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K. J. (1996). "Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome." J Biol Chem **271**(26): 15504-9.
- Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K. J. (1997). "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells." Faseb J **11**(7): 526-34.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M. and Davies, K. J. (1995). "Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome." J Biol Chem **270**(5): 2344-51.
- Gustke, N., B. Steiner, E. M. Mandelkow, J. Biernat, H. E. Meyer, M. Goedert und E. Mandelkow (1992). "The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs." FEBS Lett. **307**(2): 199-205.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1994). "Domains of tau protein and interactions with microtubules." Biochemistry **33**(32): 9511-22.
- Haddad, M., Rhinn, H., Bloquel, C., Coqueran, B., Szabo, C., Plotkine, M., Scherman, D. and Margaille, I. (2006). "Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice." Br J Pharmacol **149**(1): 23-30.
- Hailer, N. P., Jarhult, J. D. and Nitsch, R. (1996). "Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures." Glia **18**(4): 319-31.
- Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." J Neurochem **59**(5): 1609-23.
- Halliwell, B. (2002). "Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurodegeneration that leads to oxidative and nitrosative stress and subsequent cell death." Ann N Y Acad Sci **962**: 182-94.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts." Arch Biochem Biophys **246**(2): 501-14.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update." FEBS Lett **307**(1): 108-12.

- Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L.F., Blackstock, W.P., Anderton, B.H.: New Phosphorylations Sites Identified in Hyperphosphorylated Tau (Paired Helical Filament-Tau) from Alzheimer's Disease Brain Using Nano electrospray Mass Spectrometry. *J. Neurochem.*, 1998, **71**, 2465-2476.
- Hansson, E. and Ronnback, L. (2003). "Glial neuronal signaling in the central nervous system." *Faseb J* **17**(3): 341-8.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. and Hirokawa, N. (1994). "Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein." *Nature* **369**(6480): 488-91.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* **256**(5054): 184-5.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hartigan, J. A. and Johnson, G. V. (1999). "Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway." *J Biol Chem* **274**(30): 21395-401.
- Hartmann, T. (1999). "Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**(6): 291-8.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Ihara, Y. (1992): Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.*, **672**, 17047-17054.
- He, G., Qing, H., Cai, F., Kwok, C., Xu, H., Yu, G., Bernstein, A. and Song, W. (2006). "Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of APH-1." *J Neurochem* **99**(5): 1403-12.
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J. F., Carney, J. M. and et al. (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." *J Neurochem* **65**(5): 2146-56.
- Hilt, W. and Wolf, D. H. (1995). "Proteasomen. Komplexe Proteasen führen zu einem neuen Verständnis der zellularen Regulation durch Proteolyse." *Naturwissenschaften* **82**(6): 257-68.
- Himmler, A. (1989). "Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family." *Mol. Cell. Biol.* **9**(4): 1389-1396.
- Hirokawa, N. (1982). "Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method." *J Cell Biol* **94**(1): 129-42.
- Hirokawa, N., Y. Shiomura und S. Okabe (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." *J. Cell Biol.* **107**(4): 1449-1459.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. and Nitsch, R. M. (2003). "Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease." *Neuron* **38**(4): 547-54.
- Holtzman, D. M. (2004). "In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology." *J Mol Neurosci* **23**(3): 247-54.

- Hom, R. K., Gailunas, A. F., Mamo, S., Fang, L. Y., Tung, J. S., Walker, D. E., Davis, D., Thorsett, E. D., Jewett, N. E., Moon, J. B. and John, V. (2004). "Design and synthesis of hydroxyethylene-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase." J Med Chem **47**(1): 158-64.
- Hull, M., Fiebich, B. L., Lieb, K., Strauss, S., Berger, S. S., Volk, B. and Bauer, J. (1996). "Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease: new therapeutic options." Neurobiol Aging **17**(5): 795-800.
- Hüsler, J. and Zimmermann, H. (2001). Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. Bern; Göttingen; Toronto; Seattle, Verlag Hans Huber.
- Ingano, L. A., Lentini, K. M., Kovacs, I., Tanzi, R. E. and Kovacs, D. M. (2000). "Cytoplasmic presenilin aggregates in proteasome inhibitor-treated cells." Ann N Y Acad Sci **920**: 259-60.
- Irizarry, M.C., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K., Hyman, B.T. (1997) APPSw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. J. Neuropathol. Exp. Neurol., **56**, 965-973
- Jaeschke, H. (1995). "Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury." Proc Soc Exp Biol Med **209**(2): 104-11.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H. T., Nixon, R. A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P. and Westaway, D. (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 979-82.
- Jellinger, K. A. (2001). "Neuropathologie der Demenzen." Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie **2**(1): 7-31.
- Jesberger, J. A. and Richardson, J. S. (1991). "Oxygen free radicals and brain dysfunction." Int J Neurosci **57**(1-2): 1-17.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S. and Drachman, D. A. (2000). "Statins and the risk of dementia." Lancet **356**(9242): 1627-31.
- Joachim, C., Morris, J. & Selkoe, D. (1989), 'Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease', Am. J. Pathol. **135**, 309-319.
- Johnson, G.V. (1992): Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. J. Neurochem., **59**, 2056-2062.
- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. and Fuller, G. M. (2001). "The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease." Faseb J **15**(1): 43-58.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. and Goldstein, L. S. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." Neuron **28**(2): 449-59.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. and Malinow, R. (2003). "APP processing and synaptic function." Neuron **37**(6): 925-37.
- Kampers, T., P. Friedhoff, J. Biernat und E. M. Mandelkow (1996). "RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein-tau into Alzheimer-like paired helical filaments." FEBS Lett. **399**(3): 344-349.

- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M. (2000). Principles of Neural Science, McGraw-Hill.
- Kanemaru, K., K. Takio, R. Miura, K. Titani und Y. Ihara (1992). "Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments." J. Neurochem. **58**(5): 1667-1675.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-6.
- Kaufmann, S. H., Ewing, C. M. and Shaper, J. H. (1987). "The erasable Western blot." Anal Biochem **161**(1): 89-95.
- Keller, J. N., Hanni, K. B. and Markesbery, W. R. (2000). "Impaired proteasome function in Alzheimer's disease." J Neurochem **75**(1): 436-9.
- Kerokoski, P., Suuronen, T., Salminen, A., Soininen, H. and Pirttila, T. (2001). "The levels of cdk5 and p35 proteins and tau phosphorylation are reduced during neuronal apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **280**(4): 998-1002.
- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-193.
- Kim, H. S., Kim, E. M., Lee, J. P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J. H., Chang, K. A., Yu, E., Jeong, S. J., Chong, Y. H. and Suh, Y. H. (2003). "C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression." Faseb J **17**(13): 1951-3.
- Kins, S., Cramer, A., Evans, D. R., Hemmings, B. A., Nitsch, R. M. and Gotz, J. (2001). "Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice." J Biol Chem **276**(41): 38193-200.
- Kisselev, A. F. and Goldberg, A. L. (2001). "Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates." Chem Biol **8**(8): 739-58.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N. and Goldberg, A. L. (1998). "Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes." J Biol Chem **273**(4): 1982-9.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. and Goldberg, A. L. (1999). "The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation." J Biol Chem **274**(6): 3363-71.
- Klein, W. L., Krafft, G. A. and Finch, C. E. (2001). "Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" Trends Neurosci **24**(4): 219-24.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. and Fahrenholz, F. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5815-20.
- Kontseikova, E., Cattaneo, A and Novak, M. (1995). "Quick purification of recombinant human truncated tau proteins for immunoanalysis." J Immunol Methods. **185**(2):245-8.
- Kopito, R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." Trends Cell Biol **10**(12): 524-30.
- Kopp, F., Dahlmann, B. and Hendil, K. B. (1993). "Evidence Indicating that the Human Proteasome is a Complex Dimer." Journal of Molecular Biology **229**(1): 14-19.

- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, S. Bakalis und R. L. Neve (1989). "Developmentally regulated expression of specific tau sequences." *Neuron* **2**(4): 1389-1397.
- Koudinov, A. R. and Koudinova, N. V. (2005). "Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration." *J Neurol Sci* **229-230**: 233-40.
- Kowall, N. W. and Kosik, K. S. (1987). "Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease." *Ann Neurol* **22**(5): 639-43.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." *Trends Neurosci* **19**(8): 312-8.
- Ksiezak-Reding, H., W. K. Liu und S. H. Yen (1992). "Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments." *Brain Res.* **597**(2): 209-219.
- Ladner, C. J., J. Czech, J. Maurice, S. A. Lorens und J. M. Lee (1996). "Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes." *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**(8): 924-931.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- LaFerla, F. M. (2002). "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 862-72.
- Lam, Y. A., Pickart, C. M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R. J. and Layfield, R. (2000). "Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9902-6.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3922-7.
- Lasch, P., Petras, T., Ullrich, O., Backmann, J., Naumann, D. and Grune, T. (2001). "Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A." *J Biol Chem* **276**(12): 9492-502.
- Laurenzi, M. A., Arcuri, C., Rossi, R., Marconi, P. and Bocchini, V. (2001). "Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2." *Neurochem Res* **26**(11): 1209-16.
- Law, A., Gauthier, S. and Quirion, R. (2001). "Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type." *Brain Res Brain Res Rev* **35**(1): 73-96.
- Lee, G., Neve, R. L. and Kosik, K. S. (1989). "The microtubule binding domain of tau protein." *Neuron* **2**(6): 1615-24.
- Lee, V. M., B. J. Balin, L. Otvos, Jr. und J. Q. Trojanowski (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau." *Science* **251**(4994): 675-678.
- Lee, V. M., Goedert, M. and Trojanowski, J. Q. (2001). "Neurodegenerative tauopathies." *Annu Rev Neurosci* **24**: 1121-59.
- Lee, M. H., Hyun, D. H., Jenner, P. and Halliwell, B. (2001). "Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production." *J Neurochem* **78**(1): 32-41.

- Lee, V. M., Wang, J. and Trojanowski, J. Q. (1999). "Purification of paired helical filament tau and normal tau from human brain tissue." Methods Enzymol **309**: 81-9.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M. J., Delacourte, A., Michalski, J. C. and Caillet-Boudin, M. L. (2003). "Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization." Biochim Biophys Acta **1619**(2): 167-76.
- Lendahl, U. and McKay, R. D. (1990). "The use of cell lines in neurobiology." Trends Neurosci **13**(4): 132-7.
- Lewis, J., Dickson, D., Lin, W., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. & McGowan, E. (2001). 'Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP', *Science* **293**, 1487-1491.
- Li, Y., Liu, L., Barger, S. W. and Griffin, W. S. (2003). "Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway." J Neurosci **23**(5): 1605-11.
- Li, Z., Jansen, M., Pierre, S. R. and Figueiredo-Pereira, M. E. (2003). "Neurodegeneration: linking ubiquitin/proteasome pathway impairment with inflammation." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 547-52.
- Liao, H., Y. Li, D. L. Brautigan und G. G. Gundersen (1998). "Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau." *J. Biol. Chem.* **273**(34): 21901-21908.
- Liaudet, L., Pacher, P., Mabley, J. G., Virag, L., Soriano, F. G., Hasko, G. and Szabo, C. (2002). "Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation." Am J Respir Crit Care Med **165**(3): 372-7.
- Lichtenberg-Kraag, B., E. M. Mandelkow, J. Biernat, B. Steiner, C. Schroter, N. Gustke, H. E. Meyer und E. Mandelkow (1992). "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**(12): 5384-5388.
- Lieb, K., Fiebich, B. L., Schaller, H., Berger, M. and Bauer, J. (1996). "Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce expression of alpha 1-antichymotrypsin in human astrocytoma cells by activation of nuclear factor-kappa B." J Neurochem **67**(5): 2039-44.
- Lindl, T. (2000). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lindwall, G. und R. D. Cole (1984a). "Phosphorylation affects the ability of Tau protein to promote microtubule assembly." *J. Biol. Chem.* **259**: 5301-5305.
- Lindwall, G. und R. D. Cole (1984b). "The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain." *J. Biol. Chem.* **259**(19): 12241-12245.
- Ling, E. A. and Wong, W. C. (1993). "The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts." Glia **7**(1): 9-18.
- Lipton, S. A. and Rosenberg, P. A. (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." N Engl J Med **330**(9): 613-22.
- Litersky, J. M. and Johnson, G. V. (1992). "Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain." J Biol Chem **267**(3): 1563-8.

- Liu, C. W., Lee, G. and Jay, D. G. (1999). "Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons." Cell Motil Cytoskeleton **43**(3): 232-42.
- Liu, Q., Smith, M. A., Avila, J., DeBernardis, J., Kansal, M., Takeda, A., Zhu, X., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P. I., Oliveira, C. R., Santos, M. S., Shimohama, S., Aliev, G., de la Torre, J., Ghanbari, H. A., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Sayre, L. M. and Perry, G. (2005). "Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations." Free Radic Biol Med **38**(6): 746-54.
- Lopez Salon, M., Morelli, L., Castano, E. M., Soto, E. F. and Pasquini, J. M. (2000). "Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease." J Neurosci Res **62**(2): 302-10.
- Lopez Salon, M., Pasquini, L., Besio Moreno, M., Pasquini, J. M. and Soto, E. (2003). "Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells." Exp Neurol **180**(2): 131-43.
- Love, S., Barber, R. and Wilcock, G. K. (1999). "Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease." Brain **122** (Pt 2): 247-53.
- Lovestone, S. and Reynolds, C. H. (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." Neuroscience **78**(2): 309-24.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E. and Rogers, J. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-62.
- Maher, P. and Davis, J. B. (1996). "The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity." J Neurosci **16**(20): 6394-401.
- Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1998). "Tau in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 425-7.
- Mandelkow, E. M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede und E. Mandelkow (1992). "Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau." FEBS Lett. **314**(3): 315-321.
- Mandelkow, E. M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B. and Mandelkow, E. (1996). "Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein." Ann N Y Acad Sci **777**: 96-106.
- Mandelkow, E., Song, Y. H., Schweers, O., Marx, A. and Mandelkow, E. M. (1995). "On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments." Neurobiol Aging **16**(3): 347-54.
- Maragakis, N. J. and Rothstein, J. D. (2006). "Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease." Nat Clin Pract Neurol **2**(12): 679-89.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-9.
- Masuhr, K. F. (1998). Neurologie. Stuttgart, Hippokrates (Duale Reihe).
- Matsuo, E. S., Shin, R. W., Billingsley, M. L., Van deVoorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1994). "Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau." Neuron **13**(4): 989-1002.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-9.

- Mattson, M. P., Barger, S. W., Furukawa, K., Bruce, A. J., Wyss-Coray, T., Mark, R. J. and Mucke, L. (1997). "Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease." Brain Res Brain Res Rev **23**(1-2): 47-61.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." J Neurosci **12**(2): 376-89.
- Mattson, M. P., Fu, W., Waeg, G. and Uchida, K. (1997). "4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau." Neuroreport **8**(9-10): 2275-81.
- Matus, A. (1988). "Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology." Annu. Rev. Neurosci. **11**: 29-44.
- Mayer, R. J. (2000). "The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(2): 145-8.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I. and Masters, C. L. (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Ann Neurol **46**(6): 860-6.
- McNaught, K. S. and Olanow, C. W. (2003). "Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S73-84; discussion S84-6.
- McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P. and Olanow, C. W. (2003). "Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease." Exp Neurol **179**(1): 38-46.
- McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O. and Jenner, P. (2001). "Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(8): 589-94.
- McRae, A., Dahlstrom, A. and Ling, E. A. (1997). "Microglial in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease." Gerontology **43**(1-2): 95-108.
- Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D. and Rossi, F. (1995). "Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma." Nature **374**(6523): 647-50.
- Mikkelsen, R. B. and Wardman, P. (2003). "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms." Oncogene **22**(37): 5734-54.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. and Eisdorfer, C. (2002). "The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis." J Neurol Sci **202**(1-2): 13-23.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." Nature **312**(5991): 237-42.
- Moore, S. and Thanos, S. (1996). "The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration." Prog Neurobiol **48**(4-5): 441-60.
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G. W. (2000). "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 982-5.
- Morgan, S. J. and Darling, D. C. (1994). Kultur tierischer Zellen. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Mori, H., Kondo, J. and Ihara, Y. (1987). "Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease." Science **235**(4796): 1641-4.
- Morimoto, B. H. and Koshland, D. E., Jr. (1990). "Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3518-21.
- Morishima-Kawashima, M. und K. S. Kosik (1996). "The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active." Mol. Biol. Cell **7**(6): 893-905.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. and Ihara, Y. (1993). "Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments." Neuron **10**(6): 1151-60.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani und Y. Ihara (1995). "Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau." J. Biol. Chem. **270**(2): 823-829.
- Moro, M. A., Cardenas, A., Hurtado, O., Leza, J. C. and Lizasoain, I. (2004). "Role of nitric oxide after brain ischaemia." Cell Calcium **36**(3-4): 265-75.
- Mortimer C.E. (1987), Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mudher, A. & Lovestone, S. (2002), 'Alzheimer's disease - do tauists and baptists finally shake hands?', TINS **25**, 22–26.
- Mudher, A. K. and Perry, V. H. (1998). "Using okadaic acid as a tool for the in vivo induction of hyperphosphorylated tau." Neuroscience **85**(4): 1329-32.
- Nagy, Z., Esiri, M., Jobst, K., Morris, J., King, E., McDonald, B., Litchfield, S., Smith, A., Barnetson, L. & Smith, A. (1995), 'Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria.', Dementia **6**, 21–31.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K., Davies, P., Greengard, P. & Buxbaum, J. (2000), 'Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline', J. Amer. med. Assoc. **283**, 1571–1577.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-62.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. and Donlon, T. A. (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." Brain Res **387**(3): 271-80.
- Nunan, J., Williamson, N. A., Hill, A. F., Sernee, M. F., Masters, C. L. and Small, D. H. (2003). "Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein." J Neurosci Res **74**(3): 378-85.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S. and Smith, M. A. (1999). "RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease." J Neurosci **19**(6): 1959-64.

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-21.
- Olanow, C. W. (1993). "A radical hypothesis for neurodegeneration." Trends Neurosci **16**(11): 439-44.
- Olesen, O. F. (1994). "Proteolytic degradation of microtubule associated protein tau by thrombin." Biochem Biophys Res Commun **201**(2): 716-21.
- Olney, J. W., Wozniak, D. F. and Farber, N. B. (1998). "Glutamate receptor dysfunction and Alzheimer's disease." Restor Neurol Neurosci **13**(1-2): 75-83.
- Orlowski, M., Cardozo, C. and Michaud, C. (1993). "Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids." Biochemistry **32**(6): 1563-72.
- Ott, A., Breteler, M. M., van Harskamp, F., Stijnen, T. and Hofman, A. (1998). "Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study." Am J Epidemiol **147**(6): 574-80.
- Pacifici, R. E. and Davies, K. J. (1990). "Protein degradation as an index of oxidative stress." Methods Enzymol **186**: 485-502.
- Pacifici, R. E., Kono, Y. and Davies, K. J. (1993). "Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome." J Biol Chem **268**(21): 15405-11.
- Papasozomenos, S. C. and Binder, L. I. (1987). "Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system." Cell Motil Cytoskeleton **8**(3): 210-26.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E. and Garrido, C. (2003). "Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 505-12.
- Parkinson, J. F., Mitrovic, B. and Merrill, J. E. (1997). "The role of nitric oxide in multiple sclerosis." J Mol Med **75**(3): 174-86.
- Perez, M., Hernandez, F., Gomez-Ramos, A., Smith, M., Perry, G. and Avila, J. (2002). "Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells." European Journal of Biochemistry **269**(5): 1484-1489.
- Perez, M., J. M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini und J. Avila (1996). "Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction." J. Neurochem. **67**(3): 1183-1190.
- Peters, J. M., Franke, W. W. and Kleinschmidt, J. A. (1994). "Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm." J Biol Chem **269**(10): 7709-18.
- Petersen, R. C. (2004). "Mild cognitive impairment as a diagnostic entity." Journal of Internal Medicine **256**(3): 183-194.
- Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G., Kim, J., Dillmann, W. H., Browne, S. E., Hall, A., Voellmy, R., Tsuboi, Y., Dawson, T. M., Wolozin, B., Hardy, J. and Hutton, M. (2004). "CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation." Hum Mol Genet **13**(7): 703-14.

- Phinney, A. L., Calhoun, M. E., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Zheng, H. and Jucker, M. (1999). "No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice." *Neuroscience* **90**(4): 1207-16.
- Pieper, A. A., Walles, T., Wei, G., Clements, E. E., Verma, A., Snyder, S. H. and Zweier, J. L. (2000). "Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption." *Mol Med* **6**(4): 271-82.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." *J Neurosci* **13**(4): 1676-87.
- Pike, C.J., B.J. Cummings, R. Monzavi, and C.W. Cotman. 1994. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 63:517-31.
- Pohl, T. (1990). "Concentration of proteins and removal of solutes." *Methods Enzymol* **182**: 68-83.
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., Davies, K. J. and Grune, T. (2006). "Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress." *Biochem J* **400**(3): 511-20.
- Preuss, U., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1997). "The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells." *J Cell Sci* **110** (Pt 6): 789-800.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A. and Herms, J. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci* **26**(27): 7212-21.
- Puig, B., Vinals, F. and Ferrer, I. (2004). "Active stress kinase p38 enhances and perpetuates abnormal tau phosphorylation and deposition in Pick's disease." *Acta Neuropathol (Berl)* **107**(3): 185-9.
- Qing, H., Zhou, W., Christensen, M. A., Sun, X., Tong, Y. and Song, W. (2004). "Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway." *Faseb J* **18**(13): 1571-3.
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R. B. (2004). "Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway." *Exp Cell Res* **295**(1): 245-57.
- Rechsteiner, M., Realini, C. and Ustrell, V. (2000). "The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation." *Biochem J* **345** Pt 1: 1-15.
- Rechsteiner, M., Rogers, S. and Rote, K. (1987). "Protein structure and intracellular stability." *Trends in Biochemical Sciences* **12**: 390.
- Reines, S. A., Block, G. A., Morris, J. C., Liu, G., Nessly, M. L., Lines, C. R., Norman, B. A. and Baranak, C. C. (2004). "Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study." *Neurology* **62**(1): 66-71.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J. and Grune, T. (1998). "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." *Biochem J* **335** (Pt 3): 637-42.
- Ren QG, Liao XM, Chen XQ, Liu GP and Wang JZ (2007). "Effects of tau phosphorylation on proteasome activity." *FEBS Lett.* **581** (7): 1521-8.

- Ren QG, Liao XM, Wang ZF, Qu ZS and Wang JZ (2006). "The involvement of glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase-2A in lactacystin-induced tau accumulation." *FEBS Lett.* **580** (10): 2503-11.
- Reisberg, B. (1988). "Functional assessment staging (FAST)." *Psychopharmacol Bull* **24**(4): 653-9.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. and Mobius, H. J. (2003). "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **348**(14): 1333-41.
- Reszka, A. A., R. Seger, C. D. Diltz, E. G. Krebs und E. H. Fischer (1995). "Association of mitogen-activated protein-kinase with the microtubule cytoskeleton." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8881-8885.
- Richter-Landsberg, C. and Vollgraf, U. (1998). "Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells." *Exp Cell Res* **244**(1): 218-29.
- Riederer, B. und A. Matus (1985). "Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**(17): 6006-6009.
- Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 27-33.
- Rogers, J., Webster, S., Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D. and McGeer, P. (1996). "Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis." *Neurobiol Aging* **17**(5): 681-6.
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D. S., Toan, S. V., Bruijn, L. I., Su, Z. Z., Gupta, P. and Fisher, P. B. (2005). "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." *Nature* **433**(7021): 73-7.
- Rudeck, M., Volk, T., Sitte, N. and Grune, T. (2000). "Ferritin oxidation in vitro: implication of iron release and degradation by the 20S proteasome." *IUBMB Life* **49**(5): 451-6.
- Saez, T. E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L. and Maccioni, R. B. (2004). "Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons." *In Vivo* **18**(3): 275-80.
- Santa-Maria, I., Hernandez, F., Martin, C. P., Avila, J. and Moreno, F. J. (2004). "Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers." *Biochemistry* **43**(10): 2888-97.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." *Nature* **400**(6740): 173-7.
- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D. and Eder, C. (2001). "Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways." *Eur J Neurosci* **14**(3): 463-73.
- Schneider, A., J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow und E. M. Mandelkow (1999). "Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments." *Biochemistry* **38**(12): 3549-3558.
- Schoenfeld, T. A. und R. A. Obar (1994). "Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system." *Int Rev Cytol* **151**: 67-137.

- Schulz, J. B. and Dichgans, J. (1999). "Molecular pathogenesis of movement disorders: are protein aggregates a common link in neuronal degeneration?" Curr Opin Neurol **12**(4): 433-9.
- Schweers, O., E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx und E. Mandelkow (1994). "Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure." J. Biol. Chem. **269**(39): 24290-24297.
- Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J. and Mandelkow, E. (1995). "Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8463-7.
- Scott, S. A., Johnson, S. A., Zarow, C. and Perlmuter, L. S. (1993). "Inability to detect beta-amyloid protein precursor mRNA in Alzheimer plaque-associated microglia." Exp Neurol **121**(1): 113-8.
- Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." Science **298**(5594): 789-91.
- Selkoe, D. J. (2004). "Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies." Ann Intern Med **140**(8): 627-38.
- Selkoe, D. J. and Schenk, D. (2003). "Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 545-84.
- Selkoe, D.J. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature. 399:A23-31
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.: Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules. Arch. Biochem. Biophys., 1998, **357**, 299-309.
- Sergeant, N., J. P. David, M. Goedert, R. Jakes, P. Vermersch, L. Buee, D. Lefranc, A. Watzel und A. Delacourte (1997). "Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications." J. Neurochem. **69**(2): 834-844.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., and et al., (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids, Nature, **359** (6393) : 325-327.
- Shang, F., Deng, G., Liu, Q., Guo, W., Haas, A. L., Crosas, B., Finley, D. and Taylor, A. (2005). "Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation." J Biol Chem **280**(21): 20365-74.
- Shareef, S., Sawada, A. and Neufeld, A. H. (1999). "Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(12): 2884-91.
- Shaw, M., Cohen, P. and Alessi, D. R. (1998). "The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2." Biochem J **336** (Pt 1): 241-6.
- Shea, T. B., Prabhakar, S. and Ekinici, F. J. (1997). "Beta-amyloid and ionophore A23187 evoke tau hyperphosphorylation by distinct intracellular pathways: differential involvement of the calpain/protein kinase C system." J Neurosci Res **49**(6): 759-68.

- Sheng, J. G., Jones, R. A., Zhou, X. Q., McGinness, J. M., Van Eldik, L. J., Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2001). "Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation." *Neurochem Int* **39**(5-6): 341-8.
- Sheng, J. G., Zhu, S. G., Jones, R. A., Griffin, W. S. and Mrak, R. E. (2000). "Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo." *Exp Neurol* **163**(2): 388-91.
- Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Ford, I., Gaw, A., Hyland, M., Jukema, J. W., Kamper, A. M., Macfarlane, P. W., Meinders, A. E., Norrie, J., Packard, C. J., Perry, I. J., Stott, D. J., Sweeney, B. J., Twomey, C. and Westendorp, R. G. (2002). "Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial." *Lancet* **360**(9346): 1623-30.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C. and Tsien, J. Z. (2000). "NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation." *Science* **290**(5494): 1170-4.
- Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S. P. and Kosik, K. S. (2004). "CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival." *J Biol Chem* **279**(6): 4869-76.
- Shringarpure, R., Grune, T., Sitte, N. and Davies, K. J. (2000). "4-Hydroxynonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1802-9.
- Sies H. (1986), 'Biochemistry of oxidant stress', *Angew. Chem. Int. Ed.* **25**: 1058–1071
- Sisodia, S. S. (1998). "Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial?" *Cell* **95**(1): 1-4.
- Sitte, N., Merker, K. and Grune, T. (1998). "Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts." *FEBS Lett* **440**(3): 399-402.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K. J. and Grune, T. (2000). "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells." *Faseb J* **14**(15): 2503-10.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (1994). "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth." *J Neurosci* **14**(4): 2117-27.
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A. and Markesbery, W. R. (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10540-3.
- Smith, K. J., Kapoor, R. and Felts, P. A. (1999). "Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species." *Brain Pathol* **9**(1): 69-92.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. and Kowall, N. (1996). "Oxidative damage in Alzheimer's." *Nature* **382**(6587): 120-1.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K. and Perry, G. (2000). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1502**(1): 139-44.
- Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., Sayre, L. M., Monnier, V. M. and Perry, G. (1994). "Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5710-4.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, G. S. Bloom und M. C. Mumby (1996). "Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A." *Neuron* **17**(6): 1201-1207.
- Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castano, E. M. and Frangione, B. (1998). "Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy." *Nat Med* **4**(7): 822-6.
- Spillantini, M. G. und M. Goedert (1998). "Tau protein pathology in neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci.* **21**(10): 428-433.
- Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H. E., Schmidt, B., Mieskes, G., Soling, H. D., Drexsel, D., Kirschner, M. W. and et al. (1990). "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles." *Embo J* **9**(11): 3539-44.
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radic Biol Med* **18**(2): 321-36.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalón, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Ketteman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S., Krzywinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J. and Marra, M. A. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16899-903.
- Streit, W. J. (1996). "The role of microglia in brain injury." *Neurotoxicology* **17**(3-4): 671-8.
- Streit, W. J. (2005). "Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease." *Brain Res Brain Res Rev* **48**(2): 234-9.
- Suh, J., Lee, Y. A. and Gwag, B. J. (2005). "Induction and attenuation of neuronal apoptosis by proteasome inhibitors in murine cortical cell cultures." *J Neurochem* **95**(3): 684-94.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E. and Younkin, S. G. (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." *Science* **264**(5163): 1336-40.
- Tagliavini, F., G. Giaccone, B. Frangione, and O. Bugiani. 1988. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett.* **93**:191-6.

- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P. and Gouras, G. K. (2002). "Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology." Am J Pathol **161**(5): 1869-79.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. and Yamaguchi, H. (1998). "Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons." Neurosci Res **31**(4): 317-23.
- Takeda, A., Smith, M. A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Zhu, X., Perry, G. and Sayre, L. M. (2000). "In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification." J Neurochem **75**(3): 1234-41.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, N., Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I. and et al. (1994). "APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain." J Biol Chem **269**(52): 32721-4.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B. and Tanaka, K. (2000). "Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis." J Biol Chem **275**(19): 14336-45.
- Taylor, J. P., Hardy, J. and Fischbeck, K. H. (2002). "Toxic proteins in neurodegenerative disease." Science **296**(5575): 1991-5.
- Tehrani, R., Hasanvan, H., Iverfeldt, K., Post, C. and Schultzberg, M. (2001). "Early induction of interleukin-6 mRNA in the hippocampus and cortex of APPsw transgenic mice Tg2576." Neurosci Lett **301**(1): 54-8.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K. and Weiss, M. (1964). "Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia." Am J Pathol **44**: 269-97.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C. M. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." Embo J **19**(1): 94-102.
- Tofaris, G. K., Layfield, R. and Spillantini, M. G. (2001). "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome." FEBS Lett **509**(1): 22-6.
- Tolnay, M. und A. Probst (1999). "REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders." Neuropathol Appl Neurobiol **25**(3): 171-187.
- Tomoda, H. and Omura, S. (2000). "Lactacystin, a proteasome inhibitor: discovery and its application in cell biology." Yakugaku Zasshi **120**(10): 935-49.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1999). "Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles." J Cell Sci **112** (Pt 14): 2355-67.
- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1995). "Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules." Mol. Biol. Cell **6**(12): 1887-1902.

- Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1995). "Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases." *Faseb J* **9**(15): 1570-6.
- Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., Hurn, D. and Lee, V. M. (2005). "Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments." *Expert Opin Pharmacother* **6**(5): 683-6.
- Troncoso, J. C., Costello, A., Watson, A. L., Jr. and Johnson, G. V. (1993). "In vitro polymerization of oxidized tau into filaments." *Brain Res* **613**(2): 313-6.
- Tsolaki, M., Pantazi, T. and Kazis, A. (2001). "Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors versus nootropics in Alzheimer's disease: a retrospective, longitudinal study." *J Int Med Res* **29**(1): 28-36.
- Tucker, R. P. (1990). "The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review." *Brain Res Brain Res Rev* **15**(2): 101-120.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. and Abraham, W. C. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* **70**(1): 1-32.
- Turrens, J. F. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Biosci Rep* **17**(1): 3-8.
- Uberty, D., Rizzini, C., Spano, P. F. and Memo, M. (1997). "Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line." *Neurosci Lett* **235**(3): 149-53.
- Ullrich, O. and Grune, T. (2001). "Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells." *Free Radic Biol Med* **31**(7): 887-93.
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyupoglu, I. Y. and Nitsch, R. (2001). "Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1." *Nat Cell Biol* **3**(12): 1035-42.
- Vassar, R. (2001). "The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **17**(2): 157-70.
- Vaziri, N. D., Lee, Y. S., Lin, C. Y., Lin, V. W. and Sindhu, R. K. (2004). "NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury." *Brain Res* **995**(1): 76-83.
- Vincent, V. A., Tilders, F. J. and Van Dam, A. M. (1997). "Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta." *Glia* **19**(3): 190-8.
- Vollmar, H. C., Koch, M., Löscher, S. and Butzlaff, M. (Version 05/2005). *Demenz, Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnose und Therapie*, Wissensnetzwerk evidence.de, Fakultät für Medizin der Privaten Universität Witten/Herdecke gGmbH.
- von Bergen, M., P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (2000). "Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(10): 5129-5134.
- Wald, N. and Law, M. (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study." *Lancet* **360**(9347): 1781; author reply 1783-4.

- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J. and Teplow, D. B. (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." *J Biol Chem* **274**(36): 25945-52.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002a). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-9.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002b). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." *Biochem Soc Trans* **30**(4): 552-7.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. and Selkoe, D. J. (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." *Biochemistry* **39**(35): 10831-9.
- Wang, J. Z., Gong, C. X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1995). "Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B." *J Biol Chem* **270**(9): 4854-60.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E. and Koo, E. H. (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." *Nature* **414**(6860): 212-6.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(5): 1858-62.
- Weis, S. (1997). *Handbuch Morbus Alzheimer*. Weinheim, Psychologie Verlags Union.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 169-78.
- Wekerle, H. (1995). Antigen presentation. *Neuroglia*. H. Kettenmann and B. R. Ransom. New York, Oxford, Oxford University Press: 685-699.
- Whittemore, E. R., Loo, D. T. and Cotman, C. W. (1994). "Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons." *Neuroreport* **5**(12): 1485-8.
- WHO/DIMDI (1994/2004). "Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Version 2005." *ICD-10: Kapitel V Psychische und Verhaltensstörungen (F00-F99)*.
- Wilk, S. and Orłowski, M. (1980). "Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme." *J Neurochem* **35**(5): 1172-82.
- Wille, H., E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1992). "The juvenile microtubule-associated protein MAP2c is a rod-like molecule that forms antiparallel dimers." *J. Biol. Chem.* **267**(15): 10737-10742.
- Wille, H., G. Drewes, J. Biernat, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow (1992). "Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro." *J. Cell Biol.* **118**: 573-584.
- Williams, L. R. (1995). "Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment." *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **7**(1): 55-73.

- Wilson, D. M. und L. I. Binder (1995). "Polymerization of microtubule-associated protein tau under near- physiological conditions." *J. Biol. Chem.* **270**(41): 24306-24314.
- Wilson, D. M. und L. I. Binder (1997). "Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease." *Am. J. Pathol.* **150**(6): 2181-2195.
- Wolf, D. H. and Hilt, W. (2004). "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal." *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 19-31.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G. and Siegel, G. (2000). "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors." *Arch Neurol* **57**(10): 1439-43.
- Woodgett, J. R. and Ohashi, P. S. (2005). "GSK3: an in-Toll-erant protein kinase?" *Nat Immunol* **6**(8): 751-2.
- Xie, H. Q. and Johnson, G. V. (1998). "Calcineurin inhibition prevents calpain-mediated proteolysis of tau in differentiated PC12 cells." *J Neurosci Res* **53**(2): 153-64.
- Xie, H., Litersky, J. M., Hartigan, J. A., Jope, R. S. and Johnson, G. V. (1998). "The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association." *Brain Res* **798**(1-2): 173-83.
- Yamaguchi, H., Y. Nakazato, S. Hirai, M. Shoji, and Y. Harigaya. 1989. Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol.* **135**:593-7.
- Yan, S. D., Chen, X., Schmidt, A. M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y. S., Scott, C. W., Caputo, C., Frappier, T., Smith, M. A. and et al. (1994). "Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7787-91.
- Yang, L. S. and Ksiezak-Reding, H. (1995). "Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments." *Eur J Biochem* **233**(1): 9-17.
- Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K. and Peterson, P. A. (1995). "In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing." *J Biol Chem* **270**(46): 27687-94.
- Yew, E. H., Cheung, N. S., Choy, M. S., Qi, R. Z., Lee, A. Y., Peng, Z. F., Melendez, A. J., Manikandan, J., Koay, E. S., Chiu, L. L., Ng, W. L., Whiteman, M., Kandiah, J. and Halliwell, B. (2005). "Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: a microarray analysis." *J Neurochem* **94**(4): 943-56.
- Yoshida, H. und Y. Ihara (1993). "Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: Assembly incompetence of paired helical filament tau." *Journal of Neurochem.* **61**: 1183-1186.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." *Physiol Rev* **74**(1): 139-62.
- Zambrano, C. A., Egana, J. T., Nunez, M. T., Maccioni, R. B. and Gonzalez-Billault, C. (2004). "Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1." *Free Radic Biol Med* **36**(11): 1393-402.
- Zhang, J. Y., Liu, S. J., Li, H. L. and Wang, J. Z. (2005). "Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system." *J Neural Transm* **112**(4): 547-55.

- Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Liu, Y. H., Yin, J. and Wang, J. Z. (2005). "Nitric oxide induces tau hyperphosphorylation via glycogen synthase kinase-3beta activation." FEBS Lett **579**(27): 6230-6.
- Zhang YJ, Xu YF, Liu YH, Yin J, Li HL, Wang Q and Wang JZ (2006). "Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms." FASEB J, **20**(9):1431-42.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsingji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., Stevens, K. A., Slunt, H. H., Sisoda, S. S., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H. (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." Cell **81**(4): 525-31.
- Zhu, X., Lee, H. G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G. and Smith, M. A. (2005). "Oxidative imbalance in Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **31**(1-3): 205-17.
- Zielasek, J. and Hartung, H. P. (1996). "Molecular mechanisms of microglial activation." Adv Neuroimmunol **6**(2): 191-22.
- Zukunftsforum Demenz (2004). Frühformen der Demenz - Früherfassung, Risikofaktoren und Prävention bei MCI. I. Füsgen and J. Kornhuber. Bad Schwalbach. **Band 9**.
- Zwilling, S., König, H. and Wirth, T. (1995). "High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors." Embo J **14**(6): 1198-208.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
³ H	Tritium, radioaktives Wasserstoffisotop
<i>a. dest.</i>	aqua destillata
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AD	Alzheimer-Demenz
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
AS	Aminosäuren, engl. amino acids (aa)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid (engl.), Bicinchonininsäure
BSA	Bovine serum albumine (engl.), Rinderserumalbumin
BV-2	murine Mikroglia Zelllinie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dubecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECL	Enhanced-Chemo-Lumineszenz
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FCS oder FKS	Fetales Kälberserum
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O	Wasser, Millipore
HBSS	Hanks' balanced salts solution
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HRP	horseradish peroxidase (engl.), Meerrettichperoxidase
IB4	<i>Griffonia simplicifolia</i> isolectin B4
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

M	Mol
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
MT	Mikrotubuli
N ₂	Stickstoff
NFT	neurofibrilläre Bündel, engl. neurofibrillary tangles
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffsynthetase
o. A.	ohne Angabe
OHSK	Organotypisch hippocampale Schnittkulturen
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphate buffered saline (engl.), phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit 0,1 % Tween 20
PHF	paarig helikale Filament, engl. paired helical filaments
PHF-Tau	zu PHFs aggregiertes Tau-Protein
PS	Proteasom
RNA	Ribonucleic acid
RNS	reactive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute (engl.), Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg, Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten
s.e.	standard error (engl.), Standardfehler
SD	standard deviation (engl.), Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (engl.), Natriumlaurylsulfat
SEM	standard error of the mean (engl.), Standardabweichung
Tab.	Tabelle
U	Unit
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett (Strahlung)
V	Volt
v/v	volume per volume (engl.), Volumen pro Volumen (Volumenanteil)
Vol	Volumen
w/v	weight per volume (engl.), Gewicht pro Volumen (Massenkonzentration)
z.Bsp.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Susi Keck, Robert Nitsch, Tilman Grune and Oliver Ullrich

„Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer`s disease“. *Journal of Neurochemistry*, 2003, **85**, 115-122

Diana Poppek*, **Susi Keck***, Gennady Ermak, Tobias Jung, Alexandra Stolzing, Oliver Ullrich, Kelvin J. A. Davies, Tilman Grune (**both authors contributed equally as "first author"*)

„Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress“. *Biochemical Journal*, 2006, 400(3), 511-20.

eingeladene Vorträge

S. Keck, R. Nitsch, T. Grune und O. Ullrich

„Protein turnover and oxidative stress – applications to the tau protein“. The first EIBSEE Meeting of the Priority Program CELLULAR MECHANISMS OF ALZHEIMER`S DISEASE, December 18-19, 2000, **Eibsee** Grainau / Germany

S. Keck, R. Nitsch, T. Grune und O. Ullrich

„Morbus Alzheimer: „Paired helical filaments“ (PHFs) hemmen das Proteasom“ 8. Tagung „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“, November 22-24, 2001, **Halle** / Germany

Beiträge zu internationalen wissenschaftlichen Konferenzen (Abstracts)

S. Keck, R. Nitsch, T. Grune and O. Ullrich

„Proteasome inhibition by paired helical filaments (PHFs) in brains of patients with Alzheimer`s disease“. Abstract 18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and 32nd Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (ASN), August 26-31, 2001, **Buenos Aires** / Argentina

S. Keck, R. Nitsch, T. Grune and O. Ullrich, Berlin

„Proteasome inhibition by paired helical filaments (PHFs) in brains of patients with Alzheimer`s disease“. Poster 18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, September 26.-28., 2001, **Würzburg** / Germany

S. Keck, R. Nitsch, T. Grune and O. Ullrich, Berlin

„Paired helical filaments interact with the proteasome in brains of patients with Alzheimer`s disease“. Poster 31st Annual Meeting, Society for Neuroscience, November 10-15, 2001, **San Diego** / California, USA

S. Keck, O. Ullrich and T. Grune

“Tau turnover in hippocampal neurons after oxidative stress“.

Poster 8th International Conference on Alzheimer’s Disease and Related Disorders, Alzheimer’s Association, July 20-25, 2002, **Stockholm**, Sweden

S. Keck, O. Ullrich and T. Grune

“Paired helical filaments (PHFs) inhibit the proteasome which is responsible for the turnover of tau protein”. Poster International Conference on Cell and Molecular Biology of Alzheimer’s Disease, September 8-11, 2002, **Hamburg** / Germany

S. Keck, T. Grune and O. Ullrich, Berlin

“Tau turnover in hippocampal neurons after oxidative stress“. Poster 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in **Würzburg**, Oktober 2-4, 2002, Würzburg / Germany

S. Keck, A. Gräfe, O. Ullrich and T. Grune

„Degradation of Tau – Does the Proteasomal System Play a Role?“.

Poster 9th International Conference on Alzheimer’s Disease and Related Disorders, Alzheimer’s Association, July 17–22, 2004, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Preise

S. Keck, O. Ullrich and T. Grune

„Tau turnover in hippocampal neurons after oxidative stress“

Berlin Neuroscience Forum 2002, April 18-20, Berlin, Germany

Preis für die beste Posterpräsentation

9 Anhang

I Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit, die Einarbeitung ins Laborleben und die Erstellung des Gutachtens. Er hat mir alle Möglichkeiten gegeben Einblick in die naturwissenschaftliche Forschung zu erlangen und an internationalen Konferenzen teilzunehmen. Er wurde nicht müde mich in allem zu unterstützen und meine Fragen zu beantworten.

Bei Herrn Prof. Dr. Ronald Gust bedanke ich mich für die Übernahme der Doktorvaterschaft dieser Arbeit, die Erstellung des Gutachtens, alle bürokratischen Hilfeleistungen und seine stets freundliche und unkomplizierte Art.

Prof. Dr. Tilman Grune und seinen Mitarbeitern danke ich für die Aufnahme in sein Labor im NWFZ, die gute Zusammenarbeit und für die Betreuung des Themas.

Bei Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die Möglichkeit die Untersuchungen für diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Ohm bedanke ich mich für die Bereitstellung der Gewebeproben und bei seinen Mitarbeitern für die vielen Hilfestellungen und Antworten. Besonderer Dank gilt Frank, der mich in die Techniken der Primärzellkultur eingeweiht und dabei tatkräftig unterstützt hat.

Antje möchte ich dafür danken, dass sie mich so herzlich ins Labor aufgenommen hat und für die vielen schönen Stunden, die wir mit viel Lachen inner- und außerhalb des Anatomie-Gebäudes verbracht haben (... ich will ein Snickers !!!)

Ein herzliches Dankeschön gilt Anja, die als Olivers MTA hervorragende Arbeit geleistet hat. Sie hat mich nicht nur im Labor bei so vielen Dingen unterstützt, sondern auch am Wochenende mich bei meinen Marathonvorbereitungen an der Strecke angefeuert und Plakate geschwungen.

Allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe von Oliver an der Charité in Berlin möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vergnüglichen Laborbesprechungen danken.

Bei meiner Freundin Gabi möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer für mich da war, mich unterstützt hat, mit mir diskutiert hat und immer an mich geglaubt hat (an dieser Stelle auch ein Dankeschön an die Erfinder von Telefon und E-Mail).

Katrin danke ich, dass sie mir hier im Ausland eine gute Freundin ist und mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.

Doris möchte ich dafür danken, dass sie während den Schulferien meine Arbeit auf Rechtschreibung und Grammatik durchgelesen und korrigiert hat und nicht müde wird mir die neusten Regeln und Reformen der deutschen Sprache zu erklären (hier fehlt bestimmt irgendwo ein Komma ...)

Allen Freunden und Verwandten danke ich, dass sie sich nicht abschrecken ließen, dass sie immer wieder Interesse an meiner Arbeit zeigten und mir permanent gutes Gelingen wünschten.

Meiner Familie möchte ich ganz besonders danken, dass sie mich bedingungslos unterstützt haben. Mein Bruder Jürgen, seine Frau Beate und meine Neffen Sven und Philipp haben mich ins Familienleben in Trebbin aufgenommen, ich konnte bei ihnen wohnen und viele schöne Stunden mit ihnen verbringen. Meinen Eltern danke ich für ihre endlose Liebe, ihr Vertrauen und all ihre Unterstützung in jeglicher Form.

Brian I have to thank for being my boyfriend and supporting me ever since we have met. I want to thank him for all his understanding and endless patience!

II Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

III Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susi Keck, geboren am 26.08.1974, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den 2008

.....

Susi Keck