

**Modulation der Genexpression und des
neuronalen Zelltods durch das
Amyloid-Vorläufer-Protein (APP)**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Ekaterini Copanaki
geb. am 21.07.1979 in Wiesbaden

Mainz, 2007

Die Ergebnisse der folgenden Arbeit wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

Copanaki E, Schürmann T, Eckert A, Leuner K, Müller WE, Prehn JHM*, Kögel D* (2007).

The Amyloid Precursor Protein potentiates CHOP induction and cell death in response to ER Ca²⁺ depletion. *BBA Mol Cell Res*, 1773(2): 157-65. ISI Impact Faktor 6,900; Position 24 von 156 Journals im Bereich Zellbiologie.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entstehung von Amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündel.....	2
1.2	Genetische Faktoren in der Pathologie von Morbus Alzheimer	3
1.3	Die Struktur und physiologische Funktion des Amyloid-Vorläufer-Proteins.....	5
1.4	Die proteolytische Spaltung von APP	7
1.4.1	Die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung	7
1.4.2	Die amyloidogene APP-Prozessierung	9
1.5	Morbus Alzheimer und Störungen der Calcium-Homöostase	11
1.6	Die Rolle der Apoptose bei Morbus Alzheimer	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Geräte und Materialien.....	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.2	Zelllinien.....	19
2.3	Oligonukleotide.....	20
2.4	Antikörper.....	21
2.5	Verwendete Kits	21
2.6	Rekombinante Proteine	22
2.7	Zellbiologische Methoden	22
2.7.1	Kultivierung von Zelllinien	22
2.7.1.1	Kultivierung in Kulturflaschen	22
2.7.1.2	Zellzahlbestimmung.....	23
2.7.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.8	Zytotoxische Stress- und Apoptose-Stimuli	24
2.9	Nachweis von Apoptose.....	25
2.10	Analyse von Proteinen.....	26
2.10.1	Gesamtzellextraktion	26
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	27
2.10.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE für Western-Analytik	27
2.10.4	Western-Blot-Analyse	28

Inhaltsverzeichnis

2.10.5	Coomassie-Färbung von Proteingelen	29
2.10.6	Western-Blot-Immunodetektion	29
2.11	DNA-Arbeitstechniken	31
2.11.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.11.2	DNA-Standardgelelektrophorese	31
2.12	RNA-Arbeitstechniken	32
2.12.1	Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	32
2.12.2	Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)	32
2.12.3	RNA-Interferenz	32
2.13	ELISA	33
2.14	Daten Analyse	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Die Überexpression von APP sensitiviert PC12 Zellen für die durch Calciumfreisetzung induzierte Apoptose	35
3.1.1	Quantitative Analyse der differentiellen Genexpression nach Thapsigarginbehandlung in PC12 vector und PC12 APPwt Zellen	36
3.1.2	Die Komplexierung von intrazellulärem Calcium durch den Chelator BAPTA-AM hebt die APP-abhängige Potenzierung der CHOP-Expression und der Apoptose auf	39
3.1.3	Die RNA Interferenz gegen CHOP unterbindet den potenzierenden Effekt auf die Apoptose nach Ca ²⁺ -Freisetzung in den APPwt Zellen	41
3.1.4	Die Inhibition Speicher-aktivierter Ca ²⁺ -Kanäle (SOCC's) führt zu einer Verminderung der erhöhten zyttoplasmatischen Ca ²⁺ -Konzentration und zur verminderten Apoptose nach Thapsigargin-induzierten Ca ²⁺ -Freisetzung in APP-überexprimierende PC12 Zellen	42
3.2	Die Rolle des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) und seines Metabolismus bei der Neuroprotektion	46
3.2.1	Analyse der sAPP α Expressionslevel in APP überexprimierenden PC12 Zellen	46
3.2.2	Neuroprotektion in APP überexprimierenden PC12 Zellen	47
3.2.3	Neuroprotektion durch exogenes rekombinantes sAPP α in PC12 Zellen	49
3.2.4	Neuroprotektion durch sAPP α aus konditioniertem Medium von APP-überexprimierenden HEK293 Zellen in PC12 Zellen	53
3.2.5	sAPP α -vermittelter Schutz vor oxidativem Stress	56
3.2.6	APP- und sAPP α -modulierte Apoptose nach chronischer Hypoxie	57
3.2.7	Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125 auf den sAPP α -vermittelten Schutz vor der Stress-induzierter Apoptose	58
3.2.8	Effekt des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 auf die APP-vermittelte Protektion nach zytotoxischem Stress	59
3.3	Erhöhung der sAPPα-Sekretion mittels pharmakologisch aktiver Substanzen	62

3.3.1	Protektive Effekte von Simvastatin auf in PC12 Zellen und SH-SY5Y Zellen nach Ca ²⁺ -Freisetzung und proteosomalen Stress	62
3.3.2	Einfluss von Galantamin auf die sAPP α -Freisetzung in PC12- und SH-SY5Y Zellen nach Ca ²⁺ -Freisetzung	64
3.3.3	Effekte von Omega-3 Fettsäuren auf die Sensitivität von PC12 Zellen SH-SY5Y Zellen gegen zytotoxischen Stress	67
4	DISKUSSION	70
4.1	APP, Ca²⁺-Freisetzung und Apoptose	70
4.1.1	Modulation der Ca ²⁺ -induzierten CHOP Expression durch APP	73
4.1.2	Die Regulation der CHOP Expression durch APP erfolgt UPR-unabhängig	73
4.1.3	Die RNA Interferenz gegen CHOP wirkt der APP-abhängigen erhöhten Induktion von CHOP entgegen	74
4.1.4	APP reguliert die zelluläre Ca ²⁺ -Homöostase über Speicher-aktivierte Ca ²⁺ -Kanäle	74
4.2	APP-vermittelte Neuroprotektion	76
4.2.1	APP kann sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Wirkungen entfalten	76
4.2.2	sAPP α -vermittelte Protektion	77
4.2.3	Verwendete Stress-Stimuli zur Untersuchung der protektiven Rolle von APP/sAPP α	78
4.2.4	Effekte von sAPP α auf die Aktivierung von Stress-Signalwegen und die Induktion der Apoptose	81
4.2.4.1	Anti-apoptotische Effekte von sAPP α	81
4.2.4.2	APP-moduliert die Stress-induzierte Aktivierung des JNK/c-JUN-Signalwegs	83
4.2.4.3	Effekte von sAPP α auf den anti-apoptotische PI3K/Akt-Signalweg	84
4.2.5	Die Rolle von APP und sAPP α bei der pharmakologisch induzierten Neuroprotektion	86
4.3	Ausblick	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	95
	ERKLÄRUNG	111

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β
Abb.	Abbildung
APL	Allosterisch-Potenzierender Ligand
APLP	„amyloid precursor-like proteins“
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid-Precursor-Protein“)
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BHE	Behensäure (C-22:0)
BIP/Grp78	„78 kDa glucose-regulated protein“
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologous protein
CMV	Cytomegalievirus
CTF	„C-terminal Fragments“
DHA	Docosahexaensäure (22:6n-3)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
DP	Depolarisationspuffer
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
ER	Endoplasmatischer Retikulum
evtl.	eventuell
FAD	„Familial-Alzheimer-Disease“
FCS	Fötale Kälberserum

Fura-2, AM	Fura-2, Acetoxymethylester
G418	Aminoglycosidantibiotikum Geneticin
Grp94	„94 kDa glucose-regulated protein“
h	Stunde(n)
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
kDa	Kilodalton
M	molar (mol/l)
Mg	Milligramm
min	Minute(n)
MLA	Methyllycaconitin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor(en)
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB (“nuclear factor-κB”)
ng	Nanogramm
NIPK	Neuronal cell death-inducible putative kinase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline”)
PDL	Poly-D-Lysine
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS1	Presenilin1
PS2	Presenilin2
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roslind Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S.E.M.	Standardfehler der Messwerte
Sgk1	serum/glucocorticoid-regulated kinase1
siRNA	„small interference RNA“
Tab.	Tabelle

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	„unfolded protein response“
WT	Wildtyp
w/v	„weight/volume“ (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

"Wie heißen Sie?" - "Auguste." - "Familiennamen?" - "Auguste." - "Wie heißt ihr Mann?" - "Ich glaube Auguste." Mit diesen Worten von Auguste Deter, einer Patientin in der „Irrenanstalt“ in Frankfurt am Main, begann an der Wende vom 19. zum 20. Jahrhundert die Forschung von Alois Alzheimer an einer Krankheit, die sich bei den Patienten durch Gedächtnisverlust, Verwirrtheit, beeinträchtigtes Urteilsvermögen, Wesensveränderungen, Desorientierung und der Verlust der Sprachfähigkeit äußerte und allgemein als Demenz bezeichnet wurde. Diese klinische Diagnose wurde von ihm durch neuropathologische Befunde präzisiert, indem er post mortem Gehirngewebe von Auguste D. untersuchte und die Bildung von senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln erkannte. Seine Ergebnisse fasste Alzheimer 1907 in der „Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin“ unter dem Titel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ zusammen (Alzheimer 1907).

Der Begriff der Demenz ist inzwischen als Oberbegriff für ein Krankheitsbild mit folgender Symptomatik einheitlich definiert worden: Verlust der geistigen Funktionen wie Denken, Erinnern, Orientierung und Verknüpfen von Denkinhalten und die dazu führen, dass alltägliche Aktivitäten nicht mehr eigenständig durchgeführt werden können. Hierzu zählen unter anderem die Alzheimer Demenz, Vaskuläre Demenz und Frontotemporale Demenz. Heute steht fest, dass Morbus Alzheimer die häufigste Form der Demenz mit weltweit über 15 Millionen betroffenen Patienten ist. Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), die durch den fortschreitenden Verlust der Lernfähigkeit, Angstzuständen, Depressionen und schweren Gedächtnisstörungen gekennzeichnet ist. Die AD wird von verschiedenen zellulären und molekularen Veränderungen begleitet. Zu diesen neuropathologischen Veränderungen gehören unter anderem die Akkumulation und extrazelluläre Anreicherung des β -Amyloid Proteins, die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und Bildung von intrazellulären Neurofibrillen, eine reduzierte Expression von nACh-Rezeptoren und evtl. das Vorhandensein von bestimmten Markergenen und Mutationen (siehe Einleitung 1.2).

Die Notwendigkeit für die Entwicklung von präventiven Maßnahmen und therapeutischen Medikamenten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ergibt sich aus der Altersstruktur der Bevölkerung, die sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt hat. So

zeigt die Entwicklung der Altersstruktur in den Industrieländern, dass die Lebenserwartung der Menschen stetig steigt und bereits jetzt 18 % der deutschen Bevölkerung älter als 65 Jahre sind. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Risiko für den Ausbruch einer neurodegenerativen Erkrankung mit zunehmendem Alter steigt. Schätzungsweise sind alleine in Deutschland 1,2 Millionen Menschen an einer Form der Demenz erkrankt, wovon mehr als 50 % der Demenz-Patienten an der schweren Form von Morbus Alzheimer leiden. Statistiken gehen davon aus, dass in den nächsten 30 Jahren die Anzahl der erkrankten Menschen um mehr als 40 % steigen wird.

1.1 Die Entstehung von Amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündel

Die Identifizierung von makroskopisch sichtbaren Amyloiden Plaques in Verbindung mit neurofibrillären Bündeln im Hippokampus und Isokortex im Gehirn von Patienten ist bis heute noch die Grundlage für die neuropathologische post mortem Diagnose von Morbus Alzheimer (Khachaturian 1985; Thorsett and Latimer 2000).

Der Hauptbestandteil der Plaques ist das Amyloid β -Protein, einem Spaltprodukt des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) (Masters et al. 1985; Hardy and Selkoe 2002). Dieses Peptid wurde erstmals aus Hirnhautblutgefäßen von Patienten mit dem Down Syndrom isoliert und sequenziert (Glennier and Wong 1984) und besteht aus maximal 40 bzw. 42 Aminosäureresten. Die extrazelluläre Ansammlung des 4 kDa großen Amyloid β -Peptids ($A\beta$) führt zu seiner Aggregation und zur Entstehung von diffusen (amorphen) oder neuritische Plaques (Abbildung 1).

Ein weiteres histologisches Merkmal von Morbus Alzheimer ist die Bildung und Ansammlung von Neurofibrillenbündeln (NTF, „Neurofibrilläre Tangles“). Die intrazellulären Neurofibrillen bestehen aus dem hyperphosphorylierten Tau-Protein, das normalerweise in Verbindung mit Axonen lokalisiert ist. Das Tau-Protein liegt normalerweise mit den Mikrotubuli assoziiert vor (MAPT, Mikrotubuli assoziiertes Protein) und bildet die sogenannten Fibrillen, die zur Stabilisierung des Zytoskeletts führen. Diese Stabilität ist essentiell für die Transportvorgänge der Zellen (Mandelkow 1999). Die abnorme Hyperphosphorylierung von Tau führt zur Bildung von sogenannten gepaarten helikalen Filamenten (PHF) und schließlich zur Bildung der Neurofibrillenbündel.

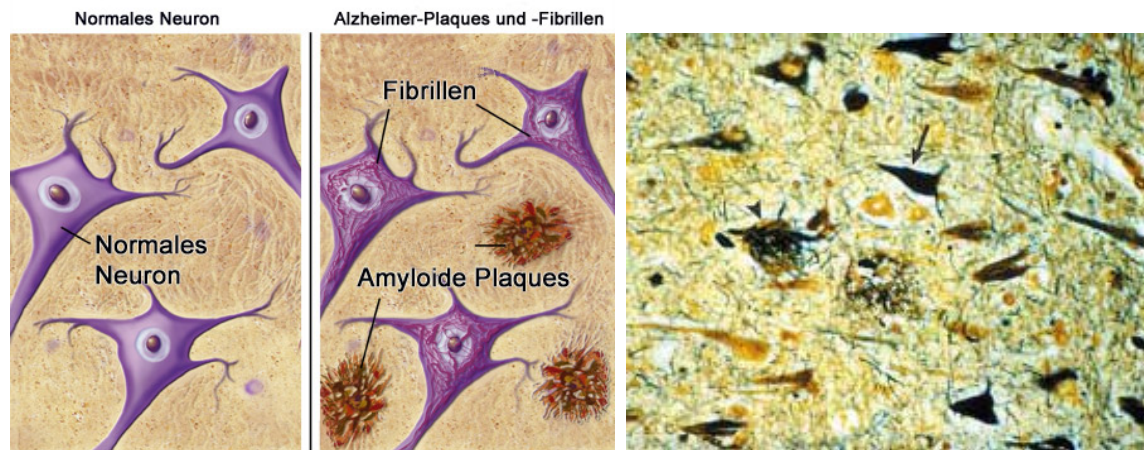


Abbildung 1: Schematische Darstellung und histologische Analyse von Amyloiden Plaques und Fibrillen.

Die Charakteristische Ablagerung in cerebralem Gewebe von Alzheimer Patienten zeigt die Ablagerungen von Extrazelluläre A β (gelb, Immunhistologische Färbung) und Neurofibrillenbündel (schwarz, Silberfärbung, Pfeil) (entnommen aus <http://www.alzheimer-forschung.de> und (Mattson 2000)).

Braak und Braak konnten den Verlauf der Fibrillenbildung und deren Anordnung in einzelne chronologische Stadien unterteilen (Braak et al. 1998), wobei die Verbreitung der Neurofibrillenbündel im Gehirn mit dem Ausmaß der Demenz, bzw. mit dem kognitiven Zustand der Patienten korreliert werden konnte (Nagy et al. 1995).

1.2 Genetische Faktoren in der Pathologie von Morbus Alzheimer

Zwei Hauptfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Entstehung von Morbus Alzheimer, zum einen das Altern und zum anderen die Genetik, wobei beide Ursachen das gleiche Krankheitsbild bedingen. Die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken, steigt im Alter an. Die altersbedingte Variante von Morbus Alzheimer wird auch als sporadische Form bezeichnet und betrifft die Mehrzahl der Patienten. Die durch Mutationen in Alzheimer-assoziierten Genen ausgelöste familiäre Form der Alzheimer Erkrankung (FAD) kommt weitaus seltener vor, betrifft aber immerhin 5 – 10 % aller erkrankten Patienten (Haass 1996). Diese genetische, autosomal dominant vererbte Prädisposition geht mit einer 100 %igen Penetranz einher und löst die frühe Form von Morbus Alzheimer aus. Die ersten Symptome treten bei dieser Form in der Regel bereits vor dem 65. Lebensjahr auf. Bislang konnten drei Gene identifiziert werden, die zur Entstehung von Morbus Alzheimer führen: *APP*, *Presenilin1 (PS1)* und *Presenilin2 (PS2)* (Tabelle 1).

Genetische Faktoren von Morbus Alzheimer			
Gen	Chromosom	Genveränderungen	Beginn der Erkrankung
APP	21	23	45 – 64 Jahre
APP	21	Trisomie 21	45 – 54 Jahre
PS1	14	165	28 – 55 Jahre
PS2	1	10	40 – 75 Jahre
ApoE	19	Polymorphismus ε2, ε3, ε4	> 60 Jahre

} 100 %
Penetranz

} Risikofaktor

Tabelle 1: Auflistung der genetischen Risikofaktoren bei Morbus Alzheimer

Die Mutationen dieser Gene führen zu der früh eintretenden familiären Form von Morbus Alzheimer. Der Polymorphismus von ApoE stellt einen Risikofaktor dar, der den Effekt des Alterns verstärkt. Die pathologisch nicht relevanten Mutationen wurden aus der Auflistung entfernt {modifiziert nach (Eckert et al. 1999)}

Patienten mit dem Down Syndrom entwickeln bereits ab dem 40. Lebensjahr die Symptome einer Alzheimer Erkrankung, man spricht hier auch von der „früh eintretenden“ („early onset“) FAD (EOFAD). Biochemische Analysen zeigten, dass neuritische Plaques aus Alzheimer und Down Syndrom Patienten hauptsächlich aus einer Ansammlung des 4 kDa großen Amyloid-β (Aβ)-Peptid bestehen (Glenner and Wong 1984; Masters et al. 1985). Das Aβ-Peptid konnte durch weitere Untersuchungen als Spaltprodukt des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) auf dem Chromosom 21 q21.105-q21.05 lokalisiert werden (Tanzi et al. 1987). Die zusätzliche Kopie des Chromosoms 21 führt bei Patienten mit dem Down Syndrom zu einer gesteigerten Expression von APP und somit unweigerlich zur EOFAD (Neve et al. 2000; Gyure et al. 2001; Mori et al. 2002). In diesem Zusammenhang konnten neuere Studien zeigen, dass durch genomische Tandem-Duplikation von APP es ebenfalls zu einer erhöhten APP Expression kommen kann (Rovelet-Lecrux et al. 2006; Sleegers et al. 2006; Rovelet-Lecrux et al. 2007). Theuns et al. analysierte die Promotorregion von APP von zwei unter der familiären Form von Morbus Alzheimer leidenden Familien und identifizierte drei Mutationen in der Promotorregion, die zu einer Steigerung der APP Expression führten (Theuns et al. 2006).

Über die Analyse von Stammbäumen von familiärer Häufung von an Alzheimer Erkrankten Patienten, in denen eine genetische Verbindung zu dem Chromosom 21 nachweisbar war, konnten insgesamt bis heute 24 verschiedene Mutation im *APP*-Gen identifiziert werden, die zur Entstehung Morbus Alzheimer führen könnten (Goate et al. 1991; Murrell et al. 1991; Mullan et al. 1992; Sleegers et al. 2006; Rovelet-Lecrux et al. 2007). Die

bisher gefundenen pathologisch relevanten Mutationen des *APP*-Gens flankieren die A β Region oder liegen in unmittelbarer Nähe der α -Sekretase Spaltungsstelle.

Mutationen in den Genen Presenilin1 (PS1) und Presenilin2 (PS2) führen ebenfalls zu einer erhöhten Bildung von A β 42 (Barinaga 1995; Sherrington et al. 1995; Mattson et al. 1998). Die ersten Symptome bei der EOFAD treten erstmal um das 30. Lebensjahr herum auf. Auffallend ist die hohe Anzahl der bereits identifizierten Mutationen für PS1 (165). Preseniline sind essentieller Bestandteil des γ -Sekretase Komplexes (siehe Einleitung 1.4.2), welches insgesamt aus vier Proteinen besteht (Takasugi et al. 2003). Für die sporadisch spät auftretende („late onset“) Form der Alzheimer Erkrankung konnte ein Risikogen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Genvariante des Apolipoprotein E ϵ 4 (*ApoE ϵ 4*), das bei etwa 15 % aller Mitteleuropäer nachgewiesen werden kann. Das Apo E Protein spielt eine regulierende Rolle in dem Lipidmetabolismus und der Cholesterinaufnahme und intrazellulären Freisetzung (Saunders et al. 1993; Strittmatter et al. 1993). Bei Patienten mit dieser *ApoE ϵ 4* Variante tritt erst dann eine gesteigerte Sekretierung von A β auf, wenn die Cholesterinwerte im Gehirn einen bestimmten kritischen Wert überschreiten. Bei ihnen kommt es zu erhöhten Amyloid-Ablagerungen im cerebralen Cortex (Rebeck et al. 1993; Schmechel et al. 1993).

1.3 Die Struktur und physiologische Funktion des Amyloid-Vorläufer-Proteins

Das APP ist Typ I Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne (Kang et al. 1987; Tanzi et al. 1987). APP wird ubiquitär in fast allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Selkoe et al. 1988). Durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen hauptsächlich drei Isoformen, die aus 695, 751 oder 770 Aminosäuren bestehen. (Sandbrink et al. 1994; Selkoe 1994). In neuronalen Zellen wird hauptsächlich die APP₆₉₅ Isoform exprimiert, während die längere APP₇₅₁ bzw. APP₇₇₀ Isoform in allen anderen Geweben gebildet wird (Koo et al. 1990; Yoshikai et al. 1990). Der neuronalen, kürzesten Isoform fehlt im Unterschied zu den anderen beiden Isoformen ein Insert in der Ektodomäne, das eine Homologie zum Kunitz-Protease-Inhibitor aufweist (Kitaguchi et al. 1988; Ponte et al. 1988; Tanzi et al. 1988).

APP ist Mitglied einer evolutionär hochkonservierten Genfamilie. Neben dem APP konnten auch die beiden Homologen APLP1 und APLP2 („amyloid precursor-like proteins“) im Menschen und in der Maus identifiziert werden (Wasco et al. 1992; Wasco et al. 1993). Während APP und APLP2 ubiquitär exprimiert werden, ist APLP1 spezifisch für das Nervensystem. APLP1 und APLP2 zeigen eine dem APP-ähnliche Topologie, besitzen allerdings keine A β -Domäne.

Die physiologische Funktion von APP

Die physiologische Funktion von APP konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden auch wenn dem APP eine Beteiligung an diversen physiologischen Prozessen zugesprochen wird (Selkoe 1994; Selkoe 1999). Hierzu zählen unter anderem Proteaseinhibition, Förderung von Zelladhäsion und Zellwachstum bis hin zur Neuroprotektion.

Einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Funktion von APP und seinen Homologen lieferte die Generierung von „knock-out“ Mäusen. APP „knock-out“ Mäuse in denen beide Allele ausgeschaltet waren, zeigten keinen ausgeprägten Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Zheng et al. 1995). Wie auch APLP1 und APLP2 defiziente Mäuse zeigten sie lediglich ein Defizit im postnatalen Wachstum. Die Kreuzung der drei Einzelmutanten miteinander zeigte, dass die Doppelmutanten des Typs APLP2^{-/-}/APLP1^{-/-} und APLP2^{-/-}/APP^{-/-} postnatal letal waren, wohingegen die APLP1^{-/-}/APP^{-/-}-Doppelmutanten lebensfähig waren und keine kompensatorische Überexpression von APLP2 zeigten (von Koch et al. 1997; Dawson et al. 1999; Heber et al. 2000). Müller und Kins gelang es Mäuse zu generieren, die in allen drei APP/APLP Familienmitgliedern defizient waren (Muller and Kins 2002). Diese weisen wie erwartet eine sehr frühe Letalität auf, zeigten aber Gehirnabnormalitäten und neuronale Migrationsdefizite (Herms et al. 2004). Die Analyse der Abnormalitäten dieser Mäuse bestätigte die Rolle der Proteine in der Adhäsion und Signaltransduktion, welche die neuronale Migration reguliert (Koo 2002; Zheng and Koo 2006).

APP wird zudem eine physiologische Funktion beim axonalen Transport in Neuronen zugeschrieben. Dabei wird APP über den axonalen Transport anterograd zu den präsynaptischen Nervenendigungen transportiert (Koo et al. 1990), wo es präsynaptisch akkumuliert (Schubert et al. 1991). Es wird angenommen, dass der anterograde Transport von APP über die leichte Kette des Kinesins (KLC), einer Komponente der Kinesin-1 Transportmaschi-

nerie, vermittelt wird (Kamal et al. 2000). Hierbei bindet APP direkt an das Kinesin oder indirekt über sogenannte Adaptorproteine, wie zum Beispiel dem JIP1-1 (Matsuda et al. 2001; Scheinfeld et al. 2002). JIP-1 gehört zur Familie der mit JNK-interagierenden Proteine (JIP, JNK-interacting protein family) und kann sowohl mit APP als auch mit KLC interagieren (Sisodia 2002).

1.4 Die proteolytische Spaltung von APP

APP wird entlang des sekretorischen Transportwegs durch drei verschiedene Proteasen proteolytisch gespalten, die α -, β - und γ -Sekretase (Abbildung 1) (Lichtenthaler and Haass 2004). Hierbei konkurrieren die α - und die β -Sekretase im sekretorischen Transportweg um dasselbe Substrat, dem APP (Buxbaum et al. 1998; Skovronsky et al. 2000). Die Prozessierung von APP lässt sich in zwei Wege unterteilen: in die amyloidogene und in die nicht-amyloidogene Prozessierung, die in den folgenden Absätzen näher beschrieben werden.

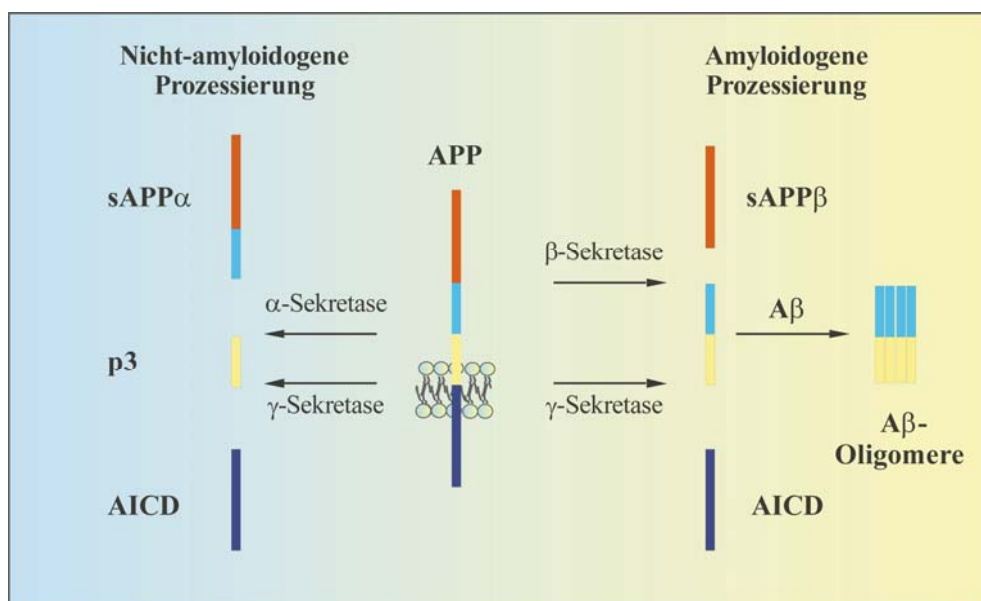


Abbildung 2: Schematische Darstellung des APP-Metabolismus (Erklärung siehe Text)

1.4.1 Die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Der größte Anteil des Amyloid-Vorläufer-Proteins wird im nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg prozessiert und beginnt mit einem Schnitt der α -Sekretase innerhalb der

A β -Domäne zwischen dem Lys16 - Leu17 (Esch et al. 1990), so dass die Generierung von A β verhindert wird. Hierbei entsteht die N-terminale Ektodomäne von APP (sAPP α) und diese wird als lösliches Molekül extrazellulär über die Plasmamembran sezerniert. Anschließend wird das in der Membran verbliebene 83 Aminosäure großes C-terminales APP Fragment (C83) entweder reinternalisiert und in Lysosomen abgebaut oder durch die γ -Sekretase in zwei kleinere Fragmente gespalten (Haass et al. 1992), dem p3 (Haass et al. 1993) und einer intrazellulären Domäne, die als AICD („APP intracellular domain“) bezeichnet wird (Selkoe 2001). Das lösliche Protein p3 wird ebenfalls extrazellulär sezerniert und konnte nicht in den amyloiden Plaques nachgewiesen werden.

Bei den bisher identifizierten α -Sekretasen handelt es sich Vertreter der ADAM-Familie („a disintegrin and metalloprotease“). Die α -Sekretasen schneiden anscheinend nicht abhängig von einer Konsensussequenz in der Aminosäuresequenz von APP, sondern vielmehr in einer Distanz von 12 – 13 AS zur Membran. Für die Erkennung dieser Schnittstelle ist eine α -helikale Struktur von APP in diesem Bereich notwendig (Sisodia 1992; De Strooper et al. 1993). Bisher konnten zwei Mitglieder der ADAM-Familie, ADAM10 (Lammich et al. 1999) und ADAM17 (Buxbaum et al. 1998) identifiziert werden, die sowohl eine α -Sekretase Aktivität aufweisen als auch genau an dieser Stelle im APP schneiden. ADAM10 ist im Gegensatz zu ADAM17 sowohl für die regulative als auch für die konstitutive Prozessierung von APP verantwortlich.

Der nicht-amyloidogene Weg führt durch die Bildung seiner Spaltprodukte zur Neuroprotektion in neuronalen Zellen. Wie oben beschrieben findet der Schnitt der α -Sekretase in der A β -Domäne statt, so dass die β -Sekretase keine Möglichkeit mehr hat am APP anzusetzen. Dem löslichen sAPP α wurden bisher verschiedene biologische Funktionen zugesprochen. Zu diesen gehören die Stimulation von Zellproliferation, Verstärkung von Zelladhäsion und Inhibition von Serinproteasen (Saitoh et al. 1989; Schubert et al. 1989; Sinha et al. 1990; Chen and Yankner 1991). Ferner wurden der N-terminalen Ektodomäne neuroprotektive Eigenschaften gegen zellulären Stress zugewiesen (Guo et al. 1998; Mattson et al. 1999). Hierbei wurde die sAPP α -vermittelte Protektion unter anderem auf die Stabilisierung der intrazellulären Calcium-Homöostase zurückgeführt (Mattson et al. 1993; Schubert and Behl 1993). Außerdem soll sAPP α seine protektive Wirkung über die Aktivierung des anti-apoptischen NF- κ B-Signalwegs ausüben (Barger and Mattson 1996).

In diesem Zusammenhang wurde bereits versucht, die α -Sekretase Aktivität spezifisch zu erhöhen, da dies ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung von Morbus Alzheimer ist (Lichtenthaler and Haass 2004). Die Überexpression von ADAM10 in Mäusen bewirkte eine erhöhte α -Sekretase Aktivität und führte somit zu einer gesteigerten sAPP α Sekretion (Postina et al. 2004). Die Kreuzung dieser Maus mit einer transgenen Alzheimer-Maus verminderte drastisch die Plaque-Entstehung im Vergleich zu den Mäusen ohne ADAM10 Überexpression. Aufgrund der geringen Substratspezifität würde die spezifische Erhöhung der α -Sekretase Aktivität allerdings bei der Anwendung im Patienten auch zu einer erhöhten Prozessierung anderer Ektodomänen, wie TNF α (tumor necrosis factor α) und Notch-Rezeptoren führen (Seals and Courtneidge 2003), so dass man nun versucht, über andere Wege die α -Sekretion spezifisch zu erhöhen.

Für diverse pharmakologische Substanzen wird vermutet, dass sie in der Lage sind die sAPP α -Sekretion zu erhöhen, und diese sind daher Gegenstand aktueller Forschungen. Zu diesen potentiellen Kandidaten gehören Wirkstoffe wie Statine und Omega-3 Fettsäuren, die in der Lage sind, die Membranfluidität zu erhöhen (Alexander 1998; Kirsch et al. 2003). Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass die A β -Produktion bei erhöhten Cholesterinwerten zunimmt (Muller et al. 1998; Eckert et al. 2000; Eckert et al. 2001) und durch Cholesterin-senkende Mittel wie Simvastatin wieder reduziert werden kann (Fassbender et al. 2001).

1.4.2 Die amyloidogene APP-Prozessierung

Im amyloidogenen Stoffwechselweg wird APP zuerst von der β -Sekretase BACE1 (β APP cleaving enzyme 1) am N-terminus der A β -Domäne gespalten und anschließend von der γ -Sekretase gespalten. Der β -Sekretase Schnitt in der extrazellulären Domäne von APP nach Methionin 596 führt zur Generierung des löslichen N-terminalem Fragments sAPP β (Seubert et al. 1993). Das übrig gebliebene 99 AS lange C-terminale Rest (CTF α) wird anschließend durch die γ -Sekretase in die Produkte A β (Haass et al. 1992; Shoji et al. 1992) und AICD (Sastre et al. 2001) prozessiert. Dieser Schnitt kann entweder nach dem Valin 636 oder Alanin 638 erfolgen und führt entweder Bildung der Produkte A β 42 und AICD57 oder A β 40 und AICD59 (Selkoe 2001).

BACE1 ist ein Typ I Transmembranprotein und gehört zur Pepsin-Familie der Aspartylproteasen (Hussein et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine Anreicherung von BACE1 in sogenannten „lipid rafts“ nachweisen (Riddell et al. 2001; Tun et al. 2002; Marlow et al. 2003). „lipid rafts“ sind spezielle Mikrodomänen in der Membran, sind reich Glycosphingolipiden und Cholesterin und enthalten Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine („GPI-anchors“) (Simons and Ikonen 1997; Brown and London 1998). Des Weiteren konnte für BACE nachgewiesen werden, dass seine Aktivität durch Glykosphingolipide, Glycerophospholipide and Sterole (Cholesterol) gesteigert werden kann und die A β Produktion durch Änderungen in Lipidzusammensetzung der Membranen beeinflusst (Ehehalt et al. 2003; Kalvodova et al. 2005).

Der γ -Sekretase Komplex setzt sich aus vier Proteinen zusammen: Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN2 (presenilin enhancer protein 2), wobei das Protein Presenilin die aktive Pore des Komplexes zu bilden scheint (De Strooper 2003). Presenilin1 oder sein Homolog Presenilin2 durchspannt die Plasmamembran mehrere Male und bildet die katalytische Untereinheit des Komplexes. Es wird angenommen, dass die Transmembrandomäne 6 und 7 des Proteins für die proteolytische Aktivität verantwortlich ist (Haass 2004).

Das bei der amyloidogenen Prozessierung entstehende A β ist ein hydrophobes Peptid und in der Lage ist sich zunächst zu Oligomeren, dann zu Protofibrillen und letztendlich zu Fibrillen zusammen zu lagern (Hardy and Selkoe 2002). Dabei erreichen die Protofibrillen einen Durchmesser von 5 nm und eine Länge von 200 nm und bilden den Hauptbestandteil der für Morbus Alzheimer charakteristischen Amyloid-Plaques. In den Zellen wird hauptsächlich das A β 40 gebildet während A β 42 nur 5 – 10 % der Gesamtmenge von A β 40/42 ausmacht. Die beiden Peptide unterscheiden sich vor allem in ihrer Toxizität. A β 42 wird hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, aggregiert schneller und ist toxischer als das A β 40 (Hartmann et al. 1997). Dieses wird wiederum hauptsächlich im trans-Golgiapparat prozessiert. Ein frühes Merkmal der Alzheimer Krankheit ist der Verlust von Synapsen und synaptischen Aktivität (Selkoe 2002). Elektrophysiologische Untersuchung konnten belegen, dass die löslichen Oligomere und Protofibrillen von A β in der Lage sind eine Inhibition der Langzeitpotenzierung (LTP, „long term potentiation“) zu bewirken (Walsh et al. 2002; Walsh and Selkoe 2004), die wiederum in engem Zusammenhang mit Gedächtnisleistung und Lernprozessen steht (Morris 2003). Eine Übersicht über die intrazellulären pathologischen Effekte, die vom

A β -Peptid ausgehen können, sind in Abbildung 33 aufgeführt und in der Diskussion näher beschrieben.

Diverse Mutationen können dazu beitragen, die Gesamtseznernierung des A β -Peptids oder spezifisch die Produktion von A β 42 zu erhöhen (Selkoe et al. 1996). Dies ist bei der sogenannten schwedischen APP-Mutation (APP^{sw}) der Fall. Bei dieser Mutation handelt es sich um die Doppelmutation K595N/M596L, die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen wurde (Mullan et al. 1992; Kogel et al. 2003). Diese Mutation erhöht die Affinität der β -Sekretase zu dem Substrat (Citron et al. 1992). Personen die Träger dieser Mutation sind entwickeln in jungen Jahren eine familiäre Form von Morbus Alzheimer. APP^{sw} wird bevorzugt durch β -Sekretase prozessiert und ist mit einer erhöhten Produktion von A β und einer Blockade der sAPP α Sekretion assoziiert.

Durch die γ -Sekretase Spaltung entsteht das instabile AICD (Edbauer et al. 2002), welches aber über die Bindung an seinen Interaktionspartner Fe65 stabilisiert werden kann (Kimberly et al. 2001; Minopoli et al. 2001). Dies wiederum führt zur Akkumulation von AICD im Zytoplasma und im Zellkern, wo es an den Transkriptionsfaktor Tip60 bindet kann (Cao and Sudhof 2001). Hinweise sprechen dafür, das der Komplex zwischen dem Transkriptionsfaktor Fe65 und AICD die Expression von Genen reguliert, die in die Calcium-Homöostase des endoplasmatischen Retikulums und Reorganisationsprozesse des Zytoskeletts involviert sind (Leissring et al. 2002; Muller et al. 2007).

1.5 Morbus Alzheimer und Störungen der Calcium-Homöostase

Die Aufrechterhaltung der empfindlichen Calcium-Homöostase ist essentiell für die Funktionalität einer Zelle. Ca²⁺-Ionen sind an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen in neuronalen Zellen beteiligt. Zu diesen Funktionen zählt die Freisetzung von Neurotransmittern und die Erregung von Neuronen. Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und der Verlust der Kontrolle über die Calcium-Homöostase initiieren apoptotische Vorgänge, die wiederum zum Zelltod führen.

Studien belegen, dass die Störung der empfindlichen Calcium-Homöostase in neuronalen Zellen eine Rolle bei Alterserscheinungen des Gehirns (Toescu et al. 2004) und der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer (Schneider et al. 2001; Toescu et al. 2004) spielt.

Studien von Mattson et al. konnten belegen, dass eine Störung der empfindlichen Calcium-Homöostase auch über die A β -Toxizität entstehen kann (Mattson et al. 1992; Hartmann et al. 1993). Auch hier konnte eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration unter anderem in hippokampalen Kulturen der Ratte nachgewiesen gewesen. A β ist ebenfalls in der Lage die Funktion der Ca²⁺-ATPasen und Na⁺/K⁺-ATPasen spezifisch zu beeinträchtigen (Mark et al. 1995). Ferner konnten zwei weitere APP Spaltprodukte, C99 (β -CTF) und AICD mit einer Störung der Calcium-Homöostase in Verbindung gebracht werden (LaFerla 2002; Leissring et al. 2002; Smith et al. 2005).

Die Stabilisation der Calcium-Homöostase macht hingegen Neurone weniger anfällig für ischämische und exzitatorische Schäden und ist entscheidend für die synaptische Plastizität (Mattson and Chan 2003). Die lösliche N-terminale Ektodomäne von APP sAPP α ist zudem in der Lage den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel schnell und reversibel zu vermindern, indem sie die Spannungsgesteuerten Kanäle hemmt (Mattson 1997).

Neben der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch erhöhte A β -Produktion und verminderte sAPP α Sekretion können auch Zellschäden denselben Effekt bewirken. Oxidativer Stress kann zur Schädigung von Proteinen und DNA und zur erhöhten Lipidperoxidation führen. Der damit einhergehende Verlust der Membranintegrität führt zu einer Störung der Ca²⁺-ATPasen und Glucose- und Glutamatrezeptoren und zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle und letztendlich zum Stress-induziertem Zelltod (Mark et al. 1995).

1.6 Die Rolle der Apoptose bei Morbus Alzheimer

Apoptose bezeichnet einen aktiven determinierten, biochemischen Vorgang, der innerhalb eines Organismus zur kontrollierten Elimination von Zellen führt, die entweder nach einem bestimmten Differenzierungsstand nicht mehr benötigt werden oder von ihrer Funktion abweichen. Man spricht deswegen auch vom „programmierter Zelltod“. Apoptose wurde erstmal von Kerr und seinen Kollegen 1972 beschrieben (Kerr et al. 1972). Im Gegensatz zur Nekrose löst die Apoptose keine Entzündungsreaktion im Gewebe aus. Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS). So werden z.B. Neurone, die keine funktionierenden Synapsen ausbilden eliminiert (Weller et al. 1997; Monk et al. 2001).

Für Morbus Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen wird kontrovers diskutiert, ob die betroffenen Neuronen einen primär nekrotischen oder apoptotischen Zelltod sterben. Nach dem aktuellen Forschungsstand geht man nun davon aus, dass beide Formen des Zelltods eine Rolle für den Verlust von Neuronen spielen. Zudem ist bekannt, dass viele Stress-Stimuli in der Lage sind, in neuronalen Zellen sowohl apoptotische als auch nekrotische Formen des Zelltods zu induzieren, was u.a. auch für A β -Peptide bereits gezeigt werden konnte (Selznick et al. 2000). Im folgenden Abschnitt werden nun apoptotische Vorgänge in neuronalen Zellen beschrieben, die mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht werden konnten.

Morbus Alzheimer ist gekennzeichnet durch synaptische Dysfunktion und das Absterben von Neuronen (Selkoe 2002). Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, dass diese in Patienten durch einen apoptotischen Zelltod sterben (Behl 2000). Die Quantifizierung apoptotischer Zellkerne in hippocampalen Gewebe aus Gehirnen von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe zeigte, dass in diesem Areal signifikant mehr Anzeichen für apoptotischen Zelltod zu sehen waren (Daly et al. 1998). Außerdem konnte in post mortem Gehirngewebe von Patienten mit Morbus Alzheimer eine erhöhte DNA-Fragmentierung (Su et al. 1994; Masliah et al. 1998), ein verändertes Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen (Kitamura et al. 1998), sowie eine erhöhte Caspase-Aktivität (Yang et al. 1998; Engidawork et al. 2001) (Lu et al. 2000).

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von neuronalen Zellen *in vitro* mit dem toxischen A β zu apoptotischem Zelltod führt (Estus et al. 1997; Tamagno et al. 2003), welcher über Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 vermittelt wird (Roth 2001). In neuronalen PC12 Zellen bewirkte die Überexpression von APP mit der „Schwedischen Doppelmutante“ (APP^{sw}, siehe oben) nach oxidativem Stress eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3, 8 und 9 und führte zu einer erhöhten Aktivierung von JNK1 und JNK2 (Marques et al. 2003).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins lässt sich in zwei Hauptwege einteilen, deren Spaltprodukte sich in ihrer biologischen Effekten im Hinblick auf Neuroprotektion und Neurotoxizität diametral unterscheiden: Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl die neuroprotektiven als auch die neurotoxischen Effekte von APP näher betrachtet werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die differentielle Genregulation durch APP Überexpression nach Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung in PC12 Zellen untersucht werden. Hierbei wurde das in den Kulturüberstand sekretierte sAPP α vor Applikation des Stress-Stimulus entfernt. Zu Beginn dieser Arbeit lagen Beobachtungen vor, dass APP-überexprimierende PC12 Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine abnorm hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung aufweisen. Mittels Affimetrix GeneChip[®] Technologie konnten Gene identifiziert werden, deren Transkription von der APP Überexpression beeinflusst wurde. Weiterführend sollte nun der Einfluss von APP auf die Regulation der zellulären Calcium-Homöostase sowie auf den durch Ca^{2+} -Freisetzung ausgelösten Zelltod untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die neuroprotektive Wirkung der N-terminalen Ektodomäne von APP (sAPP α) in in vitro Zellsystemen etabliert werden. Hierfür sollten drei verschieden produzierte Varianten des sAPP α -Proteins getestet werden: 1) autokrines sAPP α in APP-überexprimierenden neuronalen Zelllinien, 2) von *E. coli* produziertes aufgereinigtes rekombinantes sAPP α und 3) sekretiertes sAPP α aus konditioniertem Medium von APP-überexprimierenden HEK293 Zellen. Für die Etablierung sollten folgende mit Morbus Alzheimer assoziierte Stress-Stimuli verwendet werden: Störungen der Ca^{2+} -Homöostase, proteosomaler Stress, DNA-Schädigung, oxidativer Stress und Hypoxie. Zur Analyse der molekularen Effekte von sAPP α im Rahmen der Neuroprotektion sollte zusätzlich die Rolle des pro-apoptotischen JNK/c-Jun Stress-Signalwegs und dessen Regulation durch sAPP α untersucht werden. Die Inhibition des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalwegs sollte zudem Aufschluss darüber geben, inwieweit die sAPP α -vermittelte Neuroprotektion über diesen Signalweg vermittelt wird.

Neuartige pharmakologische Ansätze in der Therapie von Morbus Alzheimer könnten zur Entwicklung von wirksameren Pharmaka führen, die direkt in den APP-Metabolismus eingreifen oder die Sekretion des neuroprotektiven sAPP α erhöhen. Deswegen sollten die neuroprotektiven Eigenschaften pharmakologischer Substanzen und ihre Wirkung auf den APP-Metabolismus untersucht werden. Im Rahmen der Arbeit wurden die Pharmaka Simvastatin (Statin), Galantamin (Alkaloid) und Docosahexaensäure (Omega-3 Fettsäure) untersucht. Statine und Omega-3 Fettsäuren wirken modulierend auf die Membranfluidität, während Galantamin sich über die Modulation der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren positiv auf die Calcium-Homöostase auswirkt. In einer Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob dieser pharmakologischen Substanzen in der Lage sind, einen Wirkstoffvermittelten Schutz vor der Stress-induzierten Apoptose zu bewirken. Ferner sollte untersucht werden, ob diese Substanzen in der Lage sind, die sAPP α Sekretion spezifisch zu erhöhen und inwieweit die induzierten neuroprotektiven Effekte von dieser Erhöhung abhängen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät (Bezeichnung)	Hersteller
Analytik Waage BP61	Sartorius, Göttingen
Bakterienschüttler	HAT Infors, Bottmingen, Schweiz
Cleanbench (Herasave)	Haereus, Hanau
Cleanbench (Technoflow)	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop (TE2000S)Objektive: 60x Ölimmersion, Numerische Apertur (NA): 1.40	Nikon, Düsseldorf
Gel-Dokumentationssystem	MWG Biotech
Luminometer (Centro LB960)	Berthold, Bad Wildbad
Odyssey® Infrared Scanner	LI-COR, Lincoln, USA
pH-Messgerät (pH 530)	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage (Seralpur Delta UF)	Seral, Ransbach-Baumbach
SPOT 2 Kamera	Dagnostic Instruments/Visitron, Puchheim
Tecan Reader GENios	Tecan, San Diego, USA
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler (Primus 25)	MWG Biotech, Ebersberg
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Haraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge Fresco)	Kendro, Düsseldorf
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Zellkulturschrank (HeraCell)	Haraeus, Hanau
Stratalinkers®UV Crosslinker	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden soweit verfügbar, in Analysen- oder Arzneibuchqualität bzw. „molecular biology grade“ verwendet. Sie wurden von den Firmen Applichem, Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisendorf) oder Serva (Heidelberg) bezogen, wie auch alle nicht näher bezeichneten Chemikalien.

Verbrauchsmaterialien

Sterile Gefäße, wie Kulturflaschen wurden ebenso wie sterile Gefäße zur Aufbewahrung von Lösungen und Medien von folgenden Firmen bezogen: Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Becton Dickinson (BD, Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden)

Zellkulturmaterialien

Die auf Mykoplasmen- und Keimfreiheit getesteten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Substanz	Hersteller / Lieferant
Aqua ad iniectabilia Delta-Pharma	Delta Pharma Boehringer
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium 4,5g/L D-Glucose)	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM Serum-reduziertes Medium	PAA, Cölbe/ Invitrogen, Karlsruhe
PBS Puffer (1x, nach Dulbecco-) Pulver	AppliChem
Penicillin/ Streptomycin (10.000 I.E. Penicillin, 10 mg/ ml Streptomycin)	Sigma, Deisenhofen

Pferdeserum	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
Poly-D-Lysine HBr mol wt 70.000 -150.000	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin/EDTA Lösung in HBSS	Gibco (über Invitrogen, Karlsruhe)

Molekularbiologische Chemikalien

Chemikalien / Verbrauchsmaterial	Hersteller / Lieferant
Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40 % [PAA]	Serva, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz-Trhydrat (ATP)	AppliChem
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
2-APB	Sigma, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia Delta-Pharma	Delta Pharma Boehringer
BABTA-AM	Molecular Probes (über Invitrogen, Karlsruhe)
BD Gaspak 150-System	BD Laboratories, Heidelberg
Behensäure	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol-2 pA	Fulka, Neu-Ulm
dNTP Mix (10mM)	Eppendorf, Hamburg
Docosahexaensäure (DHA)	Sigma, Deisenhofen
DTT	Eppendorf, Hamburg
ECL Chemiluminescence	Amersham Biosciences
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydra	AppliChem
Epoxomicin	Alexis, Grünberg
Ethidiumbromid 1% (10 mg/mL)	Sigma, Deisenhofen
First Strand Buffer	Eppendorf, Hamburg
Galantamin	Janssen, Beerse (Belgien)
Glycerin	Sigma, Deisenhofen

Hexanuclotide pd(N)6 A260 units	Amersham Biosciences
JNK/SAPK Inhibitor-II: SP600125	Calbiochem, Cambridge
Lipoid [®] S100	Lipoid, Ludwigshafen
LY264002, HBr	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I und II	Sigma, Deisenhofen
Poly-D-Lysine HBr mol wt 70.000 - 150.000	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S (C.I.27195) Certistain	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
RNaseZap [®]	Ambion, Darmstadt
Roti [®] -Quant UN 1760	Roth, Karlsruhe
Saccharose (Sucrose)	AppliChem
Simvastatin	Meck, Darmstadt
SK&F96365	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Thapsigargin	Alexis (Grünberg, Germany).
Tween [®] 20	AppliChem
Wasserstoffperoxid	Apotheke, Uniklinikum Frankfurt

2.2 Zelllinien

HEK293

Die HEK293 Zelllinie ist eine humane Embryonenkarzinom-Zelllinie aus der Niere (Graham et al. 1977). Die Transfektion der HEK Zellen mit dem Humanen Wildtyp von APP (APPwt) wurde von Frau Dr. Barbara Steiner durchgeführt (Eckert et al. 2001).

- *verwendete Klone*
 - HEK293 untransfiziert
 - HEK293 APPwt: HEK269 APPwt

PC12 Zellen

Naive PC12 Zellen sind Nebennierenmarkszellen der Ratten (Greene and Tischler 1976). Die Transfektion der PC12 Zellen mit dem Humanen Wildtyp von APP (APPwt) oder dem Leervector (vector) wurde von Frau Dr. Barbara Steiner durchgeführt (Haass et al. 1995; Eckert et al. 2001). Hierfür wurden die DNA-Sequenzen in einen Vektor mit pCMV-Promotor kloniert.

- *verwendete Klone*
 - PC12 untransfiziert
 - PC12 vector: neoO1
 - PC12 APPwt: M5 und N10

SH-SY5Y

Die humane Neuroblastomzelllinie (Biedler et al. 1973) wurde mit dem Humanen Wildtyp von APP kloniert. In diesem Fall wurde APP in einen pCEP4 Plasmidvektor im Labor von Dr. Thomas Bayer in Bonn kloniert.

- *verwendete Klone*
 - SH-SY5Y untransfiziert
 - SH-SY5Y APPwt

2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech synthetisiert.

Oligo-nukleotid	Sequenz	PubMed „Accession No.“
CHOP	5'-CTT CAC TAC TCT TGA CCC TGC AT-3' (s) 5'-ATG TGC ACT GGA GAT TAC TGC TT-3' (as)	NM_024134
BiP	5'-GGTACATTTGATCTGACTG-3' (s) 5'-CACTTCCATAGAGTTTGCTG-3' (as)	NM_037215
GAPDH	5'-CTC GTG GTT CAC ACC CAT-3' (s) 5'-GGC TGC CTT CTC TTG TGA-3' (as)	NM_017008

2.4 Antikörper

Primärantikörper	Typ	Hersteller
anti-Aktin	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
anti-APP (22C11)	Maus monoklonal	Chemicon Temecula, USA
anti-APP (6E10)	Maus monoklonal	Signet, Dedham, MA
anti-GAPDH [6C5]	Maus monoklonal	Abcam Ltd, Cambridge, UK
anti-Active [®] JNK pAb	Kaninchen polyklonal	Promega, Mannheim
anti- α -Tubulin	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Sekundärantikörper	Typ	Hersteller
anti-Maus	IgG HRP-konjugiert	Zytomed, Berlin
anti-Kaninchen	IgG HRP-konjugiert	Zytomed, Berlin
Anti-Maus	IRDye 680 und IRDye 800	LI-COR, USA
Anti-Kaninchen	IRDye 680 und IRDye 800	LI-COR, USA

2.5 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit [®]	Uptima / KMF, Köln
Qiashredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Midi Kit (50)	Qiagen
Super Signal Chemiluminiszenzreagenz Pico und Femto	Pierce / Perbio Science, Bonn
sAPP α ELISA	IBL, America

2.6 Rekombinante Proteine

Die aufgereinigte, rekombinante und lösliche N-terminale Domäne von APP sAPP α und dessen Teilfragmente wurden in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und lagen in PBS gelöst vor.

Proteine	Hersteller
sAPP α : Aminosäuresequenz 1 – 612	Sigma, Deisenhofen
Teilfragment sAPP α : Aminosäuresequenz 304 – 612	Sigma, Deisenhofen
Teilfragment sAPP α : Aminosäuresequenz 444 – 612	Sigma, Deisenhofen

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung von Zelllinien

2.7.1.1 Kultivierung in Kulturflaschen

Kultivierung von HEK293 Zellen

Die HEK293 Zellen wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 10 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium DMEM enthielt 10 % FCS und 5% Pferdeserum. Die Zellen wurden alle 2 - 3 Tage von ihrer Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:6 passagiert. Der Zelllinie HEK293 APPwt wurde in konstanten Zeitabständen das selektive Antibiotikum Geneticin (G418) in einer Konzentration von 500 μ g/ml zugesetzt.

Kultivierung von PC12 Zellen

Die PC12 neoO1 und APPwt (Klon M5 und N10) wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium DMEM (4,5 g/L Glucose) enthielt insgesamt 15 % Serum, welches sich aus 5 % Pferdeserum und 10 % FCS zusammensetzt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage von ihrer Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3 passagiert. Den Zelllinien wurde in konstanten Zeitabständen das selektive Antibiotikum Geneticin (G418) in einer Konzentration von 500 μ g/ml zugesetzt.

Kultivierung von SH-SY5Y Zellen

Die SH-SY5Y Zellen und SH-SY5Y wtAPP Zellen wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI enthielt die Zusätze 10 % FCS, L-Glutamine und MEM-Vitamine. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mittels Trypsin von ihrer Wachstumsfläche abgelöst und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:6 passagiert. Den Zelllinien wurden in konstanten Abständen mit dem Antibiotikum Hygromicin selektiert.

2.7.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahlbestimmung für die Deckgläschen und je nach Bedarf auch für Kulturflaschen wurde mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zählkammer wird zur mikroskopischen Zählung von Zellen verwendet, wobei alle Zellen, sowohl lebende als auch tote erfasst werden. In einer solchen Zählkammer ist auf einem Glasplättchen ein Gitternetz aufgezeichnet, welches in kleine Quadrate mit bekanntem Volumen unterteilt ist. Es wird im Allgemeinen der Durchschnitt (Ausgangszellzahl) von vier ausgezählten Großquadraten gebildet, die sich aus je 16 Kleinquadraten zusammensetzen. Die Zellsuspension wird in entsprechender Verdünnung über Kapillarkräfte unter das Deckglas gesaugt. Die gewünschte Zielkonzentration an Zellen (Zielzellzahl) wird mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zielzellzahl}}{\text{Ausgangszellzahl} \times 10^4} \times \text{Vol (ml)} = \text{Zellsuspension in ml}$$

2.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese von ihrer Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und bei 1000 Upm für 7 min bei RT abzentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus, Hanau). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium, welches 10 % DMSO enthielt, vorsichtig resuspendiert und in Einfrierampullen zunächst für zwei Tage bei – 80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden die Ampullen zunächst schnell in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde langsam in 5 ml frisches, 37 °C warmes Kulturmedium überführt und vorsichtig durchmischt. Das DMSO im Kulturmedium wurde durch Zentrifugation für 7 min bei 1000 Upm (Tischzentrifuge Heraeus, Hanau) entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem, 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert und in einer sterilen Kulturflasche in Kultur genommen.

2.8 Zytotoxische Stress- und Apoptose-Stimuli

UV-Strahlung

UV-Bestrahlung führt zu DNA-Schäden und ist ein klassischer apoptotischer Stress-Stimulus. Für die UV-Bestrahlung der Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen einer Dosisbestrahlung von 100 J/m² UV ausgesetzt. Nach der UV-Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium wieder auf die Zellen gegeben. Als UV-Quelle diente ein Stratalinkers[®] UV Crosslinker (Stratagene, Amsterdam).

Thapsigargin, Epoxomicin und Wasserstoffperoxid

Die Stress-bedingte Induktion der Apoptose erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Thapsigargin (1 µM in DMSO gelöst), einem Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Calcium-Transporter. Dies führt wiederum zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und somit zu einer erhöhten zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Infolge dessen werden im Zytoplasma Caspasen aktiviert, die einen Caspase-abhängigen Zelltod auslösen (Thastrup 1990).

Proteosomaler Stress wurde in den Zellen durch die Substanz Epoxomicin ausgelöst. Epoxomicin ist ein Proteasom-Inhibitor, der die proteolytisch aktiven Zentren des 20S-Proteasoms irreversibel inhibiert (Meng et al. 1999).

Oxidativer Stress wurde in den Zellen durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (10 µM H₂O₂) induziert. Wasserstoffperoxid diffundiert dabei direkt durch die Zellmembran und wirkt über die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikal (OH[•]).

Hypoxie

Für die Induktion von Apoptose ausgelöst durch Hypoxie (< 0,1 % O₂) wurden die kultivierten und je nach Versuch vorbehandelten Zellen in eine Hypoxiekammer gestellt und bei 37 °C unter Sauerstoffausschluss weiter kultiviert. Die in der Hypoxiekammer befindlichen GasPacks wurden nach Angaben des Herstellers mit 10 ml Wasser aktiviert. Zufluss des Wassers zum Filterpapierdocht geschieht durch ein System aus kleinen Kanälen. Der Docht leitet das H₂O zu den Gasgenerator-Tabletten in der Tablettenkammer. Der durch die Natriumborhydrid-Tablette freigesetzte Wasserstoff verbindet sich in Gegenwart des Palladium-Katalysators mit dem in der Kammer enthaltenen Sauerstoffs zu Wasser. Somit findet in der Hypoxiekammer eine exotherme Reaktion statt, bei der der Sauerstoff reduziert wird und zu anoxischen Bedingungen führt. Da hier chronische Hypoxie untersucht werden sollte, wurden die Zellen für 24 Stunden oder 48 Stunden behandelt.

2.9 Nachweis von Apoptose

Caspase-3 Aktivitätsmessung (Caspase-Assay)

Aus zuvor behandelten Zellen wurden durch Lyse zytosolische Extrakte gewonnen (150 µl bzw. 200 µl Lysepuffer). Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis für 15 min lysiert oder bis zur Analyse der Caspase-Aktivität bei -80 °C eingefroren. Hierdurch wird zudem die Lyse der Zellen erleichtert. Deren Caspase-Aktivität wurde anschließend durch Inkubation der Zelllysate (25 µl bzw. 50 µl Lysat) mit 10 µM des fluorogenen Substrates „DEVD-AMC“ in 75 µl bzw. 150 µl Puffer Reaktionspuffer bestimmt. Das Substrat (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Bachem, Heidelberg) besteht aus einem Tetrapeptid (DEVD), das als Caspase-Spaltstelle dient, und dem daran gekoppelten Fluorophor Aminomethylcoumarin (AMC). Das durch Caspasespaltung freigesetzte Aminomethylcoumarin kann fluorimetrisch nach Anregung mit 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen werden. Die DEVD Sequenz wird präferentiell von Caspase-3 ähnlichen Caspasen (wie -3, -7 und -6) gespalten.

- Verwendete Lösungen:

Lysepuffer:	10 mM	HEPES pH 7,4
	0,5 %	CHAPS
	42 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF

Reaktionspuffer:	25 mM	HEPES pH 7,5
	1 mM	EDTA
	10 %	Sucrose,
	0,1 %	CHAPS
	3 mM	DTT
	10 µM	Substrat (DEVD)

2.10 Analyse von Proteinen

2.10.1 Gesamtzellextraktion

Für die Analyse der Proteine wurden die Zellen nach der Zellernte zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit heißem SDS-Lysepuffer (95 °C) lysiert. Die Menge an SDS-Lysepuffer richtete sich hierbei nach Art, Fläche und Konfluenz der ausgesäten Zellen. Anschließend wurde das Gesamtzellextrakt 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und entweder gleich mittels der Western-Blot-Analyse analysiert oder bei -20 ° bzw. -80 °C bis zur Analyse gelagert.

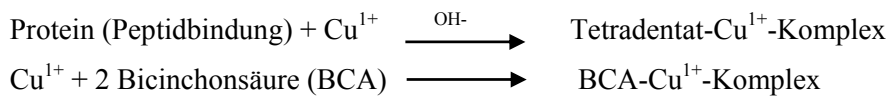
- Verwendete Lösungen:

PBS

SDS-Lysepuffer:	2 %	SDS (w/v)
	68,5 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10 %	Glycerin
	1:100	Proteinase-Inhibitor Cocktail (Sigma)
	1:1000	Phosphatase-Inhibitor Cocktails I und II (Sigma)

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce/Perbio, Bonn) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation der Proteinlysate mit dem BCA Reagenz (37° C) wurde anhand der mitgeführten BSA-Standardgerade die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 560 nm (A_{560}). Hierbei werden die proportional zu den Proteinkonzentration gebildeten BCA-Cu¹⁺-Komplexe gemessen. Die Reaktion basiert auf folgendem Schema:



2.10.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE für Western-Analytik

Die Auftrennung von Protein entsprechend ihrer Größe und Ladung erfolgte in Acrylamidgelen nach der Methode von Lämmli et al. (Laemmli 1970). Hierbei führt die unspezifische Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine zu einer Dissoziation von Untereinheiten und zu einer negativen Gesamtladung der Proteine. Im elektrischen Feld können die Proteine anschließend aufgetrennt werden und wandern entsprechend ihrer Gesamtladung, die proportional zu ihrer Größe ist.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele (Sammel- und Trenngel), die sich in der Acrylamid-Konzentration sowie im pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel entsteht eine scharfe Proteinbande, nach dem Weiterlaufen in das Trenngel erfolgt eine reproduzierbare Auftrennung der Proteine. Sammelgel (5 %) und Trenngel (7 – 15 %) wurden nach Sambrock et al. hergestellt, die Polymerisierung erfolgte ausgehend von Acrylamid (Monomer) und Bisacrylamid (bifunktional) und wurde durch Zugabe von TEMED (Katalysator) und APS (Quervernetzung) gestartet.

Die Gelbox wurde in die Gelkammer eingespannt und mit 1x Western-Elektrophorese-Laufpuffer (WEB) bedeckt. Die Proteinproben, in Laemmli-Laufpuffer aufgenommen und kurz aufgeköcht (3 - 5 min, 90 °C), wurden in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoreti-

sche Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke (Einlauf: 15 mA für 30 min.; Auftrennung: 15 -20 mA für ca. 1 h).

- **Verwendete Lösungen:**

Lämmli-Puffer (6x): 350 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 30 % Glycerol, 10 % SDS,
 600 mM DTT
 0,01 % Bromphenoblau

Trenngel: 7% - 15 % PAA (37,5:1)
 375 mM Tris/HCl (pH 8,8)
 0,1 % SDS
 0,1 % APS
 0,05 % Temed

Sammelgel: 5 % PAA (37,5:1)
 120 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 0,1 % SDS
 0,1 % APS
 0,05 % Temed

WEB: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 25 mM SDS

2.10.4 Western-Blot-Analyse

Der Transfer von Proteinen auf (Nitrocellulose-) Membranen wird als Western Blot bezeichnet. Für den Transfer wurde ein elektrophoretisches Blotverfahren benutzt. Die verwendete Apparatur (Blotter) besteht aus zwei Metall-Platten (Anode und Katode). Die Anode wurde mit Transfer-Puffer befeuchtet. Der Transfer-Puffer enthält je nach Proteingröße 10 – 20 % Methanol, da der Transfer von großen Proteinen durch einen sehr hohen Methanolgehalt erschwert wird. Darauf legte man zwei Lagen Whatman-Papier (in Transfer-Puffer getränkt). Die Nitrocellulose-Membran wurde ebenfalls mit Transfer-Puffer angefeuchtet und darauf das Proteingel gelegt. Bedeckt wurde das Gel mit zwei weiteren Lagen Whatman-Papier (in Transfer-Puffer getränkt) und schließlich der Kathoden-Platte. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 mM für 90 min. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 2 min in Ponceau-Lösung geschwenkt. Die aufgetrennten Proteine erscheinen als gefärbte Banden. Für die Analyse der Proteine mit dem Infrarot-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe unten) wurde dieser Schritt

ausgelassen, da die Ponceaurotfärbung das Signal im Infrarot-Imager unspezifisch überstrahlen würde.

- **Verwendete Lösungen:**

Ponceau-Lösung: 0,2 % Ponceau S7
 3 % Trichloressigsäure
 3 % Sulfosalicylsäure

Transfer-Puffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 10 - 20 % Methanol

2.10.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die geblotteten Gele können nach dem Transfer mittels der Coomassie-Färbung angefärbt werden, dadurch werden die auf dem Gel verbliebenen bzw. nicht transferierten Gele sichtbar. Dies ist zum einen sinnvoll, da hierüber eine optische Kontrolle des Transfers möglich ist und zum anderen kann es unter Umständen als Ladekontrolle dienen. Bei dem Nachweis von Proteinen aus konditioniertem Medium ist weder eine Proteinbestimmung noch eine gängige Ladekontrolle wie α -Tubulin möglich, eine ungleiche Beladung würde durch Coomassie-Färbung sichtbar werden. Die Gele wurden für ein bis zwei Stunden bei RT und leichtem Schwenken nach Angaben des Herstellers in der Färbelösung inkubiert und anschließend übernacht gewaschen.

Die Gele wurden nach der Entfärbung auf einem Stück Whatman-Papier und für 120 Minuten bei ca. 60 °C in einem Geltdrockner getrocknet.

2.10.6 Western-Blot-Immunodetektion

Die auf die Nitrocellulose-Membran geblotteten Proteine wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungen in 5 % Blocko-Lösung (Magermilchpulver oder BSA) inkubiert (1 Stunde bei RT). Für die Detektion mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System (LICOR, USA) wurde bis zur Absättigung der unspezifischen Bindungen kein Tween 20[®] verwendet. Dann wurde der Primär-Antikörper, in 3 % Blocko- oder 3 % BSA-Lösung verdünnt zur Membran gegeben und die Membran für 120 min oder über Nacht in der Lösung inkubiert. Nach drei Waschschrinen (TBS-T_{0,05} %) wurden entsprechende Sekun-

2.11 DNA-Arbeitstechniken

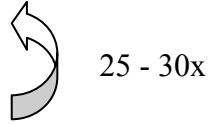
2.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) zyklische Replikation, die sich durch ein exponentielles Wachstum auszeichnet und enzymatisch eine bestimmte Nukleotidsequenz *in vitro* zu replizieren ermöglicht (Saiki et al. 1989).

Für die Analysen wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

1	µl	cDNA
1	µl	Primer (sense)
1	µl	Primer (antisense)
10	µl	2x Reaktionspuffer (enthält die dNTPs, jeweils 10 mM)
0,8	µl	Taq Polymerase
6,2	µl	H ₂ O

Die PCR-Bedingungen wurden in der Regel folgendermaßen gewählt:

Initiale Denaturierung:	2 min	94°C	
Denaturierung:	30 sec	94 °C	
Annealing:	30 sec	55 °C	
Elongation:	45 sec	72 °C	
Terminale Elongation:	3 min	72°C	

Die hergestellten PCR-Produkte wurden anschließend mit 6x-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.11.2).

2.11.2 DNA-Standardgelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde je nach erwarteter Produktgröße ein 1,5 – 2 %iges (v/w) Agarosegel verwendet. Als Laufpuffer und zum Lösen der Agarose diente 1x TAE-Puffer. Für die Färbung der DNA-Fragmente im Gel wurde dem Gel während der Herstellung direkt Ethidiumbromid (5 µg/ml) hinzugefügt. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/6 Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V mindestens 45 min. Die gefärbten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator mit 254 nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Für die Dokumentation

wurden mit einem Geldokumentationssystem (MWG Biotech) digitale Aufnahmen der Gele erstellt.

2.12 RNA-Arbeitstechniken

2.12.1 Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Unerwünschte DNA wurde durch eine Hydrolyse mit DNase I entfernt. Die RNA-Konzentrationen wurden UV-photometrisch bei 260 nm vermessen und die Reinheit der Präparationen durch das A260/A280-Verhältnis bestimmt, welches zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von eins 40 µg RNA/ml.

2.12.2 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte mit der *Moloney Murine Leukemia Virus*-Reversen Transkriptase (M-MLV RT) von Invitrogen. Als Matrize diente die isolierte Gesamt-RNA und als Primer für das Enzym wurden Hexanukleotide verwendet. Für die Standard-PCR-Reaktion wurden jeweils 0,1 Volumen der cDNA eingesetzt.

Für einen Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zunächst 2 µg Gesamt-RNA, 2 µl Hexanukleotid-Primer und 6 µl RNase-freies Wasser miteinander vermischt. Die Proben wurden anschließend für fünf Minuten bei 65°C im Thermocycler denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde ein Master-Mix aus den Komponenten 200 µM dNTP, 10 mM DTT, 5x Erststrangpuffer und 200 Einheiten der M-MLV RT hergestellt und mit je 8 µl Lösung pro Ansatz auf die Proben verteilt. Die RNA wurde dann für 50 min bei 42 °C revers transkribiert. 1 µl der cDNA wurde in der anschließenden PCR als Matrize eingesetzt (siehe 2.11.1).

2.12.3 RNA-Interferenz

Die Expression bestimmter Proteine kann durch transiente Transfektion (siMPorter, Upstate) kurzer doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) gemindert bzw. inhibiert werden. Die langen dsRNAs werden in der Zelle durch eine Typ III-RNase (*Dicer*) zu

siRNAs prozessiert, die 21 - 23 Nukleotide enthalten. In diesem Fall wurden die siRNAs synthetisch hergestellt und direkt transfiziert (siehe unten). Die siRNA wird dann ATP-abhängig entwunden und dann als einzelsträngige siRNAs in den hochmolekularen Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert. Dieser bindet nun, in seiner aktiven Form, an eine komplementäre mRNA-Sequenz und degradiert diese.

Die Transfektion der PC12 vector und APPwt Zellen wurde (siMPorter, Upstate) durchgeführt. Die siRNA (Ambion, Darmstadt) in einer finalen Konzentration von 50 nM eingesetzt. Als nicht-genspezifische Kontrolle diente hier zum einen für die optische Kontrolle, eine FAM markierte siRNA (Ambion, Darmstadt) und eine nicht markierte Kontrolle (siControl; Ambion, Darmstadt). 4 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. Die Behandlung der Zellen erfolgte 16 Stunden nach der Trasfektion.

Gen	siRNA Oligonukleotidsequenzen
CHOP	5'- GGUCCUGUCCUCAGAUGAAAdTdT -3' 5'- UUCAUCUGAGGACAGGACCCdTdG -3'

2.13 ELISA

Für die Konzentrationsbestimmung von sezerniertem sAPP α aus konditioniertem Medium wurde ein für sAPP α spezifischer Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Engvall and Perlman 1971) (IBL, America) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Festphasen Sandwich ELISA. Die Detektion von sAPP α verläuft über zwei spezifische Antikörper, dem Erstantikörper anti-sAPP α und einem mit der Meerrettichperoxidase -gekoppelten Zweitantikörper. Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) dient hierbei als Chromogen, reagiert mit der Peroxidase unter Bildung eines blauen Endprodukts. Das Abstoppen dieser Reaktion erfolgt über die Zugabe von Schwefelsäure und bildet einen stabilen gelben Farbkomplex. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration bestimmenden Antigens, hier dem Humanen sAPP α , in der Probe.

2.14 Daten Analyse

- Western-Blot-Analyse

Die densitometrische Analyse der Bandenstärke erfolgte mit der Odyssey[®] Application Software 2.1 (LI-COR, Lincoln, USA).

- Statistik:

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Exel[®] 2000, SPSS[®] 9.0 und GraphPad Prism 4 für Windows. Wenn nicht anders angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler der Messwerte (\pm S.E.M.) angegeben. Statistische Analysen erfolgten mittels dem One-way Anova Test.

3 Ergebnisse

3.1 Die Überexpression von APP sensitiviert PC12 Zellen für die durch Calcium-freisetzung induzierte Apoptose

Der Einfluss von APP in der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase sowie dem durch Ca^{2+} -Freisetzung ausgelösten Zelltod wurde in PC12 Zellen untersucht, die mit der humanen Wildtyp APP695 (PC12 APPwt) Isoform stabil transfiziert wurden. Als Kontrolle dienten hierbei PC12 Zellen, die mit dem Leervektor (PC12 vector) stabil transfiziert wurden (Dussmann et al. 2003). Um eine mögliche Veränderung der Calcium-Homöostase durch APP-Überexpression zu untersuchen, wurden die Zellen mit Thapsigargin behandelt. Bei der Substanz Thapsigargin handelt es sich um einen Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Calcium-Transporter (Thastrup 1990).

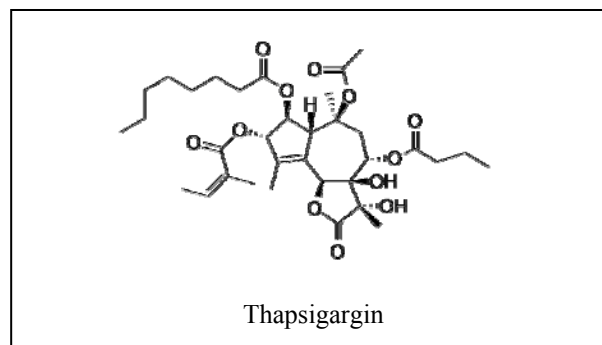


Abbildung 3: Strukturformel von Thapsigargin

Dies führt wiederum zu einer Entleerung der Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und somit zu einer erhöhten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Infolge dessen werden im Zytoplasma Caspasen aktiviert, die einen Caspase-abhängigen Zelltod auslösen. Um einen signifikanten Anstieg der Caspase-3 Aktivität messen zu können, wurde zunächst in vorangegangenen Experimenten in naive PC12 Zellen die optimale Thapsigargin-Dosis und Inkubationsdauer ermittelt (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde in den folgenden Versuchen jeweils vor der Behandlung mit Thapsigargin ein Mediumwechsel in den APP überexprimierenden Zellen und der Kontroll-Zelllinie vorgenommen, um einen möglichen Nebeneffekt des Spaltprodukts $\text{sAPP}\alpha$ (siehe Einleitung 1.4.1) auszuschließen. $\text{sAPP}\alpha$ wird von den Zellen in das Medium sezerniert und kann somit durch den Austausch des Kulturmediums entfernt werden. Die APP-Überexpression in PC12 Zellen bewirkte bereits nach 12 h einen signifikanten Anstieg der

Caspase-3 Aktivität im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abbildung 4). Zudem konnte in vorangegangenen Experimenten bereits für APP-überexprimierende PC12 Zellen, eine im Vergleich zur Kontrolle abnormal hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-induziertem Ca^{2+} -Freisetzung nachgewiesen werden (Copanaki et al. 2007). In diesem Zusammenhang wurde in weiterführenden Experimenten die Beziehung zwischen APP Überexpression und Regulation der Calcium-Homöostase näher untersucht.

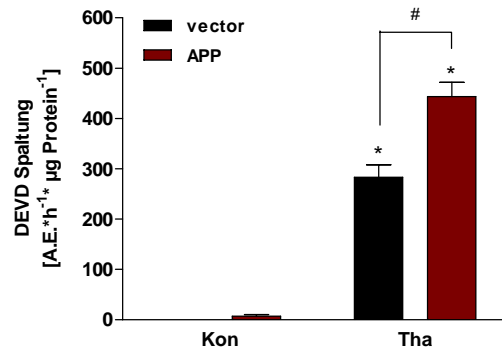


Abbildung 4: Die Überexpression von APP führt zur erhöhten Thapsigargin-induzierten Apoptose in PC12 Zellen

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vec) wurden entweder mit dem Lösungsmittel DMSO (Kon) oder 1 μM Thapsigargin (1 μM Tha) für 12 h behandelt. Die PC12 APP Zellen zeigten im Caspase-Assay einen signifikanten Anstieg der Caspase-3 Aktivität nach Thapsigargin Stimulation im Vergleich zu der Kontrollzelllinie. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (PC12 vector, DMSO). # p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber behandelten Kontrollzellen (PC12 vector).

3.1.1 Quantitative Analyse der differentiellen Genexpression nach Thapsigarginbehandlung in PC12 vector und PC12 APPwt Zellen

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Thapsigargin um einen Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Calcium-ATPasen (SERCA). Diese Inhibition führt zur Freisetzung der Calcium-Ionen aus dem ER und somit zur Inhibition der im ER vorhandenen Ca^{2+} -abhängigen Chaperone, die für ihre Aktivität auf hohe Ca^{2+} -Konzentration im ER angewiesen sind und zur Akkumulation falsch gefalteter Proteine im ER führt. Dieses Ereignis wird allgemein auch als ER-Stress bezeichnet und aktiviert eine als „*unfolded protein response*“ (UPR; zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine) bezeichnete Reaktion der Zelle (Kaufman 1999; Gulow et al. 2002). Die Freisetzung von Calcium an sich führt allerdings nicht zur Aktivierung von ER-Stress-abhängigen sondern auch zur Aktivierung

ER-Stress-unabhängige Signalwege, die wiederum zusätzlich die Apoptose in den behandelten Zellen antreiben.

Den Ergebnissen zufolge führt die Überexpression von APP nach Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltods in PC12 Zellen.

Um die möglichen transkriptionelle Regulation dieses durch APP modulierbaren Effekts näher zu untersuchen wurde eine parallele Analyse differentieller Genexpression von einer Vielzahl von Genen, basierend auf Oligonukleotid-Mikroarrays, in den APP überexprimierenden PC12 Zellen durchgeführt. Die GeneChip[®] Analyse zeigte, dass die Expression vieler UPR-Zielgene nach induzierter Inhibition der Ca^{2+} -ATPase mittels Thapsigargin sowohl in der PC12 Kontrollzelllinie als auch in der APP überexprimierenden Zelllinie signifikant hochreguliert waren.

Gene identity	accession	vector	APP
sgk-1	L01624	13.9	27.9
NIPK	H31287	9.9	13.0
CHOP	U30186	8.6	12.1
BiP	S63521	9.9	8.0
NGFI-B	U17254	4.9	6.1
Erp70	M86870	5.3	4.6
grp94	S69316	4.3	4.0
Dnajb9	AI011998	3.7	3.7
grp58	AA892637	4.0	3.7
Nupr1	AF006617	3.3	3.7
lfrd1	AI014163	3.7	3.5
ORP150	AI009098	3.0	3.5
Txndc7	AA892532	3.3	3.5
calnexin	AI010725	3.3	3.3
calreticulin	X53363	4.0	3.0
Sel1L	AA859897	4.0	2.8
PHAS-I	U05014	3.5	2.5
P4HB	M21476	3.0	1.9

Tabelle 2: Teilergebnis der GeneChip[®] Analyse Thapsigargin-behandelter PC12 Zellen mit und ohne APP Überexpression.

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vector) wurden mit 0,3 μM Thapsigargin oder DMSO (Kontrolle) für 8 h behandelt. Daraufhin wurde die cRNA hergestellt und mit Rat-U34A Microarrays (Affymetrix) hybridisiert. Anschließend wurden die relativen mRNA Mengen mit dem Affymetrix Microarray Suite 5.0 Programm (MAS 5.0) quantifiziert. Die Gene, die eine differentielle Expression in den beiden Zelllinien (PC12 vector und APP) aufwiesen, wurden mit der x-fachen Induktion gegenüber der Kontrolle (PC12 vector DMSO) angegeben (Die Daten wurden von Dr. Donat Kögel zur Verfügung gestellt, (Copanaki et al. 2007)).

Zu den untersuchten Genen gehören unter anderem auch ER-lokalisierte molekulare Chaperone. Diese Proteine sind in der Lage sich vorübergehend an falsch gefaltete Zwischenprodukte zu binden und dadurch eine falsche Faltung, Aggregation und vorzeitige Assemblierung zu verhindern (Ellis and Hemmingsen 1989). Zu den auf differentielle

Genregulation untersuchten Proteine gehörten unter anderem die Gene *BIP/Grp78* („Immunoglobulin binding protein“/ „78 kDa glucose-regulated protein“), *Grp94* („94 kDa glucose-regulated protein“), *Calnexin* und *Calreticulin*. Diese Gene zeigten allerdings im Vergleich zur Kontrollzelllinie nur eine vergleichbar hohe Induktion nach Ca^{2+} -Freisetzung. Ein deutlicher Unterschied in der Genexpression war hingegen in den Genen *Sgk1* (*serum/glucocorticoid-regulated kinase1*), die auf Stress-Stimuli reagierende proapoptotische Kinase *NIPK* (*Neuronal cell death-inducible putative kinase*) und der proapoptotische Transkriptionsfaktor *CHOP* (*C/EBP homologous protein*) zu sehen. Die APP überexprimierenden PC12 Zellen zeigten hier eine stärkere Induktion als die mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen (Tabelle 2).

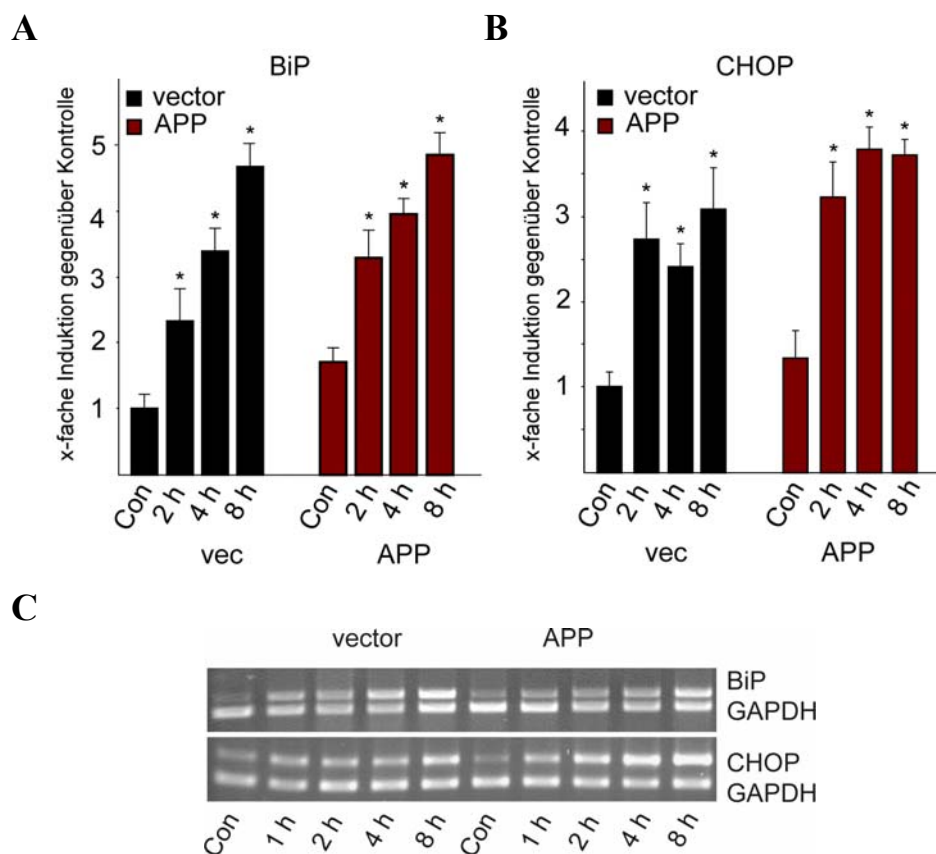


Abbildung 5: APP induzierte Hochregulation von CHOP nach Ca^{2+} -Freisetzung

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vector) wurden für die quantitative Analyse der BiP/Grp78 und CHOP Expression mittels RT-PCR, für 2 h, 4 h und 8 h mit $0,3 \mu\text{M}$ Thapsigargin bzw. für 8 h mit dem Lösungsmittel (Con, DMSO) behandelt. Nach der Behandlung wurde die die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression der Gene untersucht. Der Nachweis von GAPDH diente als interne Kontrolle. (B,C) Die Bandenintensität wurde mit dem OneDScan Programm analysiert und im Vergleich zur GAPDH Kontrolle normiert. Angegeben ist die x-fache Induktion gegenüber der Kontrolle (PC12 vector, Con). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten ($n = 4$). * $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (PC12 vector, Con)

Zusätzlich zu der Microarray GeneChip-Analyse wurden die Ergebnisse der Regulation von *BiP* und *CHOP* mittels einer weiteren Methode verifiziert. Hierfür wurden die APP überexprimierenden PC12 Zellen und Kontrollzellen für 1 h, 2 h und 4 h mit 0,3 μM Thapsigargin behandelt. Die Expressionsänderung wurde anschließend mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Sowohl die Kinetik als die Steigerung der BiP-Expression war in Zellen mit APP Überexpression und Kontrollzellen vergleichbar hoch (Abbildung 5 A, C). Das Ergebnis der GeneChip Analyse für *CHOP* konnte ebenfalls mit der RT-PCR bestätigt werden. Die Kinetik zeigte eine deutliche, durch APP-modulierte erhöhte CHOP Induktion nach Thapsigargin Behandlung (Abbildung 5 A, C).

3.1.2 Die Komplexierung von intrazellulärem Calcium durch den Chelator BAPTA-AM hebt die APP-abhängige Potenzierung der CHOP-Expression und der Apoptose auf

In den vorangegangenen Versuchen konnte bisher gezeigt werden, dass die Überexpression von APP in PC12 Zellen zu einer vermehrter Apoptose nach Ca^{2+} -Freisetzung führt und dass der Transkriptionsfaktor CHOP in diesen Zellen stärker exprimiert wird als in den Kontrollzellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CHOP nicht nur durch die UPR aktiviert werden kann (Marciniak et al. 2004), sondern auch Ca^{2+} -Freisetzung unabhängig durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol (Bartlett et al. 1992). Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Effekt ein Chelator von zytosolischem Ca^{2+} auf die durch Thapsigargin-induzierte CHOP Proteinexpression und auf die Apoptose hat. BAPTA [1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetraaceticacid-tetra (acetoxymethyl) ester] ist ein Chelator, der in der Lage ist zytosolisches Calcium zu komplexieren. Da der Chelator aufgrund seiner Ladung die Zellmembran nicht passieren kann wird er als inaktiver Acetoxymethylester (AM) (Abbildung 6) in die Zelle transportiert. Als Ester kann BAPTA-AM in die Zelle transportiert werden und wird anschließend im Zytosol durch zelleigene Enzyme gespalten und somit aktiviert.

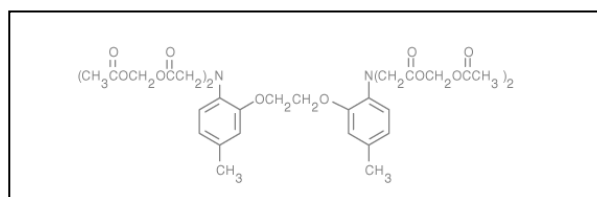


Abbildung 6: Strukturformel von 5,5'-dimethyl BAPTA

Hierzu wurde in den PC12 Zellen APPwt und PC12 vector in An- oder Abwesenheit von BAPTA-AM mit Thapsigargin Apoptose induziert. Den Kontrollen wurde die entsprechende Menge an Lösungsmittel (DMSO) hinzugefügt. Die Western-Blot-Analyse zeigte wie erwartet eine im Vergleich zur Kontrolle höhere CHOP Proteinexpression in den APP überexprimierenden Zellen nach Thapsigargin induzierter Inhibition der Ca^{2+} -ATPasen (Abbildung 7 A). Die Inkubation mit BAPTA-AM und Thapsigargin bewirkte in den PC12 APPwt Zellen eine deutlich verringerte CHOP Proteinexpression, wohingegen der Effekt von BAPTA-AM in den PC12 vector Zellen schwächer war.

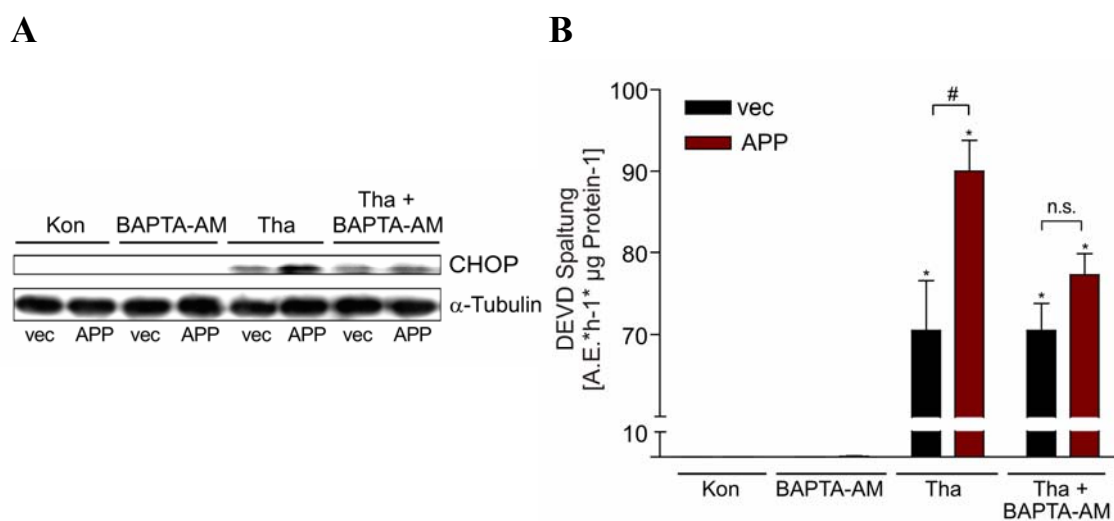


Abbildung 7: Die Komplexierung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen durch den Chelator BAPTA-AM wirkt dem potenzierenden Effekt von APP auf die CHOP Expression und dem Zelltod entgegen.

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vec) wurden mit 1 μM Thapsigargin mit und ohne 1 μM BAPTA-AM für 12 h behandelt. Die Kontrollen wurden mit den entsprechenden Mengen Lösungsmittel (DMSO) mit und ohne 1 μM BAPTA-AM für 12 h behandelt. (A) Die CHOP Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. α -Tubulin diente hier als Ladekontrolle. (B) Die Caspase-3 Aktivität wurde im Caspase-Assay untersucht. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten ($n = 4$). * $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber unbehandelter Kontrolle (PC12 vector). # $p < 0,05$ signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen. n.s.: nicht signifikant.

Zusätzlich zur Analyse der Proteinexpression wurde eine Zelltod-Analyse mittels der Caspase-3-Aktivitätsmessung (DEVD-Spaltung) durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen erhöhter APP-vermittelter Apoptose und erhöhtem zytosolischem Ca^{2+} -Gehalt herzustellen. Dabei zeigte sich, dass die Apoptose nach der Komplexierung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen mittels BAPTA-AM in den Thapsigargin behandelten PC12 vector und APPwt Zellen keinen signifikanten Unterschied aufwies (Abbildung 7 B).

3.1.3 Die RNA Interferenz gegen CHOP unterbindet den potenzierenden Effekt auf die Apoptose nach Ca^{2+} -Freisetzung in den APPwt Zellen

Um nun die funktionelle Relevanz von CHOP für die aufgezeigten Effekte in den APP überexprimierenden PC12 Zellen näher zu untersuchen, sollte nun ein Knockdown von CHOP mittels RNA Interferenz (RNAi) etabliert werden. Die Transfektionseffizienz wurde mittels einer Transfektion mit einer FAMTM-markierten Kontroll-siRNA optisch über die Fluoreszenz (Emission λ 518 nm) in den beiden Zelllinien, PC12 vector und APPwt, kontrolliert. Die Transfektionseffizienz betrug ca. 60 % und konnte auch durch eine Erhöhung der siRNA Konzentration nicht verbessert werden, da diese toxische Wirkung auf die PC12 Zellen hatte. Für das Experiment wurden die Zelllinien PC12 vector und APPwt zunächst mit doppelsträngiger siRNA („*small interfering RNA*“)-Oligonukleotiden gegen CHOP bzw. der nicht-genspezifischen siRNA transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die PC12 Zellen für 12 h mit Thapsigargin behandelt und somit die CHOP Expression in den Zellen induziert. Die Western-Blot-Analyse zeigte sowohl in den APP überexprimierenden als auch in den PC12 vector Zellen bereits nach 12 h eine im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten PC12 Zellen, eine stark verminderte CHOP Expression (Abbildung 8 A).

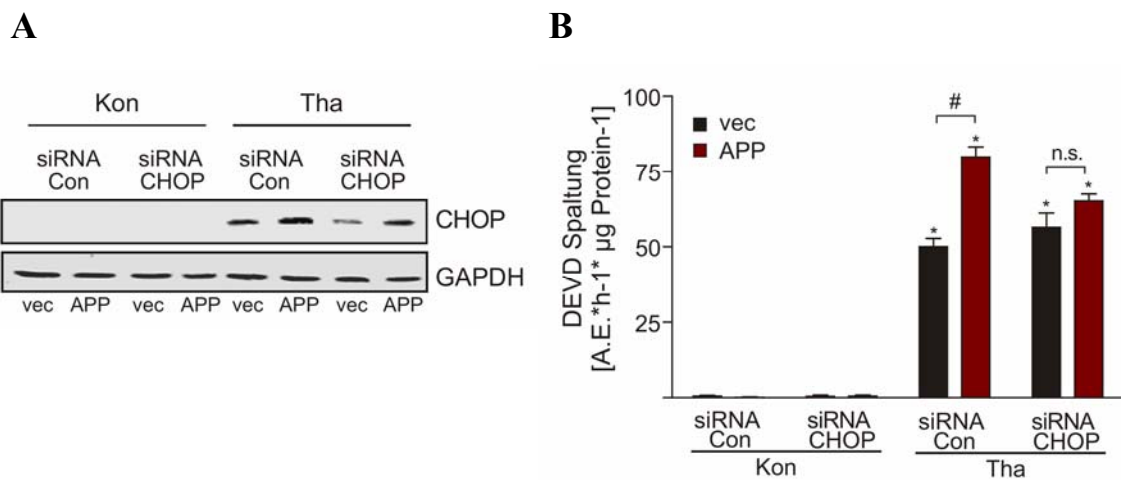


Abbildung 8: Die RNA Interferenz gegen CHOP hebt die potenzierenden Wirkung von APP auf den durch Ca^{2+} -Freisetzung vermittelten Zelltod auf

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vec) wurden mit 30nM siRNA gegen CHOP (siRNA CHOP) oder Kontroll-siRNA (siRNA Con) transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 12 h mit 1 μM Thapsigargin (Tha) oder Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. (A) Die CHOP Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. GAPDH diente hier als Ladekontrolle. (B) Die Caspase-3 Aktivität wurde im Caspase-Assay (siehe Methoden) untersucht und mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber unbehandelter Kontrolle (PC12 vector). # p < 0,05 signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen. n.s.: nicht signifikant.

Parallel zu der Analyse der CHOP Proteinexpression nach RNAi wurde eine Caspase-3 Aktivitätsmessung (DEVD-Spaltung) durchgeführt, um den Effekt der verminderten CHOP Expression auf die APP überexprimierenden Zellen zu analysieren (Abbildung 8 A). Auch hier zeigte sich, dass durch CHOP RNAi eine starke Abnahme der durch Thapsigargin-induzierten Apoptose in den APP überexprimierenden Zellen erzielt werden kann. Nach Einsatz von RNAi lässt sich kein signifikanter Unterschied der Caspase-3 Aktivität in den Zelllinien PC12 vector und APPwt feststellen.

3.1.4 Die Inhibition Speicher-aktivierter Ca^{2+} -Kanäle (SOCC's) führt zu einer Verminderung der erhöhten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und zur verminderten Apoptose nach Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung in APP-überexprimierende PC12 Zellen

Wie bereits erwähnt konnte in vorangegangenen Experimenten für APP überexprimierende PC12 Zellen, eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-induziertem Ca^{2+} -Freisetzung gemessen werden (Copanaki et al. 2007). Dies könnte einerseits daran liegen, dass in PC12 APPwt Zellen eine bereits im unbehandelten Zustand höhere Konzentration an Ca^{2+} -Ionen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums vorliegt und es somit nach Inhibition von SERCA zu einer erhöhten Ausschüttung an Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ins Zytosol kommt (siehe Schema, Abbildung 32). Andererseits ist bekannt, dass die Ausschüttung von Calcium aus dem ER einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom hervorruft. Dieser Einstrom erfolgt über die Aktivierung von Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanälen (SOCC's; store operated calcium channels). Aus diesem Grund wurde als nächstes eine durch APP Überexpression mögliche Beeinflussung bzw. Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms über die SOCC's untersucht. Hierzu wurden zwei SOCC-Inhibitoren, 1- $\{\beta\}$ -[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl}-1H-imidazole (SK&F96365) und 2-Aminoethoxydiphenylboran (2-APB) verwendet.

Um eine unspezifische Inhibition anderer Kanäle zu verhindern, wurden die Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt (Merritt et al. 1990; Bootman et al. 2002). Die Calcium-Imaging Messungen wurden mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffs Fura-2 durchgeführt (siehe Material und Methoden). Für die Messung wurden die PC12 vector und APPwt Zellen zunächst für 30 min mit dem Farbstoff beladen und anschließend jeweils in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren SK&F96365 und 2-APB mit 1 μM Thapsigargin stimuliert.

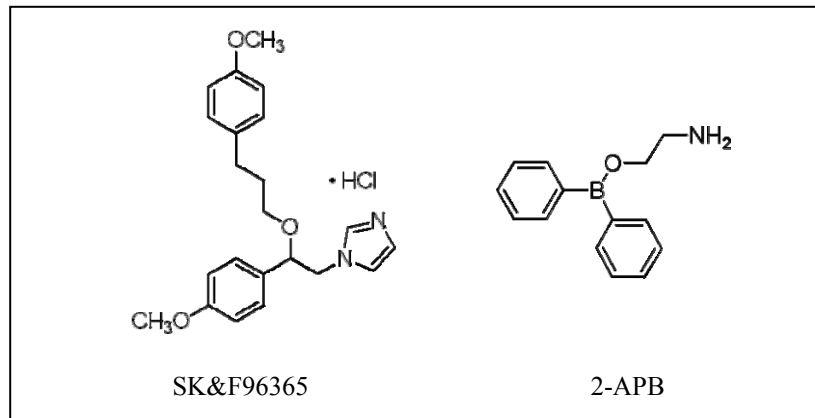


Abbildung 9: Strukturformel von SK&F96365 (links) und 2-APB (rechts)

Die Präinkubation der Inhibitoren vor der Stimulation mit Thapsigargin betrug 2 min. Die Fura-2 Messung bestätigte nochmals eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den APP überexprimierenden Zellen (Abbildung 10 A, B, C). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die SOC-Inhibitoren in der Lage waren das Ca^{2+} -Signal sowohl in den PC12 vector als auch in den APPwt Zellen deutlich zu vermindern. Dieser Effekt war in den APP überexprimierenden Zellen sogar stärker ausgeprägt als in PC12 vector Zellen, so dass die Signalstärke in beiden Zelllinien nach der Inkubation mit den SOC-Inhibitoren nun vergleichbar hoch war. Dies deutet darauf hin, dass die gemessene erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in den APP überexprimierenden PC12 Zellen tatsächlich auf die Verstärkung durch Speicher-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen ist. Um den Einfluss der SOCC-Inhibitoren auf die durch Thapsigargin ausgelöste Apoptose zu untersuchen, wurde eine Caspase-3-Aktivitätsmessung (DEVD-Spaltung) durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Zelllinien PC12 vector und APPwt für 12 Stunden in An- oder Abwesenheit der SOC-Inhibitoren SK&F96365 und 2-APB mit $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin inkubiert (Abbildung 11).

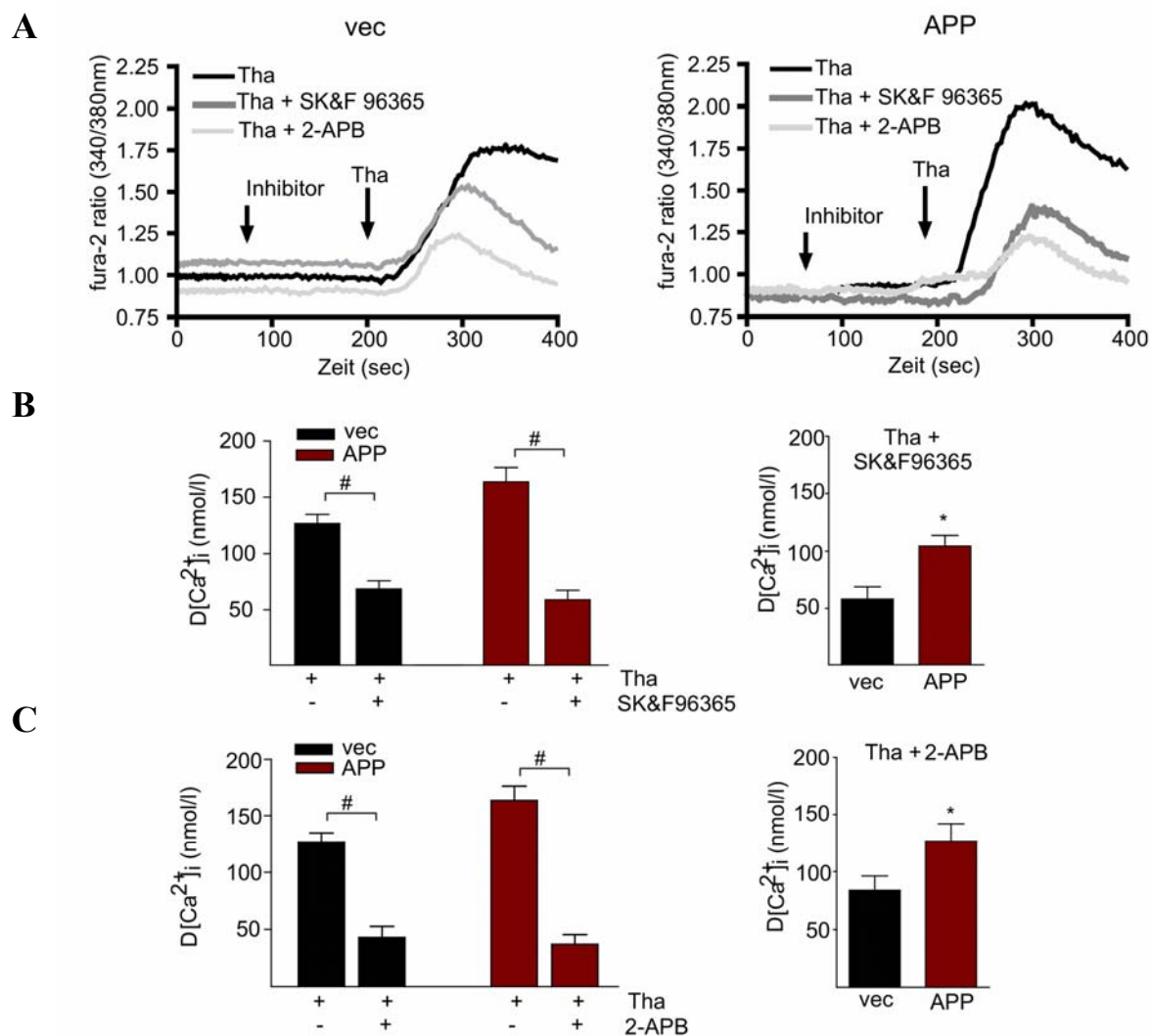


Abbildung 10: Die Überexpression von APP erhöht den SOCC-abhängigen Calcium-Einstrom nach Thapsigargin-Behandlung

(A) PC12 vector (vec) und APPwt (APP) Zellen wurden für 30 min mit Fura-2/AM beladen und anschließend mit 1 μ M Thapsigargin stimuliert (schwarz). Die SOCC-Inhibitoren SK&F96365 (dunkelgrau) und 2-APB (hellgrau) wurden 120 sec vor der Stimulation mit Thapsigargin der Messung appliziert. (B und C) Quantitative Auswertung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach Thapsigargin mit und ohne SK&F96365 (B, links) bzw. 2-APB (C, links). Die Änderungen der Ca²⁺-Konzentrationen wurden für jede Messung in Relation zum jeweiligen Anfangssignals gesetzt und sind in nmol/L angegeben. # $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber der PC12 vector oder APPwt Kontrolle ohne Inhibitor. (B und C, rechts) Die angegebenen Werte entsprechen der Differenz zwischen Thapsigargin mit und ohne SK&F96365 (B) bzw. mit und ohne 2-APB (C). * $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollzelllinie PC12 vector (gemessen von Dr. Kristina Leuner, Pharmakologisches Institut Naturwissenschaftler, Frankfurt).

Der Caspase-Assay zeigte in den PC12 Zellen mit APP Überexpression eine signifikante Verminderung der Apoptoserate nach der Behandlung mit Thapsigargin und den jeweiligen SOC-Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Thapsigargin behandelt wurde. Eine zusätzliche Präinkubation mit BAPTA-AM, SOC-Inhibitoren und Thapsigargin für 30 min zeigte die höchste Abnahme der Apoptoserate. Man kann also davon ausgehen, dass die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und

der extrazelluläre Einstrom über die aktivierten SOCCs synergetisch auf die Apoptoserate nach Thapsigargin-induziertem Zelltod wirken und sie somit erhöhen. In der Kontrollzelllinie PC12 vector konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

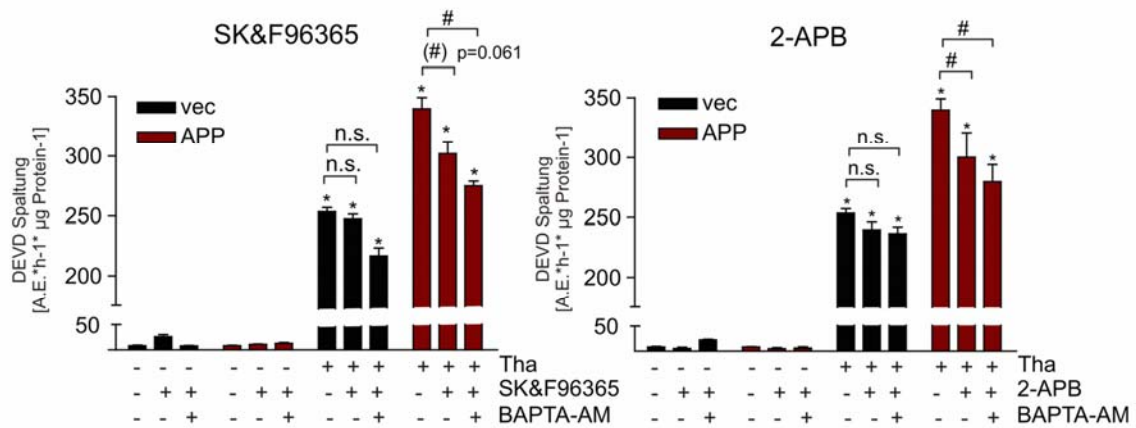


Abbildung 11: Synergetische Effekte von BAPTA-AM und SOCC-Inhibitoren in APP-überexprimierenden PC12 Zellen

APP überexprimierende PC12 Zellen (APP) und Kontrollzellen (vec) wurden mit 5 μM BAPTA-AM oder dem Lösungsmittel (DMSO) vorbehandelt und anschließend mit 1 μM Thapsigargin (Tha) oder Lösungsmittel (DMSO, Kon) für 12 h in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren SK&F96365 (10 μM) bzw. 2-APB (10 μM) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität wurde im Caspase-Assay untersucht und mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ aus separaten Experimenten ($n = 4$). * $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber unbehandelter Kontrolle (PC12 vector). # $p < 0,05$ signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen. n.s.: nicht signifikant.

3.2 Die Rolle des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) und seines Metabolismus bei der Neuroprotektion

Die biologischen Effekte von APP sind vielschichtig und hängen vom jeweiligen Kontext und APP-Metabolismus ab. Die proteolytische Prozessierung von APP lässt sich in zwei Wege unterteilen, deren Produkte sich in ihrer Funktion unterscheiden: Neuroprotektion oder Neurotoxizität (siehe Abbildung 2). Der größte Anteil von APP wird durch die α -Sekretase an der Zelloberfläche gespalten und führt zur Sekretion des neuroprotektiven sAPP α (Barger and Mattson 1996; Thornton et al. 2006). In zweiten Weg wird APP durch die β - und γ -Sekretase gespalten und führt zur Bildung des neurotoxischen A β -Protein, dem Hauptbestandteil der sogenannten Alzheimer Plaques (Hardy and Selkoe 2002; LaFerla et al. 2007). In PC12 Zellen konnte bereits eine Protektion vor Apoptose durch APP Überexpression nach ER-Stress, ausgelöst durch Tunicamycin (N-verknüpften Glykosylierung von Proteinen im ER Lumen) und DNA-Schädigung nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden (Kogel et al. 2003; Kogel et al. 2005).

In den bisher gezeigten Experimenten wurde an Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) überexprimierenden Zellen gezeigt, dass zelluläres nicht freigesetztes APP einen negativen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase ausübt und somit die durch Ca²⁺-Freisetzung ausgelöste Apoptose in diesen Zellen fördert. In den folgenden Experimenten soll nun die neuroprotektive Wirkung von APP bzw. einem seiner Spaltprodukte, sAPP α , näher untersucht werden. sAPP α entsteht durch die Spaltung des integralen Membranproteins durch die α -Sekretase-Aktivität an der Zelloberfläche (siehe Einleitung) und wird dann von der Zelle extrazellulär abgegeben (Guo et al. 1998). In Ergänzung zu der Ca²⁺-Freisetzung, sollten zusätzliche Stress-Stimuli, die mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht wurden eingesetzt werden (proteosomaler Stress, DNA-Schädigung und Hypoxie).

3.2.1 Analyse der sAPP α Expressionslevel in APP überexprimierenden PC12 Zellen

Für den Nachweis der sAPP α -Proteinexpression in den PC12 APPwt Zellen wurde über drei Tage hinweg täglich das konditionierte Medium gesammelt und das Protein mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 12 A). Der Antikörper detektiert hierbei spezifisch das sezernierte sAPP α - und nicht das sAPP β -Fragment (Furukawa et al. 1996),

welchem keine protektiven Eigenschaften zugeschrieben werden. Als Kontrolle diente hierbei konditioniertes Medium der Kontrollzelllinie PC12 vector. Die optische und quantitative Auswertung der Western-Blot-Analyse ergab eine Steigerung der sAPP α -Expression 72 h nach der Aussaat. Dieses Ergebnis konnte durch einen für das sAPP α -Protein spezifische ELISA bestätigt werden (Abbildung 12 B). Da der hier angewendete Antikörper gegen das humane sAPP α (2B3) eine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies, unter anderem Ratte, aufweisen könnte, wurde hier jeweils die Differenz zwischen mit APP transfizierten und untransfizierten PC12 Zellen angegeben. Drei Tage nach der Aussaat konnte hierbei eine sAPP α -Proteinexpression von ca. 3 ng/ml gemessen werden. Um eine entsprechend hohe extrazelluläre sAPP α -Konzentration für die folgenden Versuche zu gewährleisten, wurden die APP überexprimierenden Zellen erst drei Tage nach der Aussaat unter Zugabe des Stress-Stimulus behandelt. Im Gegensatz zu dem unter Abschnitt 3.1 beschriebenen Experiment, wurde das konditionierte Medium mit dem sezernierten sAPP α auch während der Behandlung auf den Zellen belassen.

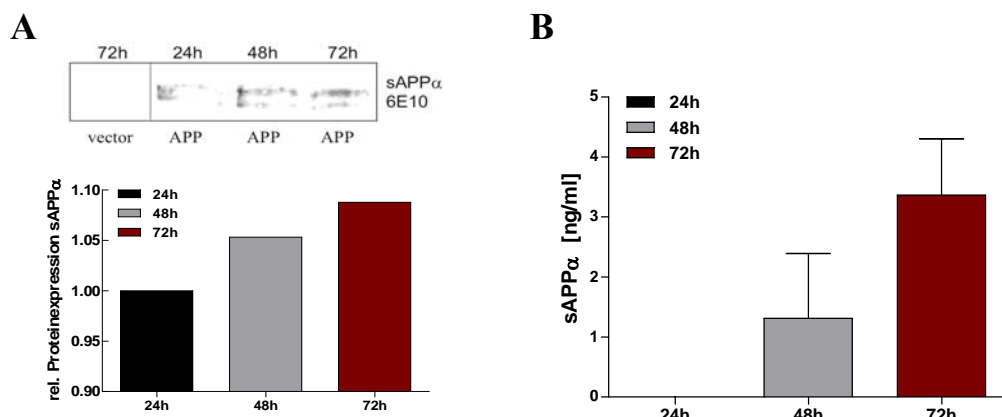


Abbildung 12: sAPP α Proteinexpression in APP-überexprimierenden Zellen

In APP überexprimierenden PC12 Zellen (APP) und der Kontrollzelllinie (vector) wurde jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h der Zellkulturüberstand gesammelt. Die sAPP α Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die Membran wurde mit dem Antikörper 6E10 gegen sAPP α inkubiert. Die quantitative Auswertung des Western-Blots wurde mit der Software Odyssey 2.1 durchgeführt. (B) Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Differenz aus PC12 APPwt und PC12 vector. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 2).

3.2.2 Neuroprotektion in APP überexprimierenden PC12 Zellen

Die APP überexprimierenden PC12 Zellen und die Kontrollzellen wurden mit den toxischen Stress-Stimuli Thapsigargin und Epoxomicin behandelt (Abbildung 13). Epoxomicin ist ein Proteasom-Inhibitor, der die proteolytisch aktiven Zentren des

20S-Proteasomens irreversibel inhibiert (Meng et al. 1999). Beide Inhibitoren können durch die Aktivierung von Effektor Caspasen Apoptose in den Zellen auslösen.

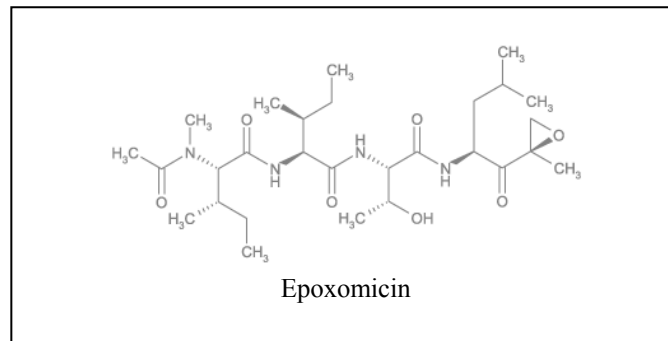


Abbildung 13: Strukturformel von Epoxomicin

Nach Induktion der Apoptose sowie der Behandlung mit den Inhibitoren für 16 h wurde für die Analyse des Zelltods eine Caspase-3 Aktivitätsmessung (DEVD-Spaltung) durchgeführt. Die APP-überexprimierenden PC12 Zellen zeigten sowohl nach der Ca^{2+} -Freisetzung als auch nach Inhibition des Proteasoms eine signifikant geringere Caspase-Aktivität im Vergleich zu den Leervektor transfizierten PC12 Zellen (Abbildung 14).

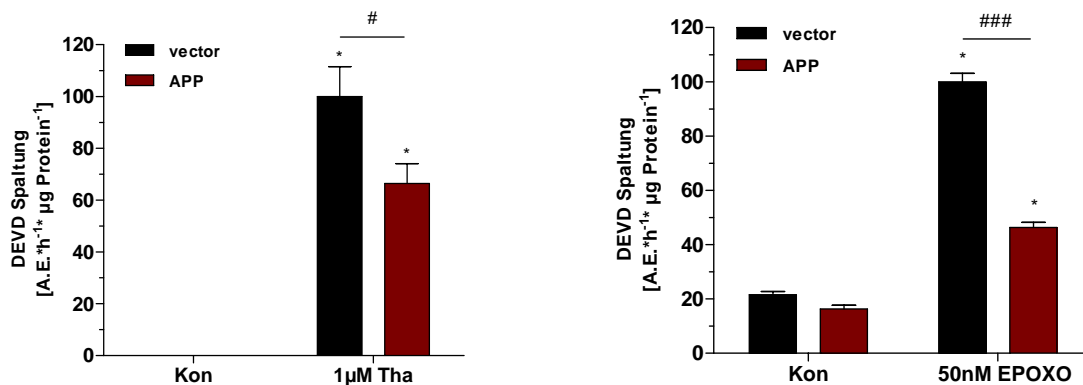


Abbildung 14: APP schützt PC12 Zellen vor der Thapsigargin- und Epoxomicin-induzierten Apoptose

PC12 vector (vector) und APPwt (APP) Zellen wurden mit 1 μM Thapsigargin (1 μM Tha, links) und 50 nM Epoxomicin (50 nM Epoxo, rechts) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) für 16 h behandelt. Die PC12 APP Zellen zeigten im Caspase-Assay eine signifikante Protektion gegenüber den Kontrollzellen sowohl nach Stimulation mit Thapsigargin als auch nach Epoxomicin. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte ±SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (PC12 vector, DMSO). # p < 0,05, ### p < 0,001: signifikanter Unterschied gegenüber behandelte(r) Kontrolle (PC12 vector).

Eine Regulation der Genexpression und des Stress-responsiven JNK-Signalwegs durch APP Überexpression konnte bereits gezeigt werden (Kogel et al. 2005). Die UV-induzierte Aktivierung des Apoptosesignalwegs zeigte eine deutlich verringerte Phosphorylierung von JNK1/JNK2 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Aus diesem Grund wurde nun untersucht, in wie weit APP Überexpression die JNK-Aktivierung nach Epoxomicin Proteasominhibition moduliert kann.

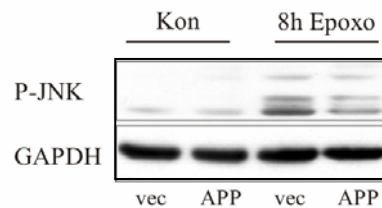


Abbildung 15: Phosphorylierung von JNK1/JNK2 in APP überexprimierenden PC12 Zellen nach Induktion von proteosomalem Stress

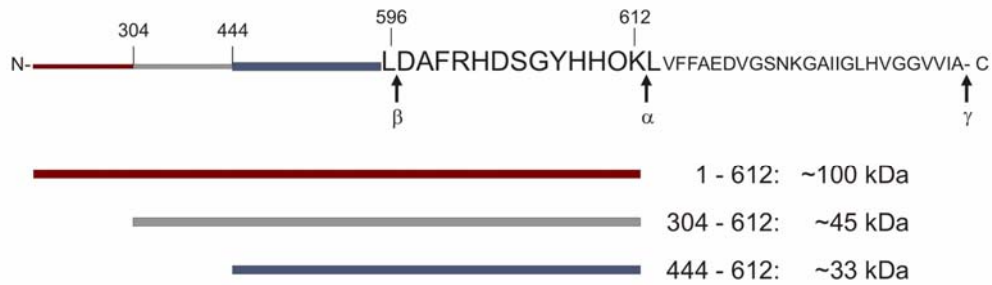
PC12 APPwt (APP) Zellen und die Kontrollzellen (vector) wurden für 8 h mit 50 nM Epoxomicin (Epoxo), oder mit dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und durch Western-Blot-Analyse mit dem anti-ACTIVE[®] JNK Antiserum analysiert. GAPDH diente hier als Ladekontrolle.

Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die Phosphorylierung von JNK nach der Epoxomicin-Behandlung deutlich niedriger war als in den Kontrollzellen (Abbildung 15). Auch hier findet also eine Protektion vor Apoptose bzw. partieller Inhibition des JNK-Signalwegs durch APP Überexpression statt.

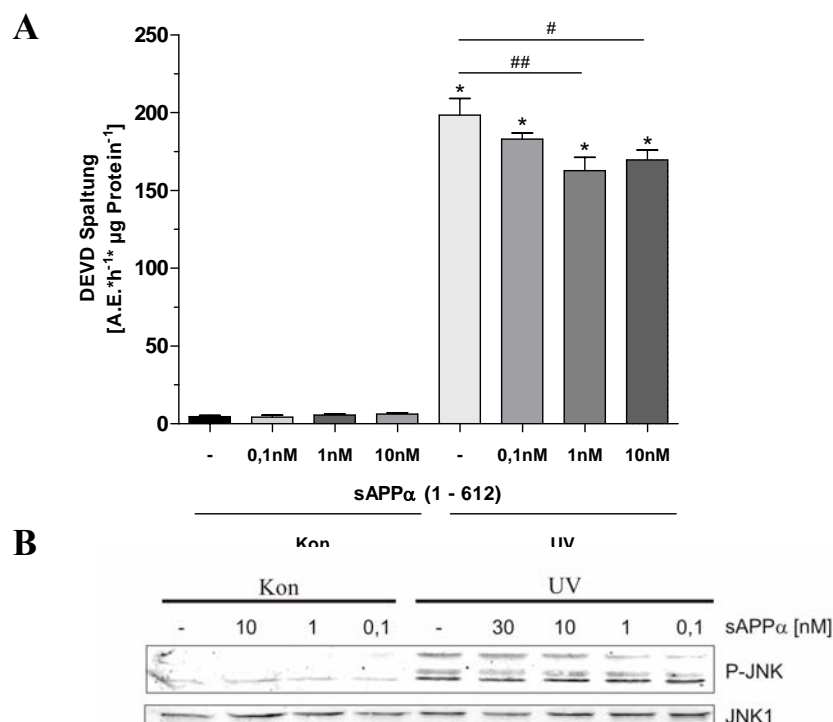
3.2.3 Neuroprotektion durch exogenes rekombinantes sAPP α in PC12 Zellen

Die bisher erhobenen Daten belegen, dass APP Überexpression unter bestimmten Voraussetzungen PC12 Zellen vor zytotoxischem Stress potent schützen kann und dass dieser Schutz mit einer verminderten Aktivierung von JNK1/JNK2 einhergeht.

Die APP-Überexpression in PC12 Zellen verändert das Expressionsmuster vieler Gene (Kogel et al. 2003), so dass die Schutzfunktion von sAPP α nicht eindeutig belegt werden konnte. Um den Einfluss von sAPP α direkt zu untersuchen, wurden nun naive PC12 Zellen mit aufgereinigtem rekombinantem sAPP α behandelt. Für die Experimente wurden zum einen das sAPP α in voller Länge (Aminosäuresequenz 1 – 612, (Thornton et al. 2006) eingesetzt und zum anderen zwei Teilfragmente des sAPP α , mit den Aminosäureausschnitten 304 - 612 und 444 - 612 (Sigma, Deisenhofen; Abbildung 16).

Abbildung 16: Übersicht über die rekombinanten sAPP α Protein-Fragmente

Sowohl für das sAPP α Protein in voller Länge als auch für die beiden Fragmente konnte bereits eine neuroprotektive Wirkung gezeigt werden (Furukawa et al. 1996; Mattson 1997). Das rekombinante sAPP α wurde in *E. coli* exprimiert, anschließend isoliert und aufgereinigt. Literaturangaben zufolge sollte das sAPP α -Protein 16 - 24 h vor der Behandlung mit den Stress-Induktoren auf die Zellen gegeben werden.

Abbildung 17: Präinkubation von PC12 Zellen mit rekombinanten sAPP α (1 - 612) schützt PC12 Zellen vor der vor UV-induzierter Apoptose

PC12 Zellen wurden für 16 h in An- oder Abwesenheit von rekombinatem sAPP α (1 - 612) mit den angegebenen Konzentrationen präinkubiert und wurden anschließend mit UV bestrahlt. (A) 16 h nach der Behandlung wurde die Caspase-3 Aktivität mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 3). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05 und ## p < 0,01: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle ohne sAPP α . (B) Für die Analyse der Phosphorylierung von JNK wurden die Zellen 4 h nach der Behandlung lysiert. Die Western-Blot-Analyse wurde mit dem anti-ACTIVE[®] JNK Antiserum durchgeführt. JNK1 diente hier als Ladekontrolle.

Diese Präinkubation mit dem rekombinanten sAPP α , in einer Konzentration von 0,1 nM - 10 nM, ist notwendig, um eine signifikante Protektion gegen toxische Einwirkungen auf die Zellen zu beobachten (Mattson et al. 1993; Goodman and Mattson 1994). Um den Einfluss von sAPP α auf das Zellüberleben nach Stress-Induktion zu beobachten, wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an sAPP α (1 - 612, 304 - 612 und 444 - 612) für 16 h präinkubiert, anschließend mit UV bestrahlt und 16 h nach der UV Behandlung lysiert (Kogel et al. 2005).

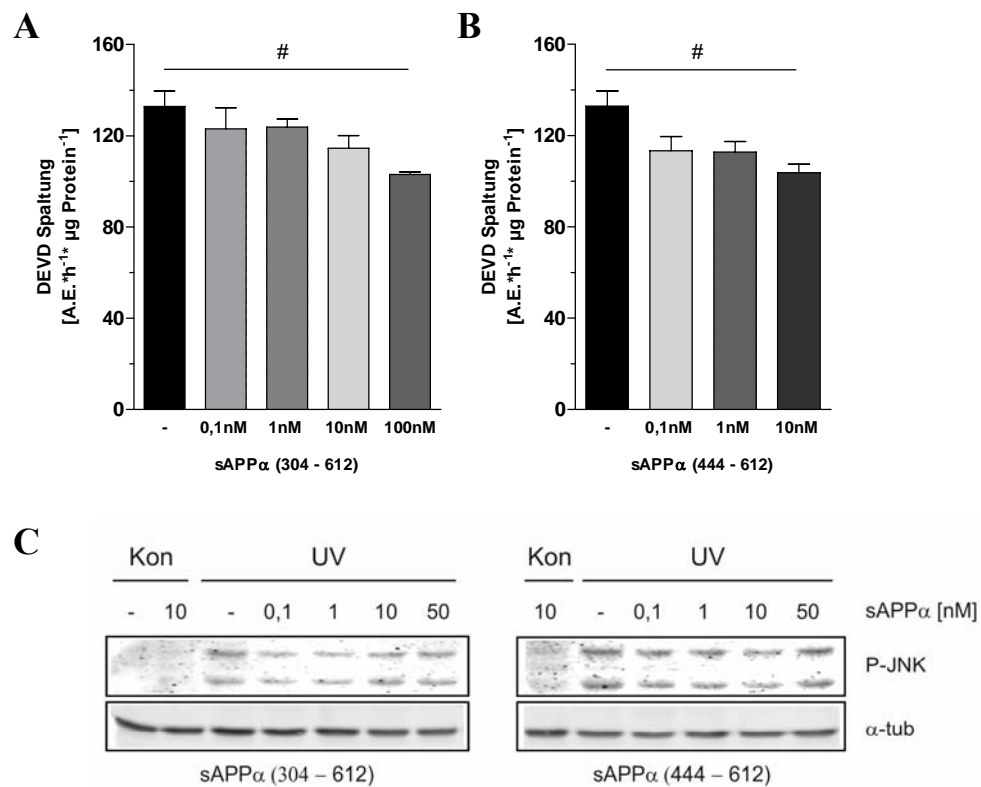


Abbildung 18: Präinkubation von PC12 Zellen mit rekombinanten sAPP α -Fragmenten schützt PC12 Zellen vor der vor UV-induzierter Apoptose

PC12 Zellen wurden für 16 h in An- oder Abwesenheit von rekombinanten sAPP α (444 - 612, links) und sAPP α (304 - 612, rechts), mit den angegebenen Konzentrationen präinkubiert und wurden dann mit UV bestrahlt. (A, B) 16 h nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Zelltodanalyse durchgeführt. Die Caspase-3 Aktivität wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4 - 8). # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle ohne sAPP α (-). (C) Für die Analyse der Phosphorylierung von JNK wurden die Zellen 4 h nach der Behandlung lysiert. Die Western-Blot-Analyse wurde mit dem anti-ACTIVE[®] JNK Antiserum durchgeführt. α -tub diente hier als Ladekontrolle.

Die Zelltod-Analyse wurde über die Caspase-3-Aktivität (DEVD-Spaltung) durchgeführt und zeigte eine dosisabhängige- und vor allem geringere Aktivierung von Effektor-Caspsen in den sAPP α vorbehandelten Zellen. Sowohl das rekombinante sAPP α , in voller Länge (Abbildung 17 A), als auch die beiden rekombinanten sAPP α -Fragmente

(Abbildung 18 A und B) waren in der Lage naive PC12 Zellen vor UV-induziertem Zelltod dosisabhängig zu schützen. Die Analyse der JNK-Aktivierung über die Phosphorylierung zeigte, im Vergleich zur Kontrolle ohne sAPP α , eine geringere Phosphorylierung und somit eine geringere Aktivierung der JNK1/JNK2-Proteine. Dies konnte allerdings nur bei der Präinkubation von sAPP α in den niedrigen Konzentrationen, 0,1 nM - 10 nM, beobachtet werden (Abbildung 17 B und Abbildung 18 C). In den höheren Konzentrationen (30 nM - 50 nM) führt die Inkubation mit dem sAPP α -Proteinen wieder zur Erhöhung der JNK1/JNK2-Phosphorylierung. Insgesamt zeigen die hier eingesetzten rekombinanten sAPP α nur moderate Effekte auf den Zelltod und die durch Stress ausgelöste Aktivierung von JNK1/JNK2. So dass man davon ausgehen kann, dass das rekombinante Protein in höheren Konzentration toxisch auf die Zellen wirkt. Dies könnte zum Beispiel auf eine posttranslationale Modifikationen in *E. coli* (Faltung, Glykosylierung, etc.) oder einem mangelnden Reinheitsgrad der Proteine zurückzuführen sein. Somit würde ein höherer protektiver Effekt durch sAPP α bei der Zelltodanalyse verdeckt wird.

3.2.4 Neuroprotektion durch sAPP α aus konditioniertem Medium von APP-überexprimierenden HEK293 Zellen in PC12 Zellen

Die beiden bisher gezeigten Modellsysteme, APP Überexpression in PC12 Zellen und die Präinkubation mit aufgereinigtem rekombinantem sAPP α -Protein in PC12 Zellen, zeigten zwar einen protektiven Effekt vor Apoptose und eine partiell geringere Aktivierung von JNK1/JNK2. Jedoch zeigten auch beide Systeme, dass sie für die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung des sAPP α nicht optimal sind. Deswegen wurde nun versucht die protektive Wirkung des Proteins über die direkte Zugabe von, nicht heterolog exprimierten sAPP α aus konditioniertem Medium zu zeigen. Hierfür wurden HEK293 Zellen verwendet, in die bereits das humane Wildtyp APP695-Protein stabil transfiziert wurde. Das konditionierte Medium wurde anschließend auf die ausgesäten PC12 Zellen gegeben. Die Proteinexpressionslevel des intrazellulären als auch des sezernierten APPs wurde für die folgenden Versuche hinweg konstant über die Western-Blot-Analyse und über ELISA (IBL, America) kontrolliert (Abbildung 19). Die Proteinkonzentration von sAPP α bewegte sich in alle in der Folge durchgeführten Experimente zwischen 5 - 15 ng/ml (Abbildung 19 B).

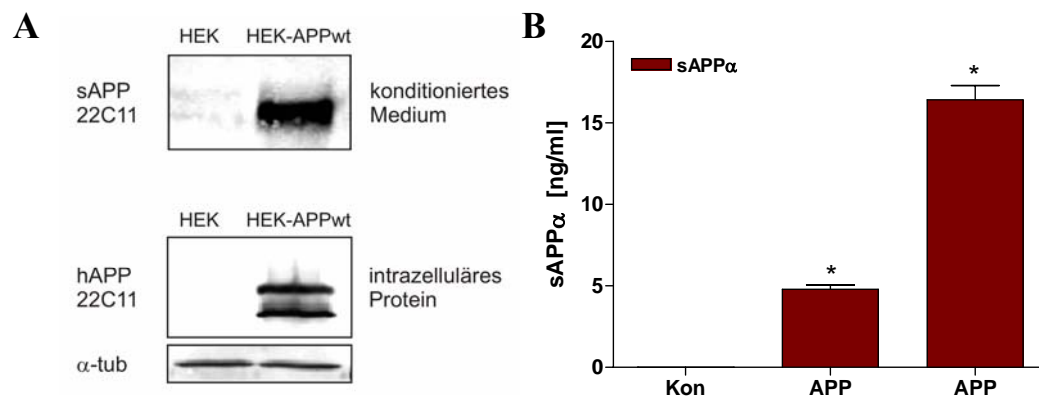


Abbildung 19: Proteinexpression in APP-überexprimierenden HEK293 Zellen.

Die Überexpression des humanen APP-Proteins in der verwendeten HEK293 Zelllinie (HEK-APPwt) wurde durch Western Blots (A) und ELISA (B) bestätigt. Die HEK Zellen wurden mit definierter Zellzahl ausgesät, 24 h im Inkubator gelassen und anschließend ein Mediumwechsel vorgenommen. 24 h nach dem Mediumwechsel wurden die Proteinexpression in den Zellen (A, oben) und in den Kulturüberständen (A, unten und B) untersucht. (B) Die Western-Blot-Analyse wurde mit dem Antikörper 22C11 (hAPP) durchgeführt. α -Tubulin (α -tub) diente hier als Ladekontrolle. (B) Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente. (A, B) Als Kontrolle dienten hier nicht transfizierte HEK293 Zellen (HEK, Kon)

Die sAPP α -vermittelte Neuroprotektion sollte zunächst wieder über UV-induzierte DNA-Schädigung etabliert werden. Zu diesem Zweck wurde der konditionierte Kulturüberstand der APP-überexprimierenden HEK293 (HEK APPwt) auf die PC12 Zellen gegeben und für 16 h präinkubiert. Es zeigte sich hierbei keinerlei signifikanten toxischen oder protektiven Effekte zu den Kontrollüberstände. Der Überstand wurde unverdünnt oder 1:1 mit frischem Medium versetzt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach der Präinkubation UV bestrahlt und nach 20 h lysiert. Im Vergleich zur Kontrolle, Überstand aus naiven HEK293 Zellen, zeigten mit sAPP α inkubierten Zellen nach UV-Bestrahlung eine deutlich geringere Aktivierung von Effektor-Caspasen (Abbildung 20). Den höchsten Schutz gegenüber UV-Stress-induziertem Zelltod zeigten die PC12 Zellen, die eine Mischung aus konditioniertem und frischem Medium (1:1), erhielten.

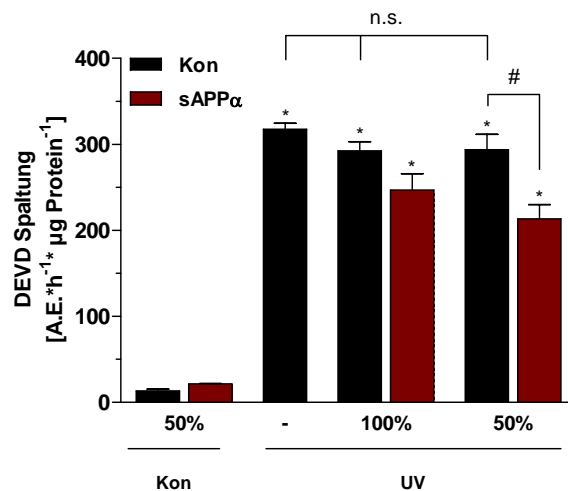


Abbildung 20: Sekretiertes rekombinantes sAPP α schützt PC12 Zellen vor der UV-induzierten Apoptose.

PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α), in den Konzentrationen 100 %, 50 % und 0 % (-) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon) für 16 h präinkubiert und UV bestrahlt. 20 h nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Caspase-3 Aktivität wurde gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (Kon). # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber UV-behandelter Kontrolle (-).

Für die weiteren Experimente wurde mit dieser Verdünnung des konditionierten Kulturüberstands weitergearbeitet. Wiederholungen dieses Versuchs zeigten, dass die Zellen mit Konzentration höher als 2,5 ng/ml (siehe oben) präinkubiert werden mussten, um eine Protektion in den sAPP α -präinkubierten Zellen zu zeigen. Dieses Ergebnis lässt sich mit den Ergebnissen der APP-überexprimierenden PC12 Zellen korrelieren (siehe Ergebnisse 3.2.1). Hier zeigte sich ebenfalls erst eine Protektion, wenn die sAPP α -Proteinkonzentration 2 -3 ng/ml (nach 72 h) überschritten hatte.

Als nächstes wurde die Protektion durch sAPP α nach Thapsigargin-induziertem Ca²⁺-Freisetzung und proteosomalem Stress untersucht. Dazu wurden wieder PC12 Zellen analog zum UV-induzierten Zelltod (siehe oben) für 20 h mit Thapsigargin und Epoxomicin behandelt. Die anschließende Messung der Effektor-Caspasen zeigte eine sAPP α -vermittelte signifikante Protektion gegenüber der Kontrolle (Abbildung 21).

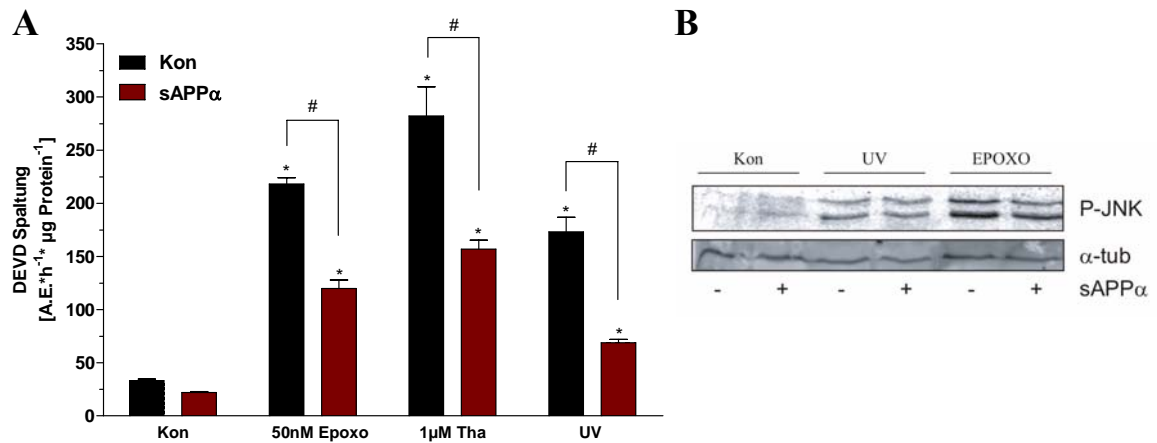


Abbildung 21: sAPP α schützt PC12 Zellen vor multiplen Stress-Stimuli

PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α , +) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon, -) für 16 h präinkubiert und dann mit 50 nM Epoxomicin (Epoxo), 1 μ M Thapsigargin (Tha) oder UV behandelt. (A) 20 h nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Caspase-3 Aktivität wurde gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4-8). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (Kon). # p < 0,001: signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen behandelten Kontrolle. (B) Für die Analyse der Phosphorylierung von JNK wurden die Zellen 3 h nach der UV- und 6 h nach der Epoxomicin-Behandlung lysiert. Die Western-Blot-Analyse wurde mit dem anti-ACTIVE[®] JNK Antiserum durchgeführt. α -Tub diente hier als Ladekontrolle.

Die Analyse der Aktivierung von JNK1/JNK2 zeigte nach UV Bestrahlung und proteosomaler Stress, im Vergleich zur Kontrolle ohne sAPP α , eine geringere Phosphorylierung von JNK1/JNK2. Wobei die sAPP α vermittelte Protektion der Western-Blot-Analyse zufolge, je nach Stimulus unterschiedlich stark ist. Dies lässt vermuten, dass die Protektion nicht nur über den JNK/c-Jun-Signalwegs vermittelt wird, sondern auch andere Signalwege hier eine Rolle spielen und zudem abhängig vom jeweiligen Stress-Stimulus ist.

3.2.5 sAPP α -vermittelter Schutz vor oxidativem Stress

Zusätzlich zu den bisher gezeigten Stress-Stimuli sollte nun oxidativer Stress in PC12 Zellen ausgelöst werden. Als oxidativer Stress wird das Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) bezeichnet. Die erhöhte Produktion von ROS wird unter anderen mit der Morbus Alzheimer Erkrankung aber auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Behl et al. 1994; Hensley et al. 1994; Tamagno et al. 2003).

Experimentell wurde der oxidative Stress hier durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) simuliert. Wasserstoffperoxid diffundiert dabei direkt durch die Zellmembran und wirkt über die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikal (OH^\cdot).

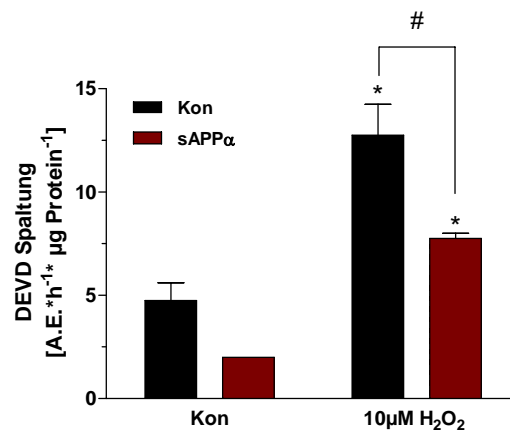


Abbildung 22: sAPP α vermittelte Protektion nach Induktion von oxidativem Stress

PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon) für 18 h präinkubiert und dann 10 μ M H_2O_2 behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurde die Caspase-3 Aktivität gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (Kon, DMSO). # p < 0,01: signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen behandelten Kontrolle (Kon, H_2O_2).

Für diesen Versuch wurden PC12 Zellen wie zuvor sAPP α aus konditioniertem Medium HEK-APPwt präinkubiert und anschließend mit H_2O_2 behandelt. Als Nachweis für die Induktion von Apoptose wurde anschließend die Caspase-3 Aktivität gemessen (Abbildung 22). Die PC12 Zellen mit sAPP α wiesen hierbei eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringere Caspasen-Aktivität nach der Wasserstoffperoxid-Behandlung auf. Der Zelltod-Analyse zeigte also, dass eine Präinkubation mit sAPP α signifikant vor oxidativem Stress schützen kann.

3.2.6 APP- und sAPP α -modulierte Apoptose nach chronischer Hypoxie

Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) gilt als Risikofaktor für Morbus Alzheimer. Hypoxie ist ein wichtiger pathophysiologischer Stress-Stimulus der Alzheimer Erkrankung, den man in Gehirngewebe von an Alzheimer erkrankten Patienten wiederfindet. Um den Schutz von exogen hinzugefügtem sAPP α in den PC12 Zellen zu untersuchen wurden die Zellen für 24 h chronischer Hypoxie (0 % Sauerstoff) ausgesetzt und auf ihren Zelltod untersucht (Abbildung 23 A). Unter Hypoxie zeigten die sAPP α -vorbehandelten PC12 Zellen eine im Vergleich zu Kontrolle geringere Effektor-Caspasen Aktivität. Zusätzlich wurden APP-überexprimierende PC12 Zellen und die mit dem Leervektor transfizierten PC12 Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und ebenfalls auf ihre Caspase-3 Aktivität hin untersucht (Abbildung 23 B). Die PC12 Zellen mit APP Überexpression wiesen eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich höhere Apoptose auf.

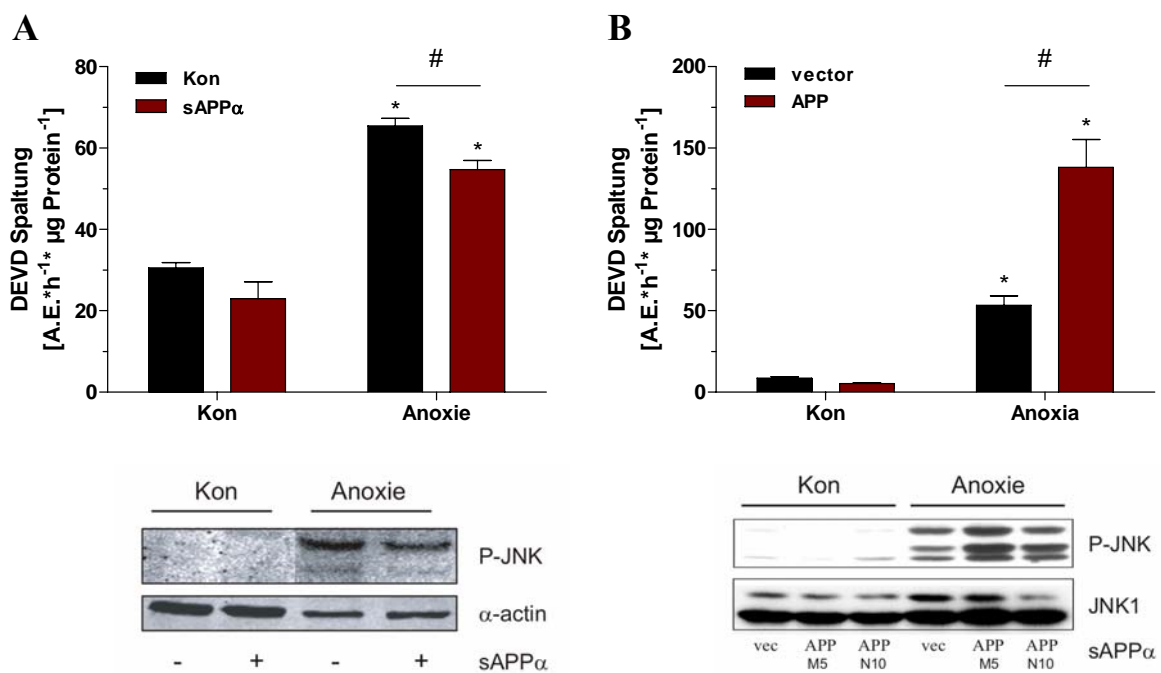


Abbildung 23: Einfluss von exogenem und stabil exprimierten sAPP α und APPwt auf die Hypoxie-induzierte Apoptose in PC12 Zellen

(A) PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon) für 16 h präinkubiert und dann für 24 h unter Hypoxie gesetzt oder bei Normoxie weiter inkubiert. (B) PC12 APPwt (APP) Zellen und die Kontrollzellen (vector, vec) wurden für 48 h unter anoxischen bzw. normoxischen Bedingungen kultiviert (A/B oben). Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4 - 12). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber behandelter Kontrolle. (A/B, unten). Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und durch Western-Blot-Analyse mit dem anti-ACTIVE[®] JNK Antiserum analysiert. JNK1 bzw. α -Aktin (α -actin) dienten hier als Ladekontrolle.

Die Western-Blot-Analyse der Stress-induzierten JNK-Aktivierung nach Hypoxie zeigte, dass die Präinkubation mit dem rekombinanten sAPP α -Protein für 18 h ausreichend ist, um die Phosphorylierung von JNK deutlich zu reduzieren (Abbildung 23 A, unten). Die APP-überexprimierenden Zellen zeigten hingegen einen gegenteiligen Effekt. Die Phosphorylierung von JNK1/JNK2 war hier im Vergleich zur Kontrolle in beiden APPwt Klonen unter anoxischen Bedingungen stark erhöht (Abbildung 23 B, unten). Es konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass sowohl bei Patienten als auch in Tiermodellen nach induzierter Ischämie erhöhte APP- und A β -Proteinlevel vorliegen (Yokota et al. 1996; Jendroska et al. 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass die sAPP α Proteinlevel in SH-SY5Y und PC12 Zellen nach chronischer Hypoxie stark reduziert sind (Webster et al. 2002).

3.2.7 Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125 auf den sAPP α -vermittelten Schutz vor der Stress-induzierter Apoptose

Die bisher durchgeführten Versuche und Ergebnisse zeigten, dass sAPP α in der Lage ist die Aktivität von JNK zu modulieren. Deswegen sollte nun die Rolle des JNK/c-Jun Signalwegs und dessen Regulation durch sAPP α bei Thapsigargin induzierter Ca²⁺-Freisetzung und nach Epoxomicin induziertem proteosomalen Stress untersucht werden. Eine Beteiligung dieses Signalwegs wurde durch den Einsatz des JNK/SAPK Inhibitor-II (SP600125) untersucht. SP600125, ein Anthrapyrazolon-Derivat, ist ein selektiver Inhibitor von JNK (Bennett et al. 2001). In Zellkulturmodellen hemmt er dosisabhängig die Phosphorylierung von c-Jun. In den ersten Experimenten zeigte sich, dass PC12 Zellen sehr empfindlich auf diesen Inhibitor reagieren und dieser selbst in niedriger Konzentration über andere Signalwege, toxisch auf die Zellen wirkt (Daten nicht gezeigt). Die PC12 Zellen wurden analog zu den vorangegangenen Experimenten mit oder ohne sAPP α für 18 h präinkubiert. Die Zugabe des Inhibitors oder dem Lösungsmittel erfolgte 1 h vor Ablauf dieser Inkubationsdauer. Anschließend wurden die PC12 mit den angegebenen Stress-Stimuli für 20 h behandelt und die Caspase-3 Aktivität im Caspase-Assay gemessen. Interessanterweise konnte lediglich in den Thapsigargin-behandelten Zellen der sAPP α -vermittelte Schutz aufgehoben werden (Abbildung 24).

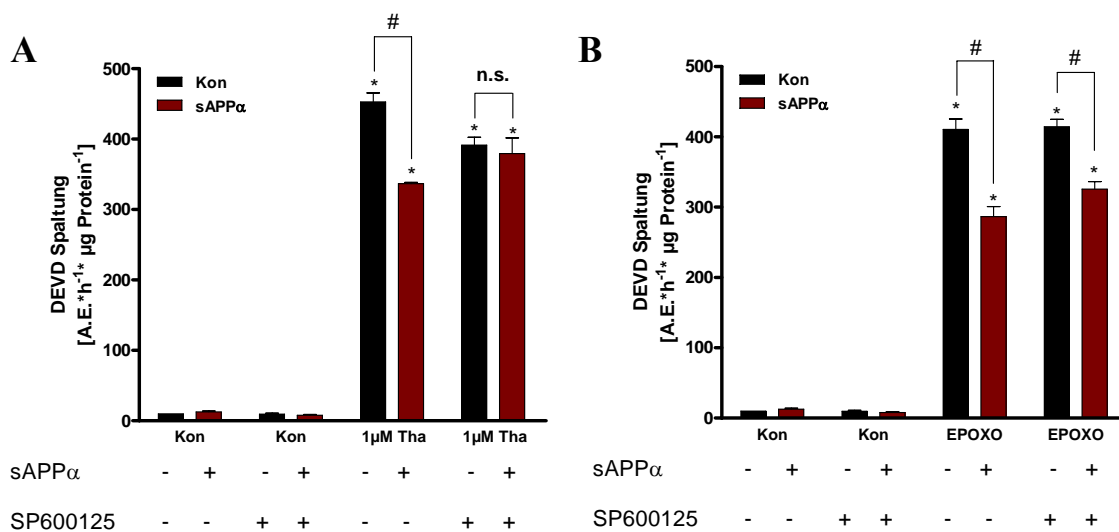


Abbildung 24: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die sAPP α -vermittelte Protektion nach Ca²⁺-Freisetzung und Proteasominhibition

PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon) für 17 h präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 nM SP600125 für 1 h oder dem Lösungsmittel (DMSO). Dann wurden die Zellen für 20 h mit 1 μ M Thapsigargin (Tha, links), 50 nM Epoxomicin (Epoxo, rechts) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 2 - 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber behandelter Kontrolle.

Für die Epoxomicin-behandelten Zellen konnte dies nicht gezeigt werden. Durch Inhibition der Phosphorylierung von JNK nach Thapsigargin-induzierten Zelltod konnte die Apoptoserate in der Kontrolle signifikant reduziert werden. Dies gilt jedoch nicht für die sAPP α präinkubierten Zellen. Die Ergebnisse sprechen also dafür, dass ein Teil der sAPP α -vermittelten Protektion über die Inhibition der Stress-induzierten Aktivierung des JNK/c-Jun Signalwegs läuft und je nach Stress-Stimulus unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

3.2.8 Effekt des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 auf die APP-vermittelte Protektion nach zytotoxischem Stress

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das humane Wildtyp APP den anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalweg aktivieren kann (Burton et al. 2002). Dieser wiederum ist in der Lage, den JNK-Signalweg über die Phosphorylierung von MLK3 (eng. Mixed lineage kinase 3) zu inhibieren (Barthwal et al. 2003).

Dies führt zur Hypothese, dass die sAPP α -vermittelte Protektion über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg führt (siehe Schema, Abbildung 34). Um die Beteiligung dieses

Signalwegs bei der APP-vermittelten Protektion zu überprüfen, wurde der zellpermeable Inhibitor LY294002 (Abbildung 25 B) eingesetzt (Vlahos et al. 1994). Dieser hemmt spezifisch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase), welche an die aktive Seite der katalytischen Untereinheit bindet und die Kinase-Aktivität hemmen kann. Im Experiment wurde den PC12 Zellen 2 h vor Ende Beendigung der Präinkubation mit sAPP α der PI3K-Inhibitor hinzugefügt. Die Zellen wurden dann mit den Stress-Stimuli Thapsigargin, UV-Strahlung und Epoxomicin, behandelt und auf die Aktivität ihrer Effektor-Caspasen untersucht (Abbildung 25 A, C, D).

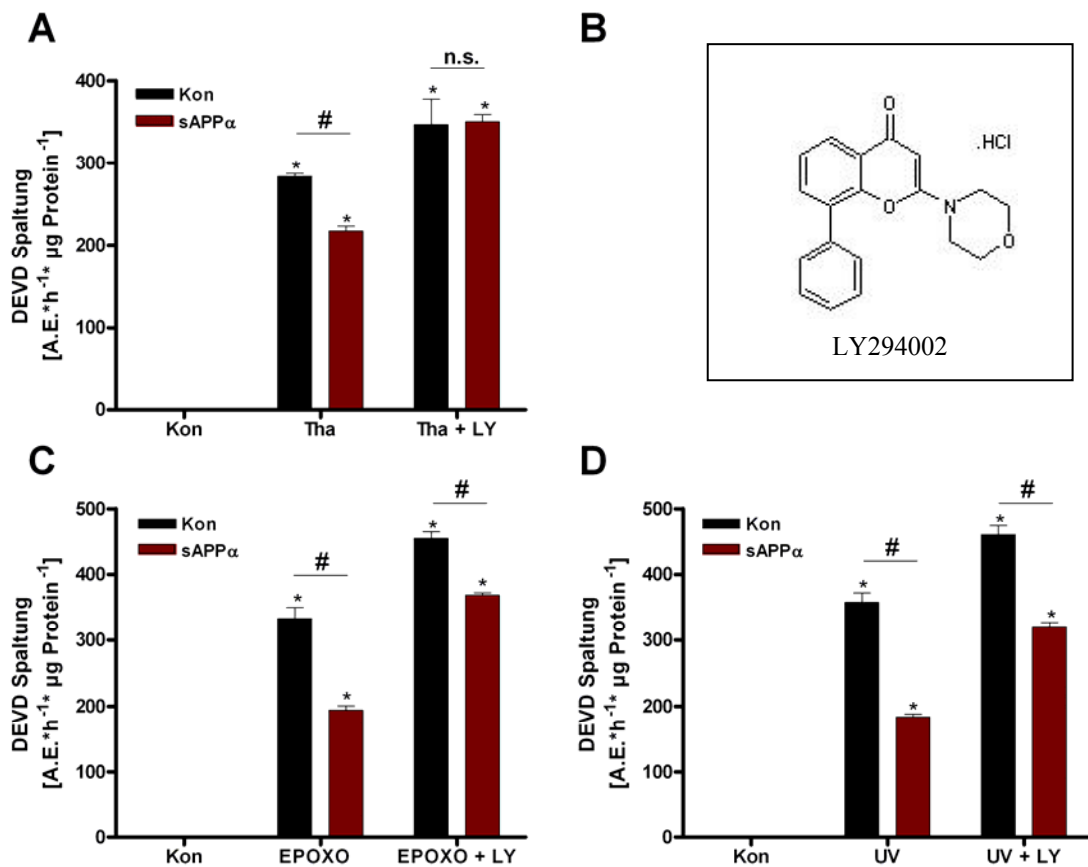


Abbildung 25: Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die sAPP α vermittelte Protektion nach Induktion von apoptotischem Stress in PC12 Zellen

(A, C, D) PC12 Zellen wurden mit den Kulturüberständen von HEK293-APPwt Zellen (— sAPP α) oder HEK293 Kontrollzellen (— Kon) für 16 h präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μ M LY294002 (LY) für 2 h oder dem Lösungsmittel (DMSO). (C) Dann wurden die Zellen für 20 h mit 1 μ M Thapsigargin (Tha, links), 50 nM Epoxomicin (Epoxo, rechts) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die PC12 Zellen wurden 20 h nach der UV-Strahlung lysiert. (D) Die Caspase-3 Aktivität der zytosolischen Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 3 - 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. (B) Strukturformel von LY294002

Die Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor zeigte, dass in den Thapsigargin behandelten Zellen die Caspase-3 Aktivität sowohl in den sAPP α -präinkubierten Zellen als auch in der Kontrolle zunimmt. Diese Zunahme ist im Verhältnis zur Kontrolle stärker als in den PC12 Zellen mit sAPP α , so dass in beiden Ansätzen ein vergleichbar hohes Niveau erreicht werden konnte und keine signifikante Protektion mehr vorlag. Die Schutzfunktion nimmt in den Epoxomicin behandelten und UV bestrahlten Zellen weniger stark ab. Die Protektion in den PC12 Zellen mit sAPP α beträgt nach proteosomalem Stress und DNA-Schädigung in etwa 30 - 50 % und kann durch den LY294002 Inhibitor um ca. 40 - 55 % partiell reduziert werden.

3.3 Erhöhung der sAPP α -Sekretion mittels pharmakologisch aktiver Substanzen

In den bisher gezeigten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe von sAPP α und die Überexpression von APP in PC12 Zellen eine Protektion vor Ca²⁺-Freisetzung, Proteasominhibition und DNA-Schäden bewirkt. Zu diesem Zweck sollten verschiedene pharmakologische Substanzen im Bezug auf ihre Wirkung auf den APP- Metabolismus und im Hinblick auf Neuroprotektion untersucht werden. Ziel dieser Versuche war die sAPP α -Sekretion über pharmakologische Substanzen zu steigern, um einen potenten Schutz gegenüber zytotoxischer Stress-Stimuli zu erreichen.

3.3.1 Protektive Effekte von Simvastatin auf in PC12 Zellen und SH-SY5Y Zellen nach Ca²⁺-Freisetzung und proteosomalen Stress

In diversen Studien konnte belegt werden, dass ein erhöhter Cholesterinspiegel die Entstehung der Alzheimer-Krankheit begünstigt (Simons et al. 2002; Kirsch et al. 2003). An dem Transport von Cholesterin ist das Apo E4 Protein beteiligt. Das ApoE ϵ 4 Allel des Apolipoprotein E Gens ist ein bereits identifizierter Risikofaktor Morbus Alzheimer und erhöht das Risiko an Alzheimer zu erkranken.

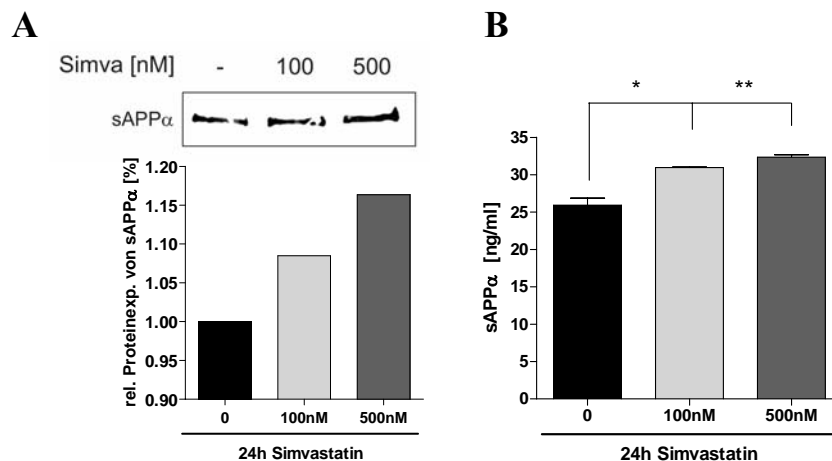


Abbildung 26: Simvastatin moduliert die sAPP α Proteinexpression in HEK293 APPwt Zellen

APP überexprimierende HEK293 Zellen wurden mit 100 nM, 500 nM Simvastatin oder dem Lösungsmittel (Ethanol) für 24 h behandelt. Danach wurden jeweils die Zellkulturüberstände gesammelt. (A) Die sAPP α Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper 6E10 gegen sAPP α inkubiert (oben). Die quantitative Auswertung des Western-Blots wurde mit der Odyssey 2.1 Software durchgeführt (unten). (B) Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 2).

Die Einnahme von Statinen konnte in einigen epidemiologische Studien zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit an Morbus Alzheimer zu erkranken, sinkt. Als Statine werden Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase bezeichnet und werden als Cholesterin-senkendes Mittel eingesetzt und sind in der Lage die Membranfluidität zu beeinflussen.

Zudem konnte eine Statin-vermittelte gesteigerte Bildung von sAPP α und zugleich verminderte A β Produktion in neuronalen und peripheren Zellen nachgewiesen werden (Fassbender et al. 2001; Kojro et al. 2001; Johnson-Anuna et al. 2007). Der Effekt von Simvastatin auf die sAPP α Sekretion in APP überexprimierenden HEK293 Zellen wurde zunächst über die Western-Blot-Analyse und dann über ELISA (IBL, America) untersucht (Abbildung 26 A, B).

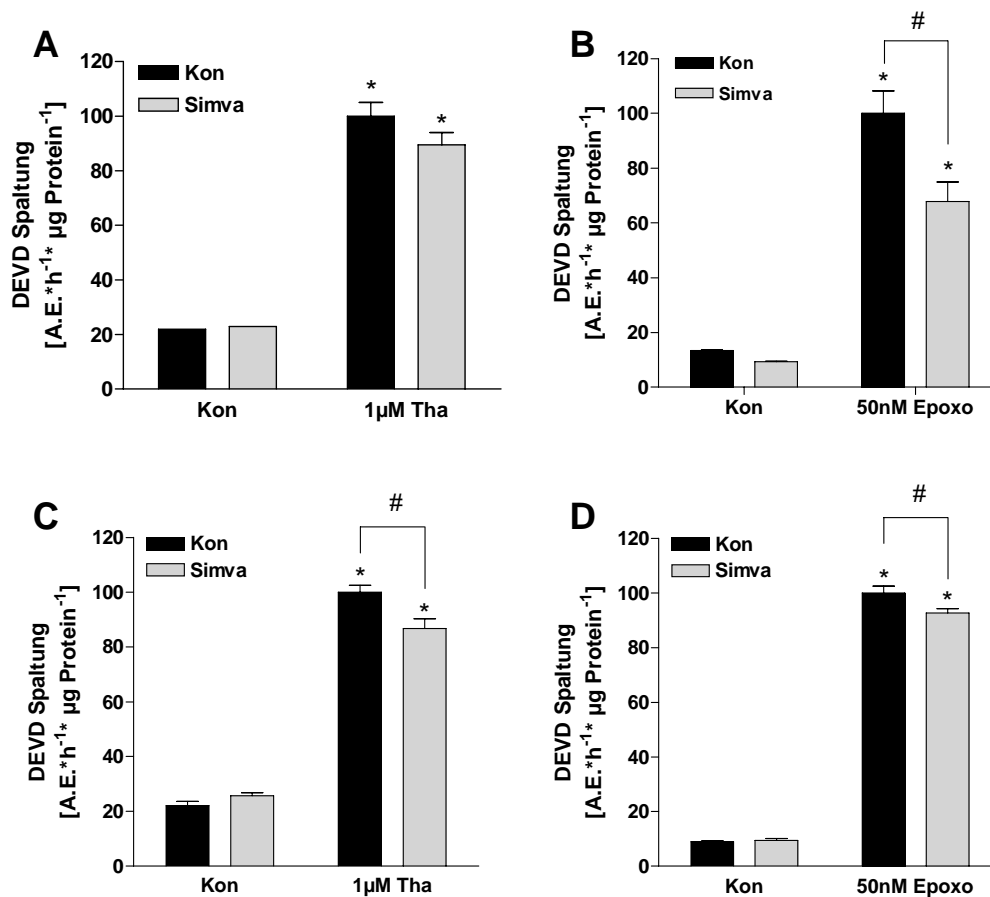


Abbildung 27: Moderate Effekte von Simvastatin auf die Apoptosesensitivität

PC12 Zellen (A, B) und SH-SY5Y Zellen (C, D) wurden mit 100 nM Simvastatin oder dem Lösungsmittel (Ethanol) für 6 Tage präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit 1 μ M Thapsigargin (Tha), 50 nM Epoxomicin (Epoxo) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 2 - 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen.

Die Western-Blot-Analyse zeigte nach 24 h Inkubation mit 100 nM und 500 nM eine dosisabhängige Steigerung der APP α Sekretion. Dieser Effekt konnte auch mit bei der quantitativen Auswertung des ELISAs bestätigt werden. Die Behandlung mit 500 nM Simvastatin wies eine im Vergleich zur Kontrolle um etwa 25 % gesteigerte sAPP α -Sekretion auf (Abbildung 26 B). Für die Zelltodanalyse wurden naive PC12 und SH-SY5Y Zellen für sechs Tage mit 100 nM Simvastatin behandelt, wobei alle zwei Tage das Medium erneuert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Thapsigargin, Epoxomicin oder dem Lösungsmittel behandelt. Der Caspase-Assay zeigte sowohl für die PC12 Zellen (Abbildung 27A, B) als auch für die SH-SY5Y (Abbildung 27C, D) eine lediglich sehr geringfügige Protektion durch Inkubation mit Simvastatin nach Thapsigargin-induzierter Inhibition der Ca²⁺-ATPasen und Epoxomicin-induziertem Proteasom-Stress.

3.3.2 Einfluss von Galantamin auf die sAPP α -Freisetzung in PC12- und SH-SY5Y Zellen nach Ca²⁺-Freisetzung

Galantamin ist ein schwacher Acetylcholinesterase-Inhibitor, der zur Behandlung der Alzheimer'schen Demenz eingesetzt wird. Neben der schwachen ACh-Esterase-Hemmwirkung ist inzwischen auch bekannt, dass Galantamin auch ein wirksamer allosterisch potenzierender Ligand ist (Maelicke et al. 1995; Schrattenholz et al. 1996)

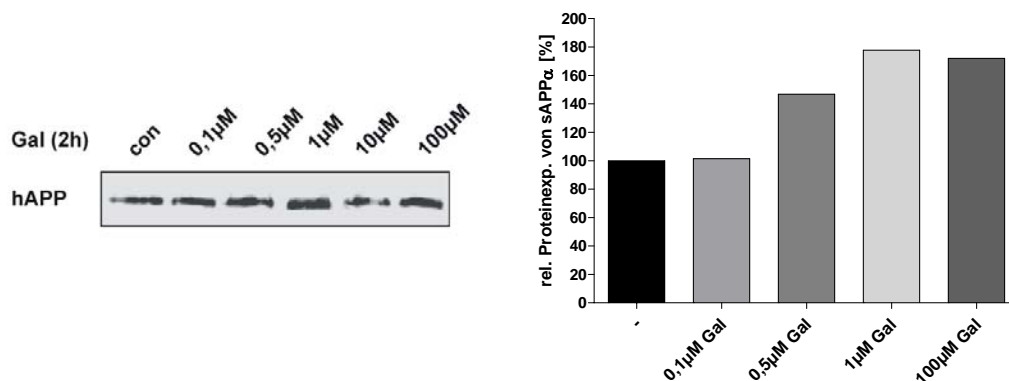


Abbildung 28: Einfluss von Galantamin auf die Sekretion von sAPP α

APP überexprimierende HEK293 Zellen (APP) wurden jeweils mit 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Galantamin oder Lösungsmittel (Wasser) für 2 h behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und der Nachweis der sAPP α Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse dargestellt. Die Membran wurde mit einem Antikörper 6E10 gegen sAPP α inkubiert. Die quantitative Auswertung des Western-Blots wurde mit der Odyssey 2.1 Software durchgeführt (Die Konzentration 10 μ M Galantamin war nicht auswertbar und wurde deshalb in der quantitativen Auswertung nicht berücksichtigt).

In einer Studie von Lenzken konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Galantamin in der Lage ist die Sekretion von sAPP α in differenzierten SH-SY5Y Zellen signifikant zu erhöhen (Lenzken et al. 2007).

Im folgenden Experiment wurden APP überexprimierende HEK293 Zellen auf ein mögliche Erhöhung der sAPP α Sekretion durch steigende Konzentration von Galantamin untersucht (Abbildung 28). Nach einer Inkubationsdauer von 2 h wurden die Zellkulturüberstände mittels Western-Blot-Analyse auf ihre sAPP α Proteinexpression untersucht. Anhand des Western-Blots konnte eine dosisabhängige Erhöhung der sAPP α Proteinkonzentration belegt werden. Als nächsten wurden naive und APP überexprimierende PC12 Zellen für 24 h mit Galantamin vorbehandelt. Anschließend wurde in den Zellen mittels Thapsigargin die Inhibition der Ca²⁺-ATPasen induziert und auf die Aktivität von Effektor-Caspasen untersucht (Abbildung 29 A, B). Hierbei zeigten sowohl die naiven als auch die APP-überexprimierenden PC12 Zellen eine dosisabhängige Protektion vor der Thapsigargin-induziertem Inhibition der Ca²⁺-ATPasen. Eine signifikante Protektion stellte sich in PC12 APPwt bereits bei niedrigeren Konzentrationen ein.

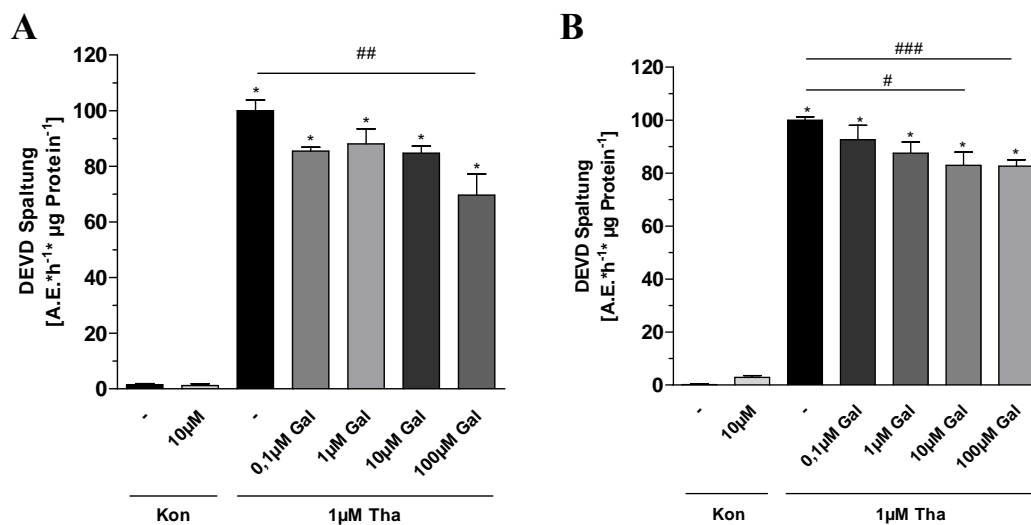


Abbildung 29: Neuroprotektive Wirkung von Galantamin auf naive und APP-überexprimierende PC12 Zellen nach Induktion von Ca²⁺-Freisetzung

Naive (A) und APP überexprimierende (B) PC12 Zellen wurden mit den angegebenen Galantamin Konzentrationen oder dem Lösungsmittel (Wasser) für 24 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit 1 µM Thapsigargin (Tha) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 µM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen. ### p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber behandelter Kontrolle (-).

Analog zu diesem Versuch wurden nun naive und APP überexprimierende SH-SY5Y Zellen mit Galantamin vorbehandelt und mit Thapsigargin Zelltod induziert (Abbildung 30). Die Analyse der Caspase-3 Aktivität zeigte in den naiven SH-SY5Y Zellen ähnlich wie in den naiven PC12 Zellen erst bei einer Inkubation mit 100 μM für 24 h einen signifikanten Schutz vor Apoptose. Die APP überexprimierenden SH-SY5Y Zellen zeigten hingegen schon bei einer Konzentration von 0,1 μM Galantamin eine signifikant niedrigere Apoptose.

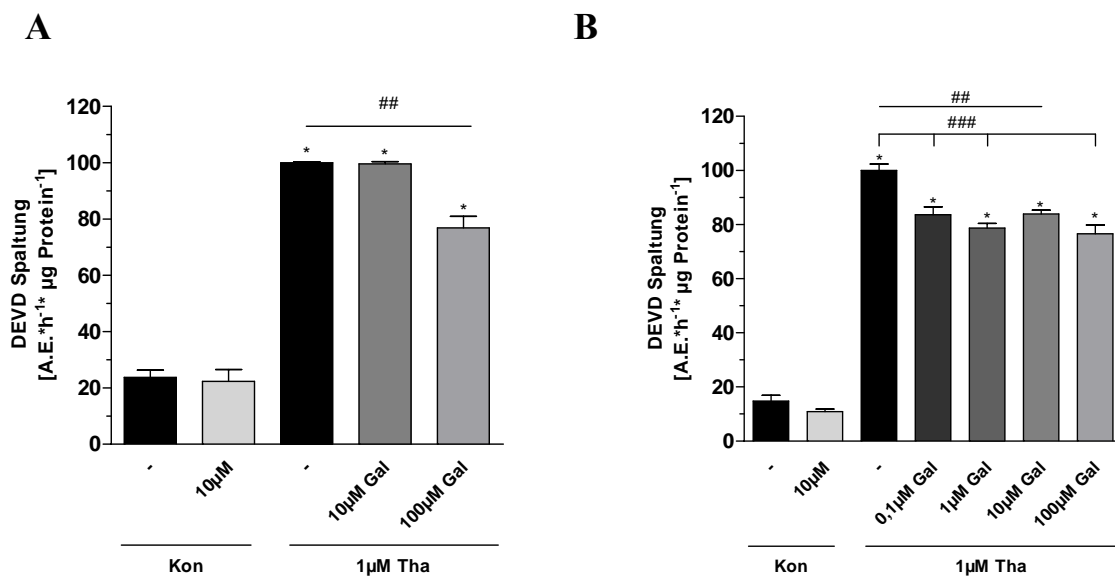


Abbildung 30: Neuroprotektive Wirkung von Galantamin auf SH-SY5Y und SH-SY5Y hAPP Zellen nach Induktion von Ca^{2+} -Freisetzung

Naive (links) und APP Überexprimierende (rechts) SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Galantamin Konzentrationen oder dem Lösungsmittel (Wasser) für 24 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit 1 μM Thapsigargin (Tha) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μM) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten ($n=4$). * $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # $p < 0,05$: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollzellen. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber behandelter Kontrolle (-).

Behandlung mit Galantamin war somit in allen vier Zelllinien die Zellen dosisabhängig vor Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung zu schützen. Wobei die Protektion in den Zellen mit APP Überexpression, im Vergleich zu den naiven Zellen, bereits bei niedrigeren Konzentrationen von Galantamin eintrat. Zudem konnte eine dosisabhängige Steigerung der sAPP α Konzentration im Überstand von APP überexprimierenden HEK293 nachgewiesen werden.

3.3.3 Effekte von Omega-3 Fettsäuren auf die Sensitivität von PC12 Zellen SH-SY5Y Zellen gegen zytotoxischen Stress

Omega-3-Fettsäuren sind ungesättigte Fettsäuren, die als essentielle Fettsäuren über die Ernährung aufgenommen werden müssen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Omega-3-Fettsäuren protektive Eigenschaften besitzen (Kromann and Green 1980; Hashimoto et al. 2002; Akbar et al. 2005). Zu diesen potentiell schützenden Fettsäuren gehören unter anderem die langkettige, ungesättigte Docosahexaensäure (DHA). Es wurde zudem eine funktionelle Verbindung zwischen dem APP Metabolismus und der Membranfluidität hergestellt (Calon et al. 2004; Akbar et al. 2005; Florent et al. 2006). Als potentiell Alzheimermedikament sollte nun auch eine mögliche neuroprotektive Wirkung von DHA in PC12 Zellen und SH-SY5Y Zellen, sowie APP überexprimierenden Klone dieser Zelllinien, nach der Einwirkung von Stress untersucht werden. Als Kontrolle wurde zum einen ein Kontroll-Liposom (Lipoid[®]S100, Phosphatidylcholin aus fettfreiem Sojalecithin) und die Docosasäure (Behensäure), eingesetzt. Als Behensäure wird die gesättigte Form der DHA bezeichnet. Die Liposomen werden für die Behandlung der Zellen in sogenannte kleine, unilamellare Transfer-Liposomen verpackt. Dies führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität der Fettsäuren, die notwendig ist, um die Aufnahme von DHA in die Zellen zu verbessern (Hashimoto et al. 2006). Die vier Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Fettsäuren (100 μ M – 250 μ M) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Stress Stimulus Thapsigargin behandelt. Ein Ansatz pro Versuchsreihe wurde jeweils ohne die jeweilige Fettsäure inkubiert und diente als interne Kontrolle. Die Inkubation mit der DHA Fettsäure in den PC12 Zellen zeigte in der Zelltodanalyse, die über die Caspase-Aktivität gemessen wurde, eine deutlich signifikante Protektion (ca. 30 %) vor Thapsigargin induziertem Zelltod im Bereich von 100 μ M - 150 μ M (Abbildung 31 A).

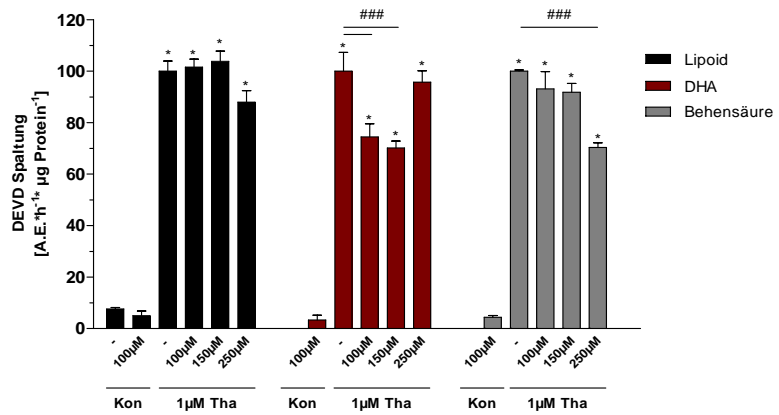
Abbildung 31: Wirkung von DHA auf die Sensitivität von naiven und APP-überexprimierenden PC12 und SH-SY5Y Zellen

Naive (A, C) und APPwt(B, D) PC12 und SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an DHA, Behensäure oder dem Kontrolllipid Lipoid[®]S100 (Lipoid) für 18 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit 1 μ M Thapsigargin (Tha) oder dem Lösungsmittel (DMSO, Kon) behandelt. Die Caspase-3 Aktivität zytosolischer Proteinextrakte wurde mit dem fluorogenen Substrat AC-DEVD-AMC (10 μ M) nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus separaten Experimenten (n = 4). * p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle. # p < 0,05, ## p < 0,05, ### p < 0,05: signifikanter Unterschied gegenüber der angegebenen Kontrolle. (C) Die abweichende Darstellung wurde gewählt, weil die SH-SY5Y APPwt per se eine geringere Apoptose durch die Inkubation mit dem Lipoid zeigten. Aus diesem Grund wurden hier DHA mit der jeweiligen Lipoidkonzentration verglichen.

Abbildung 31: Wirkung von DHA auf die Sensitivität von naiven und APP-überexprimierenden PC12 und SH-SY5Y Zellen

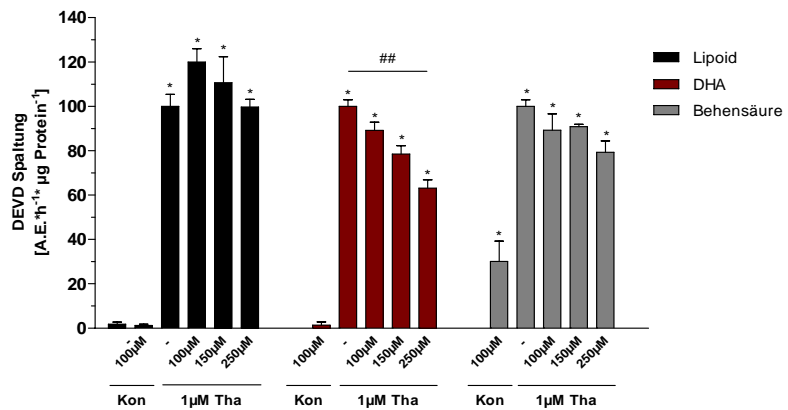
A

PC12 Zellen



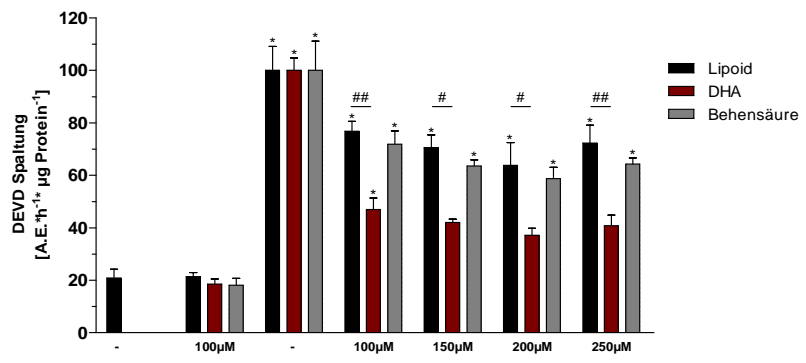
B

PC12 APPwt Zellen



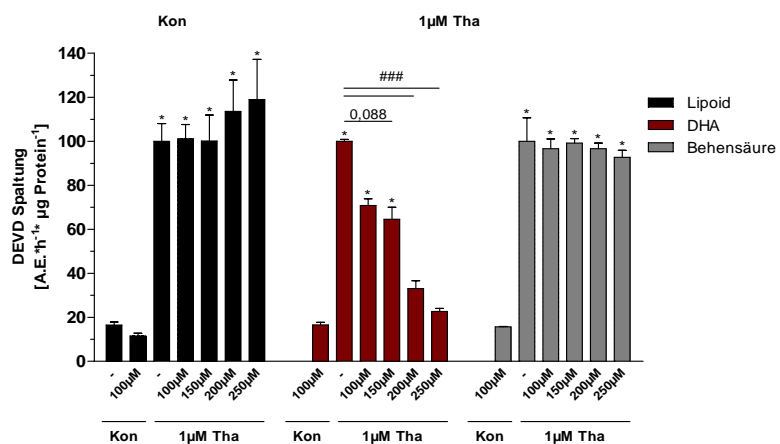
C

SH-SY5Y Zellen



D

SH-SY5Y APPwt Zellen



Die SH-SY5Y Zellen zeigten ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 31 C). Hier war bei den angegebenen Konzentrationen ein deutlich signifikanter Schutz (ca. 30 %) vor Apoptose nachweisbar. Die APP überexprimierenden PC12 und SH-SY5Y Zellen zeigten bei niedrigen Konzentrationen eine weniger starke Protektion (Abbildung 31 B, D). Interessanterweise, war die Protektion bei hohen Konzentrationen von DHA dafür höher als in den naiven Zellen. In den PC12 APPwt war eine ca. 10 % höhere Protektion zu beobachten, in den SH-SY5Y APPwt Zellen sogar eine um 45 % niedrigere Caspase-3 Aktivität. Die Behensäure zeigte hingegen lediglich in dem Versuchsansatz mit den naiven PC12 Zellen, in einer Konzentration von 250 μ M eine signifikant geringere Caspase-Aktivität gegenüber der Lipoid[®]S100-Kontrolle.

4 Diskussion

Das Amyloid-Vorläufer-Protein und seine Prozessierung spielen eine essentielle Rolle bei der Entstehung der familiären und sporadischen Alzheimer Erkrankung (Selkoe 2001; Mattson 2004). Die beiden Haupt-Spaltprodukte, die für die Entstehung dieser Krankheit entscheidend sind zum einen das A β -Peptid, welches über den amyloidogenen Weg gebildet wird und die Hauptkomponente der amyloiden Plaqueablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten darstellt (Hartley et al. 1999; LaFerla et al. 2007). Das zweite Spaltprodukt, sAPP α , wird über den nicht-amyloidogenen Weg gebildet. Hier erfolgt die Spaltung durch die α -Sekretase, wobei die Schnittstelle innerhalb der A β Aminosäuresequenz von APP liegt und somit die Bildung des toxischen A β unterbunden wird. Zudem konnte für sAPP α eine neuroprotektive und neurotrophe Wirkung nachgewiesen werden (Barger and Mattson 1996).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte der Überexpression von APP auf die Genexpression in PC12 Zellen untersucht und ein funktioneller Zusammenhang zwischen der erhöhten Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP und der erhöhten Zelltodrate nach Ca²⁺-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern hergestellt.

Im zweiten Teil wurde die neuroprotektive Wirkung von sAPP α experimentell untersucht. Hierzu wurden drei verschiedene Modellsysteme etabliert, in denen sAPP α diversen Stress- und Apoptose-induzierenden Stimuli entgegenwirkte. In Ergänzung dazu wurden die pharmakologischen Substanzen Galantamin, DHA und Simvastatin eingesetzt und ihre Wirkung auf den Metabolismus von APP und den Stress-induziertem Zelltod analysiert.

4.1 APP, Ca²⁺-Freisetzung und Apoptose

Die Aufrechterhaltung der empfindlichen Calcium-Homöostase ist essentiell für die Funktionalität einer Zelle. Verlust der Kontrolle über die Calcium-Homöostase führt zur Initiierung apoptotischer Vorgänge und schließlich zum Zelltod. Die Zellen reagieren unter anderem auf erhöhte zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentrationen mit der Aktivierung pro-apoptotischer Mediatoren wie Death-Associated Protein (DAP) Kinase und CHOP, sowie der Ca²⁺-abhängigen Protease Calpain. Hierbei wird Calpain von seinem endogenen

Inhibitor Calpastatin freigesetzt (Orrenius et al. 2003) und kann zur Spaltung und Aktivierung diverser Pro-Caspasen führen.

Die Speicherung von Calcium und die Signaltransduktion, sowie die Faltung, Modifikation und Sortierung neu synthetisierter Proteine gehören zu den Hauptaufgaben des ERs (Orrenius et al. 2003). Jegliche Störung in dessen Funktion führt zu einem sogenannten ER-Stress. ER Stress kann einerseits durch Freisetzung von Calcium aus dem ER induziert werden, kann aber durch viele Stress-Stimuli auch Calcium-unabhängig induziert werden, z.B. durch Entzug von Sauerstoff und Glucose, aber auch durch Inhibition der N-verknüpften Glykosylierung von Proteinen im ER Lumen (Lee 2001; Patil and Walter 2001).

Thapsigargin induziert eine Ca^{2+} -Freisetzung, indem es die sarko- und endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen hemmt (SERCA) (Abbildung 32). Die SERCAs pumpen als Ca^{2+} -ATPasen unter ATP-Verbrauch Calcium aus dem Zytoplasma ins ER und sind somit essentiell für die Funktionalität und Aktivität Ca^{2+} -abhängiger Chaperone und Enzyme. Die Inhibition führt zu einer Entleerung des Calcium-Speichers, zur Akkumulation falsch gefalteter Proteine und aktiviert die als „unfolded protein response“ (UPR; zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine) bezeichnete Antwort der Zelle auf ER Stress (Paschen and Mengesdorf 2005; Schroder and Kaufman 2005). Dies führt wiederum zur Induktion von ER Chaperonen, wie BiP und Grp94 und der ATF4-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors CHOP.

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Störung der empfindlichen Calcium-Homöostase in neuronalen Zellen eine Rolle bei Alterserscheinungen des Gehirns (Toescu et al. 2004) und der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer (Schneider et al. 2001; Toescu et al. 2004) spielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von APP Überexpression auf die zelluläre Calcium-Homöostase und Ca^{2+} -Freisetzung nach Stress-induziertem Zelltod untersucht. Für die Analyse einer möglichen Modulation der Apoptose durch APP wurden PC12 APPwt Zellen und zur Kontrolle Leervektor transfizierte PC12 Zellen auf ihre Caspase-Aktivität nach Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung hin untersucht.

Die Zelltodanalyse der APP-überexprimierenden PC12 Zellen zeigte eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigerte Caspase-3 Aktivität. Die APP-modulierte gesteigerte Caspase-3 Aktivität deutete auf eine mögliche im Vergleich zur Kontrolle veränderte transkriptionelle Regulation in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen hin.

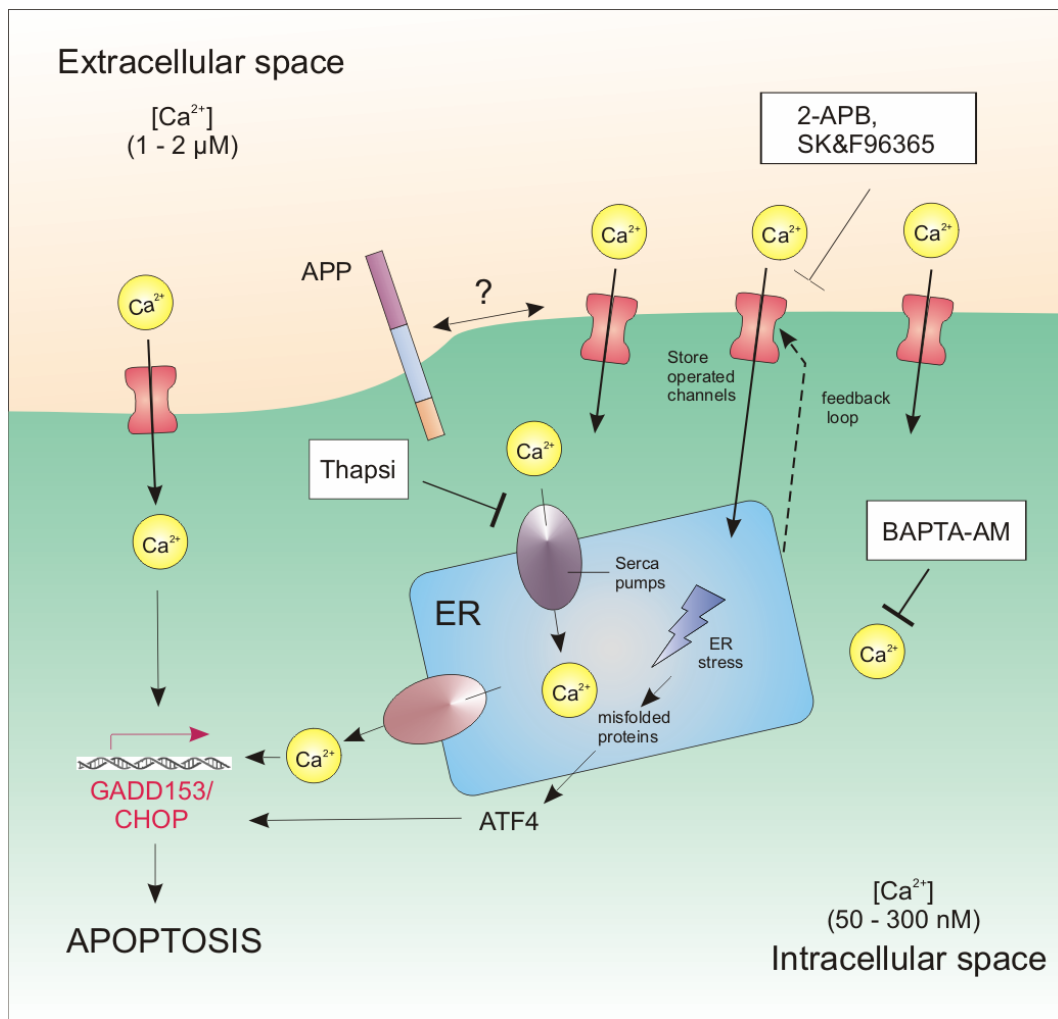


Abbildung 32: Hypothetisches Modell der APP-abhängigen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration über Speicheraktivierte Calcium-Kanäle nach Entleerung des Calcium-Speichers durch Thapsigargin (Erklärung siehe Text, modifiziert nach (Orrenius et al. 2003))

Eine GeneChip®-Analyse sollte die zugrunde liegenden transkriptionellen Ereignisse der Effekte von APP aufklären. Die Analyse zeigte, dass in den Zelllinien PC12 vector und PC12 APPwt UPR Zielgene nach Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Freisetzung signifikant hochreguliert waren. Hierbei waren die meisten mit ER-Stress in Verbindung gebrachten hochregulierten Gene in beiden Zelllinien in vergleichbarem Ausmaß induziert worden. Zu diesen gehören die molekularen Chaperone BiP, Grp58, Erp70, Calreticulin und Calnexin, bei denen keine durch APP induzierten transkriptionellen Unterschiede festgestellt werden konnten.

Im Gegensatz zu den eben genannten Chaperonen wurde die Stress-responsive und anti-apoptotische Kinase NIPK (Ord and Ord 2003; Ohoka et al. 2005) und der Transkriptionsfaktor CHOP (Marciniak et al. 2004; Oyadomari and Mori 2004) nach Thapsigargin-

induzierter Calciumspeicherentleerung in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen im Vergleich zu den Leervektor transfizierten PC12 Zellen signifikant hochreguliert. Eine semiquantitative RT-PCR, die die Kinetik der CHOP Expression untersuchte, bestätigte das Ergebnis der GeneChip[®]-Analyse, dass die Induktion von CHOP im Vergleich zur Kontrolle APP-abhängig erhöht wird.

4.1.1 Modulation der Ca²⁺-induzierten CHOP Expression durch APP

Die Stress-responsive Kinase NIPK ist ebenso wie CHOP ein Zielgen des Transkriptionsfaktors ATF4 (Ord and Ord 2005). Es wurde allerdings auch gezeigt, dass NIPK ebenso ein Zielgen von CHOP ist und somit eventuell nicht direkt über ATF4 aktiviert wird (Ohoka et al. 2005). Zudem wurde in einer neueren Studie für NIPK eine Funktion als Feinregulator der intrinsischen Antwort auf ER Stress beschrieben (Jousse et al. 2007). Der pro-apoptische Transkriptionsfaktor CHOP wurde erstmals 1992 von Ron und Habener identifiziert und als dominant-negativer Inhibitor von C/EBP (CCAAT/enhancer-binding Protein) beschrieben. CHOP wird normalerweise in sehr niedrigen Konzentrationen exprimiert (Ron and Habener 1992). Erst nach der Einwirkung diverser Stress-Stimuli, wie z.B. Hypoxie und ER Stress wird die Transkription von CHOP hochreguliert (Bartlett et al. 1992; Wang et al. 1996; Carriere et al. 2004). In den letzten Jahren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Stress-induzierte Hochregulation von CHOP eine wichtige Rolle in der neuronalen Apoptose bei verschiedenen akuten Schädigungen und chronischen Erkrankungen des ZNS spielt. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem auch Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Marciniak et al. 2004; Ghribi et al. 2006; Paz Gavilan et al. 2006).

4.1.2 Die Regulation der CHOP Expression durch APP erfolgt UPR-unabhängig

Um zu untersuchen, inwieweit die APP-modulierte gesteigerte Induktion und Expression von CHOP eine Folge der „unfolded protein response“ (UPR) oder durch eine UPR-unabhängige Reaktion erfolgt, wurden die durch Thapsigargin freigesetzten intrazellulären Ca²⁺-Ionen komplexiert. Die Komplexierung intrazellulärer Calcium-Ionen durch den Chelator BAPTA-AM konnte nicht nur die APP-vermittelte Potenzierung der Apoptose aufheben, sondern auch die CHOP-Proteinexpression deutlich reduzieren. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnte die gesteigerte Expression von CHOP durch Induktion

mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 ebenfalls durch den Einsatz von BAPTA-AM vermindert werden (Bartlett et al. 1992). Die Ergebnisse sprechen zusammenfassend für eine durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration spezifische Induktion der CHOP-Expression in einer UPR-unabhängigen Reaktion, die durch eine Entleerung des Calcium-Speichers mittels Thapsigargin ausgelöst wurde. Die Behandlung der Zellen mit dem Calcium-Chelator und den SOC-Inhibitoren in Kombination bewirkte interessanterweise in den APP-überexprimierenden, nicht aber in den Vehikel transfizierten PC12 Zellen die höchste Abnahme in der Apoptose. Dies spricht für die Hypothese, dass die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER und der erhöhte extrazelluläre Einstrom über die aktivierten SOCCs sich synergistisch auf die APP-modulierte Apoptose auswirken. Außerdem konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Induktion von ER Stress durch Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, der keinen Effekt auf die ER Ca^{2+} -Homöostase hat, die Stress-induzierte Expression von CHOP in APP-überexprimierenden Zellen nicht verändert (Kogel et al. 2003).

4.1.3 Die RNA Interferenz gegen CHOP wirkt der APP-abhängigen erhöhten Induktion von CHOP entgegen

Ein Knockdown mittels RNA-Interferenz sollte die Rolle des ER Stress-induzierten CHOP-Proteins in der APP-modulierten Apoptose untermauern. Die RNA-Interferenz mittels transienter Transfektion von siRNA gegen CHOP war hier tatsächlich in der Lage, den potenzierenden Effekt der APP-überexprimierenden auf die Apoptose nach Thapsigargin-induziertem ER Stress gänzlich zu unterdrücken.

4.1.4 APP reguliert die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase über Speicher-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle

In einer Studie von 1992 konnte gezeigt werden, dass erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytoplasma zu einer Stabilisierung der mRNA von *CHOP* führen und zudem die transkriptionelle Aktivierung von *CHOP* steigern (Bartlett et al. 1992). In den APP-überexprimierenden PC12 Zellen konnte nach Thapsigargin-induzierter Entleerung der Calciumspeicher eine im Vergleich zu Kontrolle erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Diese erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -

Konzentration korrelierte also mit der Beobachtung der gesteigerten CHOP mRNA- und Proteinexpression sowie der erhöhten Apoptose in den APP überexprimierenden Zellen. Diese erhöhten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Level könnten durch eine bereits im unbehandelten Zustand höhere Konzentration an Ca^{2+} -Ionen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums in PC12 APPwt Zellen erklärt werden. Nach Inhibition von SERCA würde es somit zu einer erhöhten Ausschüttung an Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ins Zytosol kommen. Es wäre aber auch möglich, dass diese erhöhten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration sekundär über einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom hervorgerufen wird.

Um diesen Mechanismus der APP-modulierten Calcium-Homöostase zu untersuchen, wurden die Inhibitoren SK&F96365 und 2-APB eingesetzt. Diese Inhibitoren hemmen spezifisch die Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle (SOCC's) und verhindern den externen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über diese Kanäle, die wiederum über eine Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern aktiviert werden können. Sowohl die gesteigerte Apoptose als auch die erhöhte zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration konnte in den APP überexprimierenden Zellen durch den Einsatz der SOC-Inhibitoren aufgehoben werden. Die Messungen deuten auf eine durch APP Überexpression modulierte Verstärkung bzw. Amplifikation des Ca^{2+} -Einstroms über die Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle hin. Zusammenfassend sprechen die Daten dafür, dass die APP-induzierte Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms über die Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle und die darauf folgende erhöhte CHOP Expression zu einem erhöhten Zelltod nach der Entleerung der Calcium-Speicher führt. Der Mechanismus dieses APP-abhängigen Effekts ist momentan unbekannt. In einigen Arbeiten wurde allerdings interessanterweise die Hypothese aufgestellt, dass ungespaltenes APP möglicherweise als Rezeptor an der Zelloberfläche fungieren kann (Kawasumi et al. 2002; Nilsson et al. 2006). Somit besteht die theoretische Möglichkeit, dass APP und die Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle an der Zellmembran physikalisch miteinander interagieren.

4.2 APP-vermittelte Neuroprotektion

4.2.1 APP kann sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Wirkungen entfalten

In dem bisher gezeigten Zellsystem PC12 APPwt wurde der Einfluss des Amyloid-Vorläufer-Proteins nach APP Überexpression auf die Genregulation nach Thapsigargin-induziertem Stress untersucht. Für APP konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle bei dem durch Ca^{2+} -Freisetzung induzierten Zelltod beschrieben werden. In diesem Zusammenhang wurde eine gesteigerte APP Expression in Patienten mit der autosomal-dominanten früh eintretenden Form der familiären Alzheimer-Erkrankung (EOFAD, „*earlyonset familial Alzheimer's disease*“) (Cabrejo et al. 2006; Rovelet-Lecrux et al. 2006; Theuns et al. 2006; Rovelet-Lecrux et al. 2007) festgestellt. Das *APP*-Gen konnte auf dem Chromosom 21 lokalisiert werden (Kang et al. 1987). Patienten mit der Trisomie 21 bzw. dem Down Syndrom weisen einen erhöhten A β -Spiegel im Blut auf. Als Folge der gesteigerten APP Expression weisen diese Patienten ebenfalls das neuropathologische Bild der früh eintretenden Form der Alzheimer Krankheit auf (Neve et al. 2000; Gyure et al. 2001; Mori et al. 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete gestörte ER Calcium-Homöostase in APP-überexprimierenden Zellen könnte womöglich eine Sensibilisierung der Neurone auf pathologisch ausgelöste Entleerung der Calcium-Speicher widerspiegeln.

Die Wirkungen von APP und seiner Spaltprodukte sind sehr vielschichtig und hängen stark vom jeweiligen Kontext ab. So konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die Überexpression des human Wildtyp APP in neuronalen Zellen den Zelltod sowohl fördern als auch inhibieren kann (Kogel et al. 2003; Esposito et al. 2004; Recuero et al. 2004; Kogel et al. 2005). In den meisten Studien steht hauptsächlich die pathophysiologische amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins im Blickpunkt des Interesses. Bei der zur Zeit favorisierten „Amyloid-Hypothese“ nimmt die Bildung, Aggregation und neurotoxische Wirkung des A β -Peptids eine zentrale Rolle in der Entstehung der sporadischen wie familiären Form von Morbus Alzheimer ein (Hartley et al. 1999; Selkoe 2001).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die mögliche physiologische Funktion von APP im Rahmen der Neuroprotektion untersucht werden. Die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP in die Spaltprodukte sAPP α , p3 und AICD verhindert die Bildung des toxischen A β -Peptids, da die α -Sekretasespaltstelle innerhalb des A β -Peptides liegt (siehe Einleitung). Unter physiologischen Bedingungen wird der Großteil von APP über die α - und γ -Secretase gespalten. Dies führt zur Bildung und Sekretion des löslichen sAPP α -Proteins (Barger and Mattson 1996). Für sAPP α wurde bereits in diversen Studien eine neuroprotektiven und neurotrophe Wirkung postuliert (Furukawa et al. 1996; Luo et al. 2001; Selkoe 2002).

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die neuroprotektive physiologische Funktion von APP im Hinblick auf den Schutz von neuronalen Zellen vor diversen Morbus Alzheimer relevanten Stress-Stimuli bzw. Apoptose Stimuli zu untersuchen.

4.2.2 sAPP α -vermittelte Protektion

Für die Untersuchungen der sAPP α -vermittelten Neuroprotektion nach Verwendung der jeweiligen Stress-Stimuli musste zunächst ein System etabliert werden, mit dem sAPP α den Zellen in ausreichender Konzentration zur Verfügung gestellt wird, um überhaupt eine Protektion beobachten zu können. Da in APP-überexprimierenden PC12 Zellen bereits ein signifikanter Schutz vor DNA-Schäden und Tunicamicin-induziertem ER-Stress (Kogel et al. 2003; Kogel et al. 2005) beobachtet werden konnte, wurde in diesen Zellen zunächst die Menge des ins Medium abgegebenen sAPP α bestimmt. Um einen signifikanten Schutz vor Stress-induziertem Zelltod in den PC12 APP^{wt} Zellen beobachten zu können, war eine Konzentration von 3 ng/ml sAPP α ausreichend. Diese Menge an sAPP α im Kulturüberstand wurde in den PC12 Zellen mit APP Überexpression nach drei Tagen erreicht. In diesem Zellsystem konnte sowohl nach Zugabe von Thapsigargin- als auch nach Zugabe von Epoxomicin eine signifikante Protektion in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen gezeigt werden.

Um die postulierte neuroprotektive Rolle von sAPP α direkt zu bestätigen, wurde nun rekombinantes aufgereinigte sAPP α eingesetzt, da beim APP-Metabolismus in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen nicht nur sAPP α gebildet wird, sondern ebenfalls andere Spaltprodukte zu einem gewissen Teil gebildet werden (vergleiche Einleitung 1.4). Die

protektive Funktion von rekombinantem aufgereinigtem sAPP α wurde in naiven PC12 Zellen untersucht. Die hier verwendeten rekombinanten Proteine, sAPP α (AS-Sequenz: 1 – 612) sowie zwei Teilfragmente von sAPP α (AS-Sequenz: 304 – 612, AS-Sequenz: 444 -612), sollten Literaturangaben zufolge eine Protektion gegenüber apoptotischen Stress-Stimuli bewirken, da die protektiv wirkende Domäne von sAPP α auf den Bereich der Aminosäuresequenz 591 – 612 konzentriert ist (Furukawa et al. 1996).

Im dritten Modellsystem wurde die sAPP α -vermittelte Neuroprotektion über die Zugabe von exogen exprimiertem sAPP α nachgewiesen. Hierzu wurden APP-überexprimierende HEK293 Zellen kultiviert und das sekretierte sAPP α im konditionierten Medium aufgefangen. Durch eine Präinkubation mit dem konditionierten Medium der HEK APPwt Zellen für 16 - 20 Stunden konnte eine potente Protektion vor diversen zellulären Stress-Stimuli in naiven PC12 Zellen nachgewiesen werden (siehe unten). Mit diesem Modellsystem konnte erfolgreich ein Versuchsaufbau etabliert werden, mit dem im Rahmen dieser Arbeit effektiv die neuroprotektive physiologische Funktion von sAPP α untersucht werden konnte.

4.2.3 Verwendete Stress-Stimuli zur Untersuchung der protektiven Rolle von APP/sAPP α

Im Rahmen dieser Arbeit sollten pathophysiologisch relevante apoptotische Stress-Stimuli auf die protektive Wirkung von sAPP α untersucht werden. Morbus Alzheimer ist durch synaptische Dysfunktion und das Absterben von Neuronen gekennzeichnet (Selkoe and Podlisny 2002). Zahlreiche Studien konnten in vivo und in vitro belegen, dass das Absterben der Neurone durch programmierten Zelltod erfolgt (Behl 2000). In Gehirnen von Alzheimer erkrankten Patienten konnte zudem ein verändertes Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen und der Caspase-Induktion nachgewiesen werden (Kitamura et al. 1998; Engidawork et al. 2001), so dass die Untersuchung von Apoptose-induzierenden Stress-Stimuli in Bezug auf eine mögliche sAPP α -vermittelte Protektion von essentieller Bedeutung ist. Einer Vielzahl von verschiedenen pro-apoptotischen Stress-Stimuli, die im Folgenden näher beschrieben werden, scheinen ursächlich an der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer beteiligt zu sein (siehe Abbildung 1).

Proteosomaler Stress

Das Proteasom spielt eine zentrale Rolle beim intrazellulären Proteinabbau, Akkumulationen falsch gefalteter Proteine, und wird deswegen mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem Morbus Alzheimer (Keller et al. 2000; Song and Jung 2004) und Parkinson (McNaught and Jenner 2001) in Verbindung gebracht. Die Inhibition des Proteasoms stellt somit einen für Morbus Alzheimer relevanten Stress-Stimulus dar. Mehrere Studien gehen davon aus, dass der Signalweg des Proteasoms eine Verbindung zwischen der „Amyloid-Hypothese“ und der „Tau-Hypothese“ aufzeigt (Mandelkow 1999; Oddo et al. 2004). Zudem belegen neuere Daten, dass die pathologische Aggregation von A β -Oligomeren die Proteasom-Funktion beeinträchtigt und somit zur Entstehung der Tau-Pathologie bzw. zur Tau-Hyperphosphorylierung und zur Bildung von intrazellulären Neurofibrillen entscheidend beitragen könnte (Tseng et al. 2007).

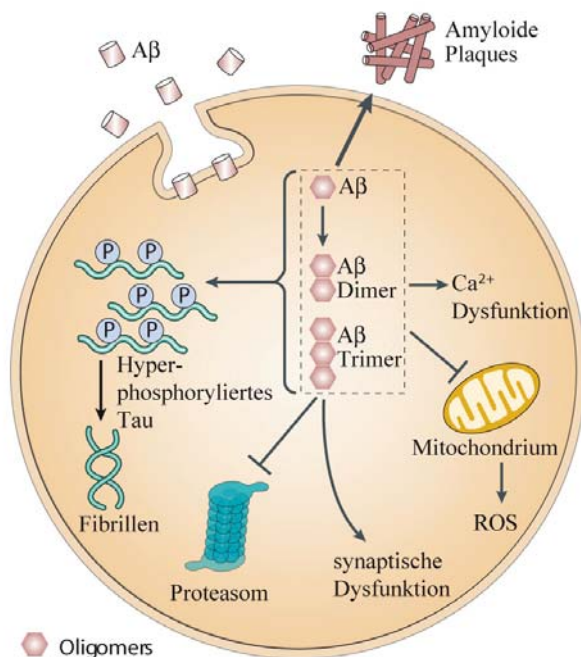


Abbildung 33: Pathophysiologische Effekte von intraneuronalem A β

Das Amyloid- β wird intrazellulär produziert oder aus extrazellulären Quellen wieder in die Zelle aufgenommen. A β zeigt diverse pathologische Effekte auf die Zell- und Organellenfunktion. A β kommt als Monomer vor kann aber auch weiter zu Dimere oder Trimere aggregieren. Jeder dieser Zustände kann toxisch für die neuronalen Zellen sein. Hinweise sprechen dafür, dass A β die Hyperphosphorylierung von Tau vereinfacht, die Funktion der Proteasomen und Mitochondrien stört und erhöhte zytosmatische Calciumspiegel sowie synaptische Dysfunktion auslöst (LaFerla et al. 2007).

Ca²⁺-Freisetzung

Ein weiterer Stress-Stimulus, der zur Induktion des programmierten Zelltods führen kann, ist die Störung der empfindlichen Calcium-Homöostase in den Zellen. Neurodegenerative Erkrankung werden oft mit einem Ungleichgewicht der Calcium-Konzentration in Neuronen in Verbindung gebracht (Mattson 2000; LaFerla 2002; Paschen and Mengesdorf 2005). Dieses Ungleichgewicht löst unter anderem die Aktivierung von Effektor-Caspasen und somit die Apoptose aus. Bereits in einer früheren Studien wurde gezeigt, dass PC12

Zellen mit Presenilin 1 Mutation durch die Präinkubation mit rekombinantem sAPP α effektiv vor Thapsigargin-induziertem Zelltod geschützt werden können (Guo et al. 1998). sAPP α soll hierbei seine protektive Wirkung die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs ausüben (Barger and Mattson 1996).

DNA-Schäden

DNA Schäden können sowohl altersbedingt auch durch pathophysiologische Veränderungen, wie zum Beispiel eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bei Alzheimer Patienten auftreten (Thomas and Fenech 2007). UV-Bestrahlung führt zu DNA-Schäden und ist ein klassischer apoptotischer Stress-Stimulus, der zu einer Aktivierung des JNK/c-Jun-Signalwegs führt (Mielke et al. 2000). In APP-überexprimierenden PC12 Zellen konnte eine Neuroprotektion vor UV-induziertem Zelltod (Kogel et al. 2003; Kogel et al. 2005) beobachtet werden. Die Inhibition der γ -Sekretase nach UV-induzierter DNA-Schädigung hatte zudem keinen Effekt auf die verminderte JNK1/JNK2 Aktivität in PC12 Zellen mit APP Überexpression, so dass hier von einer sAPP α - und nicht AICD-vermittelte Protektion ausgegangen werden kann.

Oxidativer-Stress

Die erhöhte Produktion von ROS (reaktiven Sauerstoffverbindungen) konnte bereits in einigen Studien mit Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Behl et al. 1994; Hensley et al. 1994; Tamagno et al. 2003). Von Mattson et al. wurde postuliert, dass neuronale Zellen unter anderem durch die Behandlung mit Substanzen, die zu einer Stabilisierung der zellulären Calcium-Homöostase führen, wie es auch für sAPP α beschrieben ist (siehe oben), wirksam vor oxidativem Stress geschützt werden können (Mattson et al. 1998). Es ist zudem bemerkenswert, dass oxidativer Stress nicht nur zur Produktion von intrazellulärem A β führen kann, sondern A β zudem eine zusätzliche Quelle für ROS darstellt (Butterfield et al. 1999; Misonou et al. 2000; Barnham et al. 2004). An kultivierten Neuronen konnte gezeigt werden, dass A β in Anwesenheit von Metallionen, wie zum Beispiel Kupfer (Pogocki 2003) H₂O₂ erzeugen kann und somit oxidativen Stress induzieren kann (Behl et al. 1994). Oxidativer Stress führt dabei zur Produktion von Peroxiden und zur Induktion der Lipid-Peroxidation und konnte durch den Einsatz von Antioxidantien, wie der Katalase, wirksam inhibiert werden. Dies wiederum führte zur Annahme, dass die Bildung von Radikalen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Morbus Alzheimer beiträgt.

Hypoxie

Der Sauerstoffmangel im Gehirn von Alzheimerpatienten und besonders in den Plaquerregionen kann zu einem erheblichen Verlust der Hirnfunktionen führen (Yokota et al. 1996; Jendroska et al. 1997; Kalaria 2000). Studien belegen, dass hypoxische Bedingungen im Gehirn eine Veränderung $A\beta$ -Metabolismus bewirken und eine erhöhte APP-Expression auslösen (Baiden-Amisshah et al. 1998). Webster et al. untersuchte diesen Effekt in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y und setzte die Zellen chronischer Hypoxie aus (Webster et al. 2002). Nach chronischer Hypoxie war in den SH-SY5Y Zellen eine deutliche Abnahme in ihrer sAPP α -Sekretion und der α -Sekretase ADAM10 deutlich nachweisbar (Webster et al. 2002; Webster et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte der Genpromotor der β -Sekretase BACE1 als Hypoxie-Responsives Element in SH-SY5Y Zellen identifiziert werden und führte nach Hypoxie zu einer erhöhten Prozessierung und Spaltung von $A\beta$ -Peptiden (Sun et al. 2006).

4.2.4 Effekte von sAPP α auf die Aktivierung von Stress-Signalwegen und die Induktion der Apoptose

4.2.4.1 Anti-apoptotische Effekte von sAPP α

Für die Analyse der sAPP α -vermittelten Protektion gegen die oben erwähnten pro-apoptotischen Stress-Stimuli wurde die Caspase-3 Aktivität in naiven oder APP-überexprimierenden PC12 Zellen untersucht. Die Aktivierung von Effektor-Caspasen als zentralem Ereignis beim programmierten Zelltod wurde hier als Maß für die sAPP α -vermittelte Protektion verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die oben genannten pathophysiologisch relevanten Stress-Stimuli eingesetzt, um die mögliche Relevanz des Verlusts der physiologischen Funktion von APP für die Entstehung und Entwicklung von Morbus Alzheimer zu aufschlüsseln.

Die Inhibition des Proteasoms wurde mittels Proteasominhibition durch Epoxomicin induziert. Hier konnte eine signifikante Protektion der Zellen vor dem apoptotischen Zelltod in den APP-überexprimierenden Zellen und den mit sAPP α aus HEK APPwt Zellen präinkubierten PC12 Zellen beobachtet werden.

Die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wurde durch Thapsigargin initiiert. Sowohl in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen als auch durch die exogene Zugabe von rekombinantem

sAPP α konnte hierbei eine Protektion vor Apoptose nach Inhibition des Proteasoms durch Epoxomicin und Thapsigargin-induzierter Ca²⁺-Freisetzung etabliert werden.

Die Annahme, dass sAPP α neuronale Zellen vor DNA-Schäden schützen kann, konnte sowohl über die direkte Zugabe von rekombinanten aufgereinigtem sAPP α , als auch durch Präinkubation mit sekretiertem sAPP α aus konditioniertem HEK293 APP^{wt} Medium bestätigt werden. Zudem zeigte sich, dass auch die rekombinanten Teilfragmente von sAPP α , mit der Aminosäuresequenz 304 – 612 AS und 444 – 612 AS einen Schutz vor UV-induzierten DNA-Schäden bewirken. Das in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte rekombinante sAPP α zeigte allerdings nur moderate Effekte auf die Neuroprotektion nach DNA-Schädigung und darüber hinaus eine dosisabhängige Aktivierung der Stresskinasen JNK1/JNK2. Diese Beobachtung ist eventuell auf fehlende posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung aber auch veränderte Faltung oder einem mangelndem Reinheitsgrad zurückzuführen und zeigte, dass die drei aufgereinigten sAPP α -Peptide für die weiterführenden Experimente in dieser Versuchsreihe nicht optimal geeignet waren.

Die hier untersuchten Modellsysteme zeigten, dass die Protektion über die die exogene Zugabe von rekombinanten sAPP α aus konditioniertem Medium auf naive PC12 Zellen am höchsten war. So konnte in den gezeigten Experimenten eine signifikante sAPP α -Protektion vor Ca²⁺-Speicherentleerung nach Inhibition der Ca²⁺-ATPasen, Proteasominhibition und UV-induzierten DNA-Schäden induzierten Zelltod nachgewiesen werden.

Nun wurden an diesem Modellsystem zwei weitere wichtige pathologische Stress-Stimuli untersucht. Dabei handelte es sich zum einen um oxidativen Stress, ausgelöst durch Wasserstoffperoxid, und zum anderen um Sauerstoffentzug.

Durch Behandlung der Zellen mit H₂O₂ kommt es zur Schädigung von Proteinen und DNA und zum anderen zur erhöhten Lipidperoxidation. Die dadurch beeinträchtigte Membranzintegrität führt zu einer Störung der Ca²⁺-ATPasen und Glucose- und Glutamatrezeptoren, zur mitochondrialen Dysfunktion und zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Die hierdurch induzierte Störung der Ionen-Homöostase der Zellen, führt letztendlich zum Stress-induziertem Zelltod (Mark et al. 1995). Auch hier zeigte sich, dass sAPP α in der Lage war PC12 Zellen potent vor H₂O₂-induziertem Zelltod und somit vor oxidativem Stress zu schützen.

Im Gegensatz zu den anderen Stress-Stimuli bewirkte der Entzug von Sauerstoff in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen eine erheblich stärkere Induktion der Apoptose als

in den Kontrollzellen. Außerdem wurden naive PC12 Zellen mit rekombinantem sekretiertem sAPP α präinkubiert und anschließend chronisch mit Hypoxie behandelt. Die Messung der Caspase-3 Aktivität zeigte, dass sAPP α durchaus in der Lage ist, PC12 Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod zu schützen. Zusammengenommen würde dies die Annahme einer gesteigerten BACE1- und toxischen A β -Produktion, ausgelöst durch APP-Überexpression nach chronischer Hypoxie, bestätigen (Baiden-Amisshah et al. 1998; Sun et al. 2006). Die Analyse der Aktivierung von JNK1/JNK2 zeigte, dass deren Phosphorylierung deutlich niedriger war als in der Kontrolle wohingegen die APP-überexprimierenden Zellen den gegenteiligen Effekt zeigten. Hier war die Aktivierung von JNK1/JNK2 deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis konnte durch einen weiteren APP-überexprimierenden Klon bestätigt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass bei der sAPP α -vermittelten Protektion nach chronischer Hypoxie die Aktivierung des JNK/c-Jun-Signalwegs inhibiert wird.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Versuchsreihe die für sAPP α postulierte Schutzfunktion vor pathophysiologisch relevanten Stress-Stimuli untermauert werden. Die hier eingesetzten Stress-Stimuli können mit Symptomen bzw. stoffwechselphysiologischen Veränderungen bei Alzheimer Patienten in Verbindung gebracht werden (siehe oben). Die Annahme, dass der Verlust der antiamyloidogenen Prozessierung und der damit verbundenen physiologischen Rolle von APP bei der Entstehung und Entwicklung von Morbus Alzheimer eine Schlüsselfunktion einnimmt, konnte somit mit neuen experimentellen Befunden unterstützt werden. Zugleich zeigt die sAPP α -vermittelte Protektion einen Ansatzmöglichkeit für die Entwicklung pharmakologischer Substanzen, die zu einer Prozessierung zugunsten von sAPP α führen und/oder seine Sekretion erhöhen.

4.2.4.2 APP-moduliert die Stress-induzierte Aktivierung des JNK/c-JUN-Signalwegs

Durch die Analyse der Effektor-Caspasen konnte gezeigt werden, dass sAPP α in der Lage ist, PC12 Zellen potent vor Stress-induzierter Apoptose (oxidativer Stress, DNA-Schäden, Hypoxie (< 0,01 % O₂), Proteasominhibition und Inhibition der Ca²⁺-ATPasen) zu schützen. Zusätzlich konnte eine Inhibition der Epoxomicin-induzierten Aktivierung von JNK1/JNK2 durch APP gezeigt werden. Für APP-überexprimierende PC12 Zellen konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die APP Überexpression nach UV-

induzierter Apoptose zu einer potenten Inhibition der JNK-Aktivierung führt (Kogel et al. 2005). Zudem konnte der protektive Effekt von APP durch den Einsatz des indirekten JNK-Inhibitors CEP-11004 (synthetischen hergestellter, Mixed-Lineage Kinase (MLK)-Inhibitor) nach DNA-Schädigung imitiert werden. Der c-Jun N-terminal kinase (JNK) Signalweg stellt einen zentralen Stress-responsiven, proapoptotischen Signalweg dar und beeinflusst neuronale Plastizität, Neurogeneration und Neurodegeneration. Zudem sprechen Studien dafür, dass der JNK-Signalweg eine Schlüsselfunktion in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson einnimmt (Bozyczko-Coyne et al. 2002).

Unter diesen Voraussetzungen wurde die Wirkung des direkten JNK/SAPK Inhibitors-II SP600125 in An- und Abwesenheit von sAPP α untersucht, um den Signalweg der sAPP α -vermittelten Protektion zu analysieren. Die Inkubation von sAPP α mit SP600125 bewirkte den Verlust der sAPP α -vermittelten Protektion nach Inhibition der Ca²⁺-ATPasen durch Thapsigargin. Somit konnte der Schutz durch sAPP α in den behandelten Kontrollzellen nachgeahmt werden. Interessanterweise konnte der JNK-Inhibitor nur die Caspase-Aktivität in den sAPP α -unbehandelten PC12 Zellen, nicht aber in den sAPP α -behandelten Zellen senken. Dieser Effekt konnte allerdings nicht nach Proteasominhibition gezeigt werden. Hier konnte lediglich die Differenz der Caspase-Aktivität ohne SP600125 und somit die Protektion zwischen sAPP α -behandelten und -unbehandelten PC12 Zellen in Anwesenheit von SP600125 um etwa ein Drittel gesenkt werden. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass sAPP α den Stress-induzierten JNK-Signalweg, abhängig vom jeweiligen Stress-Stimulus, unterschiedlich stark bzw. anteilig inhibieren kann.

4.2.4.3 Effekte von sAPP α auf den anti-apoptotische PI3K/Akt-Signalweg

In einer Studie von Burton konnte eine Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalwegs durch das Wildtyp APP-Protein gezeigt werden, nicht jedoch für die mutierte Version (Burton et al. 2002). Der PI3K/Akt-Signalweg ist wiederum in der Lage den JNK-Signalweg über die Phosphorylierung von MLK3 zu inhibieren (Barthwal et al. 2003). In einer Studie von Guo et al. wurde zudem gezeigt, dass sAPP α neuronale Zellen vor Nährstoffmangel und Glutamat-induziertem oxidativen Stress schützen kann (Cheng et al. 2002). Um eine sAPP α -induzierte Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-

Signalwegs zu untersuchen, wurde der Signalweg durch den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor LY296002 gehemmt (Vlahos et al. 1994).

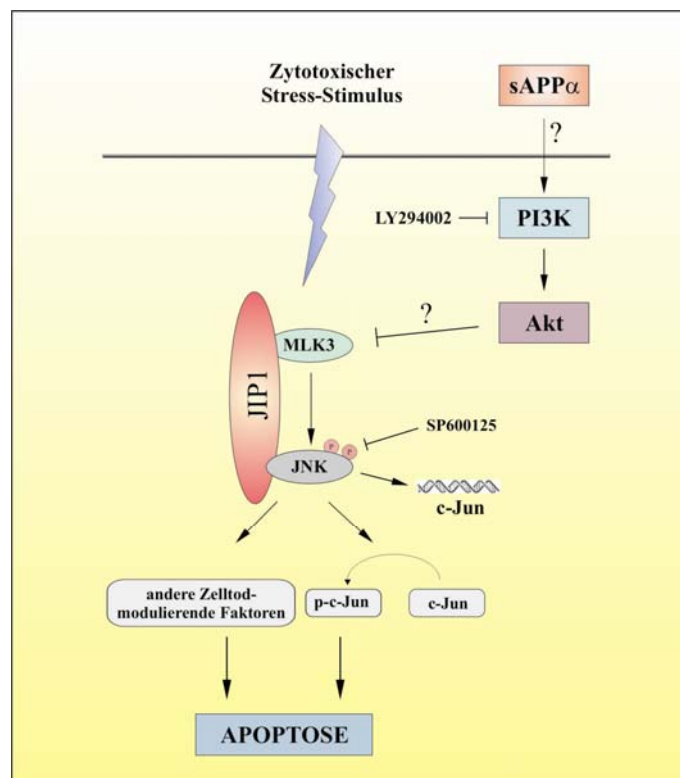


Abbildung 34: Hypothesisches Modell der sAPP α -vermittelten Protektion vor zytotoxischem Stress
(Erklärung siehe Text)

In Anwesenheit des PI3-Kinase-Inhibitors war es möglich, die sAPP α -vermittelte Protektion vor Stress-induziertem Zelltod Stimuli-abhängig partiell oder gar völlig auszuschalten. Die Protektion nach DNA-Schädigung und Inhibition des Proteasoms konnte in Anwesenheit von LY296002 um etwa die Hälfte aufgehoben werden. Der Schutz vor Thapsigargin-induzierter Ca²⁺-Freisetzung konnte völlig aufgehoben werden. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass der PI3K/Akt-Signalweg im sAPP α -vermittelten Schutz vor zytotoxischem Stress von essentieller Bedeutung ist. In Anbetracht des beobachteten inhibitorischen Effekts von APP bzw. sAPP α auf den JNK-Signalweg könnte eine Überaktivierung des JNK-Signalwegs bei Morbus Alzheimer auf zwei Effekte einer modulierte APP-Prozessierung zurückzuführen sein: eine verminderte Bildung des neuroprotektiven sAPP α und einer gleichzeitig verstärkten Produktion des neurotoxischen A β -Peptids.

4.2.5 Die Rolle von APP und sAPP α bei der pharmakologisch induzierten Neuroprotektion

In den bisher gezeigten Experimenten konnte die Antagonisierung des Stress-aktivierten JNK/c-Jun Signalwegs und der protektive Einfluss von sAPP α über die Analyse der Caspase-3 Aktivität als Endpunkt der Apoptose eindeutig belegt werden. Auch eine Beteiligung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalwegs bei dieser sAPP α -vermittelten Protektion konnte über die Inhibition der PI3-Kinase bewiesen werden.

Diverse Studien zeigen, dass bestimmte pharmakologische Substanzen in der Lage sind, die Symptome erkrankter Patienten zu reduzieren. Zu diesen Substanzen gehören Omega-3 Fettsäuren, speziell DHA (Glomset 2006), Statine (Gibson Wood et al. 2003; Eckert et al. 2005) und der allosterisch potenzierende Ligand (APL) von nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) Galantamin und Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Pereira et al. 2002; Santos et al. 2002).

In den bisher gezeigten Experimenten konnten naive PC12 Zellen über die exogene Zugabe von sAPP α potent vor Apoptose geschützt werden. Die oben aufgeführten pharmakologischen Substanzen sollten in der folgenden Versuchsreihe auf eine neuroprotektive Wirkung vor Stress-induziertem Zelltod untersucht werden. Außerdem sollte getestet werden, inwieweit ein protektiver Effekt auf eine Veränderung im APP-Metabolismus zurückgeführt werden kann.

Galantamin

Zur klassischen Behandlung von Morbus Alzheimer zählt die Behandlung der Krankheit mit den typischen Acetylcholinesterase-Inhibitoren, wie Donepezil, Tacrin, Rivastigmin und Galatamin. Das Prinzip dieser Medikamente ist die Erhöhung der ACh-Konzentration im synaptischen Spalt, um das Defizit in der abgeschwächten cholinergen Neurotransmission auszugleichen (Nordberg and Svensson 1998). Wobei Galantamin zu den schwachen Acetylcholinesterase-Inhibitoren gehört, jedoch durch seine Wirkung als allosterisch potenzierender Ligand eine Sonderstellung einnimmt (Schrattenholz et al. 1996; Pereira et al. 2002). Galantamin erleichtert die Bindung von Acetylcholin und erhöht somit den Agonisten-induzierten Ionenstrom durch den Kanal (Pereira et al. 1993). Zudem wurde gezeigt, dass Galantamin SH-SY5Y potent vor A β - und Thapsigargin-induzierter Apoptose schützen kann (Arias et al. 2004). Die Hemmung der PI3-Kinase mittels LY296004 hob die protektive Wirkung von Galantamin auf, so dass man zu dem Schluss kam, dass die

Protektion direkt oder indirekt über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt wird (Arias et al. 2005). Interessanterweise konnte dieser Effekt im Rahmen dieser Arbeit auch für die sAPP α -vermittelte Protektion vor zytotoxischen Stress gezeigt werden (siehe Ergebnisse 3.2.8.). Zudem konnte in einer neueren Studie eine Steigerung der sAPP α Sekretion SH-SY5Y Zellen bereits nach 2 Stunden behandelt mit Galantamin gezeigt werden (Lenzken et al. 2007). Dies führte zur Annahme, dass die Galantamin-vermittelte Protektion eventuell auch über eine gesteigerte sAPP α -Sekretion läuft und sollte experimentell untersucht werden.

Um eine Steigerung in der sAPP α Expression zu untersuchen, wurden APP-überexprimierende HEK293 Zellen mit Galantamin behandelt. Die Inkubation von HEK293 APPwt Zellen mit Galantamin bewirkte eine dosisabhängige Steigerung der sAPP α Sekretion. Die Messung der Caspase-3 Aktivität zeigte, dass eine Präinkubation mit Galantamin für 24 Stunden von PC12 und SH-SY5Y Zellen dosisabhängig vor Thapsigargin-induzierter Apoptose schützen kann. Die Protektion war in beiden Zelllinien ab einer Konzentration von 100 μ M Galantamin signifikant. Unter den gleichen Versuchsbedingungen bewirkte Galantamin in APP-überexprimierenden PC12 und SH-SY5Y Zellen bereits in niedrigeren Konzentrationen eine signifikante Protektion vor Apoptose. In PC12 APPwt trat die protektive Wirkung bei 10 μ M und in SH-SY5Y APPwt bereits bei 100 nM ein. Dies könnte analog zu dem Experiment mit der Omega-3 Fettsäure DHA auf die erhöhte Verfügbarkeit von sAPP α in den APP-überexprimierenden Zelllinien zurückzuführen sein. Auch diese Experimente sprechen zusammenfassend dafür, dass die Protektion durch Galantamin zumindest anteilig über eine gesteigerte sAPP α Sekretion vermittelt wird. Der Mechanismus der Galantamin-vermittelten Protektion vor zytotoxischem Stress ist im Gegensatz zu den Statinen und Omega-3 Fettsäuren noch weitgehend ungeklärt.

In Studien von Arias et al. konnte eine Involvierung der prä- und postsynaptisch lokalisierten α 7 nACh-Rezeptoren (nAChR) in der Galantamin-vermittelte Protektion nachgewiesen werden (Arias et al. 2004; Arias et al. 2005). Zum einen verdoppelte sich die Dichte an α 7 nAChR nach der Inkubation mit Galantamin für 48 Stunden und zum anderen konnte die Protektion spezifisch über die Inhibition der α 7 nAChR mit Methyllycaconitin (MLA) aufgehoben werden. Nitsch et al. konnten belegen, dass die Depolarisation von Membra-

nen und die synaptische Aktivität in hippocampalen Schnitten die Freisetzung von sAPP α induzieren können und somit an der APP-Prozessierung beteiligt ist. (Nitsch et al. 1993; Nitsch et al. 1993). In Neuronen wird APP über den axonalen Transport zu den präsynaptischen Nervenendigungen transportiert (Koo et al. 1990) und präsynaptisch akkumuliert (Schubert et al. 1991). Hinzukommt, dass A β mit einer sehr hohen Affinität an den $\alpha 7$ nAChR bindet, zu einer Internalisierung der Rezeptoren ins Zellinnere führt und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären A β -Konzentration beiträgt (Nagele et al. 2002; LaFerla et al. 2007). Galantamin bindet als allosterisch potenzierender Ligand an den die α -Untereinheit des $\alpha 7$ nAChRs und führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Infolge dessen wäre es hypothetisch möglich, dass die Anlagerung des A β -Peptids an den Rezeptor durch Galantamin erschwert wird und die protektive Wirkung hierdurch gesteigert wird.

Die hier gezeigte Protektion ist dementsprechend nicht auf eine veränderte Membranfluidität, wie bei Simvastatin und DHA, zurückzuführen. Womöglich könnte eine kombinatorische Behandlung mit den hier verwendeten Substanzen, DHA oder Simvastatin und Galantamin, zu einer additiven Steigerung der protektiven Effekte vor Stress-induzierter Apoptose führen.

Omega-3 Fettsäuren und Statine

Die Statine und Omega-3 Fettsäuren gehören zu einer Klasse von Substanzen, die in der Lage sind die Membranfluidität zu erhöhen (Alexander 1998; Kirsch et al. 2003). Die Membranen von Nervenzellen sind reich an Lipiden, wie Cholesterin und Phospholipide, in die die Omega-3 Fettsäuren hauptsächlich eingebaut werden. Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass die A β -Produktion bei erhöhten Cholesterinwerten zunimmt (Muller et al. 1998; Eckert et al. 2000; Eckert et al. 2001). Die Experimente wurden post mortem an Gehirngewebe von Patienten mit Morbus Alzheimer oder an gealterten NMRI-Mäusen vorgenommen. Studien an SAMP8-Mäusen mit einer Überproduktion von A β , zeigten, dass durch die Fütterung von ungesättigten Fettsäuren eine Aufrechterhaltung der Gehirnfunktion im Alter erreicht wird (Morley et al. 2002).

Die Wirkung von Omega-3 Fettsäuren auf die sAPP α -Sekretion wurde bisher noch nicht untersucht. Die Steigerung der sAPP α -Sekretion durch Omega-3 Fettsäuren und speziell DHA könnte möglicherweise ein zentraler Mechanismus der beobachteten Neuroprotekti-

on sein. Klinische Studien zeigen, dass vor allem Omega-3 Fettsäuren einen Schutz vor toxischen Einflüssen ausübt. Die protektive Wirkung von Statinen wird inzwischen in neueren Studien teilweise in Frage gestellt und Statine werden meist mit anderen Medikamenten in Kombination verabreicht. Cholesterin ist der Hauptregulator der Membranfluidität bei Eukaryoten und lagert sich in die Lipiddoppelschicht ein, wobei es bei hohen Konzentrationen die Kristallisation der Fettsäuren hemmt und somit den Phasenübergang von Lipiddoppelschichten verhindert. Darüber hinaus vermindert Cholesterin die Fluidität der Membran, indem es größere Bewegungen der Fettsäureketten sterisch hemmt. (Stryer 1996). Statine, speziell Simvastatin und Lovastatin, sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, wirken Cholesterin-senkend und können die Membranfluidität positiv verändern. Nach der „lipid raft“ Hypothese sind Proteine in der Lipiddoppelschicht in speziellen Membranmikrodomänen, sogenannte „lipid rafts“ organisiert. (Simons and Ikonen 1997; Brown and London 1998). Die Domänen sind reich an Glycosingolipiden und Cholesterin und enthalten Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine („GPI-anchors“). Neuere Studien belegen, dass auch die Amyloid-Vorläufer-Proteine als Transmembranproteine in „lipid rafts“ organisiert sind und dass vor allem die β -Sekretase-Spaltung hierdurch beeinflusst wird und eine wichtige Funktion bei der Generierung von A β hat (Hattori et al. 2006; Kim et al. 2006). Zudem wird die A β Oligomerisierung durch die Interaktion zwischen A β und Monosialogangliosid-Ansammlungen in „lipid rafts“ beschleunigt. Dies führt zur Bildung von A β gebundenem GM1 Gangliosid und letztendlich zur Aggregation des A β -Peptids zu Oligomeren (Zha et al. 2004; Wakabayashi et al. 2005; Matsuzaki et al. 2007). Zudem wird allgemein angenommen, dass bei erhöhten Cholesterinkonzentrationen in Membranen und die dadurch resultierende verminderte Membranfluidität die Spaltung von APP durch die β -Sekretase sterisch erleichtert wird. Dadurch wird die nicht-amyloide Prozessierung und die Sekretion von sAPP α stark vermindert.

Eine Simvastatin-vermittelte Protektion konnte in einer Studie von Johnson-Anuna et al. gezeigt belegt werden. Hier konnte ein Schutz vor A β -Toxizität in naiven SH-SY5Y Zellen nachgewiesen werden (Johnson-Anuna et al. 2007).

Eine Präinkubation mit Simvastatin in APP-überexprimierenden HEK293 Zellen bewirkte eine um etwa 25 % erhöhte Freisetzung von sAPP α nach 48 Stunden. In der Analyse der Caspase-3 Aktivität konnte Simvastatin in den hier durchgeführten Experimenten sowohl bei naiven Ratten PC12 Zellen als auch bei den Humanen SH-SY5Y Zellen eine verringerte

te Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden allerdings war dieser Effekt im Vergleich zu den Substanzen DHA und Galantamin sehr gering. Auch im Vergleich zu den bereits gezeigten protektiven Effekten durch die Behandlung mit rekombinantem sAPP α vor Thapsigargin-induzierter Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER war die hier maximal erreichte Protektion eher vernachlässigbar. Høglund et al. konnte zudem in einer dreijährigen Studie zeigen, dass Simvastatin zwar einen Effekt auf die Cholesterinspiegel zeigt, aber keinen Effekt auf die A β Level in Patienten mit Morbus Alzheimer (Høglund et al. 2005).

Neue Studien, zeigten vielversprechende Ergebnisse für eine durch Omega-3-Fettsäuren vermittelte Protektion. Die Etablierung eines in vitro Modells für die neuroprotektive Wirkung von Omega-3 Fettsäuren wurde bisher noch nicht publiziert, konnte aber hier erstmals erfolgreich etabliert werden. Einen erheblich größeren Effekt als bei den Statinen bewirkte die Präinkubation der Zellen mit DHA. In den naiven PC12 und SH-SY5Y Zellen konnte bereits bei niedrigen Konzentrationen eine signifikante Protektion nach Thapsigargin-induzierter Apoptose detektiert werden. Die protektiven Effekte blieben auch bei höheren Konzentrationen von 100 bis 200 μ M DHA vergleichbar hoch. Interessanterweise war die Wirkung in den APP-überexprimierenden Zelllinien PC12 und SH-SY5Y eine andere. Hier zeigte sich eine später einsetzende aber dafür bei höheren Konzentration (200 bis 250 μ M DHA) signifikante Protektion vor der Stress-induzierten Apoptose, die höher war als in den naiven Zelllinien. Eine Erklärung für das Ergebnis in den naiven Zelllinien wäre, dass sie im Vergleich zu den APP-überexprimierende Zelllinien weniger toxisches A β produzieren, so dass hier der Schutz ohne größere Nebeneffekte des A β -Peptids über eine erhöhte sAPP α Sekretion des natürlich vorhandenen APP Zellen laufen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DHA den anti-apoptotischen Akt-Pathway aktivieren kann und hierüber ebenfalls einen Beitrag zum Überleben von neuronalen Zellen beitragen kann (Akbar et al. 2005; Lukiw and Bazan 2006). In einem von Dr. Gunter Eckert (Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Universität Frankfurt) durchgeführten Experiment konnte zudem eine Steigerung der sAPP α Sekretion in SH-SY5Y APPwt durch die Behandlung mit der Omega-3 Fettsäure DHA belegt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Gunter Eckert, Daten nicht publiziert).

In Zellen mit APP Überexpression wird, wie auch in den naiven Zellen, immer ein gewisser Teil des membrangebundenen APP durch die β -Sekretase gespalten. Demzufolge ist die Produktion des A β -Peptids in diesen Zellen mit APP Überexpression erhöht (Kogel et al. 2003; Marques et al. 2003). Dies könnte hier die beobachtete Wirkung von DHA auf

die APPwt Zellen erklären, in denen erst bei sehr hohen Konzentrationen eine protektive Wirkung von DHA beobachtet werden konnte. Diese Daten sprechen dafür, dass bei einer erhöhten A β Konzentration auch die Konzentration an eingesetzten DHA gesteigert werden muß, um die toxischen Effekte von A β gänzlich zu eliminieren.

4.3 Ausblick

Die hier gezeigten Experimente deuten insgesamt auf eine sAPP α -vermittelte Schutzfunktion des Amyloid-Vorläufer-Proteins hin. Gezeigt wurde dies in naiven PC12 und SH-SY5Y sowie in den APP-überexprimierenden PC12 und SH-SY5Y Zellen.

Interessant wäre nun eine Untersuchung über die Wirkung von rekombinantem sAPP α in den Zelllinien PC12 APPsw und SH-SY5Y APPsw (Mullan et al. 1992; Kogel et al. 2003) Diese Zellen zeigen nach oxidativem Stress einen im Vergleich zu den APPwt Zellen erhöhten Zelltod. Nach der hier aufgestellten Hypothese sollte eine Inkubation mit exogen zugeführten rekombinanten sAPP α aus APP-überexprimierenden HEK293 Zellen in der Lage sein, auch APPsw Zellen potent vor zytotoxischem Stress zu schützen und die toxischen Effekte von A β -Peptiden zu antagonisieren.

Um den Galantamin-vermittelten Schutz vor Apoptose näher zu untersuchen und die Beteiligung des α 7 nAChR zu belegen, würde es hier anbieten die α 7-Rezeptoren mit α -Bungarotoxin und Methyllycaconitin spezifisch zu hemmen. Der Theorie nach sollte diese Hemmung erhöhte Caspase-3 Aktivität zur Folge haben. Interessant wäre auch eine Bestimmung der sAPP α -Sekretion und A β -Konzentration in den Galantaminvorbehandelten Zellen, da die Korrelation dieser Werte zusätzlichen Aufschluss über die funktionelle Wirkung von Galantamin geben würde. Eine Kombination der hier untersuchten pharmakologischen Substanzen würde zudem Auskunft darüber geben, ob die Substanzen die gleichen anti-apoptotischen Signalwege aktivieren bzw. dieselben toxischen Einflüsse, wie z.B. erhöhte A β Spiegel, auf die Zellen minimieren. Ein additiver Effekt der protektiven Eigenschaften durch die Kombination von pharmakologischen Substanzen könnte neue Ansatzpunkte für Therapien von Morbus Alzheimer liefern.

Die molekularen Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von sAPP α , Omega-3 Fettsäuren und Galantamin sind bisher weitgehend ungeklärt. Die Effekte der Omega-3 Fettsäuren, Statine und Galantamin auf die sAPP α Sekretion sollten zunächst für die

weiterführenden Versuche neben der Western-Blot-Analyse mittels ELISA quantifiziert werden, um die Ergebnisse der Neuroprotektion mit den Experimenten, in denen sAPP α direkt eingesetzt wurde, korrelieren zu können. Darüber hinaus wäre es auch sehr interessant, zu untersuchen, inwiefern sAPP α , Omega-3 Fettsäuren und Galantamin in der Lage sind, die Hyperphosphorylierung von Tau zu inhibieren und die Aktivierung der Stress-induzierten Tau-Kinasen JNK, GSK3 β and Cdk5 zu reduzieren bzw. aufzuheben.

Um die protektiven Effekte der pharmakologischen Substanzen zu etablieren und ihre Wirkungsweise genauer zu analysieren, wäre es zudem sinnvoll, die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Behandlungen vergleichend in hippocampalen Kulturen und in vivo Modellen durchzuführen. Daneben könnte man im Rahmen dieser Experimente die protektive Wirkung von sekretiertem sAPP α in hippocampalen Kulturen testen und auf die Aktivierung der oben genannten Stresskinasen untersuchen.

Als weiteren Beweis für die Annahme, dass die beobachtete Protektion in Omega-3 Fettsäure-, Statin- und Galantamin-behandelten Zellen auf eine Steigerung in der sAPP α Sekretion zurückzuführen ist, müsste die Aktivität der α -Sekretase durch einen spezifischen Inhibitor wie Batistamat gehemmt werden. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits ein Protokoll für den Knockdown von APP etabliert werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl die Inhibition der α -Sekretase als auch der Knockdown von endogenem APP sollte in der Lage sein, die Neuroprotektion zu vermindern bzw. aufzuheben.

5 Zusammenfassung

Das Amyloid-Vorläufer-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Entwicklung von Morbus Alzheimer. Hierbei ist die proteolytische Prozessierung von APP von entscheidender Bedeutung. Das Verhältnis von neurotoxischen und neuroprotektiven Spaltprodukten, die über den amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung gebildet werden, ist für das Überleben von Neuronen und die Resistenz gegen Stress-Stimuli von hoher Relevanz.

Störungen der Calcium-Homöostase sind ein bekanntes Phänomen bei Morbus Alzheimer. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von APP in der Regulation des neuronalen Zelltods nach Calcium-Freisetzung untersucht. Hierbei wurde das in den Kulturüberstand sekretierte sAPP α vor Applikation des Stress-Stimulus entfernt. Die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum wurde durch die Inhibition der sarko- und endoplasmatischen Calcium-ATPasen (SERCA) ausgelöst. Dies führt zur schnellen Induktion der sogenannten „unfolded protein response“ (UPR) und zu einer Aktivierung von der Effektor-Caspasen Aktivität. Für APP-überexprimierende PC12 Zellen konnte bereits zuvor eine im Vergleich zur Kontrolle nach durch Calcium-Freisetzung-induzierten Apoptose erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen nachgewiesen werden. Über die Messung der Aktivierung von Effektor-Caspasen konnte zudem ein gesteigerter Zelltod in den APP-überexprimierenden Zellen gemessen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der pro-apoptotische Transkriptionsfaktor CHOP, nicht aber die klassischen UPR-Zielgene spezifisch hochreguliert wurden. Die APP-modulierte gesteigerte Induktion von Apoptose nach Calcium-Freisetzung konnte durch Komplexierung der intrazellulären Calcium-Ionen und durch Knockdown von CHOP im Vergleich zur Kontrolle gänzlich unterdrückt werden. Ferner bewirkte die Inhibition der Speicher-aktivierten Calcium-Kanälen (SOCC) eine signifikante Unterdrückung der beobachteten erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration und der gesteigerten Apoptose in den APP-überexprimierenden PC12 Zellen. In diesem Teil der Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass APP in der Lage ist den durch Calcium-Freisetzung-induzierten Zelltod zu potenzieren. Diese Modulation durch APP verläuft in einer UPR-unabhängigen Reaktion über die Aktivierung von SOCCs, einer erhöhten Aufnahme von extrazellulärem Calcium und durch erhöhte Induktion des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die sAPP α -vermittelte Neuroprotektion untersucht. Dabei handelt es sich um die N-terminale Ektodomäne von APP, die über die Aktivität der α -Sekretase prozessiert wird und anschließend extrazellulär abgegeben wird. Ziel dieser Versuchsreihe war die neuroprotektive physiologische Funktion von APP im Hinblick auf den Schutz von neuronalen Zellen vor diversen für Morbus Alzheimer relevanten Stress-Stimuli bzw. Apoptose Stimuli zu untersuchen. Durch die Analyse der Effektor-Caspasen konnte gezeigt werden, dass sAPP α in der Lage ist PC12 Zellen potent vor oxidativem Stress, DNA-Schäden, Hypoxie, proteasomalem Stress und Calcium-Freisetzung zu schützen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sAPP α in der Lage ist den proapoptotischen Stress-induzierten JNK/Akt-Signalweg zu inhibieren. Eine Beteiligung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalwegs bei der sAPP α -vermittelten Protektion konnte über die Inhibition der PI3-Kinase ebenfalls demonstriert werden, denn die Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs bewirkte eine Aufhebung der sAPP α -vermittelte Neuroprotektion. Zusammenfassend konnte die für sAPP α postulierte Schutzfunktion vor pathophysiologisch relevanten Stress-Stimuli in neuronalen Zellen untermauert werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden drei verschiedenen Gruppen von pharmakologischen Substanzen auf ihre neuroprotektive Wirkung untersucht und mit ihren Effekten auf den APP-Metabolismus korreliert. Die Untersuchungen ergaben, dass Galantamin, ein schwacher Acetylcholinesterase Inhibitor und allosterisch potenzierender Ligand von nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren, in der Lage war, sowohl naive, als auch APP-überexprimierende Zelllinien potent vor dem Stress-induziertem Zelltod zu schützen. Zudem bewirkte Galantamin in APP-überexprimierende HEK293 Zellen eine rasche Erhöhung der sAPP α -Sekretion, so dass hier von einer Rezeptor-vermittelten Modulation des APP Metabolismus ausgegangen werden kann. Omega-3 Fettsäuren wirken sich positiv auf die Membranfluidität von Zellen aus und es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung des toxischen A β -Peptids hierdurch vermindert wird. Die Omega-3 Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) konnte neuronale Zellen mit und ohne APP Überexpression potent vor dem Stress-induziertem Zelltod schützen. Hierdurch konnte erstmal die neuroprotektive Wirkung von Omega-3 Fettsäuren im in vitro Modell erfolgreich etabliert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Akbar, M., F. Calderon, Z. Wen and H. Y. Kim (2005). "Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10858-63.
- Alexander, J. W. (1998). "Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids." Nutrition **14**(7-8): 627-33.
- Alzheimer (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." Allg. Zeitschr. Psychiatr. **64**: 146-148.
- Arias, E., E. Ales, N. H. Gabilan, M. F. Cano-Abad, M. Villarroya, A. G. Garcia and M. G. Lopez (2004). "Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors." Neuropharmacology **46**(1): 103-14.
- Arias, E., S. Gallego-Sandin, M. Villarroya, A. G. Garcia and M. G. Lopez (2005). "Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors." J Pharmacol Exp Ther **315**(3): 1346-53.
- Baiden-Amissah, K., U. Joashi, R. Blumberg, H. Mehmet, A. D. Edwards and P. M. Cox (1998). "Expression of amyloid precursor protein (beta-APP) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury." Neuropathol Appl Neurobiol **24**(5): 346-52.
- Barger, S. W. and M. P. Mattson (1996). "Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor." Brain Res Mol Brain Res **40**(1): 116-26.
- Barinaga, M. (1995). "Missing Alzheimer's gene found." Science **269**(5226): 917-8.
- Barnham, K. J., C. L. Masters and A. I. Bush (2004). "Neurodegenerative diseases and oxidative stress." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 205-14.
- Barthwal, M. K., P. Sathyanarayana, C. N. Kundu, B. Rana, A. Pradeep, C. Sharma, J. R. Woodgett and A. Rana (2003). "Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival." J Biol Chem **278**(6): 3897-902.
- Bartlett, J. D., J. D. Luethy, S. G. Carlson, S. J. Sollott and N. J. Holbrook (1992). "Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, gadd153. Ca²⁺ increases transcriptional activity and mRNA stability." J Biol Chem **267**(28): 20465-70.
- Behl, C. (2000). "Apoptosis and Alzheimer's disease." J Neural Transm **107**(11): 1325-44.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-27.
- Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning and D. W. Anderson (2001). "SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13681-6.
- Biedler, J. L., L. Helson and B. A. Spengler (1973). "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." Cancer Res **33**(11): 2643-52.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge and C. M. Peppiatt (2002). "2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release." Faseb J **16**(10): 1145-50.

- Bozyczko-Coyne, D., M. S. Saporito and R. L. Hudkins (2002). "Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **1**(1): 31-49.
- Braak, H., R. A. de Vos, E. N. Jansen, H. Bratzke and E. Braak (1998). "Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases." Prog Brain Res **117**: 267-85.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.
- Burton, T. R., A. Dibrov, T. Kashour and F. M. Amara (2002). "Anti-apoptotic wild-type Alzheimer amyloid precursor protein signaling involves the p38 mitogen-activated protein kinase/MEF2 pathway." Brain Res Mol Brain Res **108**(1-2): 102-20.
- Butterfield, D. A., B. Howard, S. Yatin, T. Koppal, J. Drake, K. Hensley, M. Aksenov, M. Aksenova, R. Subramaniam, S. Varadarajan, M. E. Harris-White, N. W. Pedigo, Jr. and J. M. Carney (1999). "Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease." Life Sci **65**(18-19): 1883-92.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-7.
- Buxbaum, J. D., G. Thinakaran, V. Koliatsos, J. O'Callahan, H. H. Slunt, D. L. Price and S. S. Sisodia (1998). "Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path." J Neurosci **18**(23): 9629-37.
- Cabrejo, L., L. Guyant-Marechal, A. Laquerriere, M. Vercelletto, F. De la Fourniere, C. Thomas-Anterion, C. Verny, F. Letournel, F. Pasquier, A. Vital, F. Checler, T. Frebourg, D. Campion and D. Hannequin (2006). "Phenotype associated with APP duplication in five families." Brain **129**(Pt 11): 2966-76.
- Calon, F., G. P. Lim, F. Yang, T. Morihara, B. Teter, O. Ubeda, P. Rostaing, A. Triller, N. Salem, Jr., K. H. Ashe, S. A. Frautschy and G. M. Cole (2004). "Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model." Neuron **43**(5): 633-45.
- Cao, X. and T. C. Sudhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." Science **293**(5527): 115-20.
- Carriere, A., M. C. Carmona, Y. Fernandez, M. Rigoulet, R. H. Wenger, L. Penicaud and L. Casteilla (2004). "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect." J Biol Chem **279**(39): 40462-9.
- Chen, M. and B. A. Yankner (1991). "An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types." Neurosci Lett **125**(2): 223-6.
- Cheng, G., Z. Yu, D. Zhou and M. P. Mattson (2002). "Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein." Exp Neurol **175**(2): 407-14.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg and D. J. Selkoe (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." Nature **360**(6405): 672-4.
- Copanaki, E., T. Schurmann, A. Eckert, K. Leuner, W. E. Muller, J. H. Prehn and D. Kogel (2007). "The amyloid precursor protein potentiates CHOP induction and cell death in response to ER Ca²⁺ depletion." Biochim Biophys Acta **1773**(2): 157-65.

- Daly, J. t., D. K. Lahiri, D. E. Justus and G. J. Kotwal (1998). "Detection of the membrane-retained carboxy-terminal tail containing polypeptides of the amyloid precursor protein in tissue from Alzheimer's disease brain." Life Sci **63**(23): 2121-31.
- Dawson, G. R., G. R. Seabrook, H. Zheng, D. W. Smith, S. Graham, G. O'Dowd, B. J. Bowery, S. Boyce, M. E. Trumbauer, H. Y. Chen, L. H. Van der Ploeg and D. J. Sirinathsinghji (1999). "Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein." Neuroscience **90**(1): 1-13.
- De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." Neuron **38**(1): 9-12.
- De Strooper, B., L. Umans, F. Van Leuven and H. Van Den Berghe (1993). "Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway." J Cell Biol **121**(2): 295-304.
- Dussmann, H., D. Kogel, M. Rehm and J. H. Prehn (2003). "Mitochondrial membrane permeabilization and superoxide production during apoptosis. A single-cell analysis." J Biol Chem **278**(15): 12645-9.
- Eckert, A., G. Eckert, A. Kastl, S. Leutner, S. Leutz, K. Schindowski, B. Steiner, M. Sych and W. Müller (1999). "Vom unaufhaltsamen Niedergang der Hirnzellen." Neurochemie bei Alzheimer **4**: 60-67.
- Eckert, A., B. Steiner, C. Marques, S. Leutz, H. Romig, C. Haass and W. E. Muller (2001). "Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation." J Neurosci Res **64**(2): 183-92.
- Eckert, G. P., N. J. Cairns, A. Maras, W. F. Gattaz and W. E. Muller (2000). "Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease." Dement Geriatr Cogn Disord **11**(4): 181-6.
- Eckert, G. P., W. G. Wood and W. E. Muller (2001). "Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes." J Neural Transm **108**(8-9): 1051-64.
- Eckert, G. P., W. G. Wood and W. E. Muller (2005). "Statins: drugs for Alzheimer's disease?" J Neural Transm **112**(8): 1057-71.
- Edbauer, D., M. Willem, S. Lammich, H. Steiner and C. Haass (2002). "Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)." J Biol Chem **277**(16): 13389-93.
- Eehalt, R., P. Keller, C. Haass, C. Thiele and K. Simons (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." J Cell Biol **160**(1): 113-23.
- Ellis, R. J. and S. M. Hemmingsen (1989). "Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures." Trends Biochem Sci **14**(8): 339-42.
- Engidawork, E., T. Gulesserian, B. C. Yoo, N. Cairns and G. Lubec (2001). "Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 84-93.
- Engvall, E. and P. Perlman (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-4.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure and P. J. Ward (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." Science **248**(4959): 1122-4.

- Esposito, L., L. Gan, G. Q. Yu, C. Essrich and L. Mucke (2004). "Intracellularly generated amyloid-beta peptide counteracts the antiapoptotic function of its precursor protein and primes proapoptotic pathways for activation by other insults in neuroblastoma cells." *J Neurochem* **91**(6): 1260-74.
- Estus, S., H. M. Tucker, C. van Rooyen, S. Wright, E. F. Brigham, M. Wogulis and R. E. Rydel (1997). "Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction." *J Neurosci* **17**(20): 7736-45.
- Fassbender, K., M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther and T. Hartmann (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5856-61.
- Florent, S., C. Malaplate-Armand, I. Youssef, B. Kriem, V. Koziel, M. C. Escanye, A. Fifre, I. Sponne, B. Leininger-Muller, J. L. Olivier, T. Pillot and T. Oster (2006). "Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers." *J Neurochem* **96**(2): 385-95.
- Furukawa, K., S. W. Barger, E. M. Blalock and M. P. Mattson (1996). "Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein." *Nature* **379**(6560): 74-8.
- Furukawa, K., B. L. Sopher, R. E. Rydel, J. G. Begley, D. G. Pham, G. M. Martin, M. Fox and M. P. Mattson (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.
- Ghribi, O., M. Y. Golovko, B. Larsen, M. Schrag and E. J. Murphy (2006). "Deposition of iron and beta-amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets." *J Neurochem* **99**(2): 438-49.
- Gibson Wood, W., G. P. Eckert, U. Igbavboa and W. E. Muller (2003). "Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1610**(2): 281-90.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." *Biochem Biophys Res Commun* **122**(3): 1131-5.
- Glomset, J. A. (2006). "Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes." *Sci STKE* **2006**(321): pe6.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* **349**(6311): 704-6.
- Goodman, Y. and M. P. Mattson (1994). "Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury." *Exp Neurol* **128**(1): 1-12.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2424-8.
- Gulow, K., D. Bienert and I. G. Haas (2002). "BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2443-52.

- Guo, Q., N. Robinson and M. P. Mattson (1998). "Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis." *J Biol Chem* **273**(20): 12341-51.
- Gyure, K. A., R. Durham, W. F. Stewart, J. E. Smialek and J. C. Troncoso (2001). "Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome." *Arch Pathol Lab Med* **125**(4): 489-92.
- Haass, C. (1996). "Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease." *Curr Opin Neurol* **9**(4): 254-9.
- Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." *Embo J* **23**(3): 483-8.
- Haass, C., A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." *J Biol Chem* **268**(5): 3021-4.
- Haass, C., E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung and D. J. Selkoe (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." *Nature* **357**(6378): 500-3.
- Haass, C., C. A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt and D. J. Selkoe (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." *Nat Med* **1**(12): 1291-6.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hartley, D. M., D. M. Walsh, C. P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1999). "Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons." *J Neurosci* **19**(20): 8876-84.
- Hartmann, H., A. Eckert and W. E. Muller (1993). "beta-Amyloid protein amplifies calcium signalling in central neurons from the adult mouse." *Biochem Biophys Res Commun* **194**(3): 1216-20.
- Hartmann, T., S. C. Bieger, B. Bruhl, P. J. Tienari, N. Ida, D. Allsop, G. W. Roberts, C. L. Masters, C. G. Dotti, K. Unsicker and K. Beyreuther (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides." *Nat Med* **3**(9): 1016-20.
- Hashimoto, M., S. Hossain and O. Shido (2006). "Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity." *Mol Cell Biochem* **293**(1-2): 1-8.
- Hashimoto, M., S. Hossain, T. Shimada, K. Sugioka, H. Yamasaki, Y. Fujii, Y. Ishibashi, J. Oka and O. Shido (2002). "Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats." *J Neurochem* **81**(5): 1084-91.
- Hattori, C., M. Asai, H. Onishi, N. Sasagawa, Y. Hashimoto, T. C. Saido, K. Maruyama, S. Mizutani and S. Ishiura (2006). "BACE1 interacts with lipid raft proteins." *J Neurosci Res* **84**(4): 912-7.
- Heber, S., J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rulicke, H. von Kretschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H. P. Lipp, D. P. Wolfer and U. Muller (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." *J Neurosci* **20**(21): 7951-63.
- Hensley, K., J. M. Carney, M. P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. F. Wu, R. A. Floyd and D. A. Butterfield (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3270-4.

- Herns, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretzschmar, S. Sisodia and U. Muller (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." *Embo J* **23**(20): 4106-15.
- Hoglund, K., K. M. Thelen, S. Syversen, M. Sjogren, K. von Bergmann, A. Wallin, E. Vanmechelen, H. Vanderstichele, D. Lutjohann and K. Blennow (2005). "The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease." *Dement Geriatr Cogn Disord* **19**(5-6): 256-65.
- Hussein, A. S., M. E. Grigg and M. E. Selkirk (1999). "Nippostrongylus brasiliensis: characterisation of a somatic amphiphilic acetylcholinesterase with properties distinct from the secreted enzymes." *Exp Parasitol* **91**(2): 144-50.
- Jendroska, K., O. M. Hoffmann and S. Patt (1997). "Amyloid beta peptide and precursor protein (APP) in mild and severe brain ischemia." *Ann N Y Acad Sci* **826**: 401-5.
- Johnson-Anuna, L. N., G. P. Eckert, C. Franke, U. Igbavboa, W. E. Muller and W. G. Wood (2007). "Simvastatin protects neurons from cytotoxicity by up-regulating Bcl-2 mRNA and protein." *J Neurochem* **101**(1): 77-86.
- Jousse, C., C. Deval, A. C. Maurin, L. Parry, Y. Cherasse, C. Chaveroux, R. Lefloch, P. Lenormand, A. Bruhat and P. Fournoux (2007). "TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway." *J Biol Chem* **282**(21): 15851-61.
- Kalaria, R. N. (2000). "The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **21**(2): 321-30.
- Kalvodova, L., N. Kahya, P. Schwille, R. Ehehalt, P. Verkade, D. Drechsel and K. Simons (2005). "Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro." *J Biol Chem* **280**(44): 36815-23.
- Kamal, A., G. B. Stokin, Z. Yang, C. H. Xia and L. S. Goldstein (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.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-6.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev* **13**(10): 1211-33.
- Kawasumi, M., Y. Hashimoto, T. Chiba, K. Kanekura, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, H. Tajima, T. Niikura and I. Nishimoto (2002). "Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults." *Neurosignals* **11**(5): 236-50.
- Keller, J. N., K. B. Hanni and W. R. Markesbery (2000). "Impaired proteasome function in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **75**(1): 436-9.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Khachaturian, Z. S. (1985). "Progress of research on Alzheimer's disease. Research opportunities for behavioral scientists." *Am Psychol* **40**(11): 1251-5.
- Kim, S. I., J. S. Yi and Y. G. Ko (2006). "Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts." *J Cell Biochem* **99**(3): 878-89.
- Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette and D. J. Selkoe (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." *J Biol Chem* **276**(43): 40288-92.

- Kirsch, C., G. P. Eckert, A. R. Koudinov and W. E. Muller (2003). "Brain cholesterol, statins and Alzheimer's Disease." *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 2**: S113-9.
- Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri and H. Ito (1988). "Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity." *Nature* **331**(6156): 530-2.
- Kitamura, Y., S. Shimohama, W. Kamoshima, T. Ota, Y. Matsuoka, Y. Nomura, M. A. Smith, G. Perry, P. J. Whitehouse and T. Taniguchi (1998). "Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease." *Brain Res* **780**(2): 260-9.
- Kogel, D., R. Schomburg, E. Copanaki and J. H. Prehn (2005). "Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway." *Cell Death Differ* **12**(1): 1-9.
- Kogel, D., R. Schomburg, T. Schurmann, C. Reimertz, H. G. König, M. Poppe, A. Eckert, W. E. Muller and J. H. Prehn (2003). "The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." *J Neurochem* **87**(1): 248-56.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz and F. Fahrenholz (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.
- Koo, E. H. (2002). "The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog?" *Traffic* **3**(11): 763-70.
- Koo, E. H., S. S. Sisodia, D. R. Archer, L. J. Martin, A. Weidemann, K. Beyreuther, P. Fischer, C. L. Masters and D. L. Price (1990). "Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1561-5.
- Koo, E. H., S. S. Sisodia, L. C. Cork, A. Unterbeck, R. M. Bayney and D. L. Price (1990). "Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates." *Neuron* **4**(1): 97-104.
- Kromann, N. and A. Green (1980). "Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974." *Acta Med Scand* **208**(5): 401-6.
- 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.
- LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **8**(7): 499-509.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass and F. Fahrenholz (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.
- Lee, A. S. (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." *Trends Biochem Sci* **26**(8): 504-10.
- Leissring, M. A., M. P. Murphy, T. R. Mead, Y. Akbari, M. C. Sugarman, M. Jannatipour, B. Anliker, U. Muller, P. Saftig, B. De Strooper, M. S. Wolfe, T. E. Golde and F. M. LaFerla (2002). "A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4697-702.
- Lenzken, S. C., C. Lanni, S. Govoni, A. Lucchelli, G. Schettini and M. Racchi (2007). "Nicotinic component of galantamine in the regulation of amyloid precursor protein processing." *Chem Biol Interact* **165**(2): 138-45.

- Lichtenthaler, S. F. and C. Haass (2004). "Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **113**(10): 1384-7.
- Lu, D. C., S. Rabizadeh, S. Chandra, R. F. Shayya, L. M. Ellerby, X. Ye, G. S. Salvesen, E. H. Koo and D. E. Bredesen (2000). "A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor." Nat Med **6**(4): 397-404.
- Lukiw, W. J. and N. G. Bazan (2006). "Survival signalling in Alzheimer's disease." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1277-82.
- Luo, J. J., M. S. Wallace, D. B. Hawver, J. W. Kusiak and W. C. Wallace (2001). "Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein." J Neurosci Res **63**(5): 410-20.
- Maelicke, A., A. Schratzenholz and H. Schroder (1995). "Modulatory control by non-competitive agonists of nicotinic cholinergic neurotransmission in the central nervous system." Seminars in Neuroscience Volume 7 (Number 2): 103-114(12).
- Mandelkow, E. (1999). "Alzheimer's disease. The tangled tale of tau." Nature **402**(6762): 588-9.
- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding and D. Ron (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Genes Dev **18**(24): 3066-77.
- Mark, R. J., K. Hensley, D. A. Butterfield and M. P. Mattson (1995). "Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death." J Neurosci **15**(9): 6239-49.
- Marlow, L., M. Cain, M. A. Pappolla and K. Sambamurti (2003). "Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP)." J Mol Neurosci **20**(3): 233-9.
- Marques, C. A., U. Keil, A. Bonert, B. Steiner, C. Haass, W. E. Muller and A. Eckert (2003). "Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway." J Biol Chem **278**(30): 28294-302.
- Masliah, E., M. Mallory, M. Alford, S. Tanaka and L. A. Hansen (1998). "Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **57**(11): 1041-52.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-9.
- Matsuda, S., T. Yasukawa, Y. Homma, Y. Ito, T. Niihara, T. Hiraki, S. Hirai, S. Ohno, Y. Kita, M. Kawasumi, K. Kouyama, T. Yamamoto, J. M. Kyriakis and I. Nishimoto (2001). "c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK." J Neurosci **21**(17): 6597-607.
- Matsuzaki, K., T. Noguch, M. Wakabayashi, K. Ikeda, T. Okada, Y. Ohashi, M. Hoshino and H. Naiki (2007). "Inhibitors of amyloid beta-protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes." Biochim Biophys Acta **1768**(1): 122-30.
- Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-132.
- Mattson, M. P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(2): 120-9.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-9.

- Mattson, M. P. and S. L. Chan (2003). "Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease." Cell Calcium **34**(4-5): 385-97.
- Mattson, M. P., B. Cheng, A. R. Culwell, F. S. Esch, I. Lieberburg and R. E. Rydel (1993). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein." Neuron **10**(2): 243-54.
- Mattson, M. P., B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg and R. E. Rydel (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." J Neurosci **12**(2): 376-89.
- Mattson, M. P., Q. Guo, K. Furukawa and W. A. Pedersen (1998). "Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease." J Neurochem **70**(1): 1-14.
- Mattson, M. P., Z. H. Guo and J. D. Geiger (1999). "Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism." J Neurochem **73**(2): 532-7.
- McNaught, K. S. and P. Jenner (2001). "Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease." Neurosci Lett **297**(3): 191-4.
- Meng, L., R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin and C. M. Crews (1999). "Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo anti-inflammatory activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10403-8.
- Merritt, J. E., W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores and T. J. Rink (1990). "SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry." Biochem J **271**(2): 515-22.
- Mielke, K., A. Damm, D. D. Yang and T. Herdegen (2000). "Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in different neural cell lines." Brain Res Mol Brain Res **75**(1): 128-37.
- Minopoli, G., P. de Candia, A. Bonetti, R. Faraonio, N. Zambrano and T. Russo (2001). "The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation." J Biol Chem **276**(9): 6545-50.
- Misonou, H., M. Morishima-Kawashima and Y. Ihara (2000). "Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells." Biochemistry **39**(23): 6951-9.
- Monk, C. S., S. J. Webb and C. A. Nelson (2001). "Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change." Dev Neuropsychol **19**(2): 211-36.
- Mori, C., E. T. Spooner, K. E. Wisniewsk, T. M. Wisniewski, H. Yamaguch, T. C. Saido, D. R. Tolan, D. J. Selkoe and C. A. Lemere (2002). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain." Amyloid **9**(2): 88-102.
- Morley, J. E., S. A. Farr, V. B. Kumar and W. A. Banks (2002). "Alzheimer's disease through the eye of a mouse. Acceptance lecture for the 2001 Gayle A. Olson and Richard D. Olson prize." Peptides **23**(3): 589-99.
- Morris, R. G. (2003). "Long-term potentiation and memory." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 643-7.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad and L. Lannfelt (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." Nat Genet **1**(5): 345-7.
- Muller, T., C. G. Concannon, M. W. Ward, C. M. Walsh, A. L. Tirniceriu, F. Tribl, D. Kogel, J. H. Prehn and R. Egensperger (2007). "Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)." Mol Biol Cell **18**(1): 201-10.
- Muller, U. and S. Kins (2002). "APP on the move." Trends Mol Med **8**(4): 152-5.

- Muller, W. E., G. P. Eckert, K. Scheuer, N. J. Cairns, A. Maras and W. F. Gattaz (1998). "Effects of beta-amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A beta 1-42 and A beta 1-43." Amyloid **5**(1): 10-5.
- Murrell, J., M. Farlow, B. Ghetti and M. D. Benson (1991). "A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease." Science **254**(5028): 97-9.
- Nagele, R. G., M. R. D'Andrea, W. J. Anderson and H. Y. Wang (2002). "Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease." Neuroscience **110**(2): 199-211.
- Nagy, Z., M. M. Esiri, K. A. Jobst, J. H. Morris, E. M. King, B. McDonald, S. Litchfield, A. Smith, L. Barnetson and A. D. Smith (1995). "Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria." Dementia **6**(1): 21-31.
- Neve, R. L., D. L. McPhie and Y. Chen (2000). "Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1)." Brain Res **886**(1-2): 54-66.
- Nilsson, T., K. Malkiewicz, M. Gabrielson, R. Folkesson, B. Winblad and E. Benedikz (2006). "Antibody-bound amyloid precursor protein upregulates ornithine decarboxylase expression." Biochem Biophys Res Commun **341**(4): 1294-9.
- Nitsch, R. M., S. A. Farber, J. H. Growdon and R. J. Wurtman (1993). "Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5191-3.
- Nitsch, R. M., B. E. Slack, S. A. Farber, P. R. Borghesani, J. G. Schulz, C. Kim, C. C. Felder, J. H. Growdon and R. J. Wurtman (1993). "Receptor-coupled amyloid precursor protein processing." Ann N Y Acad Sci **695**: 122-7.
- Nordberg, A. and A. L. Svensson (1998). "Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology." Drug Saf **19**(6): 465-80.
- Oddo, S., L. Billings, J. P. Kesslak, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla (2004). "A beta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome." Neuron **43**(3): 321-32.
- Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki and H. Hayashi (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." Embo J **24**(6): 1243-55.
- Ord, D. and T. Ord (2003). "Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity." Exp Cell Res **286**(2): 308-20.
- Ord, D. and T. Ord (2005). "Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions." Biochem Biophys Res Commun **330**(1): 210-8.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-65.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-9.
- Paschen, W. and T. Mengesdorf (2005). "Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration." Cell Calcium **38**(3-4): 409-15.
- Patil, C. and P. Walter (2001). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 349-55.
- Paz Gavilan, M., J. Vela, A. Castano, B. Ramos, J. C. del Rio, J. Vitorica and D. Ruano (2006). "Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus." Neurobiol Aging **27**(7): 973-82.

- Pereira, E. F., C. Hilmas, M. D. Santos, M. Alkondon, A. Maelicke and E. X. Albuquerque (2002). "Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors." J Neurobiol **53**(4): 479-500.
- Pereira, E. F., S. Reinhardt-Maelicke, A. Schratzenholz, A. Maelicke and E. X. Albuquerque (1993). "Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons." J Pharmacol Exp Ther **265**(3): 1474-91.
- Pogocki, D. (2003). "Alzheimer's beta-amyloid peptide as a source of neurotoxic free radicals: the role of structural effects." Acta Neurobiol Exp (Wars) **63**(2): 131-45.
- Ponte, P., P. Gonzalez-DeWhitt, J. Schilling, J. Miller, D. Hsu, B. Greenberg, K. Davis, W. Wallace, I. Lieberburg and F. Fuller (1988). "A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors." Nature **331**(6156): 525-7.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenue, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." J Clin Invest **113**(10): 1456-64.
- Rebeck, G. W., J. S. Reiter, D. K. Strickland and B. T. Hyman (1993). "Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions." Neuron **11**(4): 575-80.
- Recuero, M., E. Serrano, M. J. Bullido and F. Valdivieso (2004). "Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP." FEBS Lett **570**(1-3): 114-8.
- Riddell, D. R., G. Christie, I. Hussain and C. Dingwall (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts." Curr Biol **11**(16): 1288-93.
- Ron, D. and J. F. Habener (1992). "CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription." Genes Dev **6**(3): 439-53.
- Roth, K. A. (2001). "Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion." J Neuropathol Exp Neurol **60**(9): 829-38.
- Rovelet-Lecrux, A., T. Frebourg, H. Tuominen, K. Majamaa, D. Campion and A. M. Remes (2007). "APP locus duplication in a Finnish family with dementia and intracerebral haemorrhage." J Neurol Neurosurg Psychiatry.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerriere, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg and D. Campion (2006). "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." Nat Genet **38**(1): 24-6.
- Saiki, R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson and H. A. Erlich (1989). "Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6230-4.
- Saitoh, T., M. Sundsmo, J. M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf and D. B. Schenk (1989). "Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts." Cell **58**(4): 615-22.
- Sandbrink, R., C. L. Masters and K. Beyreuther (1994). "Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins." J Biol Chem **269**(19): 14227-34.
- Santos, M. D., M. Alkondon, E. F. Pereira, Y. Aracava, H. M. Eisenberg, A. Maelicke and E. X. Albuquerque (2002). "The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system." Mol Pharmacol **61**(5): 1222-34.

- Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M. M. Condrón, D. B. Teplow and C. Haass (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch." *EMBO Rep* **2**(9): 835-41.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts and et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* **43**(8): 1467-72.
- Scheinfeld, M. H., R. Roncarati, P. Vito, P. A. Lopez, M. Abdallah and L. D'Adamio (2002). "Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP)." *J Biol Chem* **277**(5): 3767-75.
- Schmechel, D. E., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, B. J. Crain, C. M. Hulette, S. H. Joo, M. A. Pericak-Vance, D. Goldgaber and A. D. Roses (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9649-53.
- Schneider, I., D. Reverse, I. Dewachter, L. Ris, N. Caluwaerts, C. Kuiperi, M. Gilis, H. Geerts, H. Kretschmar, E. Godaux, D. Moechars, F. Van Leuven and J. Herms (2001). "Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation." *J Biol Chem* **276**(15): 11539-44.
- Schrattenholz, A., E. F. Pereira, U. Roth, K. H. Weber, E. X. Albuquerque and A. Maelicke (1996). "Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands." *Mol Pharmacol* **49**(1): 1-6.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." *Mutat Res* **569**(1-2): 29-63.
- Schubert, D. and C. Behl (1993). "The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix." *Brain Res* **629**(2): 275-82.
- Schubert, D., L. W. Jin, T. Saitoh and G. Cole (1989). "The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion." *Neuron* **3**(6): 689-94.
- Schubert, W., R. Prior, A. Weidemann, H. Dirksen, G. Multhaup, C. L. Masters and K. Beyreuther (1991). "Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites." *Brain Res* **563**(1-2): 184-94.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." *Genes Dev* **17**(1): 7-30.
- Selkoe, D. J. (1994). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 373-403.
- Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." *Nature* **399**(6738 Suppl): A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**(2): 741-66.
- Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* **298**(5594): 789-91.
- Selkoe, D. J. and M. B. Podlisny (2002). "Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 67-99.
- Selkoe, D. J., M. B. Podlisny, C. L. Joachim, E. A. Vickers, G. Lee, L. C. Fritz and T. Oltersdorf (1988). "Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as

- 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7341-5.
- Selkoe, D. J., T. Yamazaki, M. Citron, M. B. Podlisny, E. H. Koo, D. B. Teplow and C. Haass (1996). "The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein." *Ann N Y Acad Sci* **777**: 57-64.
- Selznick, L. A., T. S. Zheng, R. A. Flavell, P. Rakic and K. A. Roth (2000). "Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent." *J Neuro-pathol Exp Neurol* **59**(4): 271-9.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal and et al. (1993). "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide." *Nature* **361**(6409): 260-3.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman and et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-60.
- Shoji, M., T. E. Golde, J. Ghiso, T. T. Cheung, S. Estus, L. M. Shaffer, X. D. Cai, D. M. McKay, R. Tintner, B. Frangione and et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science* **258**(5079): 126-9.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-72.
- Simons, M., F. Schwarzler, D. Lutjohann, K. von Bergmann, K. Beyreuther, J. Dichgans, H. Wormstall, T. Hartmann and J. B. Schulz (2002). "Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial." *Ann Neurol* **52**(3): 346-50.
- Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue and V. John (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* **402**(6761): 537-40.
- Sinha, S., H. F. Dovey, P. Seubert, P. J. Ward, R. W. Blacher, M. Blaber, R. A. Bradshaw, M. Arici, W. C. Mobley and I. Lieberburg (1990). "The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." *J Biol Chem* **265**(16): 8983-5.
- Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6075-9.
- Sisodia, S. S. (2002). "Biomedicine. A cargo receptor mystery APParently solved?" *Science* **295**(5556): 805-7.
- Skovronsky, D. M., D. B. Moore, M. E. Milla, R. W. Doms and V. M. Lee (2000). "Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network." *J Biol Chem* **275**(4): 2568-75.
- Slegers, K., N. Brouwers, I. Gijssels, J. Theuns, D. Goossens, J. Wauters, J. Dele-Favero, M. Cruts, C. M. van Duijn and C. Van Broeckhoven (2006). "APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy." *Brain* **129**(Pt 11): 2977-83.
- Smith, I. F., B. Hitt, K. N. Green, S. Oddo and F. M. LaFerla (2005). "Enhanced caffeine-induced Ca²⁺ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **94**(6): 1711-8.
- Song, S. and Y. K. Jung (2004). "Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system." *Trends Mol Med* **10**(11): 565-70.

- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen and A. D. Roses (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1977-81.
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag.
- Su, J. H., A. J. Anderson, B. J. Cummings and C. W. Cotman (1994). "Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease." *Neuroreport* **5**(18): 2529-33.
- Sun, X., G. He, H. Qing, W. Zhou, F. Dobie, F. Cai, M. Staufenbiel, L. E. Huang and W. Song (2006). "Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(49): 18727-32.
- Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thirakaran and T. Iwatsubo (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." *Nature* **422**(6930): 438-41.
- Tamagno, E., G. Robino, A. Obbili, P. Bardini, M. Aragno, M. Parola and O. Danni (2003). "H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK." *Exp Neurol* **180**(2): 144-55.
- Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." *Science* **235**(4791): 880-4.
- Tanzi, R. E., A. I. McClatchey, E. D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J. F. Gusella and R. L. Neve (1988). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease." *Nature* **331**(6156): 528-30.
- Thastrup, O. (1990). "Role of Ca²⁺-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺-ATPase inhibitor, thapsigargin." *Agents Actions* **29**(1-2): 8-15.
- Theuns, J., N. Brouwers, S. Engelborghs, K. Sleegers, V. Bogaerts, E. Corsmit, T. De Pooter, C. M. van Duijn, P. P. De Deyn and C. Van Broeckhoven (2006). "Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease." *Am J Hum Genet* **78**(6): 936-46.
- Thomas, P. and M. Fenech (2007). "A review of genome mutation and Alzheimer's disease." *Mutagenesis* **22**(1): 15-33.
- Thornton, E., R. Vink, P. C. Blumbergs and C. Van Den Heuvel (2006). "Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats." *Brain Res* **1094**(1): 38-46.
- Thorsett, E. D. and L. H. Latimer (2000). "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease." *Curr Opin Chem Biol* **4**(4): 377-82.
- Toescu, E. C., A. Verkhratsky and P. W. Landfield (2004). "Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging." *Trends Neurosci* **27**(10): 614-20.
- Tseng, B. P., K. N. Green, J. L. Chan, M. Blurton-Jones and F. M. Laferla (2007). "Aβ inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation." *Neurobiol Aging*.
- Tun, H., L. Marlow, I. Pinnix, R. Kinsey and K. Sambamurti (2002). "Lipid rafts play an important role in Aβ biogenesis by regulating the beta-secretase pathway." *J Mol Neurosci* **19**(1-2): 31-5.
- Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers and M. Citron (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's

- amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-41.
- Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui and R. F. Brown (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J Biol Chem **269**(7): 5241-8.
- von Koch, C. S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. van der Ploeg, D. L. Price and S. S. Sisodia (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." Neurobiol Aging **18**(6): 661-9.
- Wakabayashi, M., T. Okada, Y. Kozutsumi and K. Matsuzaki (2005). "GM1 ganglioside-mediated accumulation of amyloid beta-protein on cell membranes." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 1019-23.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-9.
- Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." Neuron **44**(1): 181-93.
- Wang, X. Z., B. Lawson, J. W. Brewer, H. Zinszner, A. Sanjay, L. J. Mi, R. Boorstein, G. Kreibich, L. M. Hendershot and D. Ron (1996). "Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)." Mol Cell Biol **16**(8): 4273-80.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi and F. Solomon (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10758-62.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M. D. Paradis, D. M. Romano, S. S. Sisodia, B. T. Hyman, R. L. Neve and R. E. Tanzi (1993). "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor." Nat Genet **5**(1): 95-100.
- Webster, N. J., K. N. Green, C. Peers and P. F. Vaughan (2002). "Altered processing of amyloid precursor protein in the human neuroblastoma SH-SY5Y by chronic hypoxia." J Neurochem **83**(6): 1262-71.
- Webster, N. J., K. N. Green, V. J. Settle, C. Peers and P. F. Vaughan (2004). "Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways." Brain Res Mol Brain Res **130**(1-2): 161-9.
- Weller, M., J. B. Schulz, U. Wullner, P. A. Loschmann, T. Klockgether and J. Dichgans (1997). "Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death." J Neural Transm Suppl **50**: 115-23.
- Yang, F., X. Sun, W. Beech, B. Teter, S. Wu, J. Sigel, H. V. Vinters, S. A. Frautschy and G. M. Cole (1998). "Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease." Am J Pathol **152**(2): 379-89.
- Yokota, M., T. C. Saido, E. Tani, I. Yamaura and N. Minami (1996). "Cytotoxic fragment of amyloid precursor protein accumulates in hippocampus after global forebrain ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **16**(6): 1219-23.
- Yoshikai, S., H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya and Y. Sakaki (1990). "Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene." Gene **87**(2): 257-63.
- Zha, Q., Y. Ruan, T. Hartmann, K. Beyreuther and D. Zhang (2004). "GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein." Mol Psychiatry **9**(10): 946-52.

-
- Zheng, H., M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, G. R. Dawson, S. Boyce, M. W. Conner, K. A. Stevens, H. H. Slunt, S. S. Sisoda, H. Y. Chen and L. H. Van der Ploeg (1995). "beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." Cell **81**(4): 525-31.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Mol Neurodegener **1**: 5.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt habe.

Mainz, im August 2007

Ekaterini Copanaki