"Relevanz der Methioninoxidation aus evolutionärer Sicht und im akuten oxidativen Stressmodell der Alzheimerschen Krankheit"

Dissertation

zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

> ALINE BENDER geb. in Frankfurt am Main

> > Mainz, 2008

Dekan:

- 1. Berichterstatter:
- 2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2009

1	Einle	eitung	1
	11	Oxidativer Stress	1
	111	Sauerstoff und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	1
	1.1.2	2 Die mitochondriale Atmungskette und ROS.	
	1.1.3	3 Antioxidative Verteidigungssysteme	6
	1.1.4	Proteinoxidation	9
	1.2	Die Alzheimersche Krankheit	
	1.2.1	Pathologie	
	1.2.2	2 APP-Prozessierung	
	1.2.3	3 Genetische Risikofaktoren	
	1.2.4	4 Proteinoxidation	
	1.2.5	5 Aβ-Toxizität	
	1.3	Tiermodelle der Alzheimerschen Krankheit	
	1.4	Fragestellung	
2	Mate	erial	
	21	Chemikalien	24
	2.1	Antikörner	24
	2.2	Geräte	24
	2.5	Weitere Verbrauchsmaterialien	25
	2.4	Fnzyme	25
	2.6	Oligonukleotide	25
	2.7	Klonale Zellen	26
	2.8	Primäre Zellen	26
	29	Transgene Mäuse	26
	2.10	Spezialfutter	
	2.11	Lösungen und Medien für die Zellkultur	
	2.12	Puffer und Lösungen	
3	Meth	hoden	
	2 1	Zelllaultur	20
	5.I 2.1.1	Lefikultul Klonala Zalllinian	
	3.1.1	Primärkultur von embryonalen Mittelhirn Neuronen aus der Patte	30
	3.1.2	Restimming der Zellzehl	
	3.1.2	Jangzeit-Fütterungsversuche mit dem Alzheimer-Mausmodell APP23	31
	321	Analyse der APP23-Mäuse nach zwölf Monaten	32
	327	Perfusion	32
	323	3 Anfertigung von Gefrierschnitten	32
	324	4 Entrahme nicht-fixierten Gewebes für die Proteinbiochemie	33
	33	Analytik	33
	3.3.1	DNA-spezifische Techniken	
	3.	3.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA	
	3.	3.1.2 Natriumacetat-Fällung von DNA	
	3.	3.1.3 PCR-Amplifikation von DNA	
	3.	3.1.4 DNA- Gelelektrophorese	
	3.	3.1.5 Quantifizierung von DNA	
	3.3.2	2 Protein-spezifische Techniken	
	3.	3.2.1 Protein-Isolation	
	3.	3.2.2 Protein-Quantifizierung	
	3.	3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
	3.	3.2.4 Western-Blot	
	3.	3.2.5 Immunologischer Protein-Nachweis auf Western-Blot-Ebene	

	3.3.3 Histologische Analyse	36
	3.3.3.1 Hämatoxylin/Kongorot-Färbung	36
	3.3.4 Sonstige Assays	37
	3.3.4.1 MTT Zellviabilitäts-Assay	37
	3.3.4.2 DCFA- Assay zur endogenen Peroxidbestimmung/Oxidationsmessung	38
	3.3.5 in silico-Analysen/Bioinformatik	38
	3.3.5.1 Auswahlkriterien für die analysierten Spezies	38
	3.3.5.2 Struktur-Modellierung	39
	3.3.6 Chemische Synthesen	39
4	Ergebnisse	40
	4.1 Untersuchung der antioxidativen Kapazität von Methionin	40
	4.1.1 Bioinformatische Analysen	40
	4.1.1.1 Vergleich des Methioningehalts kern- und mitochondrial kodierter	
	Proteome	40
	4.1.1.2 Analyse der Methionin-Codon-Nutzung in den Methionin-	
	akkumulierenden Spezies	42
	4.1.1.3 Strukturelle Konsequenz der Akkumulation von Methionin	45
	4.1.1.4 Suche nach MSR-Sequenzen in Zwei-Codon-Nutzern	48
	4.1.2 Analyse in lebenden Zellen	48
	4.1.2.1 Antioxidative Kapazität von Modellstrukturen von Methionin und	
	Isoleucin	48
	4.2 Induktion von oxidativem Stress in dem transgenen Alzheimer-Mausmodell	
	APP23	51
	4.2.1 Auswirkung des Selenmangels auf die GPx4-Expression	53
	4.2.2 Einfluß der Selenderizienz auf die Plaquebelastung	54
F	4.2.3 Einfluß der Selendefizienz auf die Neuronenmorphologie	5/
3	Diskussion	39
	5.1 Evolution eines alternativen genetischen Codes als Adaption an oxidativen Stress	59
	5.1.1 Akkumulation von Methionin in mitochondrial kodierten Proteinen betrifft	
	viele Tiere und einige Pilze	59
	5.1.2 Methioninakkumulation spricht gegen einen neutralen Mechanismus zur	
	Entstehung alternativer genetischer Codes	60
	5.1.3 Methioninreiche Atmungskettenkomplexe als antioxidative	
	Verteidigungsstrategie	62
	5.1.3.1 Methioninakkumulation betrifft die Proteinoberfläche	62
	5.1.3.2 Methioninakkumulierende Zwei-Codon-Nutzer besitzen Enzyme zur	
	Methionin-Reparatur	62
	5.1.3.3 Methionin-Modellsubstanz schützt eukaryontische Zellen vor oxidativem	
	Stress	63
	5.2 Auswirkungen einer in vivo-Antioxidantien-Depletion im transgenen familiären	
	Alzheimer-Mausmodell APP23	63
	5.2.1 Die Selenkonzentration läßt sich durch die selendefiziente Diät	
	gewebespezifisch verringern	64
	5.2.2 Die Histopathologie ist durch den Selenmangel nicht beschleunigt	65
	5.2.3 Die Rolle von senilen Plaques in der Alzheimer-assoziierten Neuropathologie	<u> </u>
	1st unklar	67
r	3.3 Akutes Stressmodell versus Evolution 7.3 Akutes Stressmodell versus Evolution	68
0	Zusammentassung	09
7	Abstract	70

8	Literatur	71
9	Eigene Publikationen	
	Abkürzungsverzeichnis	
	MSR-Sequenzanalyse	

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress

1.1.1 Sauerstoff und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoff ist für Aerobier lebenswichtig, da sie ihre Energie in Form von ATP durch die Oxidation von Substraten wie Kohlenhydrate und Fettsäuren gewinnen, wobei Sauerstoff schrittweise zu Wasser reduziert wird. Bei einer unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs kommt es jedoch zur Bildung von toxischen Radikalen, wodurch Nukleinsäuren, Lipide und Proteine in allen Geweben der Aerobier einer ständigen basalen Schädigung durch Oxidation ausgesetzt sind (Halliwell und Whiteman 2004). Im gesunden Aerobier besteht eine Balance zwischen der Produktion von sogenannten "reaktiven Sauerstoffspezies" (ROS) und der Aktivität antioxidativer Schutzmechanismen.

Das diatomare Sauerstoffmolekül (O₂) ist das wichtigste terminale Oxidans in aeroben Organismen. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften kann O₂ nur ein Elektron auf einmal aufnehmen. Wenn ein Elektron mit O₂ reagiert, bildet es mit einem der beiden ungepaarten Elektronen des Sauerstoffmoleküls ein Paar, wodurch das Superoxidradikal (Superoxidanion, O₂⁻) entsteht.

$$O_2$$
 Ein-Elektronen-Reduktion O_2

Die Zugabe von einem weiteren Elektron führt formal zu $O_2^{2^-}$, dem Peroxidion. Durch die Addition von zwei Elektronen zum Peroxidion geht die Bindungskapazität der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung verloren und es entstehen zwei Oxid-Ionen (O^{2^-}). In der Zelle ist das Zwei-Elektronen-Reduktions-Produkt von O_2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2), und das Produkt der Vier-Elektronen-Reduktion ist H_2O .

$$\begin{array}{ccc}
O_2 & Zwei-Elektronen-Reduktion (+2H^+) \\
O_2 & Vier-Elektronen-Reduktion (+4H^+) \\
\end{array} \xrightarrow{} \begin{array}{c}
H_2O_2 \text{ (protonierte Form von } O_2^{2^-}) \\
2H_2O \text{ (protonierte Form von } O_2^{2^-})
\end{array}$$

Zwei- oder Vier-Elektronen-Reduktionen von O_2 finden in der Zelle durch sukzessiv ablaufende Ein-Elektronen-Reduktionen statt, die von Enzymen katalysiert werden, welche, wie die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette, redoxaktive Cofaktoren wie Eisen und Kupfer in ihren aktiven Zentren besitzen. So wird mehr als 80% des molekularen Sauerstoffs, der vom menschlichen Körper aufgenommen wird, von der mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) verwendet, die aus einem O₂-Molekül durch eine Vier-Elektronen-Reduktion zwei Moleküle Wasser generiert (siehe Kapitel 1.1.2). Durch die so genannte Fenton-Reaktion kann Wasserstoffperoxid *in vivo* mit freien Übergangsmetallen zu dem hochreaktiven Hydroxylradikal (·OH) reagieren (Halliwell 1984; 1992; 2006).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe (III) + OH^- + OH$$

Weiterhin kann der Spin von einem der ungepaarten Elektronen des Sauerstoffmoleküls durch Energiezufuhr invertiert und damit Singulett-Sauerstoff gebildet werden, der direkt kovalente Bindungen angreifen kann (Foote et al. 1984). Der Großteil der Singulett-Sauerstoffbiologie findet bei Photosensibilisierungs-Reaktionen statt (Foote et al. 1984; Girotti und Kriska 2004). Singulett-Sauerstoff entsteht zudem auch während der Lipidperoxidation und kann, da er sehr leicht Lipide, Proteine und DNA oxidiert, ebenfalls zur Schädigung der Zelle beitragen (Girotti und Kriska 2004; Davies und Pryor 2005).

Neben ROS sind auch reaktive Stickstoffspezies (RNS) für oxidativen Stress in der Zelle verantwortlich. Stickstoffmonoxid (NO) wird bei Bedarf endogen in Mitochondrien durch die NO-Synthase-katalysierte Desaminierung der essentiellen Aminosäure L-Arginin gebildet (Dawson und Dawson 2004). NO ist als Second-Messenger in die Regulation zahlreicher Zellfunktionen involviert (Ignarro 1989; Moncada et al. 1991; Culotta und Koshland 1992; Wink und Mitchell 1998), beispielsweise spielt es eine essentielle Rolle bei der Gefäßerweiterung. Die Halbwertszeit von NO beträgt in der Zelle nur wenige Sekunden, es reagiert schnell mit dem Superoxidanion zu dem stark toxischen Peroxynitrit (ONOO⁻) (Beckman et al. 1990; Radi et al. 1991; Pryor und Squadrito 1995), welches Lipidmembranen schnell passieren kann (Marla et al. 1997). Peroxynitrit greift aromatische Ringe von Aminosäuren direkt durch Hydroxylierung und Nitrierung an, nitrosyliert SH-Gruppen von Cysteinen (Rubbo et al. 1994; Stubauer et al. 1999; Viner et al. 1999), nitriert Tyrosin- und Tryptophanreste, und oxidiert Methionin zu Methioninsulfoxid (Squadrito und Pryor 1998; Radi et al. 2001). Die Oxidation des Methionin-Schwefels wird wahrscheinlich durch eine Zwei-Elektronen-Oxidation der protonierten Form von Peroxynitrit, der Peroxysalpetrigen Säure (ONOOH) bewerkstelligt, die mit einem pK_a von 6,8 bei physiologischem intrazellulärem pH von 7,4 reichlich vorhanden ist (Reiter et al. 2000). Die Nitrierung von Tyrosin erfolgt hingegen nur in Anwesenheit von CO2, durch das CO2-Addukt von Peroxynitrit, Nitrosoperoxo-Carbonat (ONOOCO₂⁻) (Lymar und Hurst 1996; Tien et al. 1999; Reiter et al. 2000), und hat besonders schwerwiegende Folgen für die Zelle, da sie irreversibel ist, und die Phosphorylierung (Kong et al. 1996) oder Adenylierung (Berlett et al. 1996; Berlett et al. 1998) von Tyrosinresten regulatorischer Proteine verhindert.

Dennoch ist ein niedriger Basalgehalt an ROS/RNS essentiell für biologische Funktionen, da ROS/RNS als Aktivatoren in diversen Signalprozessen der Zelle involviert sind (Irani et al. 1997; Liaudet et al. 2000; Thannickal und Fanburg 2000).

1.1.2 Die mitochondriale Atmungskette und ROS

Unter physiologischen Bedingungen ist die mitochondriale Atmungskette der größte zelluläre Produzent von ROS (Fridovich 1989; Ambrosio et al. 1993; Fridovich 1999; Turrens 2003). Alle aeroben Zellen leiden unter Oxidations-bedingter Schädigung, doch neuronale Säugerzellen scheinen besonders empfindlich zu sein (Halliwell 1992; 2001). Ein Grund ist der hohe O2-Verbrauch des Gehirns; im erwachsenen Menschen macht dieses nur 1,5-2% des Körpergewichts aus, jedoch gehen 20% des basalen Sauerstoff-Verbrauchs auf seine Kosten. Damit ist die Sauerstoff-Verarbeitung pro Gramm Gewebemasse sehr hoch. Ein Hauptgrund für den hohen Sauerstoffumsatz des Gehirns ist der hohe Bedarf an ATP in neuronalen Zellen, um die transzelluläre Ionen-Homöostase aufrechtzuerhalten. Derjenige Teil des Energiestoffwechsels, bei dem das meiste ATP synthetisiert wird, ist die "Zellatmung" in den Mitochondrien, gleichzeitig ist sie jedoch die Hauptquelle für die Entstehung von endogenen und potentiell toxischen ROS wie O₂, H₂O₂ und OH (Wallace 1999). Der auch als Oxidative Phosphorylierung bezeichnete Prozess der Zellatmung findet in der so genannten Atmungskette oder Elektronentransportkette statt, einer Gruppe von fünf koordiniert arbeitenden Enzymkomplexen, die in die innere Mitochondrienmembran eingebettet sind. Bei den dort sukzessive ablaufenden Redoxreaktionen werden Elektronen, die hauptsächlich aus dem oxidativen Abbau von Kohlenhydraten in der Glycolyse und dem Citratzyklus, oder aus dem Abbau von Fettsäuren stammen, mit Hilfe von Elektronen-Trägermolekülen wie Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) "eingespeist" und dann von Komplex zu Komplex transportiert. Insgesamt findet eine Vier-Elektronen-Reduktion von O2 zu H2O statt. Die Elektronenübertragung ist an den Aufbau eines Protonengradienten zwischen Intermembranraum und Matrix gekoppelt, der an Komplex V, der letzten "Station" der Atmungskette, zur ATP-Synthese genutzt wird (Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Mitochondriale Atmungskette (aus (DiMauro 2004)). Elektronen werden von den Reduktionsäquivalenten NADH oder Succinat an Komplex I bzw. Komplex II geliefert. Ubichinon (Coenzym Q, CoQ) nimmt Elektronen von Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, oder von Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase, einem Enzym des Citratzyklus, auf, und wird durch zwei nacheinander ablaufende Ein-Elektronen-Reduktionen zu Ubichinol reduziert. Die durch die Reduktion gewonnenen Elektronen werden anschließend zu Komplex III, der Cytochrom-c-Reduktase transportiert, wodurch Ubichinol oxidiert und Cytochrom c (Cyt c) reduziert wird. Komplex III überträgt somit zwei Elektronen von Ubichinol auf zwei Moleküle Cyt c, welche die beiden Elektronen an Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase, COX) übergeben. COX oxidiert Cytochrom c und transportiert vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff, den finalen Elektronen-akzeptor, wobei Wasser entsteht. Komplex I, III und IV koppeln den Elektronentransport mit der Translokation von Protonen aus der Matrix in den mitochondrialen Intermembranraum. Der resultierende elektrochemische Protonen-Gradient bewirkt den Rückfluss von Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix durch die membrangebundene ATP-Synthase des Komplex V. Die dabei entstehende Energie nutzt die ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP (Mitchell 1961).

Während des Elektronentransfers kann es dazu kommen, dass Elektronen durch nichtenzymatischen Transfer (McCord 2000) mit freiem molekularem Sauerstoff reagieren und das Superoxidanion bilden. Elektronen können vor allem an den Komplexen I und III der Atmungskette "durchsickern" (Chen et al. 2003; Kudin et al. 2004). Bei physiologischen O₂-Konzentrationen beträgt die Rate der entweichenden Elektronen zwischen 0,2% und 0,4% des Gesamt-Elektronenflusses durch die Atmungskette (St-Pierre et al. 2002; Muller et al. 2004). Das Superoxidanion kann die Membran nicht passieren, es wird in den Mitochondrien zurückgehalten und kann von mitochondrialen Superoxid-Dismutasen mit manganhaltigem aktivem Zentrum (MnSODs) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden, welches in und zwischen Zellen diffundieren kann (Chan et al. 2001). H_2O_2 ist in vielen inter- und intrazellulären Signalprozessen involviert und wird von Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxinen schnell zu H_2O reduziert. In Gegenwart freier Übergangsmetalle wie Eisen und Kupfer kann Wasserstoffperoxid jedoch über die Fenton- oder die Haber-Weiss-Reaktion das hochreaktive Hydroxylradikal (\cdot OH) bilden, ein Prozess, der vermutlich bei der neurofibrillären Pathologie der Alzheimerschen Krankheit involviert ist (Smith et al. 1997).

Übergangsmetalle wie Eisen, Chrom, Nickel, Mangan, Kupfer und Cobalt weisen mehrere Oxidationsstufen auf. Der Wechsel zwischen diesen Oxidationsstufen ermöglicht die reversible Übertragung einzelner Elektronen auf die Metall-Ionen und erleichtert dadurch Redox-Reaktionen (Halliwell 2006). Unabgeschirmte, nicht Protein-gebundene Übergangsmetallionen tragen aufgrund ihrer starken Reaktivität mit freien Radikalen zum oxidativen Stress in der Zelle bei. Die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette sind reich an Übergangsmetallen wie, im Falle der Cytochrom-c-Oxidase, Eisen und Kupfer, die in den aktiven Zentren lokalisiert sind. Die exzessive Produktion von ROS im Bereich der Atmungskettenkomplexe kann an den aktiven Fe-S-Zentren der respiratorischen Enzyme I, II und III sowie im Citratzyklus, bei Enzymen wie der Aconitase, lokalen Schaden anrichten (Rotig et al. 1997; Melov et al. 1999). Überdies wurde gezeigt, dass auch die Tyrosinreste mitochondrialer Proteine durch das hochreaktive Peroxynitrit nitriert werden und dadurch sowohl Komplex I als auch die MnSOD geschädigt werden können (Yamakura et al. 1998; Riobo et al. 2001; Yamamoto et al. 2002). Komplex I kann durch die, von Peroxynitrit verursachte S-Nitrosylierung kritischer Thiol-Gruppen dauerhaft inhibiert werden (Clementi et al. 1998). Zudem können mitochondriale Membranen durch Lipidperoxidation geschädigt werden. Die Peroxidation der Kohlenwasserstoff-Seitenketten von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ("poly-unsaturated fatty acids" (PUFA)) in Membranen und Lipoproteinen stellt eine weitere Quelle für die Entstehung toxischer ROS dar. Radikale wie ·OH können leicht ein Proton (·H) einer allylischen Methylengruppe (-CH2-) abspalten und damit eine Kettenreaktion auslösen, in der das resultierende Kohlenwasserstoffradikal mit molekularem Sauerstoff unter Bildung eines Peroxylradikals reagiert, das wiederum weitere H-Atome der PUFA-Seitenketten angreifen kann (Halliwell 2006). Ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäure-Seitenketten sind essentiell für die Fluidität und damit Funktionalität biologischer Membranen. Durch die Peroxidation von Lipiden wird die Membranfluidität verringert und somit die Durchlässigkeit der Membran erhöht. Infolgedessen können Ionen wie K⁺ und Ca²⁺ vermehrt spontan die Membran passieren (Halliwell 2006). Eine Form der Adaption an oxidativen Stress ist die Reduktion des PUFA-Gehalts mitochondrialer Membranen (Pamplona et al. 1998). Eine auf die jeweiligen Gegebenheiten abgestimmte Proteinoptimierung scheint eine weitere Strategie zu sein; ein Beispiel hierfür ist die spezifische Eliminierung der redox-labilen Aminosäure Cystein in Proteinen der mitochondrialen Atmungskette (Moosmann und Behl 2008).

Die Oxidative Schädigung der DNA führt zu Strangbrüchen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzung und zu Austausch und Translokation von Schwester-Chromatiden (Davies 1995; Crawford et al. 2002). Wenn ROS-bedingte DNA- oder RNA-Schäden nicht repariert werden, hat dies eine fehlerhafte Transkription und Translation zur Folge und führt zur Synthese falschgefalteter Proteine. Die Fehlfaltung markiert die betroffenen Proteine für den proteolytischen Abbau in Lysosomen oder durch das Proteasom. Geschädigte DNA stellt ein Signal dar für die Aktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53, einem Transkriptionsfaktor, welcher den Stopp des Zellzyklus einleitet und den apoptotischen Tod der Zelle zur Folge haben kann. Die mutmaßlich geringe Reparaturkapazität der mitochondrialen DNA (mtDNA) und das Fehlen von Histonen macht die mtDNA sehr anfällig für Schädigungen durch oxidativen Stress, was in der Akkumulation multipler Deletionen resultieren kann. Dies wird allerdings kontrovers diskutiert, da die mtDNA, gemessen an dem Gesamtgehalt an oxidierten Basen, nicht in einem größeren Umfang oxidiert vorliegt als die nukleäre DNA (Lim et al. 2005).

1.1.3 Antioxidative Verteidigungssysteme

Zur antioxidativen Abwehrmaschinerie der Zelle gehören Enzyme, Vitamine und Metabolite, die entweder die Bildung von ROS und RNS verhindern oder sie in unschädliche Derivate überführen. Zu diesen Antioxidantien gehören Enzyme wie Superoxid-Dismutasen (SODs), Glutathion-Peroxidasen (GPx) und Thioredoxin-Reduktasen (TRxR), oder das Tripeptid Glutathion (GSH) (Halliwell 2001; Patenaude et al. 2005). Superoxid-Dismutasen katalysieren die Dismutation von zwei Molekülen Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (Fridovich 1989; 1995; Halliwell 2001; Liochev und Fridovich 2005). Tierische Zellen besitzen sowohl MnSODs in der mitochondrialen Matrix, als auch SODs mit Kupfer und Zink im aktiven Zentrum (CuZnSOD) im mitochondrialen Intermembranraum und im Zytosol. Wasserstoffperoxid kann von verschiedenen Enzymen entfernt werden. Catalasen disproportionieren zwei Moleküle H2O2 direkt zu zwei Molekülen Wasser und molekularem Sauerstoff. Sie sind in allen Organen, hauptsächlich aber in der Leber zu finden. Zudem gibt es in neuronalen und anderen Geweben die selenhaltigen Glutathionperoxidasen (Brigelius-Flohe 1999). Sie koppeln die Reduktion von H_2O_2 an die Oxidation von Glutathion (GSH), einem Thiol-haltigen Tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly). Das oxidierte Glutathion kann durch Glutathion-Reduktasen wieder zu GSH reduziert werden. Die mindestens fünf bekannten Glutathion-Peroxidasen können auch andere Peroxide abbauen; so katalysiert GPx4 die GSHabhängige Reduktion von Lipid-Hydroperoxiden zu Alkoholen (Brigelius-Flohe 1999).

Seit einigen Jahren werden die Peroxiredoxine zu den wichtigsten H_2O_2 -entfernenden Systemen in tierischen Zellen gezählt (Rhee et al. 2005). Sie sind in allen Zellorganellen und im Zytosol zu finden. Peroxiredoxine sind Homodimere, die Cysteine in ihren aktiven Zentren besitzen. Sie entfernen H_2O_2 und organische Peroxide, indem diese die SH-Gruppe des Cysteins oxidieren, wobei Cys-SOH entsteht. Diese Sulfensäure kann weiter mit der SH-Gruppe auf derselben oder der zweiten Peroxiredoxin-Untereinheit zu einem Disulfid reagieren, das von Thioredoxin, einem kleinen Protein, welches zwei SH-Gruppen besitzt, wieder reduziert und damit regeneriert werden kann.

Das Spurenelement Selen wird zu den Antioxidantien gezählt, da es für die katalytische Funktion antioxidativ wirksamer Selenoproteine wie der Methioninsulfoxid-Reduktase B, der Glutathion-Peroxidasen und der Thioredoxin-Reduktasen in tierischen Zellen essentiell ist. Das Gehirn ist in Bezug auf Selen ein privilegiertes Organ, d.h. der Selengehalt wird dort auch unter Selenmangel-Bedingungen soweit irgend möglich konstant gehalten, wodurch selbst unter diesen Bedingungen die Aktivität der Selenoproteine sichergestellt ist (Valentine et al. 2005). Für den Import von Selen ins Gehirn ist das Plasmaprotein Selenoprotein P essentiell. Mäuse, denen dieses Protein fehlt, sterben mit einer schweren Degeneration der Motoneurone, wenn ihnen Selen nicht hochdosiert im Futter verabreicht wird (Valentine et al. 2005). Eine simultane Depletion von Selen und Vitamin E führt in Meerschweinchen zu einer schweren Nekrose der Skelettmuskulatur, die molekular mit einer Lipidperoxidation assoziiert ist, wodurch sie nicht mehr in der Lage sind, sich aufzurichten, um Futter oder Wasser aufzunehmen, und innerhalb von fünf Wochen an multiplem Organversagen sterben (Hill et al. 2001).

Neben Glutathion enthalten neuronale Zellen eine Vielzahl weiterer niedermolekularer Antioxidantien wie das hydrophile Vitamin C (Ascorbat) und das lipophile Vitamin E (Tocopherol, Toc-OH). Die Konzentration von Vitamin C ist in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) des Menschen höher als im Plasma, zudem verfügen Neuronen und Glia über spezifische Transportsysteme, die Ascorbat bis zu millimolaren intrazellulären Konzentrationen anreichern (Rice 2000). Die Vitamin C-Konzentrationen in Gehirn und CSF werden strikt aufrechterhalten und bleiben hoch, auch wenn der Gehalt im Plasma abnimmt, was auf eine wichtige Rolle von Vitamin C für die Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) hinweist. Ascorbat ist ein starkes Reduktionsmittel und gleichzeitig ein potentes Antioxidans; mit Radikalen reagiert es zu dem reaktionsträgen Ascorbylradikal, welches wieder zu Ascorbat und Dehydro-Ascorbat disproportionieren kann (Halliwell und Gutteridge 1999). Zudem regeneriert es das Vitamin E-Radikal (Toc-O·) (Tappel 1968). Ascorbat ist neben seiner Funktion als Antioxidans u.a. auch in der Hydroxylierung von Dopamin und in der Kollagensynthese involviert (Halliwell 2006). Die Vitamin C-Konzentration in Blut, Gehirn und anderen Geweben von Mäusen, denen der Natrium-gekoppelte Vitamin C-Transporter 2 fehlt, ist stark verringert, und sie sterben wenige Minuten nach der Geburt an Lungenversagen und weisen Hirnblutungen auf (Sotiriou et al. 2002). Demnach ist Vitamin C in Lunge und Gehirn essentiell, um die durch die Geburt bedingte "Hyperoxie" durch den plötzlichen Kontakt mit 21% Sauerstoff aus der Luft, einer viel höheren Konzentration als im Uterus, überleben zu können.

Der Begriff Vitamin E umfasst eine Familie aus vier Tocopherolen und vier Tocotrienolen, die in der Lage sind, die Lipidperoxidation zu hemmen, indem sie unter Verwendung ihrer phenolischen OH-Gruppe Lipidperoxylradikale (LO·) abfangen, bevor diese umliegende Fettsäure-Seitenketten oder Membranproteine angreifen können (Parks und Traber 2000).

$$\text{Toc-OH} + \text{LO}_2 \rightarrow \text{Toc-O} + \text{LOOH}$$

Das dabei entstehende Toc-O·-Radikal ist relativ wenig reaktiv und kann u.a. durch Ascorbat wieder in Toc-OH überführt werden. Im Gehirn ist Vitamin E hauptsächlich in Form von α-Tocopherol zu finden (Muller und Goss-Sampson 1990; Roy et al. 2002; Hayton und Muller 2004), allerdings konnte γ -Tocopherol ebenfalls in CSF nachgewiesen werden (Vatassery et al. 2004). Ein großer Teil des im Gehirn vorkommenden a-Tocopherols stammt aus dem "high densitiv lipoprotein" (HDL) aus dem Plasma. Schwere, dauerhafte Vitamin E-Depletionen, wie sie bei manchen angeborenen Stoffwechsel-Störungen vorkommen, welche die Fett-Absorption und damit die Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen wie Vitamin E aus der Nahrung beeinträchtigen, oder aber die Prozessierung von α-Tocopherol betreffen, haben neurologische Schäden zur Folge. Dabei ist das ZNS generell stärker betroffen als das periphere Nervensystem (PNS), und sensorische Axone mehr als Motoraxone (Halliwell 2006). Der Vitamin E-Gehalt wird im Gehirn strikt aufrechterhalten. Eine zwölfmonatige Vitamin E-Mangel-Diät bewirkt eine Reduktion des Vitamin E-Gehalts im Gehirn von Säugern um weniger als 3% im Vergleich zum Kontrollwert (Halliwell 2006). Ebenso schwierig allerdings kann der α-Tocopherol-Gehalt im Gehirn in adulten Säugern durch Supplementation erhöht werden (Muller und Goss-Sampson 1990). Zudem gibt es keine Unterschiede im Vitamin E-Gehalt in Gehirnen von 100jährigen im Vergleich zu Menschen mittleren Alters, in Alzheimer- und Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gleichen Alters sowie in Föten mit Down-Syndrom im Vergleich zu gesunden Föten des gleichen Entwicklungsstadiums (Metcalfe et al. 1989). Dennoch wurde berichtet, dass hohe Dosen von α-Tocopherol die kognitiven Fähigkeiten alter Nager verbessern konnten (Martin et al. 2002). Auch aus epidemiologischen Studien am Menschen geht hervor, dass der erhöhte

Konsum von Vitamin E zu einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit im Alter (Perkins et al., 1999) und zu einem verringerten Auftreten der Alzheimerschen Krankheit führt (Zandi et al., 2004). Ähnliches wurde in Studien mit Alzheimer-Patienten berichtet, allerdings unterlag der Grad der "kognitiven Verbesserung" großen Schwankungen, und bei Patienten mit "mild cognitive impairment" (MCI), einer milden Ausprägung von Demenz, konnte keine Verbesserung festgestellt werden (Blacker 2005). Neben Ubichinon ist Vitamin E dennoch das einzige Antioxidans, für das in kontrollierten klinischen Studien eine Verlangsamung der Progression der Alzheimerschen Krankheit gezeigt wurde (Sano et al., 1997; Moosmann und Behl 2002). Die zellulären Effekte von α -Tocopherol sind dabei nicht notwendigerweise auf seine antioxidativen Fähigkeiten, sondern möglicherweise auch auf andere Stoffwechsel-aktivitäten zurückzuführen (Zingg und Azzi 2004).

Neuroprotektive Eigenschaften werden auch Ubichinon (Coenzym Q) zugeschrieben (Beal und Shults 2003). Dabei spielt seine reduzierte Form, Ubichinol, eine große Rolle, da es Peroxylradikale abfangen, und ebenfalls Toc-O·wieder zu Toc-OH konvertieren kann. Coenzym Q kann Mäuse vor der durch "1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyri-din" (MPTP) induzierten Toxizität schützen. Bei dieser Substanz handelt es sich um den Vorläufer des mitochondrialen Komplex I-Inhibitors "1-Methyl-4-Phenylpyridin" (MPP⁺), welcher Symptome auslöst, die denen der Parkinsonschen Krankheit sehr ähnlich sind. Zudem zeigt Coenzym Q einen geringen, jedoch statistisch signifikanten therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Huntingtonscher und Friedreichscher Ataxie (Beal und Shults 2003; Hart et al. 2005), bei deren Krankheitsverlauf oxidativer Stress ebenfalls eine Rolle spielt.

1.1.4 Proteinoxidation

In alten Säuger-Zellen ist etwa die Hälfte aller intrazellulären Proteine an mindestens einer Stelle oxidiert, was darauf schließen lässt, das während des Alterns eine nicht selektive Oxidation zellulärer Proteine stattfindet (Gafni 1997), und dass oxidativ modifizierte Proteine mit zunehmendem Alter des Organismus nicht mehr vollständig repariert werden. Proteinoxidation gilt als ein wichtiger Auslöser des phänotypischen Alterungsprozesses (Sohal 2002; Stadtman 2004). Tiermodelle mit beeinträchtigter Proteinreparatur zeigen Merkmale der vorzeitigen Alterung (Moskovitz et al. 2001). Meist hat die Oxidation von ein oder zwei Aminosäure-Seitenketten nur einen geringen Effekt auf das Protein, der weder die Stabilität noch die Funktion verändert (Levine et al. 1996; Moreau et al. 2003). Findet jedoch eine selektive Oxidation an einer für die Regulation der Proteinfunktion entscheidenden Position statt, kann dies für die Zelle negative Auswirkungen haben.

Die meisten Aminosäurereste sind anfällig für oxidative Modifikationen durch eine oder mehrere Formen von ROS (Brot und Weissbach 1983; Vogt 1995). Die einzigen oxidativen Veränderungen von Aminosäureresten, die nach heutigem Wissen repariert werden können, sind die Oxidation der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Die Oxidation von Cystein und der daraus folgende Verlust freier Thiolgruppen (SH-) ist eine der ersten Proteinveränderungen nach Kontakt mit ROS (Sohal 2002) und führt u.a. zur Produktion von intra- oder intermolekular quervernetzten Disulfid-Derivaten. Die SH-Gruppen können durch den Thioltransferase-katalysierten Disulfid-Austausch mit Glutathion oder Thioredoxin "regeneriert" werden (Stadtman und Berlett 1997). Wenn die Quervernetzung von Proteinen irreversibel ist, kann dies den Verlust der Proteinfunktion zur Folge haben. In Membranproteinen führt dies zur Verringerung des Diffusionskoeffizienten von integralen Membranproteinen und infolgedessen der Membranfluidität (Csoka und Nagy 2004).

Methioninreste sind ebenfalls sehr leicht oxidierbar durch alle Formen von ROS (Vogt 1995), wobei beide Stereoisomere von Methioninsulfoxid (S- und R-MetO) entstehen (Schoneich et al. 1993). Die ubiquitinär exprimierten Methionsulfoxid-Reduktasen (MSRs) katalysieren die Thioredoxin-abhängige Reduktion von MetO zu Methionin (Abb.1.2). Die meisten eukaryontischen Zellen besitzen zwei verschiedene MSRs: MSR-A für die spezifische Reduktion des S-Stereoisomers (Moskovitz et al. 1996; Moskovitz et al. 1997; Moskovitz et al. 2001; Kryukov et al. 2002) und MSR-B zur Reduktion des R-Stereoisomers von Methioninsulfoxid (Moskovitz et al. 1996; Kumar et al. 2002). MSR-Bs von Säugern besitzen Selenocystein, MSR-As dagegen Cystein im katalytischen Zentrum (Kryukov et al. 2002; Moskovitz et al. 2002). Die Substitution von Cystein durch Selenocystein im katalytischen Zentrum von MSR-B führt zu einer deutlichen Verringerung der MSR-B-Aktivität (Moskovitz et al. 2002).



Abbildung 1.2: Links: Reversible Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid und Irreversible Oxidation von Methioninsulfoxid zu Methioninsulfon aus (Vogt und Hesse 1994). Rechts: Zyklische Umwandlung von Methionin (L-Met) und den beiden Stereoisomeren von Methioninsulfoxid (MetO-S/-R) durch die spezifischen Methioninsulfoxid-Reduktasen (MSR-A/-B) aus (Stadtman et al. 2005). L-Met, L-Isomer von Methionin, Th(SH)₂ und Th(S-S) bezeichnen die reduzierte und die oxidierte Form von Thioredoxin.

Die beim Methionin-Recycling entstehende oxidierte Form von Thioredoxin [Th(SS)] kann in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch das Selenoprotein Thioredoxin-Reduktase (TRxR) wieder zu Thioredoxin (Th(SH)₂) reduziert werden (Holmgren 1985; Stadtman 2006). Die zyklische Oxidation und Reduktion von Methioninresten durch MSRs kann daher formal als antioxidativer Mechanismus zum Schutz der Zellen vor oxidativer Schädigung angesehen werden (Levine et al. 1996). Dieser antioxidative Verteidigungsmechanismus wäre besonders dann von Vorteil, wenn die auf diese Weise geschützten Proteinstrukturen schwieriger oder unter größerem Energieaufwand zu reparieren sind als oxidiertes Methionin, oder wenn nicht repariertes Methionin für die Zelle einen geringeren Schaden bedeutet als die Schädigung infolge eines unmittelbaren Angriffs durch ROS. Angesichts der unkomplizierten Methioninreparatur durch die MSRs (Stadtman et al. 2002; Weissbach et al. 2002) und der beobachteten Toleranz von Proteinen gegenüber Methioninoxidation (Levine et al. 1996), scheint die postulierte antioxidative Funktion des Met(O)/MSR-Systems plausibel zu sein.

Mutationen in Bakterien, Hefen und Mäusen, die zu einer verringerten MSR-Aktivität führen, gehen mit dem Verlust der Resistenz gegenüber oxidativem Stress und einer entsprechend erhöhten Anzahl oxidierter Proteine in diesen Organismen einher (Moskovitz et al. 1995; Moskovitz et al. 1997; St John et al. 2001). Dagegen führt die vermehrte Expression von MSRs zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Moskovitz et al. 1995; St John et al. 2001). Ein experimenteller Beweis für den möglichen antioxidativen Nutzen des Methionin-Recyclings über die reine Methionin-Reparatur hinaus, ist bislang allerdings nicht erbracht worden.

1.2 Die Alzheimersche Krankheit

Die mit 50-60% aller Fälle am häufigsten auftretende Form von Demenz ist die Alzheimersche Krankheit (Ferri et al. 2005). Ihre wachsende Bedeutung angesichts einer immer älter werdenden Gesellschaft drängt zur Aufklärung dieser neurodegenerativen Erkrankung. Über 100 Jahre nach ihrer erstmaligen Beschreibung (Alzheimer, 1907) scheint das Lebensalter der einzig unumstrittene Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Alzheimerschen Krankheit zu sein. Ab einem Alter von 85 Jahren liegt die Wahrschein-lichkeit, an der Alzheimerschen Krankheit zu erkranken, in der westlichen Welt bei 24% (Ferri et al. 2005).

Das erste Symptom der Alzheimerschen Krankheit ist der Verlust des Kurzzeit-Gedächtnisses. Betroffene Patienten unterliegen einem graduellen kognitiven Verfall, der meist mit einer zeitlichen und geographischen Desorientierung einhergeht. Hinzu kommen zunehmende Einschränkungen in der Urteilsfähigkeit, bei der Lösung von alltäglichen Problemen, und zunehmende Sprachschwierigkeiten (Faber-Langendoen et al. 1988). Es treten Veränderungen des Verhaltens und der Persönlichkeit des Erkrankten auf, die bis zum völligen Verschwinden der persönlichen Wesenszüge im Endstadium der Krankheit führen können (Rubin et al. 1987; Swearer et al. 1988). In den schwersten Stadien der Krankheit kommen motorische Schwierigkeiten hinzu, die den Alzheimer-Patienten bettlägerisch und in Abhängigkeit von Pflegepersonen hinterlassen (Morris et al. 1989; Romanelli et al. 1990).

1.2.1 Pathologie

Die pathologischen Merkmale der Alzheimerschen Krankheit, die sich *post mortem* auf histologischer Ebene in den Gehirnen darstellen, sind extrazelluläre "senile Plaques" und intrazelluläre "neurofibrilläre Bündel" (NFTs) sowie der progressive Verlust von Neuronen in bestimmten Gehirnregionen (Braak und Braak 1997).

Senile Plaques bestehen aus Aggregaten des Amyloid- β (A β)-Peptids, dem eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Krankheit zugesprochen wird. Das A β -Peptid geht aus der proteolytischen Prozessierung eines integralen Membranproteins, dem "amyloid precursor protein" (APP) hervor (siehe Kapitel 1.2.2). Unter den senilen Plaques werden drei Typen unterschieden (Selkoe 1991). Diffuse Plaques bestehen hauptsächlich aus unstrukturiertem Amyloid und scheinen keinen Effekt auf das angrenzende Gewebe zu haben. Fibrilläre senile Plaques mit einem dichten Kern sind dagegen oft von dystrophierten Neuronen und Glia-Fortsätzen umringt (Yamaguchi et al. 1988; Yamaguchi et al. 1988; Dickson und Vickers 2001). Der dritte Typ umfasst Amyloid-Ablagerungen, die um die Blutgefäße des Gehirns akkumulieren (Roher et al. 1993). Plaques bilden sich zuerst im basalen Neocortex und sind dann im Hippocampus und den angrenzenden Cortexarealen zu finden (Braak und Braak 1997). Im Hippocampus ist meist im Bereich des Gyrus dentatus eine Schicht aus senilen Plaques zu finden (Hyman et al. 1986). Innerhalb des Neocortex sind die Schichten II und III besonders anfällig für die Bildung von Plaques, wobei der limbische Cortex und die Assoziations-Cortices empfänglicher sind als der primäre sensorische Cortex (Pearson et al. 1985; Rogers und Morrison 1985; Duyckaerts et al. 1986; Morrison und Hof 1997; Ingelsson et al. 2004). Es wurde vermutet, dass sich die dichten senilen Plaques aus diffusen Vorläufer-Plaques entwickeln (Yamaguchi et al. 1988). Untersuchungen zur Struktur und Entstehung der Plaques in transgenen Mausmodellen der Alzheimerschen Krankheit haben jedoch gezeigt, dass sich senile Plaques durch reversible Aggregation von A β -Ansammlungen bilden (Cruz et al. 1997; Urbanc et al. 1999). Andere Studien konnten zeigen, dass sich senile Plaques bevorzugt um Überreste toter Zellen bilden, die möglicherweise den "Keim" für die Akkumulation und vermehrte Aggregation von extrazellulärem Aβ darstellen (D'Andrea et al. 2001; D'Andrea et al. 2002; Pasternak et al. 2004).

Ein weiteres pathologisches Hauptmerkmal der Alzheimerschen Krankheit sind die NFTs, die aus der hyperphosphorylierten Form des Proteins "tau" bestehen (Brion et al. 1985), das in paarweise angeordneten, helicalen Filamenten ("paired helical filaments", PHFs) organisiert ist (Kidd 1963). Tau ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das am Zusammenbau und der Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt ist. Die Hyperphosphorylierung beeinträchtigt tau in seiner Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden, was vermutlich zur Zerstörung des axonalen Zytoskeletts beiträgt (Butterfield et al. 2006). Nach Braak und Braak bilden sich neurofibrilläre Bündel zuerst in der transentorhinalen Region und sind dann im entorhinalen Cortex, Hippocampus, Assoziations-Cortex und sensorischen Cortex zu finden (Braak und Braak 1997). Durch die NFT-Entwicklung wird das Temporal-Lappen-Erinnerungssystem gestört (Klucken et al. 2003). Zudem korreliert die NFT-Dichte mit der Dauer (Ingelsson et al. 2004) und Schwere der Demenz (Wilcock und Esiri 1982; Arriagada et al. 1992; Giannakopoulos et al. 2003).

Während der Alzheimerschen Krankheit kommt es zudem zu einem umfangreichen Absterben von Neuronen, das weitgehend den Verlauf der NFT-Bildung widerspiegelt (Spires und Hyman 2005). Der großflächige Verlust von Neuronen unterbricht die neuronalen Schaltkreise und trägt zu dem mit der Alzheimerschen Krankheit assoziierten kognitiven Verfall bei. Pyramidale Neurone mit langen corticocorticalen Projektionen sind dabei besonders vulnerabel; wenn sie absterben, geht die Verbindung zwischen den Assoziations-Cortices verloren (Morrison und Hof 1997). Der neuronale Schaltkreis, der den entorhinalen Cortex mit dem Hippocampus verbindet, ist ebenfalls von dem krankheitsbedingten Absterben der Neurone betroffen. Auf diesem Weg werden Informationen aus den verschiedenen Assoziations-Cortices zur Prozessierung an den Hippocampus geliefert, ein vermutlich entscheidender Prozess für die Entstehung von Erinnerung (Squire und Zola-Morgan 1991). Bereits in frühen Stadien der Alzheimerschen Krankheit können bis zu 50% der Neurone in Schicht II des entorhinalen Cortex absterben, in schweren Fällen sind fast alle Neurone in dieser Schicht betroffen (Gomez-Isla et al. 1997). In der CA1-Region des Hippocampus gehen etwa 70% der Neurone im Zuge der Alzheimerschen Krankheit zugrunde (West et al. 1994). Die verbleibenden Neurone sind weitreichenden morphologischen Veränderungen unterworfen. Diese Neuronen dystrophieren, es kommt zur Remodellierung dendritischer und axonaler Verzweigungen, und die Synapsendichte sowie die Dichte an dendritischen Spines ändert sich (Spires und Hyman 2004). Es besteht hierbei eine starke Korrelation zwischen Synapsenverlust und kognitivem Verfall der Alzheimer-Patienten (DeKosky und Scheff 1990; Masliah et al. 1991; Terry et al. 1991).

1.2.2 APP-Prozessierung

Die zentrale Hypothese zur Entstehung der Alzheimerschen Krankheit ist die Hypothese der toxischen Amyloid-Kaskade, die besagt, dass die Ursache für die bei der Alzheimerschen Krankheit auftretende neuronale Degeneration in der fehlenden Balance zwischen Produktion und Entfernung von toxischen A β -Peptiden im Gehirn begründet ist. Dabei wird insbesondere eine erhöhte A β -Produktion bei der seltenen familiären Form der Alzheimerschen Krankheit (FAD) und eine verringerte Entfernung von A β bei der am häufigsten diagnostizierten sporadischen Form der Alzheimerschen Krankheit postuliert (Hardy und Selkoe 2002). Die Hypothese beruht auf der Tatsache, dass viele Gen-Mutationen, die zu FAD führen, die Produktion von leicht aggregierenden A β -Peptiden erhöhen. Die A β -Peptide resultieren aus der nacheinander abfolgenden Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins ("amyloid precursor protein", APP) durch verschiedene Proteasen, der α -, β - und γ -Sekretasen (Abb.1.3).



Abbildung 1.3: Proteolytische Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) durch α -, β - und γ -Sekretase (aus (Patel und Forman 2004)). A: APP-Molekül mit den Schnittstellen für die α -, β -, und γ -Sekretase. B: Der Nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung. Bei der extrazellulären APP-Prozessierung durch die α -Sekretase entsteht das N-terminale APP α -Fragment und das membrangebundene C-terminale Fragment α -CTF (C83), welches durch die γ -Sekretase weiter in das nicht-amyloidogene p3- Fragment und das γ -CTF-Fragment (AICD) gespalten werden kann. C: Amyloidogene Prozessierung von APP. Die β -Sekretase schneidet APP extrazellulär, wobei das APP β -Fragment sekretiert wird und das β -CTF-Fragment (C99) in der Membran zurückbleibt. Durch die anschließende Spaltung von C99 durch die γ -Sekretase entstehen die amyloidogenen A β 40- (orange) und A β 42-Peptide (orange + rot) sowie die "APP intracellular domain" (AICD, γ -CTF).

APP kann dabei auf zwei Wegen prozessiert werden. Auf dem nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne geschnitten, wodurch das lange lösliche APPs α -Fragment von der Zelle freigesetzt wird und das membrangebundene C-terminale Fragment (CTF) α -CTF oder C83 zurückbleibt. C83 kann durch die γ -Sekretase, die aus einem Komplex der Proteine Presenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 (De Strooper 2003) besteht, weiter prozessiert werden, wobei es zur Freisetzung des kurzen p3-Peptids kommt. Die übrigbleibende "APP intracellular domain" (AICD, γ -CTF) wird im Cytoplasma metabolisiert. Da die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne schneidet, ist die Produktion von A β -Peptiden auf diesem Weg ausgeschlossen. Auf dem amyloidogenen Weg wird APP von der β -Sekretase, dem " β -site APP cleaving enzyme 1" (BACE1), einer membrangebundenen

Aspartylprotease vom Typ I, die hauptsächlich in Endosomen und innerhalb des Golgi-Apparats und des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert ist (Huse et al. 2000), kurz vor der A β -Domäne gespalten, wobei das APPs β -Fragment sekretiert wird. Das in der Membran zurückbleibende β -CTF oder C99 ist ebenfalls ein Substrat für die γ -Sekretase, welche dieses in der Mitte der Transmembrandomäne schneidet und so das 40-42 Aminosäuren lange A β -Peptid und das AICD-Peptid produziert.

Die Proteolyse durch die γ -Sekretase verläuft heterogen; in humaner CSF ist eine Reihe von A β -Isoformen zwischen 38 und 43 Aminosäuren Länge detektierbar. Die normalerweise am häufigsten entstehenden A β -Spezies sind A β 40 (90%) und das fibrillogene A β 42 (10%). In Alzheimer-Patienten ist die totale A β -Belastung im Gehirn dramatisch erhöht (Cummings und Cotman 1995). Das Verhältnis von A β 40 zu A β 42 verschiebt sich oft auf 1:1 (Mehta et al. 2001). A β 42 ist diejenige A β -Spezies, die in Plaques von Alzheimer-Patienten am häufigsten gefunden wird (Iwatsubo et al. 1994). Die beiden zusätzlichen Aminosäuren von A β 42 sind hydrophob, wodurch A β 42 anfälliger für die Ausbildung von Fibrillen und für die Aggregation ist als A β 40 (Jarrett et al. 1993). Da A β 40 und verschiedene kürzere A β -Spezies sowohl in der CSF von Gesunden als auch von Alzheimer-Patienten zu finden sind (Seubert et al. 1992; Shoji et al. 1992), wird vermutet, dass es sich bei A β 40 um ein nicht-pathologisches Produkt des normalen Zellmetabolismus handelt (Haass et al. 1992), und A β 42 die Hauptrolle bei der Entstehung von senilen Plaques spielt.

1.2.3 Genetische Risikofaktoren

Bei der Alzheimerschen Krankheit werden zwei Formen unterschieden; die seltene familiäre Form (FAD), welche autosomal-dominant vererbt wird und bereits vor dem 65. Lebensjahr ausbrechen kann (St George-Hyslop 2000; Tanzi und Bertram 2001), und die am häufigsten auftretende, sporadische Form der Alzheimerschen Krankheit, über deren Entstehung weit weniger bekannt ist (Rocchi et al. 2003). Das heutige Wissen um genetische Risikofaktoren und die daraus abgeleiteten und entwickelten transgenen Tiermodelle basieren hauptsächlich auf Untersuchungen der familiären Formen der Alzheimerschen Krankheit. Die historisch erste Mutation, die mit FAD assoziiert wurde, ist innerhalb des APP-Gens (Goate et al. 1991) auf Chromosom 21 lokalisiert (Kang et al. 1987). Interessanterweise entwickeln Individuen mit Down-Syndrom (Trisomie 21), die eine zusätzliche Kopie von Chromosom 21 besitzen, neuropathologische Merkmale der Alzheimerschen Krankheit, wie beispielsweise senile Plaques, bereits im Alter von 40 Jahren (Wisniewski et al. 1985). Bis heute sind 20 pathologische Mutationen des APP-Gens identifiziert worden, die meistens zu einer veränderten proteolytischen Prozessierung von APP durch die β - und γ -Sekretase führen (Haass et al. 1994). Während Mutationen in Nähe der β -Sekretase-Schnittstelle meist eine gesteigerte Produktion von A β 40 und A β 42 zur Folge haben (Citron et al. 1992; Cai et al. 1993), führen Mutationen in Höhe der Restriktionsstelle der γ -Sekretase zu einer spezifischen Erhöhung der A β 42-Produktion (Suzuki et al. 1994). Die beiden Proteine Presenilin 1 und Presenilin 2 bilden das katalytische Zentrum der γ -Sekretase (De Strooper et al. 1998; Verdile et al. 2007). Mutationen in den sehr homologen Presenilin-Genen PSEN1 und PSEN2 werden mit den meisten Fällen der familiären Form der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht, wobei mehr als 150 Mutationen von PSEN1 und 10 Mutationen von PSEN2 bekannt sind (De Strooper 2007). Einige dieser Mutationen führen vermutlich zu einer gesteigerten Produktion von A β 42 (Borchelt et al. 1996; Jankowsky et al. 2004; De Strooper 2007). Mit einer kumulativen Wahrscheinlichkeit von unter 0,1% aller Alzheimer-Fälle tritt die FAD jedoch nur selten auf (Harvey et al. 2003).

Die meisten diagnostizierten Fälle der Alzheimerschen Krankheit treten zu einem späteren Lebenszeitpunkt (nach dem 65. Lebensjahr) auf und sind vom sporadischen Typ. Die Ursachen der sporadischen Alzheimerschen Krankheit sind bisher nicht aufgeklärt, allerdings spielen genetische Faktoren auch hier eine Rolle, da 64% der sporadischen Alzheimer-Fälle mit der Anwesenheit des Apolipoprotein E (ApoE)-ɛ4-Allels assoziiert sind (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993). Das auf Chromosom 19 lokalisierte ApoE-Gen kodiert für ein sekretorisches Protein, das in Transport, Aufnahme und Verteilung von Cholesterin involviert ist (Lin-Lee et al. 1985; Paik et al. 1985; Mahley 1988). Sowohl ApoE als auch sein Rezeptor, das "low density lipoprotein receptor-related protein" (LRP) konnten in senilen Plaques detektiert werden (Namba et al. 1991; Arelin et al. 2002). ApoE kann Aß direkt binden (Strittmatter et al. 1993) und zu senilen Plaques translozieren (Wisniewski und Frangione 1992), weswegen ApoE eine Rolle als "pathologisches Chaperon" zugeschrieben wird, das den Abbau von Aß verhindert und die Plaque-Bildung erleichtert (Bales et al. 2002). Ein weiteres Charakteristikum der Alzheimerschen Krankheit ist die proinflammatorische Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia in Plaquenähe. Das hauptsächlich in Gliazellen exprimierte ApoE könnte daher möglicherweise auch in der Entstehung/Vermittlung neuronaler Entzündungsreaktionen beteiligt sein (Bales et al. 2002).

1.2.4 Proteinoxidation

Die oxidative Schädigung von Biomolekülen ist eines der frühesten Ereignisse im Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung und hat möglicherweise einen starken Einfluß auf Ausbruch, Progression und Pathogenese der Krankheit (Cras et al. 1995; Smith et al. 1996; Smith et al. 1997; Zhu et al. 2007). Die im Zuge der Alzheimerschen Krankheit auftretende oxidative Modifikation von Proteinen zeigt sich anhand erhöhter Mengen carbonylierter Proteine, einer vermehrten Nitrierung von Tyrosinresten sowie Proteinquervernetzungen (Cras et al. 1995; Smith et al. 1996; Smith et al. 1997). Carbonylierte Proteine sind hauptsächlich in Hippocampus und Parietal-Cortex zu finden, jedoch nicht im Cerebellum, einer Hirnregion mit minimaler Alzheimer-Pathologie (Hensley et al. 1995).

Die oxidative Modifikation von Methionin scheint in besonderer Weise mit der im Zuge der Alzheimerschen Krankheit auftretenden Histopathologie zusammenzuhängen. In senilen Plaques sind große Mengen an Aβ40-assoziiertem Methioninsulfoxid zu finden (Naslund et al. 1994), das durch Methioninsulfoxid-Reduktasen wieder zu Methionin reduziert werden kann (Moskovitz et al. 1997). Die Aktivität der Methioninsulfoxid-Reduktasen im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist allerdings reduziert (Gabbita et al. 1999; Lovell et al. 2000). Der Zusammenhang zwischen der Oxidation von Methionin und dem Auftreten von assoziierten pathologischen Merkmalen der Alzheimerschen Krankheit wird zudem in einem transgenen Mausmodell, in dem das Gen für die MSR-A ausgeschaltet wurde, nahegelegt. Die betroffenen Tiere zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine beschleunigte Histopathologie, die in ihren Ausprägungen (Verlust der Astrozytenintegrität, erhöhte Plaquebelastung und tau-Phosphorylierung) den pathologischen Merkmalen der Alzheimerschen Krankheit Plaquebelastung und tau-Phosphorylierung).

1.2.5 Aβ-Toxizität

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass das Aβ-Peptid selbst die Oxidation verschiedener Biomoleküle initiieren kann. Ein Beispiel dafür ist die Aβ-induzierte Peroxidation von Membranlipiden und Lipoproteinen (Varadarajan et al. 2000; Kontush et al. 2001), welche in Form eines Anstiegs an Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2-Transnonenal (HNE), Isoprostanen und einer veränderten Phospholipid-Zusammensetzung in dem von der Alzheimerschen Krankheit betroffenen Gehirn zu beobachten ist (Sayre et al. 1997; Zhu et al. 2004). Die signifikante Erhöhung von freiem HNE in ventrikulärer Cerebrospinalflüssigkeit und Serum wurde als Marker für das Fortschreiten der Alzheimerschen Krankheit herangezogen (Lovell et al. 1997; McGrath et al. 2001). Die Menge an Protein-gebundenem HNE ist ebenfalls erhöht (Sayre et al. 1997; Lauderback et al. 2001; Butterfield et al. 2002; Butterfield und Lauderback 2002). Die HNE-Modifikation von Proteinen hat meist die Änderung der Konformation und Funktion der betroffenen Proteine zur Folge (Subramaniam et al. 1997; Lauderback et al. 2001). Zudem ist eine erhöhte Glycierung und Glyco-Oxidation zu beobachten (Smith et al. 1994; Smith et al. 1995; Castellani et al. 2001). Die Toxizität von A β wird dabei wahrscheinlich durch Induktion der Bildung von H₂O₂ vermittelt (Behl et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist die direkte Schädigung von DNA (Xu et al. 2001) sowie die Inaktivierung von Transportenzymen durch A β beschrieben (Mark et al. 1997). Die Oxidation von DNA und RNA zeigt sich anhand erhöhter Mengen von 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8OHdG) und 8-Hydroxyguanosin (8OHG) (Nunomura et al. 1999; Nunomura et al. 1999; Nunomura et al. 2000).

Weiterhin ist bekannt, dass durch die A β -induzierte, durch Cu⁺ und Fe²⁺ katalysierte Bildung von ROS die neuronale Calciumhomöostase gestört wird (Hensley et al. 1994). Durch die Akkumulation von A β an Zellmembranen und die von A β generierten ROS kann die Funktion von membranären Na⁺/K⁺- und Ca²⁺-ATPasen sowie von Glucose- und Glutamat-Transportern beeinträchtigt werden. Infolgedessen kann es zu einem akuten Anstieg des basalen intrazellulären Ca²⁺-Spiegels kommen (Bhatia et al. 2000; Kawahara und Kuroda 2000), wodurch die Neuronen für Exzitotoxizität und Apoptose sensibilisiert (Mattson et al. 1992; Mark et al. 1995; Keller et al. 1997; Mark et al. 1997; Mark et al. 1997) und präapoptotische Reaktionen ausgelöst werden können (Arispe et al., 2005).

Aβ erniedrigt zudem die Aktivität von mitochondrialen Atmungsketten-Komplexen (Molina et al. 1997; Hirai et al. 2001; Lovell et al. 2005). Ein häufig auftretender Defekt der mitochondrialen Atmungskette bei der Alzheimerschen Krankheit ist der relative Mangel an Cytochrom-c-Oxidase, der zuerst in Blutplättchen von Alzheimer-Patienten festgestellt wurde (Parker et al. 1989). Auch in *post mortem* Gehirngewebe, besonders in NFTs-aufweisenden Neuronen, konnte eine reduzierte Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität beobachtet werden (Kish et al. 1992; Mutisya et al. 1994).

Für die Aggregation und die pro-oxidative Wirkung von A β scheint die Anwesenheit von freien Übergangsmetallen essentiell zu sein (Schubert und Chevion 1995; Bondy et al. 1998; Rottkamp et al. 2001). Ein weiterer Faktor, der für die A β -Toxizität besonders kritisch sein soll, ist die Anwesenheit von Methionin an Position 35 des A β -Peptids (Butterfield und Boyd-Kimball 2005; Joshi et al. 2005; Murray et al. 2005; Clementi et al. 2006; Crouch et al. 2006). Die Substitution des Methioninrests durch eine andere Aminosäure hatte eine signifikante Verringerung der A β -Toxizität zur Folge (Walter et al. 1997; Varadarajan et al. 2000;

Butterfield und Bush 2004). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass A β -Peptide als kleine Oligomere toxischer sind, als wenn sie in Fibrillen organisiert sind (Oda et al. 1995; Walsh et al. 1999; Lambert et al. 2001; Drake et al. 2003). Dabei ist A β 42 das toxischere APP-Spaltprodukt *in vitro* und *in vivo*. Es wird angenommen, dass lösliches A β 42 eine Konformationsänderung durchläuft, die zu einem hohen β -Faltblatt-Gehalt führt, wodurch es leicht zu löslichen Oligomeren oder zu größeren unlöslichen Fibrillen aggregieren kann, welche dann zu Plaques werden können. In diesem Prozess soll A β 42 zudem die Falschfaltung von anderen A β -Spezies auslösen (Jarrett et al. 1993). Das kürzere Peptid A β 40 wäre dann auch neurotoxisch (Varadarajan et al. 1999). Ein Konsens über den Mechanismus der A β -Toxizität besteht derzeit allerdings nicht.

1.3 Tiermodelle der Alzheimerschen Krankheit

Aufbauend auf die Erkenntnisse der genetischen Analyse der familiären Form der Alzheimerschen Krankheit, wurden transgene Tiermodelle in verschiedenen Spezies, vor allem aber in der Maus, entwickelt. Obwohl die verfügbaren Tiermodelle bisher nur die beiden histopathologischen Hauptmerkmale der Krankheit, senile Plaques und neurofibrilläre Bündel rekapitulieren, haben sie sich als Modelle zur Untersuchung der neuropathologischen Veränderungen und den assoziierten genetischen Interaktionen bei der FAD bewährt (Spires und Hyman 2005). Die Relevanz der Ergebnisse für das Verständnis der sporadischen Form der Alzheimerschen Krankheit ist jedoch unklar.

Invertebraten wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Nematode *Caenorhabditis elegans*, deren Hirnanatomie sich sehr von derjenigen in Säugern unterscheidet, werden dennoch aufgrund ihrer geringen Größe, der kurzen Lebensspanne und gut charakterisierten Genetik als Modellorganismen für neurodegenerative Erkrankungen herangezogen. Sie erlauben die schnelle, und mit einem vergleichsweise geringen finanziellen Aufwand behaftete Untersuchung der zellbiologischen Veränderungen, die in die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit involviert zu sein scheinen (Spires und Hyman 2005). In den frühen 1990er Jahren wurden viele Mausmodelle entwickelt, die durch Überexpression von humanem APP oder APP-Fragmenten unter Neuronen-spezifischen Promotoren die Alzheimer-Pathologie reproduzieren sollten. Nach vielen Versuchen existieren heute etwa ein Dutzend Mausmodelle, die aufgrund der Überexpression von FAD-APP-Varianten eine amyloide Pathologie entwickeln. Darüber hinaus existieren transgene Mausmodelle, welche der Interaktion des APP-Gens mit anderen Genen, z.B. für Preseniline, ApoE, LRP und

BACE1 Rechnung tragen sollen. Zudem gibt es verschiedene transgene Tiermodelle zur NFT-Pathologie. Da keines der etablierten mono-transgenen Tiermodelle bislang die histopathologischen Hauptmerkmale der Alzheimerschen Krankheit in hinreichender Weise rekapituliert, sind verschiedene mehrfach-transgene Modelle entwickelt worden. Die aus mehrfach-transgenen Modellen gewonnen Resultate sind allerdings von beschränkter Aussagekraft, da sie keinen menschlichen Genotyp mehr widerspiegeln.

Im folgenden soll das transgene Mausmodell APP23 näher vorgestellt werden, welches im Rahmen dieser Promotionsarbeit genutzt wurde. APP23 wurde von der Novartis AG (Basel) entwickelt (Sturchler-Pierrat et al., 1997) und gilt als das am besten charakterisierte Alzheimer-Mausmodell. In den transgenen Mäusen wird die humane APP₇₅₁ cDNA, die an Position 670/671 (KM→NL) eine in einer schwedischen Patientenkohorte erstmals entdeckte Doppelmutation trägt, unter der Kontrolle des murinen Thy1-Promotors neuronenspezifisch überexprimiert (Luthi et al. 1997). Das humane Transgen wird dabei etwa siebenmal stärker exprimiert als das endogene murine APP. Die APP23-Mäuse entwickeln erste Amyloid-Ablagerungen im Alter von etwa sechs Monaten (Sturchler-Pierrat et al. 1997), und ihre Anzahl und Größe steigt mit zunehmendem Alter. Die Ablagerungen sind von Anfang an "kongophil", also mit dem Farbstoff Kongorot anfärbbar, was als ein Charakteristikum von senilen Plaques mit dichtem Kern angesehen wird. Diffuse Plaques werden nur in alten APP23-Mäusen (14-18 Monate) mit hoher Plaque-Belastung gefunden. Eine Ausnahme bildet dabei das Striatum; hier treten, wie bei der Alzheimerschen Krankheit auch, ausschließlich diffuse Plaques auf (Stalder et al. 1999). In Regionen hoher Zelldichte wie der Pyramidenzellschicht im Bereich der CA3-Region des Hippocampus, kann ein lokaler Neuronenverlust in der unmittelbaren Umgebung der Plaques beobachtet werden. Zudem wird ein Neuronenverlust von etwa 14% im Bereich CA1 des Hippocampus beobachtet, obwohl kein Absterben von Neuronen im Cortex auftritt (Calhoun et al. 1998). Im Alter von zwölf Monaten ist in APP23-Mäusen in Plaque-assoziierten Hirnregionen eine massive Reaktion von Astrozyten und Mikroglia zu beobachten. Die kongophilen Plaques sind meist umgeben von dystrophierten Neuronen (Boncristiano et al. 2002). Zudem tritt eine Aß-Plaqueassoziierte, lokale Degeneration cholinerger Fasern auf. Hyperphosphoryliertes tau ist in den Gehirnen der APP23-Mäuse nur assoziiert mit senilen Plaques zu detektieren, wobei die Phosphorylierung von tau parallel zur Aβ-Ablagerung zu verlaufen scheint und ebenfalls mit steigendem Alter zunimmt. Es können jedoch keine NFTs detektiert werden. APP23-Mäuse entwickeln marginale Erinnerungsdefizite in Verhaltenstests (Lalonde et al. 2002; Kelly et al. 2003; Van Dam et al. 2003).

Das mono-transgene Mausmodell APP23 wurde gewählt, weil es ein authentisches Modell für eine familiäre Form der Alzheimerschen Krankheit darstellt. Durch den altersabhängigen Verlauf der Plaque-Entwicklung können sich die Mäuse normal entwickeln. Die Auswirkungen von epigenetischen Umweltfaktoren wie oxidativem Stress, der bei der Entwicklung der sporadischen Alzheimerschen Krankheit möglicherweise eine zentrale Rolle spielt, sollten sich in dem vulnerablen monotransgenen Mausmodell APP23 in einem überschaubaren Zeitrahmen bemerkbar machen.

1.4 Fragestellung

Beide Formen der Methioninsulfoxid-Reduktasen (MSRs) sind in so verschiedenen Spezies wie Hefen, Fliegen und Mäusen essentiell (Weissbach et al. 2002). MSR-A-defiziente Mäuse sind neurologisch beeinträchtigt, zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber oxidativem Stress, und haben eine verkürzte Lebensspanne (Moskovitz et al. 2001). Das Ausschalten von MSR-A in Zellen der humanen Linse hat ein verringertes Zellüberleben, eine erhöhte ROS-Produktion und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zur Folge (Marchetti et al. 2006).

Die Methionin-Reparatur durch die MSRs ist in früheren Arbeiten als Teil eines antioxidativen Schutzmechanismus beschrieben worden (Levine et al. 1996). Laut dieser Vorstellung könnten die Methioninreste in Proteinen als kompetitive antioxidative Barriere dienen, indem sie mit Oxidantien aus der Umgebung reagieren und so kritischere Positionen wie z.B. Cofaktoren innerhalb desselben Proteins oder von angrenzenden Proteinen vor einem oxidativem Angriff durch ROS bewahren.

Die Hypothese, dass das Met(O)/MSR-System über das Methionin-Recycling hinaus einen antioxidativen Mechanismus darstellt, sollte aufgrund folgender Überlegungen untersucht werden: (1) Dient das Met(O)/MSR-System lediglich der Reparatur des oxidierten Methionins, sollte der Methioningehalt von Proteinen in besonders oxidativen Zellkompartimenten unverändert oder sogar verringert sein. (2) Wenn Methioninreste in Proteinen tatsächlich einen antioxidativen Schutz für die Zelle bedeuten, könnte der Fall eintreten, dass die redoxlabile Aminosäure in Proteinen unter starker oxidativer Belastung, wie der inneren mitochondrialen Membran, in scheinbar paradoxer Weise angereichert ist. Diese Überlegungen sollten im Rahmen von *in silico*-Analysen mitochondrialer Proteome überprüft werden.

Die Hauptform der MSR-B in Säugern ist ein Selenoprotein (Moskovitz et al. 2002). Selenmangel führt in Mäusen zu einer erhöhten Methioninoxidation (Moskovitz und Stadtman 2003; Moskovitz 2007). Die Bedeutung von Selen für die normale Gehirnfunktion wird zudem darin deutlich, dass die Konzentration dieses Spurenelements auch unter Langzeit-Mangel-Bedingungen im Gehirn weitgehend aufrecht erhalten wird (Behne et al. 1988). Neuronen werden durch einen Selenmangel vulnerabel gegenüber Exzitotoxizität, welche in der Pathologie der Alzheimerschen Krankheit ebenfalls eine Rolle spielt (Savaskan et al. 2003). Erstaunlicherweise konnte in den Hirnen von MSR-A-Knockout-Mäusen eine der Alzheimerschen Krankheit ähnliche Neuropathologie beobachtet werden (Pal et al. 2007).

Die Auswirkung von oxidativem Stress im Allgemeinen und von einer erhöhten Methioninoxidation im Speziellen auf die Entwicklung einer neurodegenerativen Krankheit sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit anhand eines relevanten Umwelt-Interventionsmodells *in vivo* untersucht werden. Im Fütterungsversuch wurden transgene Mäuse des Alzheimer-Modells APP23 einem lebenslangen Selenmangel ausgesetzt. Die möglichen Auswirkungen des auf diese Weise induzierten oxidativen Stresses auf den histopathologischen Krankheitsverlauf sollten anhand charakteristischer Marker wie senile Plaques und Neurodegeneration untersucht werden.

2 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biomol (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Gibco/Invitrogen (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt), New England BioLabs (Frankfurt/Main), Peqlab (Erlangen), Roth (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben und jeweils nach Angaben des Herstellers aufbewahrt und verwendet.

2.1 Chemikalien

N-Dodecanoyl-Methionin-Methylester N-Dodecanoyl-Isoleucin-Methylester N-Palmitoyl-Methionin N-Palmitoyl-Methionin-Methylester N-Acetyl-Methionin-Methylester Rotenon MPP⁺

2.2 Antikörper

Anti-Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4) Anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogensase (GAPDH, HRP-konjugiert) Anti-Actin

2.3 Geräte

Absaug-System "VacuSafe" Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop Brutschränke Heizblock Dampfsterilisator "VarioClav" Image Master VDS Software iQ Real-Time-PCR Thermozykler Jung Einbettmedium Kryostat HM 500 OM Luminometer Mikrotiterplatten-Lesegerät Mini Protean III, Western-Blotting-System PCR DNA Thermozykler Eigensynthese Eigensynthese Eigensynthese Eigensynthese Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Abcam plc, Cambridge, UK Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Integra, Fernwald Zeiss, Göttingen Binder, Tuttlingen Eppendorf, Hamburg H+P, Oberschleißheim Pharmacia Biorad, München Leica Microsystems, Wetzlar Microm, Walldorf Wallac Inc., PerkinElmer, USA Thermo Labsystems, Ulm BioRad, München Biometra, Göttingen pH-Meter Präparierbesteck Power Pack 200, 300 Perfusions-Pumpen Spektrophotometer Trans-Blot-Blottingapparatur Swing-Out Rotor TLS 55 Sterilbänke Sub-CellGT Agarose-Gel-Elektrophorese-System Ultrazentrifuge Optima TLX XCell Sure Lock Western-Blotting-System ,,NuPAGE" Zentrifuge Universal 32 R inoLab, Weilheim FineScienceTools, Heidelberg BioRad, München Kent Scientific Corp, Connecticut, US Beckman, München Beckman, München Heraeus, Hanau BioRad, München Beckman, Krefeld Invitrogen, Karlsruhe Hettich, Tuttlingen

2.4 Weitere Verbrauchsmaterialien

Gel-Blotting-Papier Hybond N⁺ Nylontransfermembran pH-Papier Protran Nitrocellulose-Membran Zellkulturschalen Objekträger Superfrost plus Deckgläser Schleicher & Schuell, Dassel Amersham, Freiburg Merck, Darmstadt Schleicher & Schuell, Dassel TPP Europa/Schweiz Menzel, Braunschweig Roth, Karlsruhe

2.5 Enzyme

Proteinase K RNase-freie DNase Taq-Polymerase Amresco, Solon, USA Qiagen, Hilden Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Oligonukleotide

Folgende Primer wurden in der PCR zur Genotypisierung der APP23-Mäuse verwendet (siehe Kapitel 3.3.1.3).

Primer	Sequenz	T _A ^o C
APPCT-1F	5`-GAATTCCGACATGACTCAGG-3`	58
APPCT-1R	5`-GTTCTGCTGCATCTTGGACA-3`	58
Actin-1F	5`-GACAGGATGCAGAAGGAGAT-3`	58
Actin-1R	5`-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3`	58

2.7 Klonale Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adhärente klonale Zellen einer humanen Neuroblastomzell-Linie verwendet (SH-SY5Y (Biedler et al. 1973)).

2.8 Primäre Zellen

Für die Herstellung von embryonalen, neuronalen Primärkulturen wurden schwangere Sprague-Dawley-Ratten aus der Tierhaltung des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz (Duesbergweg 6) verwendet.

2.9 Transgene Mäuse

Für die Langzeit-Fütterungsversuche wurden transgene Tiere des Alzheimer-Mausmodells APP23 (Novartis AG, Basel) verwendet. In Abb.2.1 ist der zugrundeliegende Expressionsvektor schematisch dargestellt. In diesen transgenen Mäusen steht die humane APP₇₅₁ cDNA, die an Position 670/671 (KM \rightarrow NL) die "swedish"-Doppelmutation trägt, unter der Kontrolle des murinen Thy1-Promotors und wird neuronenspezifisch etwa siebenmal stärker als das endogene murine APP überexprimiert (Luthi et al. 1997).



Abbildung 2.1: Expressionsvektor zur Herstellung der transgenen Mauslinie APP23 (Novartis AG, Basel).

2.10 Spezialfutter

Selen- bzw. Vitamin E-defizientes Futter (#TD.05068 bzw. #TD.05069), sowie ein mit beiden Antioxidantien resupplementiertes Kontrollfutter (#TD.05070) wurde von der Firma Harlan Teklad (Wisconsin) bezogen. Die Zusammensetzung der Futter ist in Tab. 2.1 dargestellt.

	Selen+Vitamin E- haltiges Futter g/kg	Selen-defizientes Futter g/kg	Vitamin E-defizientes Futter g/kg
Torula-Hefe	300.0	300.0	300.0
D/L-Methionin	3.0	3.0	3.0
Saccharose	588,2556	588,2556	588,4556
Tierisches Fett	50,0	50,0	50,0
Selendefizienter Mineralmix (#TD 80313)	35,0	35,0	35,0
Calciumcarbonat	15,0	15,0	15,0
Vitaminmix (ohne Cholin, Vit. A, D, E) (#TD 83171)	5,0	5,0	5,0
Cholincitrat	2,5	2,5	2,5
Vitamin A-Palmitat (5000000 U/g)	0,04	0,04	0,04
Vitamin D ₃ , Cholecalciferol (500000 U/g)	0,0044	0,0044	0,0044
D/L-α-Tocopherol-Acetat (500 IU/g)	0,2	0,2	
Natriumselenit (0,0445% Na ₂ SeO ₃ in Saccharose)	1,0		1,0

Tab. 2.1: Zusammensetzung der verwendeten Futter

2.11 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden von der Firma GIBCO bezogen. Das verwendete fötale Rinderserum (FBS) wurde zuvor 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert.

Die Abkürzungen bedeuten: HBSS, Hanks Balanced Salt Solution (#14170); D-PBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Salt Solution; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; MEM, Mininmal Essential Medium.

Kulturmedium für SH-SY5Y-Zellen DMEM (#41965) 10% FBS 1x Antibiotika/Antimycotika-Mix (#15240) 1 mM Pyruvat (#11360)

Kulturmedium für die Primärzellkultur Neurobasal-Medium (#21103) 1x B27-Supplement (#17504) 0,5 mM L-Glutamin (#25030) 5 µg/ml Gentamicin (#15710)

Beschichtungslösung für die Primärzellkultur 0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin in D-PBS (#14190) (MW: 30000-700000)

Wasch-Medium für die Primärzellkultur MEM (#21090) 10% FBS

2.12 Puffer und Lösungen

Zusammensetzung allgemein verwendeter Puffer und Lösungen

10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) nach Maniatis 1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O 18 mM KH₂PO₄ pH 7,4 (NaOH)

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) 2 M Tris-Base 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8,5 (HCl)

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 0,89 M Tris-Base 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,3 (HCl)

10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 0,25 M Tris-Base 1,37 M NaCl 27 mM KCl pH 7,4 (HCl)

Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN 20 (TBS/Tween) 1x TBS 0,1% (v/v) Tween 20 pH 7,4

TE-Puffer 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA pH 8,0 (HCl)

TNES-Puffer 10 mM Tris-Base 100 mM NaCl 10 mM EDTA 0,5% (w/v) SDS pH 8,0

Orange-G-Auftragspuffer 0,25% Acid Orange 10 45% (v/v) Glycerol in 1x TBE 1 mM EDTA pH 8,0 *1x Lysispuffer* 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS 10% (w/v) Saccharose 5 µg/ml Aprotinin 10 mM PMSF

Solubilisierungs-Lösung 40% (w/v) Dimethylformamid 10% (w/v) SDS pH 4,0 (Eisessig)

Zusammmensetzung der für die Proteinbiochemie verwendeten Puffer und Lösungen

4x Probenauftragspuffer für die SDS-PAGE 200 mM Tris-HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerol 0,02% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) β-Mercaptoethanol

10x Laufpuffer für die SDS-PAGE 250 mM Tris-Base 2,5 M Glycin 1% (w/v) SDS pH 8,3

Trenngel für die SDS-PAGE 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 8%-12% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,1% (w/v) SDS 0,05% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS

Sammelgel für die SDS-PAGE 0,15 M Tris-HCl, pH 6,8 3% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,1% (w/v) SDS 0,05% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS

10x Transferpuffer 25 mM Tris Base 250 mM Glycin 20% (v/v) Methanol

1x Ponceau S 0,02% (w/v) Ponceau S 0,3% (w/v) Trichloressigsäure 0,3% (w/v) Sulfosalicylsäure

Blockierungspuffer 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBS/Tween

Sonstige Lösungen

30% (w/v) Saccharose in 1x PBS

4% (w/v) PFA in 1x PBS pH 7,2 (HCl)

Mowiol Einbett-Medium 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 10% (w/v) Mowiol 4-88 20% (v/v) Glycerin 2,5 % (w/v) DABCO

3 M NaAc in ddH₂O

MTT-Lösung 5mg/ml MTT in ddH₂O

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Klonale Zelllinien

Adhärente SH-SY5Y-Zellen einer humanen Neuroblastomzell-Linie (Biedler et al. 1973) wurden in einem Kulturmedium bestehend aus DMEM, 10% FBS, 1 mM Pyruvat sowie 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung in Zellkulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einer Kohlendioxid-Konzentration von 5%. Phenolrot als pH-Indikator im Medium zeigte verbrauchtes und durch den Zellstoffwechsel angesäuertes Medium an. Das Passagieren der adhärenten Zellen wurde unter Verwendung einer 0,1% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA-Lösung durchgeführt.

3.1.2 Primärkultur von embryonalen Mittelhirn-Neuronen aus der Ratte

Die Isolation der Mittelhirn-Neurone erfolgte aus Rattenembryonen im Stadium des 18. Embryonaltages. Hierfür wurden zeitlich verpaarte schwangere Sprague-Dawley-Ratten aus der institutseigenen Tierhaltung verwendet. Nach tiefer Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde das Muttertier durch Guillotinierung getötet. Danach wurden die Embryos entnommen und ebenfalls dekapitiert. Die Dissektion der Gehirne erfolgte in eiskaltem Ca²⁺- und Mg²⁺freiem PBS. Die herauspräparierten Teile des Mittelhirns wurden in eiskaltem HBSS gesammelt, mit einer Pinzette in kleine Stücke zerteilt und dann für 20 min in 0,1% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Gewebestücke in HBSS, das 10% FBS enthielt, überführt, um die Trypsin-Aktivität zu inhibieren. Die Gewebestücke wurden mit einer 10 ml-Pipette durch schonendes Auf- und Abpipettieren dissoziiert und größere Zelltrümmer durch ein Nybolt-Netz von 50 µm Porengröße abfiltriert. Anschließend wurden die im Filtrat befindlichen Zellen bei 300 g für 4 min zentrifugiert und zunächst in 10 ml des Kulturmediums ohne Antioxidantien (Neurobasal-Medium, B27-Supplement ohne Antioxidantien, 0,5 mM Glutamin, 5 µg/ml Gentamicin) resuspendiert, bevor sie im finalen Kulturmedium (Neurobasal-Medium, B27-Supplement mit Antioxidantien, 0,5 mM Glutamin, 5 µg/ml Gentamicin) auf Zellkulturschalen ausplattiert wurden. Die Zellkulturschalen waren zuvor für mindestens 30 min mit Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) inkubiert und anschließend mit MEM-Medium / 10% FBS gewaschen worden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO2 in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre. Nach neun Tagen in Kultur wurden die Primärzellen für Experimente verwendet.

Für die mikroskopische und oder immunzytochemische Auswertung wurden die Zellen am Ende eines Experiments fixiert. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abgezogen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und dann mit Methanol (-80°C) für mindestens 20 min bei - 20°C fixiert.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl des Membran-impermeablen Farbstoffs Trypanblau verdünnt. Die lebenden Zellen schließen den blauen Farbstoff aus und können daher unter dem Mikroskop als helle, doppelbrechende kugelige Strukturen identifiziert und gezählt werden.

3.2 Langzeit-Fütterungsversuche mit dem Alzheimer-Mausmodell APP23

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden nach den Richtlinien der "Nutzerordnung für die Tierhaltung" der Zentralen Versuchstier-Einrichtung (ZVTE) Mainz in der Tierhaltung des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie im Duesbergweg 6 gehalten. Sie waren zeitlebens einem 12h:12h Hell:Dunkel-Zyklus unterworfen und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Die von der Novartis AG (Basel) erhaltenen transgenen APP23-C57/B6-Männchen wurden im institutseigenen Tierstall mit C57/B6-Weibchen über mehrere Einkreuzungszyklen stabil verpaart. Geschlechtsreife F1-Individuen wurden genotypisiert (Kapitel 3.3.1.3) und die transgenen Individuen beiden Geschlechts selektiert.

Die APP23-Männchen wurden auf Kontrollfutter (Kapitel 2.10) gesetzt, um mögliche Beeinträchtigungen der Spermienfertilität zu vermeiden. Die Weibchen erhielten für 4-6 Wochen das jeweilige Spezial-Futter und wurden dann mit den Männchen verpaart. Aus den resultierenden Jungtieren der F2, die auf diese Weise die Spezialfutter bereits *in utero* erhalten hatten, wurden die eigentlichen Versuchs-Futtergruppen generiert. Im Alter von 21 Tagen wurden sie von der Mutter abgesetzt und nach Geschlecht getrennt, wobei maximal fünf Tiere in einem Käfig gehalten wurden. Die Jungtiere bekamen das jeweilige Futter, welches die Mutter vor und während der Tragzeit erhalten hatte. Sie hatten ebenfalls Zugang
zu Futter und Wasser *ad libitum*. Das Trinkwasser wurde wöchentlich gewechselt. Einmal pro Woche wurde der Gesundheitszustand der Tiere überprüft. Dabei wurden die Mäuse hinsichtlich Verhaltensauffälligkeiten, neurologischer Ausfälle und Erscheinungsbild anhand von Parametern wie Fellpflege, aktive Futteraufnahme, und die Fähigkeit, sich zur Traufe hin aufzurichten, sowie generell motorische Fähigkeiten, überprüft.

3.2.1 Analyse der APP23-Mäuse nach zwölf Monaten

Im Alter von zwölf Monaten sollten die selendefizienten APP23-Mäuse mit den transgenen Alzheimer-Mäusen auf Kontrollfutter anhand histopathologischer Marker wie seniler Amyloid-Plaques oder Neuronenverlust verglichen werden. Als primärer Endpunkt für die statistische Berechnung der notwendigen Gruppengröße via One-Way-ANOVA wurde die Plaquebelastung gewählt, und es wurden die folgenden Analyseparameter zugrunde gelegt: Es wurde eine Verdopplung oder Halbierung der Plaquebelastung als biologisch signifikantes Ergebnis postuliert. Als Meßungenauigkeit wurde eine experimentelle Schwankungsbreite von 50% angenommen. Die Detektionsstärke des statistischen Tests sollte 0,80 betragen, die Irrtumswahrscheinlichkeit 0,01. Aus diesen Parametern ergab sich rechnerisch eine notwendige Gruppengröße von vier Tieren. Beim finalen Design des Fütterungsversuchs wurde die Gruppengröße auf acht Tiere verdoppelt, da die möglichen Auswirkungen der Antioxidantien-Depletion auch anhand eines nicht-histologischen Parameters, nämlich auf Ebene der Selenoproteinexpression am Beispiel der Glutathionperoxidase 4, analysiert werden sollten.

3.2.2 Perfusion

Für die histologische Auswertung wurden die APP23-Mäuse im Alter von 12 Monaten unter tiefer Isofluran-Narkose transcardial perfundiert, wobei peristaltische Pumpen verwendet wurden (1 ml/min). Dabei wurde das Gefäßsystem zunächst mit eiskaltem PBS gespült und dann mit eiskalter 4% PFA (w/v) fixiert. Nach der Perfusion wurde das Hirn entnommen und im gleichen Fixativ mindestens zwölf Stunden bei 4°C postfixiert.

3.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die postfixierten Organe wurden zur Kryoprotektion über Nacht bei 4°C in einer 30% Saccharose-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Hirne mit Zellstoff getrocknet und in mit Einbettmedium gefüllten Aluminiumfolie-Taschen bei -80°C auf Trockeneis/EtOH eingebettet. Die Schnitt-Blöcke wurden dann bei -20°C gelagert.

In einem Cryostaten "CM 1900" von Leica wurden koronale Schnitte von 10 µm Dicke angefertigt und direkt vom Messer auf Glasobjektträger aufgezogen, die mit einem positiven Ladungsträger beschichtet waren (Menzel, Braunschweig). Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.4 Entnahme nicht-fixierten Gewebes für die Proteinbiochemie

Die Tiere wurden durch Inhalation mit Isofluran tief anästhesiert und durch Dekapitation getötet. Es wurden Gewebeproben von Cerebellum, Kortex, Herz, Niere und Leber entnommen, jeweils in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Analytik

3.3.1 DNA-spezifische Techniken

3.3.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Ohr- bzw. Schwanzbiopsien der APP23-Mäuse wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in jeweils 500 μl TNES-Extraktionspuffer mit einem sterilen Homogenisator (Eppendorf) von Hand homogenisiert und nach Zugabe von 10 μl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O) über Nacht bei 55°C verdaut. Danach wurde das Lysat vortexiert, mit 1 Volumen Phenol/Chloro-form/Isoamylalkohol (25:24:1, 4°C) versetzt, und nochmals gut gemischt (Vortex). Nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 4°C) für 5 Minuten wurde jeweils die obere Phase abgenommen, in 1 Volumen Chloroform/Isoamyl-alkohol (24:1, 4°C) überführt, und erneut für 5 min (14000 rpm, 4°C) zentrifugiert.

3.3.1.2 Natriumacetat-Fällung von DNA

Nach der Zentrifugation wurde jeweils die obere Phase abgenommen, mit 0,1 Volumen Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol (absolut, -20°C) gemischt, und für 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden nochmals mit 70% Ethanol (-20°C) versetzt, 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Danach wurden die Pellets in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen und durch 1h Inkubation bei 55°C (unter Schütteln) gelöst.

3.3.1.3 PCR-Amplifikation von DNA

Die Genotypisierung der APP23-Mäuse erfolgte über eine PCR mit spezifischen Primern zur Amplifikation eines 246 bp langen Sequenzabschnitts innerhalb der 600 bp langen, die *swedish*-Mutation tragenden, APP₇₅₁-cDNA. Zur Überprüfung der PCR wurden dem Ansatz zusätzlich Primer gegen Actin (PCR-Produkt von 146 bp Länge) beigefügt (Primersequenzen, siehe Kapitel 2.7). Die PCR mit DNA einer transgenen Maus lieferte also zwei DNA-Fragmente, die sich um 100 bp in ihrer Größe unterschieden. Jeweils 2 µl der isolierten DNA als Templat wurde mit 23 µl eines PCR-Puffers versetzt, welcher jeweils 5 pmol der vier Primer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, sowie 1,25 U Taq-Polymerase enthielt.

Die PCR wurde nach folgenden Standardbedingungen durchgeführt: Die initiale Denaturierung erfolgte für 4 min bei 94°C. Danach folgten 35 Zyklen bestehend aus 45 s bei 94°C zur Denaturierung, 45 s bei 58°C zur Rehybridisierung mit den Primern und 45 s Inkubation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, zur DNA-Synthese. Im Anschluß an die 35 PCR-Zyklen folgte noch eine 5minütige Inkubation bei 72°C zur Nachsynthese. Eine anschließende Abkühlung auf 4°C führte zur Termination der PCR.

3.3.1.4 DNA- Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die mit dem Auftragspuffer "Orange G" versetzten DNA-Proben in einem 2% Agarosegel aufgetrennt, welches außerdem 4 µg Ethidiumbromid (EtBr) enthielt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA im Gel erfolgte horizontal in 1x TAE-Puffer bei 45 Volt für 30 min (25 ml-Gel) oder für 1 h bei 70 Volt (100 ml-Gel). Der fluoreszierende Farbstoff EtBr interkaliert in die Nukleinsäuren und kann durch UV-Licht (366 nm) auf dem Transilluminator zum Fluoreszieren angeregt werden. Auf diese Weise können die DNA-Fragmente als horizontale Banden sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten werden.

3.3.1.5 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte UV-photometrisch in einer Quarzküvette (optische Schichtdicke = 1 cm), indem die Absorbtion der in ddH_2O verdünnten Nukleinsäuren bei 260 nm gegen die Referenz ddH_2O gemessen wurde.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt. Dabei wurde folgender Wert zugrunde gelegt: ds DNA 50μ g/ml bei OD₂₆₀ = 1

Konzentration $[\mu g/ml] = Abs_{260 nm} \times 50 \mu g/ml \times Verdünnungsfaktor$

3.3.2 Protein-spezifische Techniken

3.3.2.1 Protein-Isolation

Zur Isolation von Proteinen aus APP23-Mausgeweben wurden die entnommenen Gewebestücke (siehe Kapitel 3.2.4) manuell mit 3-5 Volumen eiskaltem Lysispuffer homogenisiert, der zum Schutz der Proteine vor proteolytischem Abbau zusätzlich 1x Protease-Inhibitorcocktail (Sigma, Taufkirchen) enthielt. Die Homogenisate wurden kurz sonifiziert und bei -20°C aufbewahrt. Für die Proteinbestimmung mit der BCA-Methode wurden sie in Lysispuffer verdünnt.

3.3.2.2 Protein-Quantifizierung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Kit der Firma Pierce, wobei Serumalbumin als Standard diente. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils 50 µl der Protein-Proben (1:10 oder 1:100 in Lysispuffer verdünnt) wurden mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Danach wurden die optischen Dichten der einzelnen Proben bei 560 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3.3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur weitergehenden Untersuchung wurden die komplexen Proteinproben mithilfe der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Hierfür wurde zunächst ein denaturierendes Gel, bestehend aus einem "Trenngel" und einem "Sammelgel" angefertigt (siehe Kapitel 2.12). Um eine gerade Abschlußkannte zwischen den beiden unterschiedlich prozentigen Gelen zu erhalten, wurde das Trenngel mit ddH₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel hinzugefügt und ein Gelkamm gewünschter Taschengröße eingesetzt. In der Regel wurden jeweils 10 µg Protein mit 4x Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend in die Geltasche geladen. Als Größenstandard wurde der "peqGOLD Protein-Marker IV

(Prestained)" von PeqLab verwendet. Die Proteinproben wurden bei 150 Volt in 1x SDS-Laufpuffer in der "Mini-PROTEAN[®] 3 Cell" Gel-Kammer der Firma Biorad aufgetrennt.

3.3.2.4 Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Wetblot-System der "Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell"-Apparatur von Biorad verwendet. Dabei wurden Gel und Nitrozellulosemembran zwischen in 1x Transferpuffer + 20% Methanol getränkten Whatmanpapieren und speziellen, zur Apparatur gehörenden "Schwämmchen" in Sandwich-Manier zusammengebaut und in der, mit Transferpuffer gefüllten Blot-Kammer versenkt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei 60 Volt für etwa 3 h bei Raumtemperatur. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran anschließend kurz mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrundes mit ddH₂O waren die Proteine als rote Banden sichtbar.

3.3.2.5 Immunologischer Protein-Nachweis auf Western-Blot-Ebene

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine zunächst für 1 h bei RT mit einem 5% Magermilch enthaltenden Blockierungspuffer geblockt. Dann folgte die Inkubation in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in TBS/Tween über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung des überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpers wurde die Membran dreimal für je 10 min in TBS/Tween gewaschen bevor die Inkubation mit dem sekundären, Horseraddish-Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT erfolgte. Nach drei weiteren Wasch-Schritten in TBS/Tween und Zugabe der HRP-Substrat-Lösung "Immobilon" von Millipore konnte der sekundäre Antikörper mittels der digitalen Entwicklermaschine "Las 3000" von FujiFilm detektiert und fotografisch festgehalten werden.

3.3.3 Histologische Analyse

3.3.3.1 Hämatoxylin/Kongorot-Färbung

Zum Nachweis von amyloiden Plaques wurden die Schnitte der PFA-fixierten APP23-Maushirne (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) mit dem Farbstoff Kongorot gefärbt. Zur Sichtbarmachung der Neuronenmorphologie wurden die Hirnschnitte zusätzlich mit Hämatoxilin angefärbt. Die auf Objekträger aufgezogenen Cryoschnitte wurden bei RT kurz in 1x PBS gewaschen, dann wurden sie 20 bis 40 min in einer Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (Sigma-Aldrich) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte bis zur gewünschten Blaufärbung in Leitungswasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 1% NaOH / NaCl / EtOH für 30 min bei RT. Die Färbung mit Kongorot (0,2 % in 80% EtOH) erfolgte für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Schnitte mit 80% EtOH gewaschen bis die Wasch-Lösung klar blieb, und an der Luft getrocknet. Zuletzt wurden die Hirnschnitte mit Mowiol-Einbettmedium (siehe Kapitel 2.1.2) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Das Antifade-Reagenz "1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan" (DABCO), welches im Mowiol-Einbettmedium enthalten ist, soll das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs nach erfolgter Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge verhindern. Nach Trocknung bei RT wurden die gefärbten Hirnschnitte mikroskopisch ausgewertet.

3.3.4 Sonstige Assays

3.3.4.1 MTT Zellviabilitäts-Assay

Bei diesem (colorimetrischen) Assay macht man sich die Tatsache zunutze, das metabolisch aktive, also vitale Zellen in der Lage sind, das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) zu dem purpurfarbenen unlöslichen Formazan zu reduzieren, welches sich solubilisieren und mit spektrophotometrischen Methoden quantifizieren lässt. Die Reduktion von MTT zu Formazan wird durch das "Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System" erreicht, welches zur mitochondrialen Atmungskette gehört und nur in lebenden Zellen aktiv ist. Auf diese Weise lassen sich Zellproliferation oder Zelldegeneration leicht messen.

Hierzu wurden die in 96-Loch ("well") - Zellkulturplatten ausgesäten Zellen am Ende des Experiments mit MTT-Lösung (siehe Kapitel 2.1.2; 10 μ l pro well) versetzt und für 2 bis 4 h im Brutschrank (bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre) inkubiert bis die purpurnen Präzipitate des Formazans im Medium sichtbar wurden. Diese wurden anschließend durch Zugabe von einer Detergenz-haltigen Lösung (Solubilisierungs-Lösung, siehe Kapitel 2.1.2; 100 μ l pro well) über Nacht bei Dunkelheit und RT gelöst und die Absorbtionen bei 560 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gegen Medium ohne Zellen als Referenz gemessen.

3.3.4.2 DCFA- Assay zur endogenen Peroxidbestimmung/Oxidationsmessung

Die Messung der intrazellulären Peroxid-Akkumulation erfolgte fluorimetisch mithilfe des Farbstoffs 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (DCFA). DCFA wird von lebenden Zellen aufgenommen und dort hydrolytisch zu dem nicht-membrangängigen Fluorophor Dichlorfluorescin (DCF) abgebaut, welches eine hohe Reaktivität gegenüber Peroxiden und anderen ROS aufweist und fluorimetrisch quantifiziert werden kann.

Klonale SH-SY5Y-Zellen (10^6 Zellen/ml), wurden für 15 min bei 37°C mit 5 μ M DCFA inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 1x PBS/Glucose(1mg/ml) wurde zu den Zellen H₂O₂ sowie jeweils verschiedene Antioxidanzien zugegeben und anschließend die Änderung der zellulären (DCF)-Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Wallac 1420 Victor³V Mehrkanalzähler, PerkinElmer) quantifiziert. Die Grenzwellenlänge des Anregungsfilters betrug 485 nm, die des Emissionsfilters 535 nm.

3.3.5 in silico-Analysen/Bioinformatik

Die Sequenzen für die mitochondriale Genom- und Proteom-Analyse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten aus der "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) Genom-Datenbank (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/euk_o.html</u>) bezogen. Die Sequenzen der nukleären Proteome stammen aus der Datenbank des "European Bioinformatics Institute" (EBI) Integr8 (http://www.ebi.ac.uk/integr8/).

3.3.5.1 Auswahlkriterien für die analysierten Spezies

Für die Analyse wurden alle metazoischen Stämme mit drei und mehr komplett sequenzierten mitochondrialen Genomen herangezogen. Stämme mit weniger als 50 sequenzierten Exemplaren wurden komplett analysiert (Schwämme, Cnidarier, Brachiopoden und Anneliden wurden im April 2006, Mollusken, Plathelminthen, Nematoden und Echinodermen im November 2005 bearbeitet). Stämme mit mehr als 50 sequenzierten mitochondrialen Genomen wurden nicht komplett analysiert: Von den Arthropoden wurden alle Insekten, Krustazeen und Arachniden im November 2005 bearbeitet. Die hier berücksichtigten Chordaten wurden im August 2005 einem willkürlich ausgesuchten Lehrbuch entnommen (Judge und Carey 2000). Alle komplett sequenzierten mitochondrialen Genome von Pilzen, Pflanzen und anderen Eukaryonten wurden im April 2006 analysiert. Die nukleären Proteome aus der EBI-Integr8-Datenbank wurden im November 2005 bearbeitet.

3.3.5.2 Struktur-Modellierung

Die dreidimensionalen Struktur-Modelle der Atmungskettenproteine wurden durch Alignierung mit den experimentellen Kristallstrukturen der korrespondierenden bovinen Sequenzen generiert (COX: PDB 1v54; cytochrome b: PDB 1bgy), welche von der "Protein Data Bank" (<u>http://www.rcsb.org/</u>) bezogen wurden. Die Berechnungen der Proteinstrukturen erfolgten mit Hilfe des "Geno3D"-Servers des "Pôle Bioinformatique Lyonnais" (http://geno3d-pbil.ibcp.fr) (Combet et al. 2002).

3.3.6 Chemische Synthesen

Die lipophilen N-Dodecanoyl-L-Aminosäure-methylester von Methionin und Isoleucin MetOMe und IleOMe wurden wie beschrieben (Fincher et al. 1996) durch Behandlung der entsprechenden Aminosäure-Methylester-Hydrochloride (Bachem) mit Lauroylchlorid (Sigma-Aldrich) in Gegenwart von Pyridin synthetisiert und nach der Umkristallisation per Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie und ¹H-NMR verifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der antioxidativen Kapazität von Methionin

4.1.1 Bioinformatische Analysen

4.1.1.1 Vergleich des Methioningehalts kern- und mitochondrial kodierter Proteome

Im Falle einer antioxidativen Schutzfunktion von Methionin wäre zu erwarten, dass diese Aminosäure in Proteine von Zellkompartimenten mit hoher oxidativer Belastung, wie dem Mitochondrium (Cadenas und Davies 2000), besonders häufig eingebaut wird. Um dies zu überprüfen, wurden die mitochondrialen Proteome von 361 Tieren, 39 Pilzen, 34 einzelligen Eukaryonten und 16 Pflanzen mit Hilfe einer für diesen Zweck programmierten Software nach Methionin durchsucht (Perl-Script PMHMM; Dehghanpoor und Moosmann, 2006). Das Kriterium für die Auswahl der Spezies war ein, zu diesem Zeitpunkt (August 2006) in der NCBI Genom-Datenbank aufgeführtes, komplett sequenziertes mitochondriales Genom. Stämme mit weniger als 50 sequenzierten Repräsentanten wie Schwämme, Cnidarier, Brachiopoden, Anneliden, Mollusken, Plathelminthen, Nematoden und Echinodermen wurden komplett analysiert; bei Stämmen mit mehr als 50 vollständig sequenzierten mitochondrialen Genomen wurde jeweils eine repräsentative Auswahl getroffen. Unter den Arthropoden wurden alle Insekten, Krustazeen und Arachniden berücksichtigt, die Auswahl der Chordaten wurde einem Lehrbuch entnommen (Carey und Judge, 2000). Weiterhin wurden sämtliche komplett sequenzierte mitochondriale Genome von Pilzen, Pflanzen und anderen Eukaryonten analysiert. Abbildung 4.1 zeigt den prozentualen Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen der untersuchten Spezies (schwarze Punkte). Zum Vergleich ist der Methioningehalt kern-kodierter Proteine einer repräsentativen Auswahl komplett sequenzierter Eukaryonten dargestellt (rote Quadrate).



Abbildung 4.1: Gehalt an mitochondrial kodiertem Methionin in 361 Tieren, 39 Pilzen, 34 einzelligen Eukaryonten und 16 Pflanzen (schwarze Punkte) verglichen mit dem Gehalt an kern-kodiertem Methionin in einer Auswahl korrespondierender Spezies (rote Quadrate). A: Prozentualer Methioningehalt mitochondrial-kodierter Proteome von 361 Tieren. Die Abkürzungen bedeuten: P, Primaten; M, andere Säuger; B, Vögel; R, Reptilien; A, Amphibien; F, Fische; E, Echinodermen; I, Insekten; C, Krustazeen; Ar, Arachniden; N, Nematoden; Mo, Mollusken; Pl, Plathelminthen; An, Anneliden; Br, Brachiopoden; Cn, Cnidarier; S, Schwämme. Die roten Quadrate spiegeln den Gehalt an kern-kodiertem Methionin von 10 Vergleichsspezies wider. Der korrigierte kern-kodierte Methioningehalt in diesen Spezies in Bezug auf einen identischen Transmembrandomänengehalt wird durch die grünen Dreiecke dargestellt. Bei den 10 Vergleichsspezies handelt es sich um (von links nach rechts): Homo sapiens, Bos taurus, Mus musculus, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Danio rerio, Tetraodon nigroviridis, Anopheles gambiae, Drosophila melanogaster und Caenorhabditis elegans. Spezies, die sowohl AUG als auch AUA für Methionin lesen, sind rot eingerahmt. B: Gehalt an mitochondrial-kodiertem Methionin in 39 Pilzen. Die Abkürzungen stehen für: P, Pezizomyzeten; S+, Saccharomyzeten, welche AUA für die Kodierung von Met verwenden; S-, Saccharomyzeten, welche AUA zur Kodierung von Ile benutzen; Sc. Schizosaccharomyzeten; B. Basidiomyzeten; C, Chytridiomyzeten; Z, Zygomyzeten; H, Hyaloraphidium curvatum. Als Referenz diente der Gehalt an kern-kodiertem Methionin folgender Spezies (rote Quadrate): Ashbya gossypii, Candida glabrata, Saccharomyces cervisiae, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe und Cryptococcus neoformans. C: Mitochondrial-kodiertes Methionin in 34 einzelligen Eukaryonten. Die Abkürzungen bedeuten: A, Alveolaten; M, Myzetozoen; R, Rhodophyten; S, Stramenopile; al., andere Eukaryonten. Als Referenzgehalt an kern-kodiertem Methionin dienten hier die Spezies: Paramecium tetraurelia, Plasmodium falciparum, und Dictyostelium discoideum. D: Mitochondrial-kodierter Methioningehalt in 16 Pflanzen. Die Abkürzungen stehen für: C, Chlorophyten und S, Streptophyten. Der kern-kodierte Methioningehalt von Arabidopsis thaliana diente als Referenz.

Aus Abbildung 4.1 geht hervor, dass der Methioningehalt der kern-kodierten Proteine aller hier untersuchten Eukaryonten in etwa gleich war, und im Durchschnitt 2,25% \pm 0,15% betrug (rote Quadrate; A: Tiere: $2,32\% \pm 0,14\%$; B: Pilze: $2,15\% \pm 0,07\%$; C: andere Eukaryonten: $2,06\% \pm 0,32\%$; D: Arabidopsis thaliana: 2,45%). Es fiel jedoch auf, dass der Methioningehalt mitochondrial kodierter Proteine von Spezies wie Insekten, Arachniden und Säugern etwa dreimal so hoch war (schwarze Punkte: im Durchschnitt: $6,17\% \pm 1,33\%$), und bei einigen Insekten sogar 10% und mehr erreichte. Der Methioningehalt der mitochondrial kodierten Proteine von Spezies wie Echinodermen, Plathelminthen, Cnidariern und Schwämmen entsprach dagegen demjenigen kern-kodierter Proteine (im Durchschnitt: 2,74% \pm 0,48%). Auch die mitochondrial-kodierten Proteine von Pilzen und Pflanzen, sowie einer Auswahl anderer Eukaryonten enthielten um die 2-3% Methionin (B: Pilze: $2,53\% \pm 0,64\%$; C: andere Eukaryonten: $2,42\% \pm 0,46\%$; D: Pflanzen: $2,67\% \pm 0,63\%$). Bei den mitochondrial kodierten Proteinen handelt es sich ausschließlich um Membranproteine mit einem Transmembrandomänengehalt von 55%. Für die bessere Vergleichbarkeit wurden daher die Methioningehalte kern-kodierter Proteine bezüglich eines (hypothetischen) identischen Transmembrandomänengehalts korrigiert, wodurch der Methioningehalt kern-kodierter Proteine geringfügig höher wurde (grüne Dreiecke).

Um die Ursache für die bemerkenswerten Spezies-spezifischen Unterschiede im Methioningehalt mitochondrial kodierter Proteine aufzuklären, wurde im folgenden das Muster der Methionin-Codon-Nutzung in den mitochondrialen Proteomen einer Auswahl der betroffenen Organismen untersucht.

4.1.1.2 Analyse der Methionin-Codon-Nutzung in den Methionin-akkumulierenden Spezies

Die Suche nach Methionin-Codons in den mitochondrialen Proteomen von 22 Tieren und 20 Pilzen ergab, dass Spezies mit Methioninreichen mitochondrial kodierten Proteinen neben dem Standard-Methionin-Codon AUG noch ein zweites Codon, das Isoleucin-Codon AUA zur Kodierung von Methionin verwenden. Sie werden im folgenden als Zwei-Codon-Nutzer bezeichnet, und sind in Abb. 4.1 und 4.2 durch einen roten Rahmen gekennzeichnet. Diejenigen Spezies, in denen sich der Methioningehalt der mitochondrial-kodierten Proteine nicht von dem der kern-kodierten Proteine unterschied, kodieren Methionin nach dem genetischen Standard-Code. Die Korrelation der Methioninakkumulation mit der Nutzung eines alternativen genetischen Codes konnte über drei unterschiedliche Ansätze als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Die Betrachtung von tierischen Spezies als unabhängige Gesamtheit ergab eine statistische Signifikanz von $p=2,1*10^{-41}$ (n=361), die statistische Analyse von Stämmen als unabhängige Einheit lieferte $p=5,7*10^{-5}$ (n=10). Eine phylogenetische unabhängige Kontrastanalyse bezogen auf Gruppen, die von der AUA-Codon-Neunutzung betroffen sind, ergab ebenfalls eine statistische Signifikanz (p=0,003; n=5).

Die vom genetischen Standard-Code abweichende Nutzung des Isoleucin-Codons AUA zur Kodierung von Methionin ist ein Prozess, der im Laufe der Evolution mindestens fünfmal unabhängig voneinander stattgefunden hat (Swire et al. 2005; Sengupta et al. 2007), und eine moderne Diversifikation des Standard-Codes darstellt. Die AUA-Codon-Neunutzung gilt als Paradebeispiel für die "codon capture"-Theorie zur Entstehung alternativer genetischer Codes (Osawa et al. 1992; Knight et al. 2001). Nach dieser Theorie muß das betroffene Codon aufgrund eines evolutionären Drucks auf DNA-Ebene, der den GC-Gehalt und somit die Codonnutzung beeinflusst, zunächst verschwinden, bevor es eine neue Bedeutung erlangt. Um den Entstehungsmechanismus der hier beobachteten Codon-Neunutzung aufzuklären,

wurden daher die Codon-Nutzungsmuster in einer Auswahl der in Kapitel 4.1.1.1 analysierten Tiere und Pilze untersucht. Abb. 4.2 zeigt die dem prozentualen Methionin- bzw. Isoleucin-Gehalt zugrundeliegende prozentuale Nutzung aller AUX-Codons und den prozentualen GC-Gehalt in den mitochondrialen Genomen der analysierten Spezies.



Abbildung 4.2: Zusammenhang von Aminosäuregehalt, Codon-Nutzung und GC-Gehalt in einer repräsentativen Auswahl der Tiere und Pilze aus Abb 4.1. Links: Analyse der Codon-Nutzung in mitochondrialen Proteomen von Tieren, die AUA zur Kodierung von Methionin verwenden (A^+) : *Homo sapiens, Bos taurus, Mus musculus, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Danio rerio, Tetraodon nigroviridis, Anopheles gambiae, Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (die 10 Referenzspezies aus 4.1.a); sowie von jeweils drei Repräsentanten von Tierstämmen, welche AUA zur Kodierung von Isoleucin verwenden: E, Echinodermen; Pl, Plathelminthen; Cn, Cnidarier; S, Schwämme. Rechts: Codon-Nutzungsanalyse in Saccharomyzeten, welche AUA für die Kodierung von Met verwenden (S⁺) und in jeweils drei Vertretern verschiedener Pilzstämme, die Methionin nach dem genetischen Standard-Code kodieren: P, Pezizomyzeten; Sc, Schizosaccharomyzeten; B, Basidiomyzeten; C, Chytridiomyzeten; Z, Zygomyzeten. Der prozentuale Gehalt an Methionin ist durch rote Kreise, der von Isoleucin durch grüne Dreiecke angezeigt. Die verschiedenen Codons sind durch unterschiedliche Graustufen markiert. Zwei-Codon-Nutzer sind rot eingerahmt. Im unteren Teil der Abbildung ist der prozentuale GC-Gehalt der mitochondrialen Genome der jeweiligen Spezies angegeben.

Abbildung 4.2 zeigt, dass Zwei-Codon-Nutzer, die es sowohl unter den Tieren als auch unter den Pilzen gibt, das frühere Isoleucin-Codon AUA zur Kodierung von Methionin verwenden. Dabei benutzen Tiere es etwa viermal häufiger als das eigentliche Met-Codon AUG, welches im Vergleich zu den Standard-Code-Nutzern nur noch halb so oft verwendet wird. Der Wegfall des Codons AUA für Isoleucin hat einen signifikanten, minimal verringerten Gehalt dieser Aminosäure in Zwei-Codon-Nutzern zur Folge. Interessant ist die Beobachtung, dass das AUA-Codon in Zwei-Codon-Nutzern insgesamt nicht weniger häufig benutzt wird, als in den Spezies, die den genetischen Standard-Code beibehalten haben, was für die Interpretation der Entstehung der Codon-Neunutzung von Bedeutung ist. Während Isoleucin bei Tieren mit dem Standard-Code zu etwa gleichen Teilen durch die Codons AUA und AUU, jedoch nur zu einem Bruchteil durch das Codon AUC kodiert wird, verwenden Zwei-Codon-Nutzer hauptsächlich AUU zur Kodierung von Isoleucin. Der untere Teil der Abbildung zeigt den prozentualen GC-Gehalt in den mitochondrialen Genomen der analysierten Spezies. Bis auf einzelne Ausnahmen gibt es keine systematischen Unterschiede im GC-Gehalt der Genome derjenigen Spezies, die einen alternativen genetischen Code verwenden.

4.1.1.3 Strukturelle Konsequenz der Akkumulation von Methionin

Die Auswirkung der Methioninakkumulation auf die Proteinstruktur sollte am Beispiel der mitochondrial-kodierten Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) untersucht werden. Der Echinoderm Florometra serratissima mit einem Methioningehalt der mitochondrial-kodierten Proteine von 2,00% sollte dabei die Spezies repräsentieren, die Methionin gemäß dem genetischen Standard-Code kodieren. Als Beispiel für einen Zwei-Codon-Nutzer wurde das Insekt Melipona bicolor ausgewählt, das laut der in silico-Analyse einen Methioningehalt von 11,2% aufwies. Die folgenden Abbildungen zeigen die Proteinstrukturen der drei Kern-Untereinheiten (COX core, Abb. 4.3) der Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV) und von Cytochrom b (Abb.4.4), der zentralen Untereinheit der Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III). Die Strukturmodelle wurden mit Hilfe des "Geno3D servers" der "Pôle Bioinformatique Lyonnais" (http://geno3d-pbil.ibcp.fr) (Combet et al. 2002) generiert. Dabei wurde die jeweilige Echinodermen- bzw. Insekten-Sequenz zunächst mit der entsprechenden Sequenz von Bos taurus aligniert und die Proteinstruktur anhand der bekannten Röntgenkristallstruktur des bovinen Cytochrom-C-Oxidase Holoenzyms (PDB 1v54) bzw. des bovinen Cytochrom-C-Reduktase Holoenzyms (PDB 1bgy) als Matrize, modelliert. In den Darstellungen der Sekundärstruktur von COX core und Cytochrom b sind die Methioninreste in Form raumfüllender Repräsentation in rot hervorgehoben.



Abbildung 4.3: Strukturmodelle der mitochondrial-kodierten Untereinheiten des Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)-Kernkomplexes (COX core) des Echinodermen *Florometra serratissima* und des Insekts *Melipona bicolor*. A: Fotografische Darstellung der beiden Spezies. B: Seitenansicht des COX core aus Perspektive der inneren Mitochondrienmembran, hierbei liegen die Cytochrom-c-Bindungsstelle und der Intermembranraum oben. C: Ansicht des COX core von oben, vom mitochondrialen Intermembranraum aus gesehen. Methioninreste sind rot markiert. Methioningehalt des COX core: 2,88% in *F. serratissima*; 7,78% in *M. bicolor*.

Beim Vergleich der berechneten Proteinstrukturen von *F. serratissima*, einem Vertreter der auch als "Federsterne" bekannten sessilen Echinodermen, und der stachellosen Biene *M. bicolor*, welche zwei Codons für Methionin verwendet, wird die massive Akkumulation von Methionin in den Protein-Untereinheiten der Atmunskettenkomplexe des Insekts deutlich. Darüber hinaus fällt vor allem in der Ansicht von oben (auf das Mitochondrium, Abb. 4.3c, Abb. 4.4b) auf, dass die Methioninreste bei der Biene jeweils an der Proteinoberfläche angereichert sind, während die Methioninreste bei dem Echinodermen tendenziell im Protein-Inneren zu finden sind. Die nachträgliche Quantifizierung der Oberflächenexposition aller Methioninreste ergab beispielsweise für COX core, dass Methioninreste 10,8% der Proteinoberfläche des Insekts einnehmen, während der Anteil von Methionin an der COX

core-Oberfläche des Echinodermen nur 1,7% beträgt (Bender et al., 2008, im Druck, siehe Kapitel 10). Darüberhinaus scheint die Methioninakkumulation in den Atmungskettenkomplex-Untereinheiten des Insekts besonders die Transmembrandomänen zu betreffen.



Abbildung 4.4: Berechnete Strukturen von Cytochrom b, der mitochondrial-kodierten Untereinheit der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) des Echinodermen *Florometra serratissima* und des Insekts *Melipona bicolor*. A: Die Seitenansicht von Cytochrom b aus Perspektive der inneren Mitochondrienmembran, hierbei ist der Intermembranraum oben. B: Ansicht des Cytochrom b von oben, vom mitochondrialen Intermembranraum aus gesehen. Methioninreste sind rot markiert. Methioningehalt des Cytochrom b: 1,05% in *F. serratissima*, 9,46% in *M. bicolor*.

Die Akkumulation der redox-sensitiven Aminosäure Methionin an Oberflächen von Proteinen in einem stark oxidativen Millieu wie der inneren mitochondrialen Membran muß den betroffenen Spezies einen selektiven Vorteil verschafft haben, der groß genug war, um als evolutionärer Druck zu wirken und die vom genetischen Standard-Code abweichende Nutzung eines einzelnen Codons voranzutreiben. Dieser Vorteil erschließt sich bei Betrachtung von Methionin als Teil einer antioxidativen Maschinerie. Methionin könnte, wie von Levine et al. postuliert, als Radikalfänger an der Proteinoberfläche dienen um kritischere Positionen innerhalb des Proteins zu schützen. Dieses antioxidative Verteidigungssystem wäre noch effektiver, wenn das oxidierte Methionin wieder repariert werden würde um erneut als Radikalfänger zur Verfügung zu stehen. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die Methionin-akkumulierenden Zwei-Codon-Nutzer Methioninsulfoxid-Reduktasen (MSRs) besitzen.

4.1.1.4 Suche nach MSR-Sequenzen in Zwei-Codon-Nutzern

Um den möglicherweise antioxidativen Zweck der Methioninakkumulation weiter zu plausibilisieren, wurde in allen bis August 2006 verfügbaren genomisch sequenzierten Methionin-akkumulierenden Tieren und Pilzen nach *E. coli*-homologen MSR-A- und MSR-B-Sequenzen gesucht. In allen Zwei-Codon-Nutzern wurden korrespondierende MSR-Sequenzen gefunden (siehe Anhang). Dagegen wiesen viele Einzeller, die AUA weiterhin für Isoleucin lesen, und unter ihnen speziell einige Anaerobier, keine homologen Sequenzen für MSRs auf. Spezies, die MSR-Sequenzen besitzen, nutzen allerdings nicht zwangsläufig zwei Codons für Methionin. Die Tatsache, dass alle Methionin-akkumulierenden Zwei-Codon-Nutzer ausnahmslos MSR-Sequenzen besitzen, stützt die Vermutung, dass Methionin zusammen mit seinen spezifischen Reparaturenzymen ein effektives antioxidatives Verteidigungssystem darstellt, aufgrund dessen Methionin an den Proteinoberflächen dieser Spezies angereichert wird.

4.1.2 Analyse in lebenden Zellen

4.1.2.1 Antioxidative Kapazität von Modellstrukturen von Methionin und Isoleucin

Die von der AUA-Codon-Neunutzung betroffenen Proteine sind integrale Membranproteine mit einem Gesamtanteil an Transmembrandomänen von bis zu 55%. Wie die berechneten Strukturmodelle in Abb. 4.3 und 4.4 zeigen, scheinen sie zudem die Mehrheit ihrer neu gewonnen Methionine in die Lipiddoppelschicht zu exponieren. Dieses Szenario wurde im folgenden mit selbst synthetisierten lipophilen Methylestern von Methionin und Isoleucin in Zellkulturexperimenten nachvollzogen (Abb. 4.5). Die langkettigen Derivate N-Dodecanoyl-Methionin-Methylester (NDo-Met-OMe) und N-Dodecanoyl-Isoleucin-Methylester (NDo-Ile-OMe) wurden nach einem etablierten Protokoll aus Acylhaliden und den jeweiligen Aminosäureestern synthetisiert (Abb. 4.5 A) (Fincher et al. 1996). Nach der Umkristallisation wurden sie mittels Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie sowie ¹H-NMR verifiziert. Die Substanzen NDo-Met-OMe und NDo-Ile-OMe sollten auf ihr Potential hin untersucht werden, oxidativen Stress in intakten eukaryontischen Zellen nach einem kompetitiven Mechanismus abzumildern. Für die Versuche wurden sowohl Kulturen der Neuroblastomzell-Linie SH-SY5Y als auch Primärkulturen von Mittelhirn-Neuronen aus der Ratte verwendet, die für ihre hohe Sensitivität gegenüber mitochondrialen Oxidantien bekannt sind (Moon et al. 2005). SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem redox-sensitiven Farbstoff 2,7-Dichlorfluorescindiacetat (DCFA) inkubiert, und anschließend mit H2O2 und oder den zu testenden Substanzen NDo-Met-OMe und NDo-Ile-OMe behandelt. DCFA wird in Anwesenheit von Peroxiden in den fluoreszierenden Farbstoff DCF umgewandelt. Der Gehalt an zellulären Oxidantien konnte auf diese Weise nach verschiedenen Zeitintervallen anhand der DCF-Fluoreszenz fluorimetrisch in einem Zellplatten-Lesegerät gemessen werden.



Abbildung 4.5: Antioxidative und zytoprotektive Effekte einer intramembranären Methionyl-Akkumulation. A: Chemische Struktur der beiden Modellsubstanzen N-Dodecanoyl-Isoleucin-Methylester (NDo-Ile-OMe) und N-Dodecanoyl-Methionin-Methylester (NDo-Met-OMe), die den zellulären Effekt der AUA Codon-Neunutzung in Mitochondrien nachvollziehen sollen. B: Stoffwechselbedingte Oxidantienbildung in SH-SY5Y-Zellen gemessen am temporären Anstieg der DCFA-Fluoreszenz. Kreise: Kontrolle; Quadrate: 50 μ M NDo-Ile-OMe; Dreiecke: 50 μ M NDo-Met-OMe. C: Oxidantienbildung in SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe von 500 μ M H₂O₂. Gezeigt ist der jeweilige Anstieg in der zellulären DCFA-Fluoreszenz 1 h nach der Zugabe von H₂O₂. Schwarze Balken: NDo-Met-OMe, Graue Balken: NDo-Ile-OMe. D: Vergleich verschiedener Nacylierter Methioninderivate als Oxidantien-Quencher in SH-SY5Y-Zellen. Die Experimente wurden durchgeführt wie in C. Die Messungen fanden nach einer dreistündigen Inkubation mit H₂O₂ statt. Ac: N-Acetyl-Methionin-Methylester, Do: N-Dodecanoyl-Methionin-Methylester, Pa: N-Palmitoyl-Methionin. Jede Gruppe von Balken repräsentiert (von links nach rechts) Konzentrationen von 0, 25, 50 und 100 μ M der jeweiligen Substanz. Sternchen in C und D kennzeichnen die signifikant herabgesetzte Oxidantienbildung (p<0,01 nach ANOVA mit dem Student-Newman-Keul Test-Algorithmus).

Abbildung 4.5 B zeigt, dass sich die Oxidantienbildung in den Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y durch die intramembranäre Anreicherung von Methionin in Form des Derivats NDo-Met-OMe unterdrücken ließ. Zudem konnte die Oxidantienbildung nach Zugabe von Wasserstoffperoxid, welches als Produkt zahlreicher Stoffwechselprozesse an verschiedenen Signalprozessen sowie bei der Antwort der Zelle auf Aβ-induzierte Toxizität beteiligt ist (Behl et al. 1994; Giorgio et al. 2007), durch Co-Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit NDo-Met-OMe signifikant reduziert werden (p<0,01; Abb. 4.5 C). Eine Anreicherung der Zellen mit dem Isoleucinderivat NDo-Ile-OMe hatte dagegen keine Verringerung der zellulären oxidativen Reaktivität zur Folge. Weiterhin war zu beobachten, dass die antioxidative Wirkung, gemessen an der verminderten zellulären Oxidantienbildung, von der intramembranären Lokalisierung der zugegebenen Methioninderivate abhängig war. Die zellpermeable, aber wasserlösliche Verbindung Acetyl-Methionin-Methylester zeigte einen geringen Effekt (Abb. 4.5 D).

In den Primärkulturen von Mittelhirn-Neuronen aus der Ratte konnte darüber hinaus die durch das mitochondriale Toxin Rotenon ausgelöste, verstärkte endogene Produktion mitochondrialer Oxidantien (Sherer et al. 2003) und der resultierende Zelltod durch die Gabe von 100 μ M NDo-Met-OMe signifikant verringert werden (p<0,01; Abb. 4.6 A und B).



Konzentration (µM)

Abb. 4.6. Antioxidative und zytoprotektive Effekte einer intramembranären Methionyl-Akkumulation. A: Mikroskopische Abbildungen einer Primärkultur aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen. Die Neurone wurden für drei Tage mit dem mitochondrialen Komplex I-Inhibitor Rotenon (50 nM) sowie mit den

angegebenen Aminosäurederivaten (100 μ M) inkubiert. Die Rotenon-induzierte Toxizität konnte durch Co-Inkubation mit NDo-Met-OMe abgemildert werden. **B:** Quantitative Auswertung von A durch Zählung der lebenden Neurone. **C:** Überleben einer Primärkultur des Mittelhirns von Rattenembryonen unter hyperoxischen Kulturbedingungen (20% Sauerstoff). Die Reduktion von MTT wurde in ausdifferenzierten Zellen nach einer dreitägigen Inkubation mit NDo-Met-OMe bzw. NDo-Ile-OMe spektrophotometrisch gemessen. Sternchen in B und C kennzeichnen das im Vergleich mit der Kontrolle signifikant höhere Zellüberleben (p<0,01 nach ANOVA mit dem Student-Newman-Keul Test-Algorithmus).

Die Überlebensrate von ausdifferenzierten Mittelhirn-Neuronen unter physiologisch hyperoxischen Kulturbedingungen (20% O_2) konnte zudem durch die Inkubation mit NDo-Met-OMe signifikant erhöht werden (Abb. 4.6 C).

Die intramembranäre Anreicherung von Methionin(derivaten), welche in anschließenden Untersuchungen experimentell nachgewiesen wurde (Bender et al., 2008, im Druck, siehe Kapitel 10), verleiht eukaryontischen Zellen einen signifikanten Schutz vor oxidativem Stress.

4.2 Induktion von oxidativem Stress in dem transgenen Alzheimer-Mausmodell APP23

Es ist gibt viele Hinweise, das oxidativer Stress zur Pathologie Alters-assoziierter neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit beiträgt (Smith et al. 1991; Friedlich und Butcher 1994; Hoyer 1994; Beal 1995). Die Auswirkung von oxidativem Stress auf den histopathologischen Krankheitsverlauf wurde daher *in vivo* in transgenen Mäusen eines Modells für die familiäre Form der Alzheimerschen Krankheit (FAD) untersucht. Dem antioxidativen Potential des essentiellen Spurenelements Selen kam hierbei eine besondere Bedeutung zu. Als Bestandteil der so genannten 21. Aminosäure Selenocystein ist Selen in den aktiven Zentren aller bisher charakterisierten Selenoenzyme zu finden (Low und Berry 1996) und deshalb höchst wahrscheinlich auch für die katalytische Aktivität der Selenoenzyme der zellulären antioxidativen Verteidigungsmaschinerie wie der MSR-Bs von Säugern (Moskovitz et al. 2002), der Glutathionperoxidasen und Thioredoxin-Reduktasen essentiell (Brigelius-Flohe 1999).

Im Rahmen eines Fütterungsversuchs wurden APP23-Mäuse einem lebenslangen Selenmangel ausgesetzt. Bei diesem Mausmodell ist die humane APP751-cDNA mit der schwedischen Doppelmutation siebenfach überexprimiert, wodurch eine beschleunigte Amyloid-Pathologie zu beobachten ist; APP23-Mäuse zeigen bereits im Alter von sechs Monaten senile Plaques (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Die möglichen Auswirkungen des durch den Selenmangel induzierten oxidativen Stresses auf die histopathologische

Progression wurden anhand charakteristischer Marker, wie senile Plaques und Neurodegeneration, untersucht.

Transgene APP23-Mäuse wurden verpaart und die schwangeren Weibchen auf die verschiedenen Spezialfutter gesetzt. Nach 21 Tagen wurden die Jungtiere von der Mutter abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Sie erhielten weiterhin Zugang *ad libitum* zu dem entsprechenden Spezialfutter. In Tab. 4.1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere aufgelistet. Der Fütterungsversuch wurde mit 75 APP23-Mäusen der F2-Generation gestartet, wobei 28 Mäuse auf Kontrollfutter, 32 auf selendefizientem Futter und weitere 15 auf Vitamin E-defizientem Futter gehalten wurden.

		Ko	ntrolle	Selen-	Defizienz	Vitamin E-Defizienz				
	Q 1	WT 5 7	APP23 7 9	WT 2 9	APP23 15 6	WT 2 4	APP23 6 3			
Versuchsbeginn	Σ	12	16	11	21	6	9			
	¢ 8	2 5	2 4	2 5	4 2	3 3	5 1			
Versuchsende	Σ	7	6	7	6	6	6			

Tabelle 4.1: Größe der Futterversuchsgruppen

Die Futtergruppen setzten sich zu etwa gleichen Teilen aus Wildtyp-Mäusen und transgenen Tieren zusammen. Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten, spätestens jedoch im Alter von zwölf Monaten, nach Inhalationsnarkose getötet, und die Gewebe zur histologischen oder biochemischen Analyse entnommen. Innerhalb des Zeitraums von zwölf Monaten kam es in allen Futtergruppen zu einem relativ hohen Verlust durch Spontantod, wodurch die jeweilige Gruppengröße zum Zeitpunkt der Analyse um etwa die Hälfte reduziert worden war.

Tabelle 4.2 zeigt das Körpergewicht derjenigen Mäuse, von denen nach zwölf Monaten zur histopathologischen Analyse Hirnschnitte angefertigt wurden. Da das in der Literatur beschriebene, im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringere Körpergewicht von APP23-Mäusen (Kelly et al. 2003) hier nicht beobachtet wurde (WT: $35,4 \text{ g} \pm 8,4 \text{ g}$; APP23: $27,5 \text{ g} \pm 8,0 \text{ g}$), ist in Tab. 4.2 das durchschnittliche Gewicht aller Tiere einer Futtergruppe zusammengefaßt. Es war allerdings ein geschlechtsspezifischer Unterschied zu verzeichnen; weibliche Mäuse waren im Durchschnitt 10 g leichter.

Kon	trolle	Selen-De	efizienz	Vitamin E-Defizienz				
Ŷ	ð	Ŷ	3	Ŷ	ð			
34,2 g	$46 \pm 3,4 g$	$30\pm5,4~g$	32 ±3,6 g	$23 \pm 1,3 g$	$31\pm0,1~g$			
(<i>n</i> =1)	(<i>n</i> =5)	(<i>n</i> = 4)	(<i>n</i> =4)	(<i>n</i> =5)	(<i>n</i> =3)			

Tabelle 4.2: Körpergewicht der analysierten Mäuse nach zwölf Monaten auf der entsprechenden Diät

Bei Tieren, welche die selendefiziente Diät erhalten hatten, war der geschlechtsspezifische Unterschied nicht mehr vorhanden; das Gewicht der Männchen entsprach demjenigen der Weibchen auf Kontrollfutter. Bei den Mäusen, die in einem parallelen Ansatz einer Vitamin E-defizienten Diät ausgesetzt waren, war das Körpergewicht von Weibchen im Vergleich zu denen auf Kontrollfutter um 10 g reduziert, das Gewicht der Männchen glich dem von selendefizienten Mäusen.

4.2.1 Auswirkung des Selenmangels auf die GPx4-Expression

Die zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen frischen Gewebeproben der APP23-Mäuse wurden lysiert und jeweils 10 µg der Proteinlysate mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot auf einer Nitrozellulosemembran fixiert. Zur Überprüfung des Selengehalts in den einzelnen Geweben wurde ein Antikörper gegen die Glutathionperoxidase 4 (GPx4) verwendet. Dieses Selenoprotein wird in den meisten Säugergeweben exprimiert und spielt eine Rolle bei der antioxidativen Verteidigung und der Regulation redox-sensitiver Gene (Brigelius-Flohe 1999). GPx4 kann peroxidierte Phospholipide direkt zu den korrespondierenden Alkoholen reduzieren, auch dann, wenn diese in Membranen und Lipoproteinen eingebettet sind (Thomas et al. 1990; Sattler et al. 1994). Die Aktivität von GPx4 hängt stark von der verfügbaren Selenkonzentration im jeweiligen Gewebe ab (Brown et al. 2000). Neuere Arbeiten berichten von der konstitutiven Expression von GPx4 in verschiedenen Neuronen-Typen und einer starken Hochregulation der GPx4-Expression in reaktiven Astrozyten als protektive Antwort auf eine Schädigung des Gehirns (Savaskan et al. 2007). Abbildung 4.7 und 4.8 zeigen das Ergebnis der GPx4-Expressions-Analyse. In denjenigen APP23-Mäusen, die eine selendefiziente Diät erhalten hatten, war bereits im Alter von fünf Monaten eine deutlich verminderte Expression von GPx4 im Cortex zu sehen, in den Leberlysaten der selendefizienten Tiere war die GPx4-Expression zu diesem Zeitpunkt bereits nicht mehr detektierbar (Abb. 4.8).



Abbildung 4.7: Western-Blot-Analyse der GPx4-Expression in Cortex und Herz von fünf und zwölf Monate alten APP23-Mäusen. Bei dem Western-Blot der fünf Monate alten Tiere handelt es sich um Einzelauftragungen, bei dem der zwölf Monate alten Tiere wurden die Proteinproben eines Tieres jeweils doppelt aufgetragen. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Beim Vergleich der Herz- und Cortex-Lysate zwölf Monate alter APP23-Mäuse in Abb. 4.7 wird die Hierarchie innerhalb der Gewebe hinsichtlich der Aufrechterhaltung des Selengehalts deutlich (Behne et al. 1988). Nach zwölf Monaten Selenmangel-Diät wird die GPx4 im Cortex noch exprimiert, während in den Herz-Lysaten und in der Leber (Abb.4.8) keine GPx4-Expression mehr detektierbar ist. Der Nachweis der Selendefizienz auf Selenoproteinebene bestätigt die Effizienz des gewählten Fütterungsversuchs.



Abbildung 4.8: Western-Blot-Analyse der GPx4-Expression in der Leber von fünf und zwölf Monate alten APP23-Mäusen. Bei dem Western-Blot der fünf Monate alten Tiere handelt es sich um Einzelauftragungen, bei dem der 12 Monate alten Tiere wurden die Proteinproben eines Tieres jeweils doppelt aufgetragen. Als Ladekontrolle dienten Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Aktin.

4.2.2 Einfluß der Selendefizienz auf die Plaquebelastung

Zum Nachweis von senilen Plaques wurden die koronaren Hirnschnitte der zu untersuchenden Mäuse mit dem Amyloid-bindenden Farbstoff Kongorot gefärbt, wodurch sie sowohl im Hellfeld des Mikroskops als pinkfarbene Aggregate als auch im Fluoreszenzlicht detektiert werden konnten. Eine zusätzliche Färbung mit Hämatoxylin erfolgte zur Sichtbarmachung der Zellkerne. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten sechs und neun Monate alten APP23Mäuse wiesen entgegen früherer Studien (Sturchler-Pierrat et al. 1997) keine Plaques auf. Erst in den Hirnschnitten zwölf Monate alter transgener Mäuse konnten Kongorot-positive Plaques detektiert werden. Zur Analyse der Plaquebelastung wurden pro Tier vier bis fünf Schnitte innerhalb des Bereiches von Bregma -0,94 und Bregma -2,30 ausgezählt, wobei Cortex und Hippocampus getrennt ausgezählt und die Plaques in drei Größen unterteilt (S, M, L) wurden (Tab 4.3).

rostral, Bregma -0,94	K	ontr	olle		Selen-Def					afizienz			Vitamin E-Defizier					ien	IZ	
↓ 	Q Q		72		50		57	2	50	_	6		64	_	Q 00	_	04	_	d	
caudal, Bregma -2,30	80		12	-	50		57		38		93	-	61	-	90		91	-	88	-
Nonex	<u> </u>	4				4			-	4	-	2.4				4	-		<u> </u>	
Gewichtungstaktor	E.	XI F	0	XI	7	X I	12	X 40	7	X I	0	XI		XI	2	XI	1	X I 4	2	XI
Schnitt 0	0 10	0 10		1	7	7	13	13	1	1		0	4	4	4	2	4	1	2	2
Schnitt 2	20	20		1	20	20	2	2	4	4		U	2	2		0	4	4		0
Schnitt 4	10	10		0	2	2	0	0	0	0		0	2	2		0		1		0
Schnitt 4	10	10		0	9	9	ь	ь	0	0	0	U	0	0		0		1		U
Schnitt 5	24	24	2	2	2	2		20		24		0	2	2	U	0		0		0
2.5	1	09	1. T	3		40		29	-	24		0		10		2	-	0	<u> </u>	2
Gewichtungstaktor	4	XZ	0	XZ		X2	1	XZ	1	XZ	0	XZ	4	XZ	0	XZ	0	XZ O	2	XZ
Schnitt 1	1	2		U	4	8	1	2		2		U	1	2		U	U	U	2	4
Schnitt 2	3	6	U	U	1	2	2	4	U	U	U	U	U	U	1	2	1	2		U
Schnitt 3	3	6	U	U	2	4	2	4	3	6	U	U	U	U		2	2	4		U
Schnitt 4	2	4	U	U		2	2	4	U	U	U	U	U	U	4	8	U	U	U	U
Schnitt 5	2	4	U	U	1	2			U	U		U	3	6	1	2		U		U
<u>Σ</u> Μ		22		0		18		14		8	-	0	_	8		14	-	6	<u> </u>	4
Gewichtungstaktor	-	x3	-	x3		x3		x3	-	x3	-	x3		x3	-	x3	-	x3	-	x3
Schnitt 1	U	U	U	U	U	U	1	3	1	3	U	U	U	U	2	6	U	U		U
Schnitt 2	0	0	0	0	0	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
Schnitt 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schnitt 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
Schnitt 5	1	3	0	0	0	0			0	0		0	0	0	0	0		0	0	0
Σ L		3		0		0		9		3		0		0		9		0	<u> </u>	0
Σ Kortex	94		3	_	58		52		35		0		18		25	_	12		6	-
Hippocampus	-	-			-			_		_		-		_		_			-	-
Gewichtungsfaktor	-	×1	-	×1		×1		×1	-	×1		x1		×1		×1		×1		×1
Schnitt 1	Ω	0	0	0	1	1	1	1	n	0	3	3	Ω	0	n	0	0	0	n	0
Schnitt 7	1	1	l n	0	n	0	2	2	n n	0	n i	0	1	1	3	3	n i	n	l n	0
Schnitt 2	3	3	n l	0	n	0	n	0	1	1	n l	0	2	2	2	2		n	0	0
Schnitt 4	n	n	l ñ	0	n	n	n i	ň	'n	n.	l ñ	n	ñ	ñ	ñ	ñ	l ñ	n	l n	n
Schnitt 5	n	0	n	0	0	0		0	0	0		0	0	0	2	2		n	l n	0
5 5	-	4	-	0		1		3		1	8	3		3	-	7	-	0		0
Gewichtungsfaktor		¥2	-	v2	-	v2	-	v2	-	v2	-	v2	-	v2	-	×2	-	v2	<u> </u>	v2
Schnitt 1	Ω	0	Ω	0	Ω	0	n	0	0	0	1	2	Ω	0	1	2	n	0	Ω	0
Schnitt 7	1	2	l n	n	n	n	n	n	n n	0	'n	0	n	0	i n	0	n i	n	n l	n
Schnitt 2	1	2	n	n	n	n	n	ñ	n n	n	n	n	1	2	n	0	n	n	l n	n
Schnitt 3	n	0	n	0	0	0	n	n	0	0	n n	0	'n	n	0	0	0	0	0	0
Schnitt 5	n	0	n i	0	0	0		~	n n	0		0	n	n	n n	n		n	l n	n
ΣΜ		4		0		0		0		0	0	2		2	-	2	-	0		0
Gewichtungsfaktor	-	v3	-	v3	-	v3	-	v3	-	v3		v3	-	v3		v3	-	v3	<u> </u>	V3
Schnitt 1	0	0	0	10	0	0	0	<u></u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u></u>	n	10
Schnitt 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0	0	0	0	0
Schnitt 3	0	0	ρ	0	0	0		0		0		0	0	0		0		0		n
Schnitt 4	0	0	0	0	0	0		0		0		0	0	0		0		0	0	0
Schnitt 5	0	0	0	0	0	0	0	U		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0		0	0	0	S	0	0	0	0	0		0		0
ΣHippocampus	8		0		1	5	3	5	1		5		5	5	9	5	0	-	0	
- inkessanikas	,		5								5						5		5	
Σ Gesamt	102		3		59		55		36		5		23		34		12		6	

Tabelle 4.3: Plaque-Belastung in Cortex und Hippocampus der APP23-Mäuse auf Antioxidantiendefizientem Futter. Pro Tier wurden die Plaques in vier bis fünf Hirnschnitten aus dem Bereich Bregma -0,94 und Bregma -2,30 ausgezählt. Dabei wurden Cortex und Hippocampus getrennt ausgezählt und die Plaques in drei Größen unterteilt (S, M, L). Nicht ausgefüllte Felder bedeuten, dass aus dieser Region kein Hirnschnitt zur Verfügung stand. Für die Ermittlung der Plaquebelastung wurden die erhaltenen Zahlen hinsichtlich der Plaquegröße verschieden gewichtet (Multiplikation der Anzahl mit dem Faktor 1 für kleine (S), 2 für mittlere (M) und 3 für große Plaques (M)). Für jedes analysierte Tier ist jeweils die Summe über die kleinen, mittleren und großen Plaques sowie die Gesamt-Plaquebelastung in dem analysierten Bereich des Cortex und Hippocampus angegeben. Nach Auszählung der Hirnschnitte ergab sich eine starke Korrelation von Plaquebelastung und Geschlecht. In allen drei Futtergruppen waren in den männlichen Tieren innerhalb des analysierten Hirnabschnitts lediglich 3-6 Plaques detektierbar. Laut der statistischen Analyse mittels One-Way-ANOVA war der Geschlechtsunterschied in der Plaquebelastung signifikant (p<0,05). Der Aspekt eines geschlechtsspezifischen Unterschieds in der Plaquebelastung war bei dem initialen Versuchsdesign nicht berücksichtigt worden, da in der Literatur keine (Sturchler-Pierrat et al, 1997) bzw. nur geringe geschlechtsspezifische Unterschiede in der Plaquebelastung und dem Grad der Neurodegeneration in APP23-Mäusen beschrieben sind. Kelly et al. beobachteten bei der Analyse 18 und 25 Monate alter APP23-Mäuse einen leicht, aber nicht signifikant höheren Anstieg in der Plaquebelastung bei weiblichen Tieren. Allerdings zeigten 25 Monate alte weibliche APP23-Mäuse signifikant schlechtere Ergebnisse in Tests zum Lern- und Erinnerungsvermögen (Kelly et al. 2003). In anderen Studien wurde eine doppelt so hohe Plaquebelastung weiblicher APP23-Mäuse im Vergleich zu männlichen Tieren beobachtet, wobei dieser Wert innerhalb der untersuchten Gruppen stark variierte (Sykova et al. 2005). Neben dem geschlechtsspezifischen Unterschied in der Plaquebelastung war jedoch innerhalb der analysierten Weibchen ein futterspezifischer Unterschied zu erkennen; in den selendefizienten und den parallel mitgezogenen Vitamin E-defizienten APP23-Mäusen wurden signifikant weniger senile Plaques detektiert als in der APP23-Maus auf Kontrollfutter (p<0,05). Der statistische Vergleich der Plaquebelastung innerhalb der beiden Mangel-Futtergruppen ergab ein signifikant geringeres Plaqueaufkommen in den Vitamin Edefizienten Mäusen (p<0,05).

Die durch die Kongorot-Färbung detektierten Plaques waren ausschließlich vom dichten Typus. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in Abb. 4.9 A zeigt, dass es sich dabei wie beschrieben (Kuo et al. 2001) um relativ runde Strukturen aus morphologisch homogenem filamentösem Material handelt, wobei mehrere Filamentbündel radiär aus dem Kern des Plaques zu entspringen scheinen.



Abbildung 4.9: Mikroskopische Charakterisierung der Kongorot-positiven senilen Plaques. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines typischen dichten Amyloid-Plaque. Filamentbündel entspringen radiär aus dem Plaque-Kern. B: Hellfeld-Aufnahme von A; die Hämatoxylinfärbung zeigt neben neuronalen Zellkernen auch die kreisförmig um den Plaque angeordneten Zellkerne der Mikroglia. C: Zerstörung der neuronalen Zytoarchitektur in der Plaque-Peripherie im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus. D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von C.

Die meisten detektierten Plaques waren klein (<5 μ m), die übrigen waren gemäß der Einteilung nach Stalder et al. von mittlerer Größe und hatten einen Durchmesser von 5-30 μ m (Stalder et al. 1999). Zudem waren die senilen Plaques stets mit Mikroglia assoziiert, die die Plaque-Peripherie meist kreisförmig umgaben (Abb. 4.9 B). In Regionen mit hoher Zelldichte, wie der Pyramidenzellschicht des Gyrus dentatus innerhalb des Hippocampus, konnte der lokale Verlust bzw. die Verdrängung von Neuronen in der unmittelbaren Umgebung der Plaques besonders gut beobachtet werden (Abb. 4.9 C). Die Hämatoxylin-Färbung läßt auch hier eine Schicht mikroglialer Zellkerne erkennen, die ringförmig um den Plaque herum organisiert ist.

4.2.3 Einfluß der Selendefizienz auf die Neuronenmorphologie

Um die möglichen Auswirkungen des Selenmangels auf die Neuronendichte und die Neuronenmorphologie zu untersuchen, wurden die Hämatoxylin-gefärbten Hirnschnitte in den Bereichen CA3 und CA1 des Hippocampus mikroskopisch ausgewertet. Im Hippocampus werden die eingegangenen sensorischen Informationen assoziativ verarbeitet und zum Cortex zurückgesandt. Die Verbindung zwischen den Arealen CA3 und CA1, die so genannte Schaffer-Kollaterale, ist dabei einer der Orte der Langzeitpotenzierung und Gedächtnisbildung. Diese Regionen hoher Neuronendichte sind bei Alzheimer-Patienten besonders von morphologischen Veränderungen und Neurodegeneration betroffen. Bei dem mikroskopischen Vergleich der Hämatoxylin-gefärbten Schnitte konnte jedoch weder im Wildtyp noch APP23-Mäusen eine Auswirkung der Selendefizienz auf in den Ebene der Neuronenmorphologie beobachtet werden. Abb. 4.10 zeigt eine repräsentative Auswahl der untersuchten Schnitte.



Abbildung 4.10: Mikroskopischer Vergleich der Neuronenmorphologie im Bereich der CA1- und CA3-Region des Hippocampus. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Übersicht des Hippocampus gezeigt. Die Kryoschnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt und im Hellfeld fotografiert. Die repräsentative Auswahl zeigt, dass der Selenmangel sowohl im WT als auch in APP23-Mäusen keine offenkundige Auswirkung auf die Neuronendichte hat.

Das Ergebnis der Zählung der CA3-Hippocampusneurone ist in Tab. 4.4 zusammengefasst. Die statistische Analyse mittels One-Way-ANOVA ergab eine signifikant geringere Neuronenzahl in den Vitamin E-defizienten APP23-Mäusen im Vergleich zu den selendefizienten Mäusen (p<0,05). Es wurde kein signifikanter Geschlechtsunterschied in der Zahl der CA3-Neurone beobachtet (p=0,237). Die geringe Gruppengröße lässt allerdings auch hier nur eine vorsichtige Interpretation der Daten zu.

rostral, Bregma -0,94	Kont	trolle	Se	elen-D	efizie	nz	Vitamin E-Defizienz				
1	Q	ð		Q		ð	Ŷ			ð	
caudal, Bregma -2,30	86	72	50	57	58	93	61	90	91	88	
Schnitt 1	107	96	118	210	140	115	116	107	67	100	
Schnitt 2	102		136	105	116	133	100	85	57	98	
Schnitt 3	103	129		130	86	162	112	85	46	60	
Schnitt 4	99	139	107		113	175	130	180	57	127	
Schnitt 5	127	147			107		138	110		116	
М	108	128	120	148	112	146	119	113	57	100	
SD	10	19	12	45	17	24	13	35	7	23	

Tabelle 4.4: Anzahl der CA3-Hippocampus-Neurone. Pro Tier wurden jeweils drei bis fünf Hirnschnitte aus dem Bereich Bregma -0,94 und Bregma -2,30 für die Zählung herangezogen. Dabei wurde bei einer 20fachen mikroskopischen Vergrößerung jeweils ein visuelles Feld innerhalb der CA3-Region des Hippocampus ausgezählt. Nicht ausgefüllte Felder bedeuten, dass aus dieser Region kein Hirnschnitt zur Verfügung stand.

5 Diskussion

5.1 Evolution eines alternativen genetischen Codes als Adaption an oxidativen Stress

5.1.1 Akkumulation von Methionin in mitochondrial kodierten Proteinen betrifft viele Tiere und einige Pilze

Die Aminosäuren Methionin und Tryptophan zählen evolutionsgeschichtlich zu den Neuzugängen im genetischen Standard-Code (Trifonov 2004). Um im genetischen Code manifestiert werden zu können, muss diese "nachträgliche" Aufnahme der Aminosäuren einen strukturellen oder funktionellen evolutionären Vorteil für die Zelle bedeutet haben (Knight et al., 2001). Während aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan verschiedene biochemische (Dougherty 1996) und antioxidative Funktionen (Moosmann und Behl 2000; Moosmann et al. 2001) nachgewiesen werden konnten, sind die funktionellen Vorzüge der oxidationslabilsten Aminosäure Methionin nicht befriedigend erbracht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher die von Levine et al. postulierte antioxidative Kapazität von Methionin überprüft werden (Levine et al. 1996). Im Falle einer antioxidativen Schutzfunktion des Met(O)/Msr-Systems sollte Methionin, der Hypothese der vorliegenden Arbeit zufolge, besonders in Proteinen von Zellkompartimenten mit starker oxidativer Belastung, wie dem Mitochondrium (Cadenas und Davies 2000), angereichert sein. Eine Annahme, die in Anbetracht der hohen Anfälligkeit von Methionin gegenüber Oxidation zunächst paradox erscheint. In dem konträren Fall, dass die Bedeutung des Met(O)/Msr-Systems jedoch lediglich in der Reparatur des oxidierten Methionins liegt, wäre dagegen zu erwarten, dass der Methioningehalt von Proteinen in solchen Zellkompartimenten unverändert oder sogar verringert ist.

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese wurde der Ansatz einer vergleichenden Proteomanalyse gewählt. Da dreizehn essentielle und hoch konservierte Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V der insgesamt aus etwa 80 Proteinuntereinheiten bestehenden Enzymkomplexe der Atmungskette von der mitochondrialen DNA kodiert werden ((DiMauro 2004); Abb.1.1), wurde der Methioningehalt dieser mitochondrial-kodierten Proteine bestimmt und mit dem ermittelten Methioningehalt von kern-kodierten Proteinen einer neutralen Auswahl von genomisch sequenzierten Spezies verschiedener Stämme verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass kern-kodierte Proteine der analysierten Spezies im Durchschnitt 2,3% Methionin enthalten während der Methioningehalt mitochondrial-kodierter Atmungskettenkomplex-Proteine vieler Tiere und einiger Hefen im Durchschnitt dreimal so hoch war (6,2%). Besonders methioninreich waren mit über 10% die mitochondrial-kodierten Insektenproteine. Die darauffolgende Codon-Analyse ergab, dass die Methioninakkumulation mit der Evolution eines alternativen genetischen Codes assoziiert ist, in deren Folge Methionin in den betroffenen Spezies durch zwei Codons kodiert wird; durch das Standard-Methionin-Codon AUG und das Isoleucin-Codon AUA. Besonders interessant war die Tatsache, dass die alternative mitochondriale Methionin-Kodierung hauptsächlich aerobe Tiere mit einem hohen metabolischen Grundumsatz betrifft.

5.1.2 Methioninakkumulation spricht gegen einen neutralen Mechanismus zur Entstehung alternativer genetischer Codes

Die Neunutzung des Isoleucin-Codons zur Kodierung von Methionin hat im Laufe der Evolution mindestens fünfmal unabhängig voneinander stattgefunden (Swire et al. 2005; Sengupta et al. 2007). Zur Entstehung alternativer Codes gibt es viele Theorien wobei sich im Wesentlichen zwei Meinungsfronten gebildet haben. Die Verfechter eines neutralen Mechanismus der Evolution alternativer Codes gehen davon aus, dass sich Änderungen im genetischen Code nicht auf Ebene der Aminosäuresequenzen niederschlagen dürften, weil dies weitreichende Veränderungen der Proteinstruktur und in der Konsequenz den Tod des Organismus bedeuteten würde (Osawa et al. 1992; Jukes und Osawa 1997). Die unter den neutralen Mechanismen dominierende "codon capture"-Theorie stützt sich auf die Beobachtung, das in einem AT-reichen Genom ein genetischer Druck zu bestehen scheint, in dessen Folge weniger GC-haltige Codons verwendet werden, wodurch es im Extremfall zum "Aussterben" eines GC-haltigen Codons kommen kann (Oba et al. 1991). Das vorübergehende Verschwinden oder beinahe Verschwinden des Codons ist dabei eine essentielle Bedingung für dessen Neuzuordnung. Durch genetische Drift kann das Codon dann wieder im Genom auftauchen und durch Translation über eine das Codon erkennende tRNA dekodiert werden. Auf diese Weise erlangt es eine neue Bedeutung und kann unter Umständen mit der Zeit vermehrt genutzt werden. Das laut "codon capture"-Theorie für die Codon-Neudefinition notwendige, vorübergehende Verschwinden eines Codons aus dem Genom lässt die Vermutung zu, dass dieses Codon im Vergleich zu den Codons seiner Codon-Familie ohnehin selten benutzt wurde. Zudem könnte man erwarten, dass ein wieder im Genom aufgetauchtes Codon im Vergleich zu den anderen Codons seiner Codon-Familie weniger häufig verwendet wird. Die Änderung der Codon-Bedeutung ist der "codon capture"-Theorie zufolge ein neutraler Prozess ohne Auswirkungen auf die Primärstruktur des Proteoms; Aminosäuren bleiben in Zahl und Position erhalten, sie werden lediglich von anderen Codons kodiert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten sprechen allerdings für ein anderes Szenario und bestärken den Ansatz der codon-capture-Gegner, wonach Änderungen im genetischen Standard-Code als Resultat von Veränderungen auf Protein- bzw. Aminosäuresequenzebene im Zuge der Adaption auf veränderte (Umwelt-) Gegebenheiten zu verstehen sind. Ein Beispiel für einen solchen nicht-neutralen Mechanismus der Entstehung von alternativen Codes ist die "ambiguous decoding"-Theorie (Schultz und Yarus 1996; Pezo et al. 2004), laut welcher z. B. die durch Mutation erweiterte Dekodierungs-kapazität einer tRNA dazu führen kann, dass ein Codon auf zwei Arten gelesen wird; durch seine originäre tRNA sowie durch die neue, mutierte tRNA. Diese Zweideutigkeit des Codons ist ein kritischer Schritt in dem graduellen Prozess der Codon-Neuzuordnung, in dessen Verlauf die mutierte tRNA die Dekodierung der normalen tRNA übernimmt, und diese graduell ihre Funktion verliert (Schultz und Yarus 1994). Genomische Faktoren wie GC-Druck spielen gemäß dieser Theorie keine Rolle.

Die Analyse zur Codon-Benutzung für Methionin und Isoleucin in den hier untersuchten Spezies ergab, das die Zwei-Codon-Nutzer das ehemalige Isoleucin-Codon AUA nicht weniger häufig benutzen als diejenigen Spezies, die den genetischen Standard-Code beibehalten haben (Abb. 4.2). Demnach geht das AUA-Codon quantitativ nicht verloren, seine Bedeutung hat sich lediglich geändert. Die Codon-Neunutzung scheint, zumindest im Falle des AUA-Codons, ein adaptiver Prozess zu sein, wie er von der "ambiguous decoding"-Theorie beschrieben wird, der sich auf Ebene der Proteine als Anpassung an die Anforderungen des Organismus abspielt. Auch die Tatsache, dass sich der GC-Gehalt in den Genomen der Zwei-Codon-Nutzer nicht von dem der Standard-Code-Nutzer unterscheidet (Abb.4.2), und der GC-Gehalt demnach bei dem Prozess der AUA-Codon-Neunutzung keine Rolle gespielt zu haben scheint, spricht gegen die "codon capture"- und für die "ambiguous decoding"-Theorie. Aus den berechneten Strukturmodellen der Atmungskettenkomplex-Untereinheiten ging zudem hervor, dass die Methioninreste an der Proteinoberfläche in intramembranären Helices akkumulieren (Abb. 4.3 und 4.4), an einem Ort, der normalerweise reich an der sehr hydrophoben Aminosäure Isoleucin ist. Dieser Umstand scheint in prototypischer Weise das durch die "ambiguous decoding"-Theorie beschriebene Konzept widerzuspiegeln, wonach dieselben Positionen im Protein, die vormals durch die vom betroffenen Codon kodierten Aminosäuren besetzt waren, nach der Codon-Neunutzung von den "neuen Aminosäuren" eingenommen werden. Auch die Tatsache, dass die CodonNeunutzung und in deren Konsequenz die Methioninakkumulation ausnahmslos Spezies betrifft, die im Gegensatz zu den Standard-Code-Nutzern hinsichtlich ihres Bauplans / ihrer höheren Entwicklungsstufe einen höheren Grundumsatz aufweisen und höheren oxidativen Belastungen ausgesetzt sind, spricht für den Einau von Methionin in Proteinmembranen als antioxidative Verteidigungsstrategie.

5.1.3 Methioninreiche Atmungskettenkomplexe als antioxidative Verteidigungsstrategie

5.1.3.1 Methioninakkumulation betrifft die Proteinoberfläche

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit berechneten Strukturen von Protein-Unterheinheiten der Atmungskettenkomplexe III und IV zeigten, dass das neu gewonnene Methionin in den Proteinen der Zwei-Codon-Nutzer diejenigen Positionen einnimmt, die vorher von der hydrophoben Aminosäure Isoleucin besetzt nämlich waren. bevorzugt an der Interaktionsoberfläche der Transmembrandomänen mit der Lipidphase (Abb. 4.3 und 4.4). Die Oxidation von Methionin in Mitochondrien ist nach heutigem chemischen Wissen unvermeidbar (Vogt et al., 1995), an der Proteinoberfläche hat die Methioninoxidation jedoch nur eine geringe strukturelle Beeinträchtigung des betroffenen Proteins zur Folge (Levine et al. 1996). In den meisten Geweben liegen 5-10% aller Methioninreste oxidiert vor (Stadtman et al. 2005). Der Einbau von Methionin anstelle von Isoleucin muss den betroffenen Organismen einen selektiven Vorteil verschafft haben, der groß genug war, um die Evolution eines alternativen genetischen Codes voranzutreiben. Dieser Vorteil erschließt sich bei Betrachtung von Methionin als Teil eines antioxidativen Verteidigungssystems.

5.1.3.2 Methioninakkumulierende Zwei-Codon-Nutzer besitzen Enzyme zur Methionin-Reparatur

Im Zuge der Verifizierung dieser Annahme, wurden die bis zu diesem Zeitpunkt (August 2006) verfügbaren, komplett sequenzierten Genome der in der vorliegenden Arbeit analysierten Spezies nach *E. coli*-homologen MSR-A- und MSR-B-Sequenzen durchsucht. In allen Methioninakkumulierenden Zwei-Codon-Nutzern konnten korrespondierende MSR-Sequenzen gefunden werden. Damit wäre eine potentiell notwendige Bedingung für das in dieser Arbeit entwickelte Erklärungsmodell zur Evolution eines genetischen Codes mit dem Ziel der Akkumulation von Methionin an besonders exponierten Proteinoberflächen dieser Spezies, zum Schutz vor akutem oxidativem Stress, erfüllt. Spezies, die AUA weiterhin für

Isoleucin lesen, wie die anaerob lebenden Plathelminthen, Schwämme und Echinodermen, sowie viele Einzeller, und unter ihnen speziell einige Anerobier, wiesen keine homologen Sequenzen für MSRs auf. Allerdings gab es unter den genetischen Standard-Code-Nutzern auch Spezies, die über MSR-Sequenzen verfügen.

Das Vorhandensein der MSR-Sequenzen in den von der Codon-Neunutzung betroffenen Spezies ist allerdings noch kein Beweis dafür, dass Methionin im Zusammenspiel mit MSRs den oxidativen Angriff durch ROS auf den Membranoberflächen der mitochondrialen Atmungskettenproteine abmildert, da bisher nicht gezeigt ist, ob MSRs in der Lage sind, intramembranäres Methioninsulfoxid zu reduzieren. Möglicherweise werden die Methioninreste dort nur zur einmaligen Benutzung bzw.Oxidation eingebaut.

5.1.3.3 Methionin-Modellsubstanz schützt eukaryontische Zellen vor oxidativem Stress

Der antioxidative Schutz von eukaryontischen Zellen durch die Anreicherung von Methionin im Vergleich zu Isoleucin wurde experimentell mit eigens synthetisierten lipophilen Derivaten beider Aminosäuren überprüft. Die Experimente in Kulturen einer Neuroblastomzelllinie zeigten, dass durch das Methioninderivat NDo-Met-OMe nicht nur die endogene Oxidantien-Belastung reduziert, sondern auch der durch H₂O₂-induzierte oxidative Stress abgemildert werden konnte (Abb. 4.5). Darüber hinaus konnten Primärkulturen von Mittelhirnneuronen aus der Ratte vor dem Zelltod durch das mitochondriale Toxin Rotenon geschützt werden. Die Inkubation der Zellen mit dem lipophilen Isoleucin-Derivat NDo-Ile-OMe hatte dagegen keine oxidative Schutzwirkung zur Folge. Diese Ergebnisse lieferten zusätzlich zu den Codon- und Sequenzanalysen einen funktionellen Beweis des antioxidativen Vorteils einer Methioninakkumulation in den Membranen eukaryontischer Zellen.

5.2 Auswirkungen einer *in vivo*-Antioxidantien-Depletion im transgenen familiären Alzheimer-Mausmodell APP23

Aus den Ergebnissen des ersten Teils dieser Arbeit ergibt sich, dass oxidativer Stress einen profunden Einfluss auf die basale Architektur zentraler Biomoleküle der eukaryontischen Zelle gehabt haben muss. In Anbetracht der sich daraus ergebenden Bedeutung der strukturellen antioxidativen Verteidung für die Integrität des Mitochondriums und der gesamten Zelle erscheint es nicht verwunderlich, dass oxidativem Stress bei einer großen Zahl von Erkrankungen, die mit mitochondrialer Dysfunktion und degenerativem Zelltod

einhergehen, eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird. So kommt es auch im Zuge der Neurodegeneration bei der Alzheimerschen Krankheit zur Aβ-induzierten strukturellen und funktionellen Zerstörung von Mitochondrien (Wang et al. 2007) und die verschiedenen Biomoleküle des Gehirns sind oxidativen Modifikationen unterworfen (Butterfield und Boyd-Kimball 2004), wobei u.a auch die Relevanz der Methioninoxidation für die Pathologie gezeigt wurde (Schoneich 2005). Im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist der Gehalt der zum Teil selenhaltigen MSRs verringert (Gabbita et al. 1999), dies passt zu der Beobachtung, das MSR-defiziente Mäuse eine, der Alzheimerschen Krankheit ähnliche Pathologie zeigen (Pal et al. 2007). Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von oxidativem Stress auf die Entstehung und das Fortschreiten der Alzheimerschen Krankheit anhand eines relevanten und wiederholt als oxidativ beschriebenen Stress-Modells mit Mitochondrien-Pathologie untersucht. In dem mono-transgenen Alzheimer-Mausmodell APP23 sollte oxidativer Stress durch eine selendefiziente Diät induziert werden.

5.2.1 Die Selenkonzentration läßt sich durch die selendefiziente Diät gewebespezifisch verringern

Die Analyse der Selenoprotein-Expression in den APP23-Mausgeweben bestätigte, dass die lebenslange Fütterung eines auf Torula-Hefe basierenden selendefizienten Futters ausreicht, um in vivo einen Selenmangel in den Mausgeweben zu induzieren. Im Gehirn war die GPx4-Expression nur geringfügig schwächer, was auf die, in früheren Arbeiten bereits beschriebene, gewebespezifische Aufrechterhaltung der Selenkonzentration hinweist. Laut Literatur ist unter Selensättigungsbedingungen die höchste Selenkonzentration in den Nieren zu finden, gefolgt von Leber, Milz, Bauchspeicheldrüse, Herz, Gehirn, Lunge, Knochen und Skelettmuskel (Oster et al. 1988; Zachara et al. 2001). Aus Arbeiten an Ratten ist bekannt, dass sich die Verteilung des Spurenelements innerhalb der Organe verändert, wenn nicht ausreichend Selen zur Verfügung steht (Burk et al. 1972). Die Aufrechterhaltung der Selenkonzentration erfolgt dabei nach einer strengen Hierarchie. Während in Organen wie Leber und Herz bereits nach wenigen Monaten ein Selenmangel detektiert werden kann, bleibt die Selenkonzentration im Gehirn über lange Zeit konstant. Nach einer über sechs Generationen verabreichten selendefizienten Diät konnte in Rattenhirnen immer noch 60% der Selenkonzentration von Kontrolltieren detektiert werden (Behne et al., 2000). Dies deutet auf die besondere Bedeutung der Selenoproteine im Gehirn hin. Zudem besteht auch innerhalb der Selenoproteine eines Gewebes eine Hierarchie. Die Reduktion der Expression der GPx4 und der Thyroidhormon-Deiodinase 1 (Dio1) erfolgt langsamer als bei der GPx1. Umgekehrt reagieren GPx4 und Dio1 schneller auf eine Selen-Supplementation und scheinen demnach innerhalb der Selenoproteine offenbar eine höhere Priorität und daher wohl eine essentiellere Rolle für den Organismus zu haben (Brigelius-Flohe 1999). Eine Studie mit 239 gesunden Probanden hat gezeigt, dass der Selengehalt im Blut negativ mit dem Alter korreliert ist (Berr et al. 1993); die gleiche negative Korrelation wurde in Patienten mit der Alzheimerschen Krankheit beobachtet (Ceballos-Picot et al. 1996).

5.2.2 Die Histopathologie ist durch den Selenmangel nicht beschleunigt

Da aus früheren Studien bekannt ist, dass oxidativer Stress eine große Rolle in der Alzheimer-Pathologie spielt (Moreira et al. 2005), und dies auch in transgenen APP-Mausmodellen gezeigt wurde (Yao et al. 2004), war gemäß der Arbeitshypothese zu erwarten, dass histopathologische Marker wie senile Plaques und Neurodegeneration durch den Selenmangel-induzierten zusätzlichen oxidativen Stress erhöht sein könnten. Bei der histopathologischen Analyse der APP23-Maushirne im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein, die Alzheimer-Pathologie verschlimmernder oder beschleunigender Effekt des Selenmangels beobachtet werden. Im Gegenteil ergab die Plaquezählung eine signifikant geringere Plaquebelastung in den zwölf Monate alten selendefizienten APP23-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Tieren auf Kontrollfutter (p<0,05). Die APP23-Mäuse auf Vitamin E-defizientem Futter wiesen sogar noch weniger Plaques als die Selendefizienten auf (p<0,05). Darüberhinaus war ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der Plaquebelastung zu beobachten. Zwölf Monate alte weibliche APP23-Mäuse zeigten etwa 30-50mal so viele Plaques wie die gleichaltrigen transgenen Männchen. Frühere Analysen zur Plaquebelastung in 18 und 25 Monate alten APP23-Mäusen zeigten keinen signifikanten Geschlechtsunterschied. Allerdings schnitten die 25 Monate alten weiblichen Tiere in Versuchen zu Lernverhalten und Erinnerungsvermögen wie dem "Morris water maze" und visuellen Konditionierungstests signifikant schlechter ab (Kelly et al. 2003). Durch die hohe Spontantodesrate innerhalb der APP23-Mäuse waren die Fütterungsversuchsgruppen zum Zeitpunkt der Analyse allerdings um etwa die Hälfte reduziert worden. Die Ergebnisse lassen sich daher nur unter Vorbehalt diskutieren, und müssen in Untersuchungen mit einer höheren überprüft werden. Falls durch den Selenmangel, wie bereits Gruppengröße in Meerschweinchen gezeigt (Hill et al. 2001), tatsächlich oxidative Stressbedingungen geschaffen worden sind, scheint die Plaquebildung dadurch jedenfalls nicht beschleunigt worden zu sein. In allen in dieser Arbeit analysierten transgenen Mäusen konnte bereits im Alter von zwölf Monaten die für 14-18 Monate alte APP23-Mäuse beschriebene (Bondolfi et al. 2002) Zerstörung der neuronalen Zytoarchitektur am Plaque-Ort beobachtet werden (Abb 4.9 C). Die Neurone schienen von den Amyloidablagerungen geradezu "verdrängt" zu werden, und an der Plaqueperipherie war ein lokaler Neuronenverlust zu beobachten. Stattdessen waren die analysierten Plaques meist kreisrund von glialen Zellkernen umgeben (Abb. 4.9 B). Laut Literatur handelt es sich dabei um aktivierte Mikroglia, deren Fortsätze mit den Amyloidfibrillen wechselwirken (Bondolfi et al. 2002). Aktivierte Mikroglia entlassen verschiedene Zytokine und Neurotoxine wie ROS, und eine anhaltende Aktivierung dieser Zellen kann zu einer chronischen Entzündung führen und die Degeneration der umliegenden Neurone beschleunigen. Die Assoziation von Mikroglia mit senilen Plaques ist sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch in transgenen Mausmodellen beschrieben (Itagaki et al. 1989; Frautschy et al. 1998), jedoch ist die Rolle der Mikroglia für den Krankheitsprozess unklar (Combs et al. 2001; Qin et al. 2006). Es wurde unter anderem vermutet, dass aktivierte Mikroglia der Beseitigung der Plaques dienen (Schenk et al. 1999), andererseits aber vielleicht auch den "Keim" zur Entstehung seniler Plaques darstellen (Nagele et al. 2004), oder möglicherweise zur räumlichen Beschränkung der Plaques rekrutiert werden (Simard et al. 2006). Neuere Arbeiten in einem transgenen APP-Mausmodell haben gezeigt, dass Amyloid-Plaques innerhalb von 24 Stunden entstehen können und sich nach dieser Zeitspanne offenbar nicht mehr in ihrer Größe verändern (Meyer-Luehmann et al. 2008). Dies wird auf den Einfluss der Mikroglia zurückgeführt, die sich innerhalb eines Tages nach Plaque-Entstehung als sekundäres Ereignis bei den Plaques einfinden und das weitere "Wachstum" der Plaques verhindern. Die lokalen neuronalen Veränderungen beginnen in diesem Modell ebenfalls bereits 24 Stunden nach dem Auftreten der Plaques und sind meist innerhalb einer Woche abgeschlossen. Der degenerative Prozess der Alzheimerschen Krankheit wäre nach diesem Modell von unzähligen plötzlichen Veränderungen der kortikalen Struktur geprägt (Meyer-Luehmann et al. 2008).

Als weiterer histopathologischer Marker der voranschreitenden Alzheimerschen Krankheit wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Grad der Neurodegeneration in den betroffenen Mäusen untersucht. Die mikroskopische Analyse der Hämatoxylin-gefärbten Hirnschnitte ergab unabhängig von der Diät keine offenkundige beschleunigte Neurodegeneration oder vermehrte Rekrutierung von Mikroglia innerhalb des Cortex und der CA1- und CA3-Region des Hippocampus der APP23-Mäuse. Die Zählung der CA3-Neuronen ergab jedoch eine signifikant geringere Anzahl von Neuronen in Vitamin-E-defizienten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren und den Mäusen auf selendefizientem Futter, deren Neuronenzahl derjenigen in den Kontrolltieren glich (Tab. 4.4). In transgenen APP-Mausmodellen kommt es allerdings generell nur zu einem geringen Neuronenverlust (Calhoun et al. 1998; Schmitz et al. 2004).

5.2.3 Die Rolle von senilen Plaques in der Alzheimer-assoziierten Neuropathologie ist unklar

Bis heute ist die Rolle von Amyloid-Plaques als Ursache oder Epiphänomen der im Zuge der Alzheimerschen Krankheit ablaufenden neurodegenerativen Prozesse nicht befriedigend geklärt. Laut verschiedener Studien besteht keine Korrelation zwischen Aß-Plaquebelastung und dem Auftreten von Demenz in Alzheimer-Patienten (Arriagada et al. 1992; Samuel et al. 1994). Die Zytotoxizität des Aβ-Peptids scheint in vitro von seinem physiologischen und chemischen Zustand sowie von der Art der Verabreichung abhängig zu sein (Busciglio et al. 1992; May et al. 1992). Einigen Arbeiten zufolge sind die aus unlöslichen Aggregaten von fibrillärem Aß bestehenden senilen Plaques selbst toxisch (Yankner et al. 1989; Yankner et al. 1990). Andere Studien beschreiben senile Alzheimer-Plaques als "inaktiv", solange sie kein Aβ in Form von löslichen Oligomeren absondern (Walsh et al. 2002; Lesne et al. 2006). Die Applikation löslicher Aß-Oligomere, die aus Gehirnen von Alzheimer-Patienten isoliert wurden, hatte in gesunden Nagern die Zerstörung der synaptischen Struktur und Funktion des Hippocampus zur Folge, was zu dem Verlust der Erinnerung an ein gelerntes Verhalten führte. Dabei stellten sich Aβ-Dimere als kleinste synaptotoxische Spezies heraus (Shankar et al. 2008). Eine Langzeit-Folge-Studie von Alzheimer-Patienten, die mit Aβ42 immunisiert worden waren, hat wiederum gezeigt, dass die Entfernung der Aß-Plaques nicht ausreicht, um die progressive Neurodegeneration zu verhindern (Holmes et al. 2008). In Patienten mit hohen Aβ42-Antikörper-Titern war eine schnellere klinische Progression zu beobachten als in Patienten mit moderaten Titern. Laut dieser Studie ist aggregiertes Aß in Form von Plaques nicht toxisch und könnte möglicherweise sogar protektiv wirken. Die Immunisierung ist demnach möglicherweise kontraproduktiv, da die toxischen Aß-Oligomere durch die Entfernung der Plaques nicht mehr durch Ablagerung in diesen entfernt, sondern im Gegenteil angereichert werden. Dieser Langzeit-Folge-Studie zufolge kann die Anwesenheit von Plaques zwar für die Initiierung, nicht aber für das anhaltende Fortschreiten der Neurodegeneration verantwortlich sein. Hinzu kommt, dass eine beträchtliche Menge gesunder alter Menschen post mortem eine mit Alzheimer-Patienten vergleichbare Plaquebelastung aufweisen, ohne kognitiv beeinträchtigt gewesen zu sein (Davis et al. 1999).
Zudem ist oft zu beobachten, dass sich der Grad der Amyloid-Belastung ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr ändert, während der klinische Verfall fortschreitet (Engler et al. 2006).

5.3 Akutes Stressmodell versus Evolution

Infolge der Akkumulation von Sauerstoff in der Erdatmosphäre vor ca. zwei Milliarden Jahren mussten die existierenden anaeroben Organismen Anpassungsstrategien entwickeln, um in der neuen Umwelt überleben zu können. Während manche Organismen die wenigen Sauerstoff-freien ökologischen Nischen besetzten, entwickelten sich andere Organismen, so genannte fakultative Anaerobier, welche sowohl zur Atmung als auch zur Fermentation befähigt waren. Später kamen Spezies hinzu, welche ausschließlich Sauerstoff metabolisierten. Beide Organismen-Typen mussten in der Lage sein, sich vor der, mit dem aeroben Stoffwechsel einhergehenden oxidativen Schädigung durch ROS zu schützen. Eine dieser Anpassungen an den oxidativen Stress/den oxidativen Lebensraum ist die Evolution eines alternativen genetischen Codes in Mitochondrien, der es Organismen ermöglicht, ihre mitochondrialen Membranproteine mit der Aminosäure Methionin anzureichern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluß zu, dass die Methioninreste an der Proteinoberfläche als antioxidatives "Schutzschild" akkumuliert werden, um die Proteine im hochoxidativen Millieu des Mitochondriums vor oxidativen Angriff zu bewahren.

Oxidativer Stress gehört wahrscheinlich zu den zentralen epigenetischen Faktoren, die bei der Entstehung der sporadischen Alzheimerschen Krankheit, welche die Mehrzahl aller Alzheimer-Fälle ausmacht, eine große Rolle spielen. Die Induktion von oxidativem Stress im Alzheimer-Mausmodell APP23 durch eine lebenslange Antioxidantien-Depletion im Rahmen der vorliegenden Arbeit hatte allerdings keine Modulation der Histopathologie zur Folge. Die gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass sich fundamentale evolutionäre Anpassungen zeitlich wie populationsbiologisch in einem anderen Referenzrahmen abspielen, als akute oxidative Schädigungen in einem Einzelorganismus, und sich daher nicht notwendigerweise auf dieser Ebene niederschlagen müssen.

6 Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution müssen Sauerstoff-metabolisierende Organismen eine Reihe von Anpassungen entwickelt haben, um in der zytotoxischen oxidativen Umgebung der sauerstoffhaltigen Erdatmosphäre überleben zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Analysen mitochondrial kodierter und kern-kodierter Proteome mehrerer hundert Spezies haben ergeben, dass die Evolution eines alternativen genetischen Codes in Mitochondrien eine moderne Adaptation in diesem Sinne war. Viele aerobe Tiere und Pilze dekodieren in Abweichung vom genetischen Standard-Code das Codon AUA als Methionin. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass diese Spezies dadurch eine massive der sehr leicht oxidierbaren Akkumulation Aminosäure Methionin in ihren Atmungskettenkomplexen erreichen, die generell ein bevorzugtes Ziel reaktiver Sauerstoffspezies sind. Der gewonnene Befund lässt sich widerspruchsfrei nur unter Annahme einer antioxidativen Wirkung dieser Aminosäure erklären, wie sie erstmals 1996 von R. Levine anhand von Oxidationsmessungen in Modellproteinen postuliert worden war. In der vorliegenden Arbeit wird diese Hypothese nun direkt mittels neuartiger Modellsubstanzen in lebenden Zellen bestätigt. Die durchgeführten bioinformatischen Analysen und zellbiologischen Experimente belegen, dass kollektive Proteinveränderungen die Triebkraft für die Evolution abweichender genetischer Codes sein können.

Die Bedeutung von oxidativem Stress wurde darüber hinaus auch im Referenzrahmen einer akuten oxidativen Schädigung im Einzelorganismus untersucht. Da oxidativer Stress in der Pathogenese altersassoziierter neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit prominent involviert zu sein scheint, wurden die Auswirkungungen von Umweltinduziertem oxidativem Stress auf den histopathologischen Verlauf in einem transgenen Modell der Alzheimerschen Krankheit *in vivo* untersucht. Dabei wurden transgene Mäuse des Modells APP23 im Rahmen von Fütterungsversuchen einer lebenslangen Defizienz der Antioxidantien Selen oder Vitamin E ausgesetzt. Während die Selenoproteinexpression durch die selendefiziente Diät gewebespezifisch reduziert wurde, ergaben sich keine Anzeichen eines beschleunigten Auftretens pathologischer Marker wie amyloider Plaques oder Neurodegeneration. Es war vielmehr ein unerwarteter Trend hinsichtlich einer geringeren Plaquebelastung in Vitamin E-defizienten Alzheimermäusen zu erkennen. Auch wenn diese Daten aufgrund einer geringen Versuchstiergruppengröße nur mit Vorsicht interpretiert werden dürfen, so scheint doch ein Mangel an essentiellen antioxidativen Nährstoffen die Progression in einem anerkannten Alzheimermodell nicht negativ zu beeinflussen.

7 Abstract

During evolution, oxygen-metabolizing organisms have developed multiple strategies to cope with the cytotoxic, oxidative environment of the oxygen-containing atmosphere. Comparative analyses in mitochondrial and nuclear encoded proteoms of several hundred species performed in this work unravel the evolution of an alternative genetic code in mitochondria as a modern adaptation to oxidative stress. As a consequence, many aerobic animals and fungi decode the former isoleucine codon, AUA, for methionine. This unusual decoding leads to a massive accumulation of an oxidant-labile amino acid, methionine, on the surfaces of respiratory chain complexes, which are exposed to a highly oxidative environment. These findings may yet find a coherent explanation in the antioxidative function of methionine, which was already postulated by Levine et al. in 1996. This work confirms this hypothesis by demonstrating that a newly synthesized lipophilic methionine compound significantly protects eukaryotic cells against oxidative damage. Thus, bioinformatics and cell biological experiments provide evidence that collective changes on the protein level can be the trigger for the evolution of alternative genetic codes.

Besides looking at the fundamental evolutionary level, this work also explores consequences of acute oxidative damage on the single species level. Since oxidative stress is associated in the pathogenesis of age-related neurodegenerative diseases like Alzheimer's Disease, the impact of environmental oxidative stress was examined in a transgenic mouse model of a familial form of Alzheimer's Disease *in vivo*. The progression of histopathological hallmarks of Alzheimer's Disease like senile plaques and neurodegeneration after feeding APP23 transgenic mice a diet deficient in the antioxidants selenium or vitamin E was examined. Lifelong dietary selenium restriction led to a tissue specific reduction of selenoproteins, but not to accelerated plaque build-up or neurodegeneration. Even in due consideration of the limited animal numbers used in this study, it appears that a deficiency in essential antioxidative nutrients does not accelerate the progression of Alzheimer's Disease in APP23 mice.

8 Literatur

Alzheimer A (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." <u>Allg. Zeitschr.</u> <u>Psychiatr.</u> **64**:146-148.

Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M und et al. (1993). "Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow." J Biol Chem 268(25): 18532-41.

Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK und Hyman BT (2002). "LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes." <u>Brain Res Mol Brain Res</u> **104**(1): 38-46.

Arispe N, Pollard HB und Rojas E (1993). "Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 90(22): 10573-7.

Arispe N, Rojas E und Pollard HB (1993). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 90(2): 567-71.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET und Hyman BT (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **42**(3 Pt 1): 631-9.

Arriagada PV, Marzloff K und Hyman BT (1992). "Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **42**(9): 1681-8.

Bales KR, Dodart JC, DeMattos RB, Holtzman DM und Paul SM (2002). "Apolipoprotein E, amyloid, and Alzheimer disease." <u>Mol Interv</u> **2**(6): 363-75, 339.

Beal MF (1995). "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases." <u>Ann</u> <u>Neurol</u> **38**(3): 357-66.

Beal MF und Shults CW (2003). "Effects of Coenzyme Q10 in Huntington's disease and early Parkinson's disease." <u>Biofactors</u> **18**(1-4): 153-61.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA und Freeman BA (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 87(4): 1620-4.

Behl C, Davis JB, Lesley R und Schubert D (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." <u>Cell</u> 77(6): 817-27.

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H und Elger W (1988). "Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **966**(1): 12-21.

Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB und Stadtman ER (1996). "Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(5): 1776-80.

Berlett BS, Levine RL und Stadtman ER (1998). "Carbon dioxide stimulates peroxynitritemediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylylation." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 95(6): 2784-9.

Berr C, Nicole A, Godin J, Ceballos-Picot I, Thevenin M, Dartigues JF und Alperovitch A (1993). "Selenium and oxygen-metabolizing enzymes in elderly community residents: a pilot epidemiological study." <u>J Am Geriatr Soc</u> **41**(2): 143-8.

Bhatia R, Lin H und Lal R (2000). "Fresh and globular amyloid beta protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity." <u>Faseb J</u> **14**(9): 1233-43.

Biedler JL, Helson L und Spengler BA (1973). "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." <u>Cancer Res</u> **33**(11): 2643-52.

Blacker D (2005). "Mild cognitive impairment--no benefit from vitamin E, little from donepezil." <u>N Engl J Med</u> **352**(23): 2439-41.

Boncristiano S, Calhoun ME, Kelly PH, Pfeifer M, Bondolfi L, Stalder M, Phinney AL, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Enz A, Sommer B, Staufenbiel M und Jucker M (2002). "Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis." J <u>Neurosci</u> 22(8): 3234-43.

Bondolfi L, Calhoun M, Ermini F, Kuhn HG, Wiederhold KH, Walker L, Staufenbiel M und Jucker M (2002). "Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice." J Neurosci **22**(2): 515-22.

Bondy SC, Guo-Ross SX und Pien J (1998). "Mechanisms underlying the aluminum-induced potentiation of the pro-oxidant properties of transition metals." <u>Neurotoxicology</u> **19**(1): 65-71.

Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG und Sisodia SS (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." <u>Neuron</u> **17**(5): 1005-13.

Braak H und Braak E (1997). "Staging of Alzheimer-related cortical destruction." <u>Int</u> <u>Psychogeriatr</u> **9 Suppl 1**: 257-61; discussion 269-72.

Brigelius-Flohe R (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." <u>Free Radic Biol Med</u> **27**(9-10): 951-65.

Brion JP, Couck AM, Passareiro E und Flament-Durand J (1985). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study." <u>J Submicrosc Cytol</u> **17**(1): 89-96.

Brot N und Weissbach H (1983). "Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins." <u>Arch Biochem Biophys</u> **223**(1): 271-81.

Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG und Arthur JR (2000). "Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes." <u>Clin Sci (Lond)</u> **98**(5): 593-9.

Burk RF, Brown DG, Seely RJ und Scaief CC, 3rd (1972). "Influence of dietary and injected selenium on whole-blody retention, route of excretion, and tissue retention of 75SeO3 2- in the rat." J Nutr **102**(8): 1049-55.

Busciglio J, Lorenzo A und Yankner BA (1992). "Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity." <u>Neurobiol Aging</u> **13**(5): 609-12.

Butterfield DA und Boyd-Kimball D (2004). "Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain." <u>Brain Pathol</u> **14**(4): 426-32.

Butterfield DA und Boyd-Kimball D (2005). "The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1703**(2): 149-56.

Butterfield DA und Bush AI (2004). "Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide." <u>Neurobiol Aging</u> **25**(5): 563-8.

Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM und Drake J (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." <u>Neurobiol Aging</u> **23**(5): 655-64.

Butterfield DA und Lauderback CM (2002). "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress." Free Radic Biol Med **32**(11): 1050-60.

Butterfield DA, Perluigi M und Sultana R (2006). "Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics." <u>Eur J Pharmacol</u> **545**(1): 39-50.

Cadenas E und Davies KJ (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." <u>Free Radic Biol Med</u> **29**(3-4): 222-30.

Cai XD, Golde TE und Younkin SG (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor." <u>Science</u> **259**(5094): 514-6.

Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B und Jucker M (1998). "Neuron loss in APP transgenic mice." <u>Nature</u> **395**(6704): 755-6.

Carey JR und Judge DS (2000). "Life Spans of Mammals, Birds, Amphibians, Reptiles, and Fish." Monographs on Population Aging No. 8 (Odense University Press, Odense).

Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, Founds H, Atwood CS, Perry G und Smith MA (2001). "Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine." <u>Free Radic Biol Med</u> **31**(2): 175-80.

Ceballos-Picot I, Merad-Boudia M, Nicole A, Thevenin M, Hellier G, Legrain S und Berr C (1996). "Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type--place of the extracellular glutathione peroxidase." <u>Free Radic Biol Med</u> **20**(4): 579-87.

Chan TS, Moridani M, Siraki A, Scobie H, Beard K, Eghbal MA, Galati G und O'Brien PJ (2001). "Hydrogen peroxide supports hepatocyte P450 catalysed xenobiotic/drug metabolic activation to form cytotoxic reactive intermediates." <u>Adv Exp Med Biol</u> **500**: 233-6.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL und Lesnefsky EJ (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." J Biol Chem **278**(38): 36027-31.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I und Selkoe DJ (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." <u>Nature</u> **360**(6405): 672-4.

Clementi E, Brown GC, Feelisch M und Moncada S (1998). "Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **95**(13): 7631-6.

Clementi ME, Pezzotti M, Orsini F, Sampaolese B, Mezzogori D, Grassi C, Giardina B und Misiti F (2006). "Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) induces cell death in human neuroblastoma via bax/bcl-2 ratio increase: an intriguing role for methionine 35." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **342**(1): 206-13.

Combet C, Jambon M, Deleage G und Geourjon C (2002). "Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein." <u>Bioinformatics</u> **18**(1): 213-4.

Combs CK, Karlo JC, Kao SC und Landreth GE (2001). "beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis." J Neurosci **21**(4): 1179-88.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL und Pericak-Vance MA (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." <u>Science</u> **261**(5123): 921-3.

Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P und Perry G (1995). "Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease." <u>Acta Neuropathol</u> **89**(4): 291-5.

Crawford DR, Suzuki T, Sesay J und Davies KJ (2002). "Analysis of gene expression following oxidative stress." <u>Methods Mol Biol</u> **196**: 155-62.

Crouch PJ, Barnham KJ, Duce JA, Blake RE, Masters CL und Trounce IA (2006). "Copperdependent inhibition of cytochrome c oxidase by Abeta(1-42) requires reduced methionine at residue 35 of the Abeta peptide." J Neurochem **99**(1): 226-36.

Cruz L, Urbanc B, Buldyrev SV, Christie R, Gomez-Isla T, Havlin S, McNamara M, Stanley HE und Hyman BT (1997). "Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(14): 7612-6.

Csoka B und Nagy G (2004). "Determination of diffusion coefficient in gel and in aqueous solutions using scanning electrochemical microscopy." J Biochem Biophys Methods **61**(1-2): 57-67.

Culotta E und Koshland DE, Jr. (1992). "NO news is good news." Science 258(5090): 1862-5.

Cummings BJ und Cotman CW (1995). "Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity." <u>Lancet</u> **346**(8989): 1524-8.

D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY und Lee DH (2002). "Consistent immunohistochemical detection of intracellular beta-amyloid42 in pyramidal neurons of Alzheimer's disease entorhinal cortex." <u>Neurosci Lett</u> **333**(3): 163-6.

D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY, Peterson PA und Lee DH (2001). "Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease." <u>Histopathology</u> **38**(2): 120-34.

Davies KJ (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life." <u>Biochem Soc Symp</u> **61**: 1-31.

Davies KJ und Pryor WA (2005). "The evolution of Free Radical Biology & Medicine: a 20year history." <u>Free Radic Biol Med</u> **39**(10): 1263-4.

Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR und Markesbery WR (1999). "Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects." J Neuropathol Exp Neurol **58**(4): 376-88.

Dawson VL und Dawson TM (2004). "Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk." J Bioenerg Biomembr **36**(4): 287-94.

De Strooper B (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." <u>Neuron</u> **38**(1): 9-12.

De Strooper B (2007). "Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease." <u>EMBO Rep</u> **8**(2): 141-6.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K und Van Leuven F (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." <u>Nature</u> **391**(6665): 387-90.

DeKosky ST und Scheff SW (1990). "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." <u>Ann Neurol</u> **27**(5): 457-64.

Dickson TC und Vickers JC (2001). "The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease." <u>Neuroscience</u> **105**(1): 99-107.

DiMauro S (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta 1658(1-2): 80-8.

Dougherty DA (1996). "Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp." <u>Science</u> 271(5246): 163-8.

Drake J, Link CD und Butterfield DA (2003). "Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic Caenorhabditis elegans model." <u>Neurobiol Aging</u> **24**(3): 415-20.

Duyckaerts C, Hauw JJ, Bastenaire F, Piette F, Poulain C, Rainsard V, Javoy-Agid F und Berthaux P (1986). "Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type." <u>Acta Neuropathol</u> **70**(3-4): 249-56.

Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Langstrom B und Nordberg A (2006). "Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease." <u>Brain</u> **129**(Pt 11): 2856-66.

Faber-Langendoen K, Morris JC, Knesevich JW, LaBarge E, Miller JP und Berg L (1988). "Aphasia in senile dementia of the Alzheimer type." <u>Ann Neurol</u> **23**(4): 365-70.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E und Scazufca M (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." <u>Lancet</u> **366**(9503): 2112-7.

Fincher TK, Yoo SD, Player MR, Sowell JW, Sr. und Michniak BB (1996). "In vitro evaluation of a series of N-dodecanoyl-L-amino acid methyl esters as dermal penetration enhancers." J Pharm Sci **85**(9): 920-3.

Foote CS, Shook FC und Abakerli RB (1984). "Characterization of singlet oxygen." <u>Methods</u> <u>Enzymol</u> **105**: 36-47.

Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K und Cole GM (1998). "Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice." <u>Am J Pathol</u> **152**(1): 307-17.

Fridovich I (1989). "Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas." J Biol Chem **264**(14): 7761-4.

Fridovich I (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." <u>Annu Rev Biochem</u> 64: 97-112.

Fridovich I (1999). "Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?" <u>Ann N Y Acad Sci</u> **893**: 13-8.

Friedlich AL und Butcher LL (1994). "Involvement of free oxygen radicals in betaamyloidosis: an hypothesis." <u>Neurobiol Aging</u> **15**(4): 443-55.

Gabbita SP, Aksenov MY, Lovell MA und Markesbery WR (1999). "Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain." J Neurochem **73**(4): 1660-6.

Gafni A (1997). "Structural modifications of proteins during aging." <u>J Am Geriatr Soc</u> **45**(7): 871-80.

Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G und Hof PR (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **60**(9): 1495-500.

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E und Pelicci PG (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **8**(9): 722-8.

Girotti AW und Kriska T (2004). "Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling." <u>Antioxid Redox Signal</u> 6(2): 301-10.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L und et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **349**(6311): 704-6.

Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE und Hyman BT (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." <u>Ann Neurol</u> **41**(1): 17-24.

Haass C, Hung AY, Selkoe DJ und Teplow DB (1994). "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor." J Biol Chem **269**(26): 17741-8.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB und et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." <u>Nature</u> **359**(6393): 322-5.

Halliwell B (1984). "Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical." <u>Neurotoxicology</u> **5**(1): 113-7.

Halliwell B (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." J Neurochem **59**(5): 1609-23.

Halliwell B (2001). "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment." <u>Drugs Aging</u> **18**(9): 685-716.

Halliwell B (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" <u>J</u> Neurochem 97(6): 1634-58.

Halliwell B (2006). "Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration." <u>Antioxid Redox</u> Signal 8(11-12): 2007-19.

Halliwell B und Whiteman M (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" <u>Br J Pharmacol</u> **142**(2): 231-55.

Hardy J und Selkoe DJ (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." <u>Science</u> **297**(5580): 353-6.

Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, Bradley JL, Crilley JG, Turner C, Blamire AM, Manners D, Styles P, Schapira AH und Cooper JM (2005). "Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up." <u>Arch Neurol</u> **62**(4): 621-6.

Harvey RJ, Skelton-Robinson M und Rossor MN (2003). "The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years." J Neurol Neurosurg Psychiatry 74(9): 1206-9.

Hayton SM und Muller DP (2004). "Vitamin E in neural and visual function." <u>Ann N Y Acad</u> <u>Sci</u> **1031**: 263-70.

Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA und Butterfield DA (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(8): 3270-4.

Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM und et al. (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." J Neurochem **65**(5): 2146-56.

Hill KE, Motley AK, Li X, May JM und Burk RF (2001). "Combined selenium and vitamin E deficiency causes fatal myopathy in guinea pigs." <u>J Nutr</u> **131**(6): 1798-802.

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G und Smith MA (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." J <u>Neurosci</u> **21**(9): 3017-23.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E und Nicoll JA (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-23.

Holmgren A (1985). "Thioredoxin." Annu Rev Biochem 54: 237-71.

Hoyer S (1994). "Age as risk factor for sporadic dementia of the Alzheimer type?" <u>Ann N Y</u> <u>Acad Sci</u> **719**: 248-56.

Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM und Doms RW (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." J Biol Chem **275**(43): 33729-37.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ und Damasio AR (1986). "Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease." <u>Ann Neurol</u> **20**(4): 472-81.

Ignarro LJ (1989). "Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters." <u>Pharm Res</u> 6(8): 651-9.

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT und Irizarry MC (2004). "Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain." <u>Neurology</u> **62**(6): 925-31.

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T und Goldschmidt-Clermont PJ (1997). "Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts." <u>Science</u> **275**(5306): 1649-52.

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S und Selkoe D (1989). "Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease." J Neuroimmunol **24**(3): 173-82.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N und Ihara Y (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." <u>Neuron</u> **13**(1): 45-53.

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG und Borchelt DR (2004). "Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase." <u>Hum Mol Genet</u> **13**(2): 159-70.

Jarrett JT, Berger EP und Lansbury PT, Jr. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." <u>Biochemistry</u> **32**(18): 4693-7.

Joshi G, Sultana R, Perluigi M und Allan Butterfield D (2005). "In vivo protection of synaptosomes from oxidative stress mediated by Fe2+/H2O2 or 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride by the glutathione mimetic tricyclodecan-9-yl-xanthogenate." Free Radic Biol Med **38**(8): 1023-31.

Judge DS und Carey JR (2000). "Postreproductive life predicted by primate patterns." J <u>Gerontol A Biol Sci Med Sci</u> **55**(4): B201-9.

Jukes TH und Osawa S (1997). "Point counter point. UAR codons for glutamine." <u>J Mol Evol</u> **45**(3): 207-8.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K und Muller-Hill B (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." <u>Nature</u> **325**(6106): 733-6.

Kawahara M und Kuroda Y (2000). "Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis." <u>Brain Res Bull</u> **53**(4): 389-97.

Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G und Mattson MP (1997). "4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes." <u>Neuroscience</u> **80**(3): 685-96.

Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, Abramowski D, Wiederhold KH, Sturchler-Pierrat C, Jucker M, Bergmann R, Staufenbiel M und Sommer B (2003). "Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice." <u>Neurobiol Aging</u> **24**(2): 365-78.

Kidd M (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-3.

Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM und Nobrega JN (1992). "Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease." J Neurochem **59**(2): 776-9.

Klucken J, McLean PJ, Gomez-Tortosa E, Ingelsson M und Hyman BT (2003). "Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies." <u>Neurochem Res</u> **28**(11): 1683-91.

Knight RD, Freeland SJ und Landweber LF (2001). "Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code." <u>Nat Rev Genet</u> **2**(1): 49-58.

Kong SK, Yim MB, Stadtman ER und Chock PB (1996). "Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH2 peptide." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(8): 3377-82.

Kontush A, Mann U, Arlt S, Ujeyl A, Luhrs C, Muller-Thomsen T und Beisiegel U (2001). "Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease." <u>Free Radic Biol Med</u> **31**(3): 345-54.

Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z und Gladyshev VN (2002). "Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(7): 4245-50.

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE und Kunz WS (2004). "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria." J Biol Chem **279**(6): 4127-35.

Kumar RA, Koc A, Cerny RL und Gladyshev VN (2002). "Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in Drosophila methionine-R-sulfoxide reductase." J Biol Chem **277**(40): 37527-35.

Kuo YM, Beach TG, Sue LI, Scott S, Layne KJ, Kokjohn TA, Kalback WM, Luehrs DC, Vishnivetskaya TA, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Weller RO und Roher AE (2001). "The evolution of A beta peptide burden in the APP23 transgenic mice: implications for A beta deposition in Alzheimer disease." <u>Mol Med</u> 7(9): 609-18.

Kurganov B, Doh M und Arispe N (2004). "Aggregation of liposomes induced by the toxic peptides Alzheimer's Abetas, human amylin and prion (106-126): facilitation by membrane-bound GM1 ganglioside." <u>Peptides</u> **25**(2): 217-32.

Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Sturchler-Pierrat C und Strazielle C (2002). "Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation." <u>Brain Res</u> **956**(1): 36-44.

Lambert JC, Mann DM, Harris JM, Chartier-Harlin MC, Cumming A, Coates J, Lemmon H, StClair D, Iwatsubo T und Lendon C (2001). "The -48 C/T polymorphism in the presenilin 1 promoter is associated with an increased risk of developing Alzheimer's disease and an increased Abeta load in brain." J Med Genet **38**(6): 353-5.

Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR und Butterfield DA (2001). "The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42." J Neurochem **78**(2): 413-6.

Lee G, Pollard HB und Arispe N (2002). "Annexin 5 and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid-beta-peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site." <u>Peptides</u> **23**(7): 1249-63.

Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kayed R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M und Ashe KH (2006). "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory." <u>Nature</u> **440**(7082): 352-7.

Levine RL, Mosoni L, Berlett BS und Stadtman ER (1996). "Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(26): 15036-40.

Liaudet L, Soriano FG und Szabo C (2000). "Biology of nitric oxide signaling." <u>Crit Care</u> <u>Med</u> **28**(4 Suppl): N37-52.

Lim KS, Jeyaseelan K, Whiteman M, Jenner A und Halliwell B (2005). "Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **1042**: 210-20.

Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P und Chan L (1985). "Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of ApoE mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues." <u>Biochemistry</u> **24**(14): 3751-6.

Liochev SI und Fridovich I (2005). "Cross-compartment protection by SOD1." <u>Free Radic</u> <u>Biol Med</u> **38**(1): 146-7.

Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP und Markesbery WR (1997). "Elevated 4hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease." <u>Neurobiol Aging</u> **18**(5): 457-61.

Lovell MA, Xie C, Gabbita SP und Markesbery WR (2000). "Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain." <u>Free Radic Biol Med</u> **28**(3): 418-27.

Lovell MA, Xiong S, Markesbery WR und Lynn BC (2005). "Quantitative proteomic analysis of mitochondria from primary neuron cultures treated with amyloid beta peptide." <u>Neurochem</u> <u>Res</u> **30**(1): 113-22.

Low SC und Berry MJ (1996). "Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes." <u>Trends Biochem Sci</u> **21**(6): 203-8.

Luthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, Sansig G, Portet C, Schmutz M, Schroder M, Nitsch C, Laurent JP und Monard D (1997). "Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation." J <u>Neurosci</u> **17**(12): 4688-99.

Lymar SV und Hurst JK (1996). "Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitritemediated cellular damage or cellular protectant?" <u>Chem Res Toxicol</u> **9**(5): 845-50.

Mahley RW (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology." <u>Science</u> **240**(4852): 622-30.

Marchetti MA, Lee W, Cowell TL, Wells TM, Weissbach H und Kantorow M (2006). "Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells." <u>Exp Eye Res</u> **83**(5): 1281-6.

Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA und Mattson MP (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.

Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K und Mattson MP (1997). "A role for 4hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide." <u>J Neurochem</u> **68**(1): 255-64.

Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K und Mattson MP (1997). "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." <u>J Neurosci</u> 17(3): 1046-54.

Marla SS, Lee J und Groves JT (1997). "Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(26): 14243-8.

Martin A, Youdim K, Szprengiel A, Shukitt-Hale B und Joseph J (2002). "Roles of vitamins E and C on neurodegenerative diseases and cognitive performance." <u>Nutr Rev</u> **60**(10 Pt 1): 308-26.

Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M und Terry RD (1991). "Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease." <u>Acta Neuropathol</u> **81**(4): 428-33.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I und Rydel RE (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." <u>J Neurosci</u> **12**(2): 376-89.

May PC, Gitter BD, Waters DC, Simmons LK, Becker GW, Small JS und Robison PM (1992). "beta-Amyloid peptide in vitro toxicity: lot-to-lot variability." <u>Neurobiol Aging</u> **13**(5): 605-7.

McCord JM (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress." <u>Am J Med</u> **108**(8): 652-9.

McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, Mc IS und Passmore AP (2001). "Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde." <u>Qim</u> **94**(9): 485-90.

Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M und Mehta SP (2001). "Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease." <u>Neurosci Lett</u> **304**(1-2): 102-6.

Melhorn RJ und Cole G (1985). "The Free Radical Theory of Aging: a critical review." Adv Free Radic Biol Med 1: 165-223

Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Miziorko H, Epstein CJ und Wallace DC (1999). "Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(3): 846-51.

Metcalfe T, Bowen DM und Muller DP (1989). "Vitamin E concentrations in human brain of patients with Alzheimer's disease, fetuses with Down's syndrome, centenarians, and controls." <u>Neurochem Res</u> **14**(12): 1209-12.

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ und Hyman BT (2008). "Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **451**(7179): 720-4.

Mitchell P (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." <u>Nature</u> **191**: 144-8.

Molina JA, de Bustos F, Jimenez-Jimenez FJ, Benito-Leon J, Gasalla T, Orti-Pareja M, Vela L, Bermejo F, Martin MA, Campos Y und Arenas J (1997). "Respiratory chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **48**(3): 636-8.

Moncada S, Palmer RM und Higgs EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." <u>Pharmacol Rev</u> **43**(2): 109-42.

Moon Y, Lee KH, Park JH, Geum D und Kim K (2005). "Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10." J Neurochem 93(5): 1199-208.

Moosmann B und Behl C (2000). "Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins." <u>Eur J Biochem</u> **267**(18): 5687-92.

Moosmann B und Behl C (2002). "Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders." <u>Expert Opin Invest Drugs</u> **11**:1407-35

Moosmann B und Behl C (2008). "Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan." <u>Aging Cell</u> 7(1): 32-46.

Moosmann B, Skutella T, Beyer K und Behl C (2001). "Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death." <u>Biol Chem</u> **382**(11): 1601-12.

Moreau R, Heath SH, Doneanu CE, Lindsay JG und Hagen TM (2003). "Age-related increase in 4-hydroxynonenal adduction to rat heart alpha-ketoglutarate dehydrogenase does not cause loss of its catalytic activity." <u>Antioxid Redox Signal</u> **5**(5): 517-27.

Moreira PI, Honda K, Liu Q, Santos MS, Oliveira CR, Aliev G, Nunomura A, Zhu X, Smith MA und Perry G (2005). "Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology." <u>Curr Alzheimer Res</u> **2**(4): 403-8.

Morris JC, Drazner M, Fulling K, Grant EA und Goldring J (1989). "Clinical and pathological aspects of parkinsonism in Alzheimer's disease. A role for extranigral factors?" <u>Arch Neurol</u> **46**(6): 651-7.

Morrison JH und Hof PR (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." <u>Science</u> **278**(5337): 412-9.

Moskovitz J (2007). "Prolonged selenium-deficient diet in MsrA knockout mice causes enhanced oxidative modification to proteins and affects the levels of antioxidant enzymes in a tissue-specific manner." Free Radic Res 41(2): 162-71.

Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS und Stadtman ER (2001). "Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12920-5.

Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM und Stadtman ER (1997). "The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(18): 9585-9.

Moskovitz J, Rahman MA, Strassman J, Yancey SO, Kushner SR, Brot N und Weissbach H (1995). "Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage." J Bacteriol 177(3): 502-7.

Moskovitz J, Singh VK, Requena J, Wilkinson BJ, Jayaswal RK und Stadtman ER (2002). "Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and Staphylococcus aureus and their substrate stereospecificity." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **290**(1): 62-5.

Moskovitz J und Stadtman ER (2003). "Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(13): 7486-90.

Moskovitz J, Weissbach H und Brot N (1996). "Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(5): 2095-9.

Muller DP und Goss-Sampson MA (1990). "Neurochemical, neurophysiological, and neuropathological studies in vitamin E deficiency." <u>Crit Rev Neurobiol</u> **5**(3): 239-63.

Muller FL, Liu Y und Van Remmen H (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." J Biol Chem **279**(47): 49064-73.

Murray IV, Sindoni ME und Axelsen PH (2005). "Promotion of oxidative lipid membrane damage by amyloid beta proteins." <u>Biochemistry</u> **44**(37): 12606-13.

Mutisya EM, Bowling AC und Beal MF (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." J Neurochem 63(6): 2179-84.

Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC und Wegiel J (2004). "Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease." <u>Neurobiol Aging</u> **25**(5): 663-74.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E und Ikeda K (1991). "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease." <u>Brain Res</u> **541**(1): 163-6.

Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P und et al. (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(18): 8378-82.

Nunomura A, Perry G, Hirai K, Aliev G, Takeda A, Chiba S und Smith MA (1999). "Neuronal RNA oxidation in Alzheimer's disease and Down's syndrome." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **893**: 362-4.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Friedland RP, Hirai K, Chiba S und Smith MA (2000). "Neuronal oxidative stress precedes amyloid-beta deposition in Down syndrome." J <u>Neuropathol Exp Neurol</u> **59**(11): 1011-7.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S und Smith MA (1999). "RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease." J <u>Neurosci</u> **19**(6): 1959-64.

Oba T, Andachi Y, Muto A und Osawa S (1991). "CGG: an unassigned or nonsense codon in Mycoplasma capricolum." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **88**(3): 921-5.

Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF und et al. (1995). "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress." <u>Exp Neurol</u> **136**(1): 22-31.

Osawa S, Jukes TH, Watanabe K und Muto A (1992). "Recent evidence for evolution of the genetic code." <u>Microbiol Rev</u> 56(1): 229-64.

Oster O, Schmiedel G und Prellwitz W (1988). "The organ distribution of selenium in German adults." <u>Biol Trace Elem Res</u> **15**: 23-45.

Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW und Taylor JM (1985). "Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **82**(10): 3445-9.

Pal R, Oien DB, Ersen FY und Moskovitz J (2007). "Elevated levels of brain-pathologies associated with neurodegenerative diseases in the methionine sulfoxide reductase A knockout mouse." <u>Exp Brain Res</u> **180**(4): 765-74.

Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ und Barja G (1998). "Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals." J Lipid Res **39**(10): 1989-94.

Parker WD, Jr., Boyson SJ und Parks JK (1989). "Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease." <u>Ann Neurol</u> **26**(6): 719-23.

Parks E und Traber MG (2000). "Mechanisms of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future." <u>Antioxid Redox Signal</u> 2(3): 405-12.

Pasternak SH, Callahan JW und Mahuran DJ (2004). "The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective." J Alzheimers Dis 6(1): 53-65.

Patel NV und Forman BM (2004). "Linking lipids, Alzheimer's and LXRs?" <u>Nucl Recept Signal 2</u>: e001.

Patenaude A, Murthy MR und Mirault ME (2005). "Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system." <u>Cell Mol Life Sci</u> **62**(10): 1063-80.

Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK und Powell TP (1985). "Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **82**(13): 4531-4.

Perkins AJ, Hendrie HC, Callahan CM, Gao S, Unverzagt FW, Xu Y, Hall, KS, Hui SL (1999). "Association of antioxidants with memory in a multiethnic elderly sample using the Third National Health and Nutrition Examination Survey." <u>Am J Epidemiol</u> **150**:37-44.

Pezo V, Metzgar D, Hendrickson TL, Waas WF, Hazebrouck S, Doring V, Marliere P, Schimmel P und De Crecy-Lagard V (2004). "Artificially ambiguous genetic code confers growth yield advantage." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(23): 8593-7.

Pryor WA und Squadrito GL (1995). "The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." <u>Am J Physiol</u> **268**(5 Pt 1): L699-722.

Qin S, Colin C, Hinners I, Gervais A, Cheret C und Mallat M (2006). "System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40." J Neurosci **26**(12): 3345-56.

Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J und Lal R (2005). "Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(30): 10427-32. Radi R, Beckman JS, Bush KM und Freeman BA (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." <u>Arch Biochem Biophys</u> **288**(2): 481-7.

Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M und Cayota A (2001). "Unraveling peroxynitrite formation in biological systems." <u>Free Radic Biol Med</u> **30**(5): 463-88.

Reiter CD, Teng RJ und Beckman JS (2000). "Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite." J Biol Chem **275**(42): 32460-6.

Rhee SG, Chae HZ und Kim K (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." <u>Free Radic Biol Med</u> **38**(12): 1543-52.

Rice ME (2000). "Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain." <u>Trends</u> <u>Neurosci</u> **23**(5): 209-16.

Riobo NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S und Poderoso JJ (2001). "Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation." <u>Biochem J</u> **359**(Pt 1): 139-45.

Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G und Murri L (2003). "Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review." <u>Brain Res Bull</u> **61**(1): 1-24.

Rogers J und Morrison JH (1985). "Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease." J Neurosci 5(10): 2801-8.

Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E und Ball MJ (1993). "beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(22): 10836-40.

Romanelli MF, Morris JC, Ashkin K und Coben LA (1990). "Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures." <u>Arch Neurol</u> **47**(8): 847-50.

Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A und Rustin P (1997). "Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia." <u>Nat Genet</u> **17**(2): 215-7.

Rottkamp CA, Raina AK, Zhu X, Gaier E, Bush AI, Atwood CS, Chevion M, Perry G und Smith MA (2001). "Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity." <u>Free Radic Biol Med</u> **30**(4): 447-50.

Roy S, Venojarvi M, Khanna S und Sen CK (2002). "Simultaneous detection of tocopherols and tocotrienols in biological samples using HPLC-coulometric electrode array." <u>Methods Enzymol</u> **352**: 326-32.

Rubbo H, Denicola A und Radi R (1994). "Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of Trypanosoma cruzi energetic metabolism and inhibits cell respiration." <u>Arch Biochem Biophys</u> **308**(1): 96-102.

Rubin EH, Morris JC, Storandt M und Berg L (1987). "Behavioral changes in patients with mild senile dementia of the Alzheimer's type." <u>Psychiatry Res</u> 21(1): 55-62.

Samuel W, Terry RD, DeTeresa R, Butters N und Masliah E (1994). "Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia." <u>Arch Neurol</u> **51**(8): 772-8.

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ (1997). "A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimers's Disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." <u>N Engl J Med</u> **336** (17): 1216-22.

Sattler W, Maiorino M und Stocker R (1994). "Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51)." <u>Arch Biochem Biophys</u> **309**(2): 214-21.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ und et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **43**(8): 1467-72.

Savaskan NE, Borchert A, Brauer AU und Kuhn H (2007). "Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury." Free Radic Biol Med **43**(2): 191-201.

Savaskan NE, Brauer AU, Kuhbacher M, Eyupoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D und Nitsch R (2003). "Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity." <u>Faseb J</u> **17**(1): 112-4.

Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG und Smith MA (1997). "4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease." J Neurochem **68**(5): 2092-7.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandevert C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D und Seubert P (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." <u>Nature</u> **400**(6740): 173-7.

Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L und Bayer TA (2004). "Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." <u>Am J Pathol</u> **164**(4): 1495-502.

Schoneich C (2005). "Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1703**(2): 111-9.

Schoneich C, Zhao F, Wilson GS und Borchardt RT (1993). "Iron-thiolate induced oxidation of methionine to methionine sulfoxide in small model peptides. Intramolecular catalysis by histidine." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1158**(3): 307-22.

Schubert D und Chevion M (1995). "The role of iron in beta amyloid toxicity." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **216**(2): 702-7.

Schultz DW und Yarus M (1994). "Transfer RNA mutation and the malleability of the genetic code." <u>J Mol Biol</u> **235**(5): 1377-80.

Schultz DW und Yarus M (1996). "On malleability in the genetic code." <u>J Mol Evol</u> **42**(5): 597-601.

Selkoe DJ (1991). "Alzheimer's disease. In the beginning." Nature 354(6353): 432-3.

Sengupta S, Yang X und Higgs PG (2007). "The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes." J Mol Evol **64**(6): 662-88.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C und et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." <u>Nature</u> **359**(6393): 325-7.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL und Selkoe DJ (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." <u>Nat Med</u> **14**(8): 837-42.

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A und Greenamyre JT (2003). "Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease." J Neurosci 23(34): 10756-64.

Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B und et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." <u>Science</u> **258**(5079): 126-9.

Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP und Rivest S (2006). "Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease." Neuron 49(4): 489-502.

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA und Markesbery WR (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **88**(23): 10540-3.

Smith MA, Kutty RK, Richey PL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, Wiggert B, Petersen RB und Perry G (1994). "Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." <u>Am J Pathol</u> **145**(1): 42-7.

Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF und Kowall N (1996). "Oxidative damage in Alzheimer's." <u>Nature</u> **382**(6587): 120-1.

Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS und Perry G (1997). "Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease." J Neurosci 17(8): 2653-7.

Smith MA, Sayre LM, Monnier VM und Perry G (1995). "Radical AGEing in Alzheimer's disease." <u>Trends Neurosci</u> 18(4): 172-6.

Sohal RS (2002). "Oxidative stress hypothesis of aging." Free Radic Biol Med 33(5): 573-4.

Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH und Nussbaum RL (2002). "Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival." <u>Nat Med</u> **8**(5): 514-7.

Spires TL und Hyman BT (2004). "Neuronal structure is altered by amyloid plaques." <u>Rev</u> <u>Neurosci</u> **15**(4): 267-78.

Spires TL und Hyman BT (2005). "Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals." <u>NeuroRx</u> 2(3): 423-37.

Squadrito GL und Pryor WA (1998). "Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide." <u>Free Radic Biol Med</u> **25**(4-5): 392-403.

Squire LR und Zola-Morgan S (1991). "The medial temporal lobe memory system." <u>Science</u> **253**(5026): 1380-6.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ und Brand MD (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.

St George-Hyslop PH (2000). "Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease." <u>Ann N</u> <u>Y Acad Sci</u> 924: 1-7.

St John G, Brot N, Ruan J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Weissbach H und Nathan C (2001). "Peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **98**(17): 9901-6.

Stadtman ER (2004). "Role of oxidant species in aging." Curr Med Chem 11(9): 1105-12.

Stadtman ER (2006). "Protein oxidation and aging." Free Radic Res 40(12): 1250-8.

Stadtman ER und Berlett BS (1997). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." <u>Chem Res Toxicol</u> **10**(5): 485-94.

Stadtman ER, Moskovitz J, Berlett BS und Levine RL (2002). "Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism." <u>Mol Cell</u> <u>Biochem</u> **234-235**(1-2): 3-9.

Stadtman ER, Van Remmen H, Richardson A, Wehr NB und Levine RL (2005). "Methionine oxidation and aging." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1703**(2): 135-40.

Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M und Jucker M (1999). "Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice." <u>Am J</u> <u>Pathol</u> **154**(6): 1673-84.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS und Roses AD (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(5): 1977-81.

Stubauer G, Giuffre A und Sarti P (1999). "Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions." J Biol Chem **274**(40): 28128-33.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M und Sommer B (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(24): 13287-92.

Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, Mattson MP, Keller JN, Waeg G und Butterfield DA (1997). "The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins." J Neurochem **69**(3): 1161-9.

Suzuki T, Oishi M, Marshak DR, Czernik AJ, Nairn AC und Greengard P (1994). "Cell cycledependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein." <u>Embo J</u> **13**(5): 1114-22.

Swearer JM, Drachman DA, O'Donnell BF und Mitchell AL (1988). "Troublesome and disruptive behaviors in dementia. Relationships to diagnosis and disease severity." J Am Geriatr Soc **36**(9): 784-90.

Swire J, Judson OP und Burt A (2005). "Mitochondrial genetic codes evolve to match amino acid requirements of proteins." <u>J Mol Evol</u> 60(1): 128-39.

Sykova E, Vorisek I, Antonova T, Mazel T, Meyer-Luehmann M, Jucker M, Hajek M, Ort M und Bures J (2005). "Changes in extracellular space size and geometry in APP23 transgenic mice: a model of Alzheimer's disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(2): 479-84.

Tanzi RE und Bertram L (2001). "New frontiers in Alzheimer's disease genetics." <u>Neuron</u> **32**(2): 181-4.

Tappel AL (1968). "Will antioxidant nutrients slow aging processes?" Geriatrics 23(10): 97-105.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA und Katzman R (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." <u>Ann Neurol</u> **30**(4): 572-80.

Thannickal VJ und Fanburg BL (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." <u>Am J</u> <u>Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **279**(6): L1005-28.

Thomas JP, Maiorino M, Ursini F und Girotti AW (1990). "Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides." J Biol Chem **265**(1): 454-61.

Tien M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB und Stadtman ER (1999). "Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(14): 7809-14.

Trifonov EN (2004). "The triplet code from first principles." J Biomol Struct Dyn 22(1): 1-11.

Turrens JF (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." <u>J Physiol</u> **552**(Pt 2): 335-44.

Urbanc B, Cruz L, Buldyrev SV, Havlin S, Irizarry MC, Stanley HE und Hyman BT (1999). "Dynamics of plaque formation in Alzheimer's disease." <u>Biophys J</u> **76**(3): 1330-4.

Valentine WM, Hill KE, Austin LM, Valentine HL, Goldowitz D und Burk RF (2005). "Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p." <u>Toxicol Pathol</u> **33**(5): 570-6.

Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F und De Deyn PP (2003). "Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition." <u>Eur J Neurosci</u> **17**(2): 388-96.

Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M und Butterfield DA (2000). "Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity." J Struct Biol **130**(2-3): 184-208.

Varadarajan S, Yatin S, Kanski J, Jahanshahi F und Butterfield DA (1999). "Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress." <u>Brain</u> <u>Res Bull</u> **50**(2): 133-41.

Vatassery GT, Adityanjee, Quach HT, Smith WE, Kuskowski MA und Melnyk D (2004). "Alpha and gamma tocopherols in cerebrospinal fluid and serum from older, male, human subjects." J Am Coll Nutr **23**(3): 233-8.

Verdile G, Gandy SE und Martins RN (2007). "The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid." <u>Neurochem Res</u> **32**(4-5): 609-23.

Viner RI, Williams TD und Schoneich C (1999). "Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase." <u>Biochemistry</u> **38**(38): 12408-15.

Vogt W (1995). "Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal." <u>Free Radic Biol Med</u> **18**(1): 93-105.

Vogt W und Hesse D (1994). "Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5." <u>Immunobiology</u> **192**(1-2): 1-9.

Wallace DC (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science 283(5407): 1482-8.

Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ und Teplow DB (1999). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." J Biol Chem 274(36): 25945-52.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ und Selkoe DJ (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." <u>Nature</u> **416**(6880): 535-9.

Walter MF, Mason PE und Mason RP (1997). "Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 inhibits lipid peroxidation as a result of its membrane interactions." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **233**(3): 760-4.

Wang X, Su B, Perry G, Smith MA und Zhu X (2007). "Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." <u>Free Radic Biol Med</u> **43**(12): 1569-73.

Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, Heinemann SH, Lowther WT, Matthews B, St John G, Nathan C und Brot N (2002). "Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function." <u>Arch Biochem Biophys</u> **397**(2): 172-8.

West MJ, Coleman PD, Flood DG und Troncoso JC (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." Lancet **344**(8925): 769-72.

Wilcock GK und Esiri MM (1982). "Plaques, tangles and dementia. A quantitative study." J <u>Neurol Sci</u> **56**(2-3): 343-56.

Wink DA und Mitchell JB (1998). "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide." <u>Free Radic Biol Med</u> **25**(4-5): 434-56.

Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY und Wisniewski HM (1985). "Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies." <u>Neurology</u> **35**(7): 957-61.

Wisniewski T und Frangione B (1992). "Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid." <u>Neurosci Lett</u> **135**(2): 235-8.

Xu J, Chen S, Ku G, Ahmed SH, Xu J, Chen H und Hsu CY (2001). "Amyloid beta peptideinduced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation." <u>J Cereb Blood Flow Metab</u> **21**(6): 702-10.

Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M und Harigaya Y (1988). "Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia." <u>Acta Neuropathol</u> 77(2): 113-9.

Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M und Ihara Y (1988). "A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostaining." <u>Acta Neuropathol</u> **76**(6): 541-9.

Yamakura F, Taka H, Fujimura T und Murayama K (1998). "Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine." J Biol Chem **273**(23): 14085-9.

Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y und Naoi M (2002). "Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells." <u>J Neural Transm</u> **109**(1): 1-13.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML und Neve RL (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease." <u>Science</u> **245**(4916): 417-20.

Yankner BA, Duffy LK und Kirschner DA (1990). "Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides." <u>Science</u> **250**(4978): 279-82.

Yao Y, Chinnici C, Tang H, Trojanowski JQ, Lee VM und Pratico D (2004). "Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis." J Neuroinflammation 1(1): 21.

Zachara BA, Pawluk H, Bloch-Boguslawska E, Sliwka KM, Korenkiewicz J, Skok Z und Ryc K (2001). "Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland." <u>Arch Environ Health</u> **56**(5): 461-6.

Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC, Cache County Study Group (2004). "Reduced risk of Alzheimer's Disease in users of antioxidative vitamin supplements: The Cache County Study." <u>Arch Neurol</u> **61**:82-8

Zhu X, Lee HG, Perry G und Smith MA (2007). "Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1772**(4): 494-502.

Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA und Perry G (2004). "Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease." <u>Brain Res</u> **1000**(1-2): 32-9.

Zingg JM und Azzi A (2004). "Non-antioxidant activities of vitamin E." <u>Curr Med Chem</u> **11**(9): 1113-33.

9 Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht, die im folgenden mitaufgelistet sind.

Publikationen:

Bender A, Hajieva P und Moosmann B (2008). "Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria." Proc Natl Acad Sci USA, *im Druck*.

Moosmann B, Yan J, Shin Y, Alirezaei M, Bender A, Zhang D und Lipton SA (2008). "Blockade of NMDA receptors by sphingosylphosphorylcholine: Implications for Niemann-Pick Disease Type A." *In Begutachtung*.

Abstracts:

Bender A, Hohberger A, Behl C und Moosmann B (2007). "Antioxidant activities of methionine account for the evolution of a non-standard genetic code in mitochondria: Implications for the targeting of mitochondrial aging." 2nd Symposium on Nutrition, Oxygen Biology and Medicine (NOBM) 2007, Paris, France.

Bender A und Moosmann B (2008). "Oxidative stress triggered the recent evolution of a nonstandard genetic code." XX International Congress of Genetics (ICG) 2008, Berlin, Germany.

Moosmann B, Yang J, Shin Y, Alirezaei M, Bender A, Zhang D und Lipton SA (2008). "Sphingosylphosphorylcholine blockade of NMDA receptors inducing neurodegeneration in Niemann-Pick Disease Type A." Leopoldina Symposium on Lipid Signalling 2008, Frankfurt, Germany.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
$A\beta_{40 \text{ bzw. } 42}$	Amyloid-β-Peptid bestehend aus 40 bzw. 42 Aminosäuren
AICD	APP intrazelluläre Domäne
APP	amyloid precursor protein, Amyloid-Vorläufer-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CTF	C-terminales Fragment
CuZnSOD	Kupfer/Zink-haltige Superoxiddismutase Zentrum
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FBS	fetal bovine serum, fötales Rinderserum
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s2}$
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
h	<i>hour</i> (s), Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
min	Minute(n)
MnSOD	Manganhaltige Superoxiddismutase
mM	Millimolar
μΜ	Mikromolar
MetO	Methioninsulfoxid
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MSR	Methioninsulfoxid-Reduktase
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
\mathbf{NAD}^{+}	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid

N-Do-Ile-OMe	N-Dodecanoyl-Isoleucin-Methylester				
N-DoMet-OMe	N-Dodecanoyl-Methionin-Methylester				
nM	Nanomolar				
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese				
PBS	phosphate bufferd saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung				
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion				
PEN-2	presenilin enhancer protein				
PFA	Paraformaldehyd				
PNS	peripheres Nervensystem				
PUFA	poly-unsaturated fatty acid, Poly-ungesättigte Fettsäure				
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure				
RNS	Reaktive Stickstoffspezies				
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies				
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute				
RT	Raumtemperatur				
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate)				
S	Sekunde				
SOD	Superoxiddismutase				
TBS	Tris buffered saline				
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin				
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan				
TRx (R)	Thioredoxin (-Reduktase)				
U	Einheit (unit)				
u.a.	unter anderem				
WT	Wildtyp				
z.B.	zum Beispiel				
ZNS	zentrales Nervensystem				

MSR-Sequenzanalyse

Suche nach *E. coli*-homologen MSR-Sequenzen in Standard Code Nutzern und Zwei-Codon-Nutzern. TBlastN des jeweiligen gesamten Genoms in allen Leserastern nach *E.coli* -homologen MSR-A und MSR-B-Sequenzen. Die Abkürzungen bedeuten: wgs, "whole genome shotgun": Teile des Genoms sind sequenziert; completed, das Genom war komplett sequenziert verfügbar.

Spezies	Stamm	Klasse/Ordnung		MSR-A	MSR-B
Cryptosporidium hominis Cryptosporidium parvum Plasmodium berghei Plasmodium chabaudi Plasmodium falciparum Plasmodium vivax Plasmodium yoelii yoelii Theileria parva	apicomplexa apicomplexa apicomplexa apicomplexa apicomplexa apicomplexa apicomplexa		wgs completed wgs completed wgs wgs completed	no similarity no similarity no similarity no similarity no similarity no similarity no similarity	no similarity no similarity no similarity no similarity no similarity 3,00E-31 no similarity
Dictyostelium discoideum		dictyosteliida	completed	1,00E-36	4,00E-22
Giardia lamblia		diplomonadida	wgs	5,00E-23	7,00E-28
Entamoeba dispar Entamoeba histolytica Entamoeba invadens		entamoebidae entamoebidae entamoebidae	wgs wgs wgs	no similarity no similarity 5,00E-30	no similarity no similarity 3,00E-32
Ajellomyces capsulatus Aspergillus clavatus Aspergillus flavus Aspergillus fumigatus Aspergillus nidulans Aspergillus terreus Botryotinia fuckeliana	ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota	pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina	wgs wgs completed wgs wgs wgs	7,00E-18 1,00E-27 5,00E-28 2,00E-31 5,00E-28 1,00E-32 6,00E-28	4,00E-25 1,00E-23 5,00E-25 1,00E-27 8,00E-25 2,00E-25 4,00E-24
Chaetomium globosum Coccidioides immitis Gibberella moniliformis Gibberella zeae Magnaporthe grisea Neosartorya fischeri	ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota	pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina	wgs wgs wgs wgs wgs wgs	5,00E-27 1,00E-17 2,00E-27 9,00E-19 3,00E-39 2,00E-26	5,00E-20 2,00E-24 3,00E-23 4,00E-22 2,00E-26 1,00E-25
Neurospora crassa Phaeosphaeria nodorum Sclerotinia sclerotiorum Trichoderma reesei Uncinocarpus reesii	ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota	pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina pezizomycotina	wgs wgs wgs wgs wgs	4,00E-26 4,00E-26 2,00E-29 1,00E-25 1,00E-18	1,00E-22 6,00E-20 2,00E-23 3,00E-23 3,00E-26
Ashbya gossypii Candida albicans Candida glabrata Candida tropicalis Clavispora lusitaniae Debaryomyces hansenii Kluyveromyces lactis Kluyveromyces waltii Pichia guilliermondii Saccharomyces bayanus	ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota	saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina	completed completed wgs wgs completed completed wgs wgs wgs wgs	6,00E-25 4,00E-24 5,00E-24 3,00E-16 7,00E-25 9,00E-23 3,00E-21 3,00E-22 4,00E-22 2,00E-20	5,00E-32 2,00E-24 1,00E-28 3,00E-25 9,00E-24 2,00E-29 2,00E-28 4,00E-27 5,00E-24 4,00E-27
Saccharomyces castellii Saccharomyces cerevisiae Saccharomyces kluyveri Saccharomyces kudriavzevii Saccharomyces mikatae Saccharomyces paradoxus Yarrowia lipolytica	ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota ascomycota	saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina saccharomycotina	wgs completed wgs wgs wgs wgs completed	7,00E-19 4,00E-19 2,00E-21 1,00E-20 2,00E-21 5,00E-20 2,00E-33	8,00E-30 7,00E-25 2,00E-25 6,00E-27 5,00E-25 4,00E-27 3,00E-25
Schizosaccharomyces pombe	ascomycota	schizosaccharomy cetes	completed	4,00E-34	3,00E-24
Coprinopsis cinerea okayama Cryptococcus neoformans Phanerochaete chrysosporium Ustilago maydis	basidiomycota basidiomycota basidiomycota basidiomycota		wgs completed wgs wgs	8,00E-21 7,00E-38 9,00E-19 4,00E-31	2,00E-08 4,00E-26 1,00E-18 1,00E-25
Encephalitozoon cuniculi	microsporidia		completed	no similarity	no similarity

Rhizopus oryzae	zygomycota		wgs	not available	not available
Leishmania major		kinetoplastida	completed	8,00E-24	2,00E-15
Trypanosoma brucei		kinetoplastida	completed	4,00E-26	6,00E-14
Trypanosoma cruzi		kinetoplastida (order)	wgs	2,00E-26	5,00E-14
Cyanophora paradoxa		glaucocystophycea e (alaaa)	completed	not available	not available
Thalassiosira pseudonana	bacillariophyta	(Class)	wgs	7,00E-46	1,00E-20
Andre angunti	arthranada	incosto (sloco)		1 00E 22	2 00E 12
Aedes aegypti	arthropoda		wys	1,00E-33	2,00E-13
Anopheles gamblae	anthropoda	insecta (class)	completed	6,00E-22	2,00E-05
Apis mellifera	arthropoda	insecta (class)	completed	3,00E-22	1,00E-35
Bombyx mori	arthropoda	insecta (class)	wgs	8,00E-04	6,00E-10
Drosophila melanogaster	arthropoda	insecta (class)	completed	2,00E-19	2,00E-31
Drosophila persimilis	arthropoda	insecta (class)	wgs	6,00E-06	1,00E-11
Drosophila pseudoobscura	arthropoda	insecta (class)	wgs	4,00E-07	2,00E-30
Drosophila sechellia	arthropoda	insecta (class)	was	1.00E-13	3.00E-11
Drosophila simulans	arthropoda	insecta (class)	was	2.00E-13	2.00E-10
Drosophila vakuba	arthropoda	insecta (class)	was	5 00F-14	1 00F-12
Tribolium castaneum	arthropoda	insecta (class)	completed	7,00E-15	1,00E-09
Bos taurus	chordata	mammalia (class)	was	3.00E-69	3.00E-33
Canis familiaris	chordata	mammalia (class)	was	1.00E-60	2.00E-38
Cavia porcellus	chordata	mammalia (class)	was	6 00F-12	1 00F-07
Dasynus novemcinctus	chordata	mammalia (class)	was	9 00F-12	1 00E-06
Echinons telfairi	chordata	mammalia (class)	was	5 00E-12	5.00E-07
Homo saniens	chordata	mammalia (class)	completed	5,00E-12	5,00E-07
Lovodonta africana	chordata	mammalia (class)	was		2 00 - 07
Macaca mulatta	chordata	mammalia (class)	wgs	9,00E-05	2,00E-07
Manadalahia demostian	chordata		wys	0,00E-09	3,00E-39
	chordata		wys	0,00E-04	2,002-30
	chordata		completed	0,00E-04	5,00E-30
Oryctolagus culliculus	chordata		wgs	1,00E-12	3,00E-07
	chordata		wys	2,00E-00	0,00E-30
Sorex araneus	chordata	mammalia (class) mammalia (class)	wgs was	2,00E-65 1.00E-06	1,00E-40 8.00E-08
Ciona intestinalis	chordata	ascidiacea (class)	wgs	9,00E-05	2,00E-35
Ciona savignyi	chordata	ascidiacea (class)	wgs	9,00E-45	1,00E-32
Danio rerio	chordata	actinopterygii (class)	completed	1,00E-64	7,00E-38
Gallus gallus	chordata	aves (class)	completed	8,00E-60	5,00E-39
Takifugu rubripes	chordata	actinopterygii	wgs	9,00E-14	7,00E-16
Tetraodon nigroviridis	chordata	(class) actinopterygii (class)	wgs	4,00E-15	1,00E-17
Strongylocentrotus purpuratus	echinodermata		wgs	1,00E-06	5,00E-45
Caenorhabditis briggsae	nematoda		WOS	5.00E-14	2.00E-06
Caenorhabditis elegans	nematoda		completed	3.00E-20	2.00E-26
Caenorhabditis remanei	nematoda		wgs	5,00E-35	6,00E-18
			-		
Guillardia theta		cryptophyta (class)		1,00E-32	no similarity
Paramecium tetraurelia	alveolata with	oligohymenophore		2,00E-23	2,00E-23
	apicomplexa	a (class)		,	,
Trichomonas vaginalis	1 P	trichomonada (class)		7,00E-32	2,00E-19