

Morbus Alzheimer-assoziiertes Nervenzelltod und neue molekulare Ansätze der Neuroprotektion

von

Monika Schäfer

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

im Dezember 2002

angefertigt am

Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Selbständige Nachwuchsgruppe Neurodegeneration

bei

Professor Dr. Christian Behl

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit im Rahmen der offiziellen Betreuung durch das Institut selbständig angefertigt habe und mir eine Arbeit gleichen Inhalts gegenwärtig nicht bekannt ist.

München

Die Arbeit wurde am 21. Februar 2003 in der Fakultät für Biologie eingereicht.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. September 2003

Gutachter: PD Dr. Lutz, Prof. Dr. Neuweiler, Prof. Dr. Cremer, Prof. Dr. David

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Pathogenetische Merkmale der Alzheimer Krankheit	3
2.1.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein	4
2.1.2 Die Amyloid β - und die Tau-Hypothese	6
2.1.3 Der Wnt-Signalweg	8
2.1.4 Selektive Neurodegeneration	11
2.2 Oxidativer Stress	12
2.2.1 Amyloid β als Induktor von oxidativem Stress	13
2.2.2 Glutamat als Induktor von oxidativem Stress	14
2.3 Apoptose und Nekrose	15
2.4 Gene im Zusammenhang mit Apoptose und oxidativem Stress	16
2.5 Ziel der Arbeit	17
3 Methoden	19
3.1 Zellkultur	19
3.1.1 Herstellung H_2O_2 -resistenter Zelllinien	19
3.1.2 Herstellung Glutamat-resistenter Zelllinien	20
3.2 Toxizitäts-Tests	20
3.3 Wachstumskurven	20

3.4	Western Blots	21
3.5	RNA-Isolation	21
3.6	RNA-Aufreinigung	22
3.7	Northern Blots / Slot Blots	22
3.7.1	Northern Blotting	22
3.7.2	Slot Blotting	23
3.7.3	Markierung der Sonden	23
3.7.4	Hybridisierung der Northern Blots / Slot Blots	24
3.8	Reverse Transkription	24
3.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.10	Gen Expression Arrays	25
3.11	Differential Display (DD)	26
3.11.1	Reinigung und Reamplifikation von DD-Banden	26
3.11.2	Klonierung	27
3.12	In Situ Hybridisierung	27
3.13	Chip-Hybridisierung	29
3.13.1	Herstellung Cy3- bzw. Cy5-markierter cDNA	29
3.13.2	Aufreinigung der Proben	30
3.13.3	Hybridisierung	30
3.14	Geräte- und Materialliste	31
4	Ergebnisse	34
4.1	Das Zellmodell	34
4.1.1	Morphologie der neuronalen Zellen	34
4.1.2	Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten	36
4.1.3	Selektive Resistenz gegen oxidative Stressoren	38
4.2	Untersuchung aus der Literatur bekannter Alzheimer-assoziiierter Signalwege	42
4.2.1	Glykogen Synthase Kinase-3 β	42
4.2.2	Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	46
4.2.3	Bcl-2 / Bax Familie	47

4.2.4	MAP Kinase	49
4.2.5	PARP	51
4.2.6	Seladin-1	52
4.2.7	Hitzeschock-Proteine	53
4.2.8	Gen Expression Arrays	54
4.3	Suche nach neuen Genen	65
4.3.1	Differential Display	65
4.3.2	Verifizierung der Gene aus dem Differential Display	65
4.3.3	Chip-Hybridisierung	72
4.3.4	Verifizierung der Gene aus der Chip-Hybridisierung	83
4.4	Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse	87
4.5	Zukünftige Versuche	88
5	Diskussion	90
5.1	GSK-3 β	91
5.2	APP	94
5.3	Bcl-2 / Bax-Signalweg	95
5.4	PARP	97
5.5	Seladin-1	98
5.6	Hitzeschock-Proteine	99
5.7	p53 und andere Tumor-assoziierte Signalwege	101
5.8	NF κ B	103
5.9	Differential Display	104
5.10	Chip-Hybridisierung	106
	Literaturverzeichnis	129
	Dank	130
	Lebenslauf	131

Kapitel 1

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Gene und zelluläre Signalwege aufzudecken, die eine Rolle bei dem mit Morbus Alzheimer assoziierten oxidativen Nervenzelltod spielen könnten. Dazu wurden Zelllinien entwickelt, die gegen oxidativen Zelltod resistent sind. Als Modell dienten klonale hippocampale Mausneurone der Zelllinie HT-22. Von dieser Zelllinie wurden Glutamat- und Wasserstoffperoxid-resistente Klone isoliert.

Die Genexpression von Enzymen und Transkriptionsfaktoren in diesen Zellen wurde mit derjenigen der vulnerablen, parentalen Zellen verglichen. Der Vergleich der Genexpression erfolgte durch die Methode des Differential Displays (DD), durch Gen-Expressions Arrays und durch Chip-Hybridisierung. Als Grundlage für den Vergleich der Veränderungen in einigen ausgesuchten Signaltransduktionswegen dienten außerdem Western Blot Analysen.

Für das Enzym Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK- 3β) konnte eine Rolle in der Resistenzvermittlung gegen oxidativen Stress nachgewiesen werden. Es wurde ein erniedrigter Spiegel sowohl der Gesamtmenge als auch der aktiven Form dieser Kinase in den gegen oxidativen Stress resistenten Neuronen beobachtet. Die Inhibition von GSK- 3β in nicht resistenten Zellen führte zu einer erhöhten Toleranz gegen die oxidativen Stressoren Glutamat und Wasserstoffperoxid.

Auch die sekretierte Menge an dem als protektiv wirkend beschriebenen sAPP α war bei den resistenten Neuronen größer als bei den nicht resistenten Neuronen und könnte folglich zu dem Resistenzverhalten der Zellen beitragen.

Passend zu diesen Beobachtungen wurde ein erhöhter Spiegel von phosphorylierter MAP-Kinase (MAPK) in den resistenten Neuronen gefunden. MAPK ist ein Enzym, das sowohl zu einer verstärkten Sekretion von sAPP α führen als auch GSK-3 β durch Phosphorylierung an einem Serin-Rest inhibieren kann.

Weitere Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Neuronen wurden in der Expression der Bcl2/Bax Genfamilie sowie einigen Tumor-assoziierten Genen wie z.B. p53 und Gadd45 nachgewiesen. Diese Gene wurden in den Glutamat-resistenten Zellen schwächer exprimiert als in den nicht resistenten Zellen.

DD Untersuchungen ergaben eine erniedrigte Expression für das Gen des 26S Proteasoms sowie für das Gen „Mus musculus adult male cerebellum cDNA, RIKEN“ (AMC) in Glutamat-resistenten im Vergleich zu nicht resistenten Zellen. Die Expression dieser Gene wurde auch im Gehirn von Mäusen überprüft, wobei dem Hippokampus besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde, da dieser bei Alzheimer Patienten eine starke Neurodegeneration aufweist. Die für oxidativen Stress sensitiven Hippokampus-Neurone zeigten eine besonders starke Expression sowohl des Proteasom-Gens als auch des AMC-Gens.

Insgesamt wurden viele Gene und Signalwege im Hinblick auf Unterschiede zwischen gegen oxidativen Stress resistenten und nicht resistenten Neuronen untersucht. Einige der festgestellten Unterschiede, wie z.B. die verringerte Aktivität von GSK-3 β in den resistenten Neuronen, könnten eventuell in Zukunft als Ansatzpunkte für neuroprotektive Wirkstoffe genutzt werden.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Pathogenetische Merkmale der Alzheimer Krankheit

Vor allem durch die Fortschritte in der Medizin haben die Menschen heute eine höhere Lebenserwartung als in den vergangenen Jahrhunderten. Mit fortschreitendem Alter erlangen daher auch Krankheiten Bedeutung, die früher eine geringe Rolle gespielt haben. Morbus Alzheimer ist wohl eine der bekanntesten vornehmlich altersbedingten Erkrankungen.

Bei Morbus Alzheimer handelt es sich um eine neurodegenerative Krankheit, die bei den Patienten zu einer fortschreitenden Demenz führt. Pathologisch zeichnet sie sich durch drei Hauptveränderungen im Gehirn aus: 1. Verlust von Neuronen, 2. Ablagerungen im Gehirn, sogenannten senilen Plaques, deren Hauptbestandteil aggregiertes Amyloid β -Peptid ($A\beta$) ist und 3. intrazelluläre Fibrillenbündel (neurofibrilläre „Tangles“) in degenerierenden Neuronen (Alzheimer, 1907; Terry et al., 1994).

Die meisten Fälle von Morbus Alzheimer treten sporadisch auf, wobei das Alter den größten bislang entdeckten Risikofaktor darstellt. Nur etwa 5% der Alzheimer Erkrankungen sind autosomal dominant vererbt und zeichnen sich dadurch aus, dass sie Mutationen in Genen aufweisen, die alle zu einer qualitativen oder quantitativen Veränderung der $A\beta$ -Produktion führen. Bislang wurden Mutationen im Gen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP für „Amyloid Pre-cursor Protein“) und in den beiden Presenilin-Genen (PS1 und PS2) gefunden (Hardy, 1996; s. auch Abschnitt 2.1.1).

Die Frage, welche Ereignisse im Alzheimer-Gehirn den Zelltod auslösen, ist noch nicht endgültig geklärt. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass die Entstehung von oxidativem Stress im Verlauf der Krankheit zum Absterben der Neurone beiträgt. Die Neurodegeneration als solche erfolgt über Apoptose (programmierten Zelltod) bzw. Nekrose (passiven Zelltod)(s. Abschnitt 2.3).

2.1.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein

APP ist ein Typ-I Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Region (s. Abbildung 2.1A). Es gehört zur Familie der Glykoproteine und wird ubiquitär in vielen Zelltypen exprimiert. Der N-Terminus dieses Moleküls ist in den extrazellulären Raum bzw. in das Lumen intrazellulärer Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparates gerichtet (Neve et al., 2000). Der C-Terminus liegt im Zytoplasma (Kang et al., 1987). Die Funktionen von APP *in vivo* sind bislang weitgehend unbekannt. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass es in pro- und antiapoptotische Zellvorgänge involviert ist (Yamatsuji et al., 1996; Wolozin et al., 1996; Xu et al., 1999). Die Struktur des Moleküls legt nahe, dass es sich um einen Rezeptor oder einen Wachstumsfaktor handeln könnte (Rossjohn et al., 1999).

APP kann durch drei verschiedene Sekretasen prozessiert werden: die α -, β - und γ -Sekretase (De Strooper und Annaert, 2000)(s. Abbildung 2.1B). Die α -Sekretase ist eine Disintegrin-Metalloprotease (Schlondorf und Blobel, 1999). Sie schneidet APP inmitten der $A\beta$ Region und verhindert somit eine mögliche Entstehung von $A\beta$. Es kommt zur Freisetzung eines 100 - 120 kDa großen Teils der extrazellulären Domäne des APPs. Der 83 Aminosäuren lange C-Terminus bleibt zurück. Die freigesetzte extrazelluläre Domäne wird als $sAPP\alpha$ bezeichnet und ihr werden neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (De Strooper und Annaert, 2000).

Durch die Prozessierung von APP durch die β - und γ -Sekretasen entsteht das Amyloid β -Peptid, das ein Hauptbestandteil der für Morbus Alzheimer typischen Ablagerungen im Gehirn ist (Vassar und Citron, 2000).

Die β -Sekretase ist eine membrangebundene Aspartyl-Protease. Sie schneidet APP in der extrazellulären Domäne, am N-terminalen Ende von $A\beta$, so dass ein 99 Aminosäuren langer C-

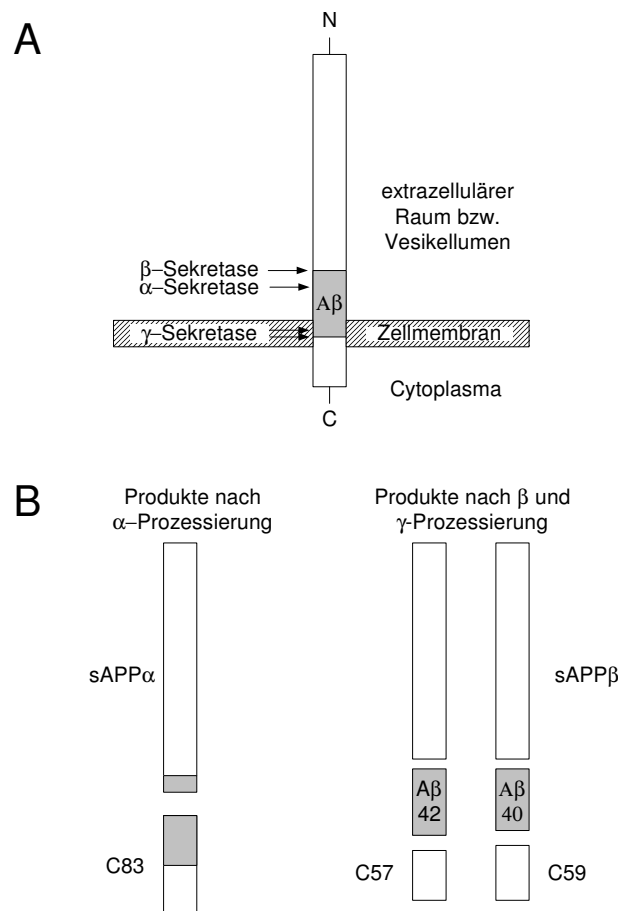


Abbildung 2.1: APP und seine Prozessierung. A: Das Transmembranprotein APP kann durch drei verschiedene Sekretasen, α -, β - und γ -Sekretase, prozessiert werden. B: Durch die α -Prozessierung entsteht das vermutlich neuroprotektive sAPP α . Durch β - und γ -Prozessierung entstehen die toxischen Produkte A β 40 bzw. A β 42

Terminus des APP zurückbleibt.

Die γ -Sekretase spaltet den nach α - bzw. β -Sekretase Prozessierung verbliebenen C-Terminus des APP (Esler und Wolfe, 2001). Die Spaltung erfolgt innerhalb der Membran am C-terminalen Ende von A β (Steiner und Haass, 2000). Es gibt mindestens zwei mögliche Schnittstellen der γ -Sekretase, die nach der vorangegangenen β -Spaltung die Bildung von A β 40 oder A β 42 bewirkt. Die Funktion der γ -Sekretase ist abhängig von der Funktion der Preseniline 1 und 2 (PS1 und PS2). PS1 und PS2 sind Proteine mit multiplen transmembranen Domänen, die hauptsächlich in intrazellulären Membranen (z.B. des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates) lokalisiert sind (Haass, 1997; Kovacs et al., 1996). Kulturen aus Mäuseembryonen, die

kein PS1 und PS2 aufweisen, bilden auch kein $A\beta$ (Herreman et al., 2000). Es wird diskutiert, ob die Preseniline selbst γ -Sekretase Funktion besitzen (Esler und Wolfe, 2001). Bei genetisch bedingten Fällen von Morbus Alzheimer konnten Mutationen in den Presenilin-Genen nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten $A\beta$ -Produktion führen (Scheuner et al., 1996; Hwang et al., 2002; Flood et al., 2002; Shizuka-Ikeda et al., 2002).

2.1.2 Die Amyloid β - und die Tau-Hypothese

Obwohl der pathologische Befund von Morbus Alzheimer mit seinen Amyloid Plaques und den Neurofibrillenbündeln schon vor fast 100 Jahren beschrieben wurde, ist bis heute noch nicht geklärt, welche Vorgänge dieses Krankheitsbild auslösen. Zwar gibt es Fälle von genetisch bedingtem Morbus Alzheimer, die mit Mutationen im PS1-, PS2- oder APP-Gen einhergehen, aber die weitaus häufigere, sporadische Form der Krankheit konnte man jedoch bislang nicht mit klar definierten Auslösern in Verbindung bringen. Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt, um eine Erklärung für das Entstehen des pathologischen Befundes zu geben. Die beiden bekanntesten Hypothesen sind die Amyloid β - und die Tau-Hypothese.

Die Anhänger der Amyloid β -Hypothese vertreten die Ansicht, dass eine Veränderung in der APP-Prozessierung der Auslöser für das Krankheitsbild ist (Hardy und Higgins, 1992). Diese Veränderung führt zu einer verstärkten Produktion von $A\beta_{42}$, welches aggregiert und so den Kern der entstehenden Plaques bildet. Außerdem bedingt dieses $A\beta_{42}$ auch alle weiteren Ereignisse im Krankheitsverlauf, wie die Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins, die zur Bildung der Neurofibrillen führt, die Neurodegeneration und schließlich die Demenz (Mudher und Lovestone, 2002). Obwohl offen bleibt, wie genau $A\beta_{42}$ diese Kaskade auslöst, gibt es einige Hinweise, die diese Hypothese unterstützen. Zum einen sind Mutationen in APP oder Presenilin-Genen eine der Ursachen für genetisch bedingte Alzheimer-Fälle. In Fibroblasten dieser Patienten sowie in Tiermodellen mit entsprechenden Mutationen findet man in der Tat einen erhöhten $A\beta_{42}$ -Spiegel (Suzuki et al., 1994; Tamaoka et al., 1994; Citron et al., 1994). Dies unterstützt die Annahme, dass die verstärkte Produktion von $A\beta_{42}$ ein frühes Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Zum anderen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden,

dass $A\beta$ eine neurotoxische Wirkung auf Zellkulturen hat und unter einigen Bedingungen *in vitro* die Phosphorylierung des Tau-Proteins bewirken kann (Takashima et al., 1998a; Alvarez et al., 1999a).

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

Die Tau-Hypothese sieht das entscheidende Ereignis im Krankheitsverlauf daher in der Bildung der Fibrillenbündel und der damit verbundenen Zerstörung des Cytoskeletts. Die Fibrillen bestehen aus dem mit den Mikrotubuli assoziierten Protein Tau. Es wird angenommen, dass die Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli das Cytoskelett der Zelle stabilisiert. Im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung wird Tau jedoch hyperphosphoryliert, verliert dadurch seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und bildet stattdessen filamentförmige Aggregate im Zellkörper. Das Cytoskelett bricht letztendlich durch die fehlende Stabilisierung des Tau-Proteins zusammen (Lovestone et al., 1996).

Zu Gunsten dieser Hypothese spricht die Tatsache, dass die Fibrillenbündel in degenerierenden Neuronen vorzufinden sind, was ein Indiz dafür sein könnte, dass sie zum Tod dieser Neuronen beitragen. In späten Krankheitsstadien findet man auch extrazelluläre Fibrillenbündel. Außerdem beginnt die Formation von Fibrillen in Gehirnarealen, die eine Rolle beim Gedächtnis spielen (Braak und Braak, 1998; Braak et al., 1994) und konnte gut mit dem kognitiven Zustand der Patienten korreliert werden (Nagy et al., 1995).

Allerdings fanden Naslund und seine Kollegen auch eine Korrelation zwischen der Akkumula-

tion von Amyloid und dem kognitiven Zustand der Patienten (Naslund et al., 2000).

Da Mutationen im Gen, das für das Tau-Protein kodiert, zwar zur Formation von Fibrillenbündeln führen, nicht aber zur Bildung von Amyloid-Plaques, während Mutationen in APP-, PS1- oder PS2-Genen jedoch beide Pathologien hervorrufen können, scheint es fast sicher, dass die Amyloid Aggregation das frühere Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Die Bildung der Fibrillenbündel scheint eher eine Folge der Amyloid-Plaques Bildung zu sein. Mutationen im Gen des Tau-Proteins sind jedoch ausreichend, um eine Demenz zu verursachen.

Neuere Studien bringen die Amyloid- und die Tau-Hypothese etwas näher zusammen. Beobachtungen an transgenen Mäusen, die sowohl mutiertes Tau-Protein als auch mutiertes APP überexprimieren, zeigen, dass die Amyloid- und Tau-Pathologien miteinander in Verbindung stehen. Im Gegensatz zu den Mäusen, die nur die Tau-Mutation besitzen, weisen die Doppelmutanten grundsätzlich mehr Fibrillenbündel auf. Außerdem finden sich bei den Doppelmutanten Fibrillen in Hirnarealen, die bei den reinen Tau-Mutanten nicht betroffen sind (Lewis et al., 2001). Eine weitere interessante Beobachtung machten Götz und Kollegen an reinen Tau-Mutanten: Durch Injektion von Amyloid β ins Gehirn dieser Mäuse wurde eine verstärkte Fibrillen-Formation in Gehirnarealen hervorgerufen, von denen die Neuronen zur Injektionsstelle projizieren. Dieser Effekt von Amyloid konnte jedoch nur bei Mäusen mit Tau-Mutation beobachtet werden. Bei Mäusen, die das Wildtyp Tau-Protein überexprimieren, löste die Amyloid-Injektion keine Fibrillen-Formation aus (Götz et al., 2001). Die Gegenwart von Amyloid allein ist demnach *in vivo* nicht ausreichend, um die Fibrillen-Pathologie auszulösen. Dass die Amyloid- und Tau-Pathologien miteinander in Verbindung stehen, konnte also gezeigt werden. Worin genau die Verbindung liegt, ist jedoch noch unklar. Möglicherweise könnte der Wnt-Signalweg diese fehlende Verbindung darstellen (s. Abschnitt 2.1.3).

2.1.3 Der Wnt-Signalweg

Der Name Wnt ist eine Verschmelzung aus den Namen der Gene „Int-1“ der Maus (mittlerweile Wnt-1 genannt) und „Wingless“ in *Drosophila* (Nusse et al., 1991). Der Wnt-Signalweg ist ein wichtiger Signalweg in der neuronalen Entwicklung (Wodarz und Nusse, 1998), aber auch im

adulten Gehirn werden die zugehörigen Proteine exprimiert.

Im Verlauf des Wnt-Signalwegs binden extrazelluläre Liganden an membrangebundene Rezeptoren der frizzled (Fzd) Proteinfamilie, welche zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Das Signal wird von dort durch Aktivierung des Proteins Dishevelled (Dvl) in die Zelle weitergeleitet. Dvl inaktiviert die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK 3 β) durch Bildung von Multiproteinkomplexen, die auch Adenomatous polyposis coli (APC)-, Axin- und β -Catenin-Proteine einschließen. Die GSK-3 β -Inaktivierung führt zur Stabilisierung und Anreicherung von β -Catenin in der Zelle, welches an die Transkriptionsfaktoren Tcf (T-cell factor) und LEF (lymphoid enhancer factor) bindet. Die β -Catenin/Tcf/LEF-Komplexe aktivieren dann die Wnt-Zielgene (s. Abb 2.2 links). In Abwesenheit der Wnt-Liganden phosphoryliert aktives GSK-3 β β -Catenin und markiert es so für die Ubiquitin-Proteasom vermittelte Degradierung. Dadurch sinkt der β -Catenin Spiegel in der Zelle und die Wnt-Zielgene werden nicht exprimiert (Aberle et al., 1997; Yost et al., 1996) (s. Abb 2.2 rechts).

Es gibt einige Hinweise, die darauf hindeuten, dass eine Verbindung zwischen Wnt-Signalweg und Alzheimer-Pathologie besteht (De Ferrari und Inestrosa, 2000). Zwei Proteine des Wnt-Signalweges können mit dem mit Morbus Alzheimer in Verbindung stehenden PS1 interagieren: β -Catenin und GSK-3 β . Komplexe aus PS1 und β -Catenin erhöhen die Stabilität des β -Catenins. PS1-Mutationen bei familiärem Morbus Alzheimer destabilisieren β -Catenin, was zur Induktion von Apoptose beitragen könnte, indem antiapoptotisch wirkende Wnt-Zielgene nicht mehr abgelesen werden.

Die Interaktion von PS1 mit GSK-3 β könnte möglicherweise von noch größerer Bedeutung sein. Es könnte sich dabei um die fehlende Verbindung zwischen der Amyloid-Plaques- und der Fibrillenbündel-Bildung im Alzheimer-Gehirn handeln (s. Abbildung 2.3). GSK-3 β kann nämlich neben PS1, das mit der APP-Prozessierung und somit der Amyloid-Plaques-Bildung in Verbindung steht, auch das Tau-Protein binden. Hyperphosphoryliertes Tau-Protein bildet die Fibrillenbündel im Alzheimer Gehirn. GSK-3 β ist in der Lage, Tau-Protein zu phosphorylieren (Zheng-Fischhofer et al., 1998). Wird GSK-3 β inhibiert, so wird auch die Alzheimer-typische

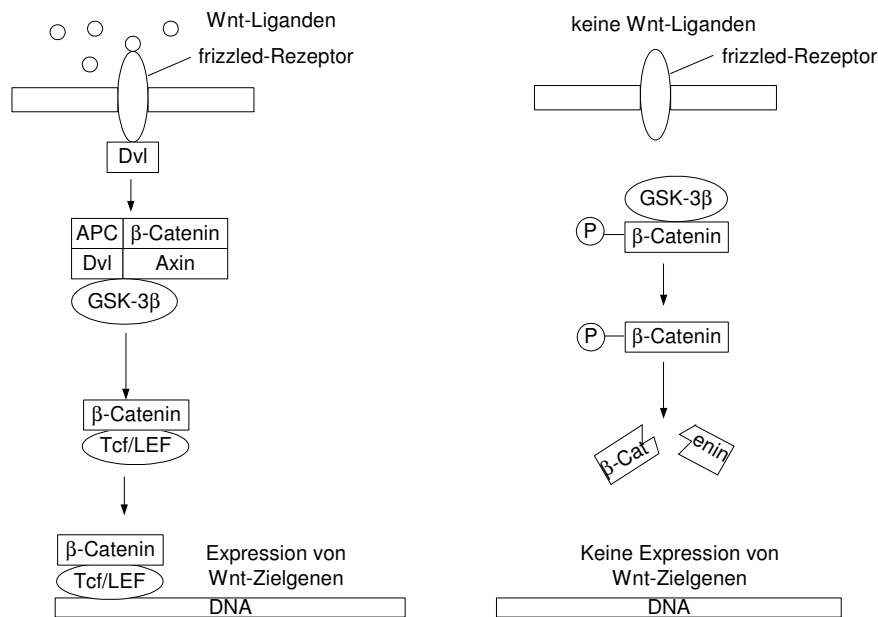


Abbildung 2.2: Der Wnt-Signalweg. Links: Wnt-Liganden binden an Rezeptoren der frizzled Familie, von wo das Signal über das Protein Dishevelled (Dvl) in die Zelle weitergeleitet wird. Im Zytoplasma bildet Dvl zusammen mit APC, β -Catenin und Axin einen Komplex, der das Enzym GSK-3 β inhibiert. Die Inaktivierung von GSK-3 β resultiert in der Stabilisierung und Anreicherung von β -Catenin in der Zelle. Die Bindung von β -Catenin an die Transkriptionsfaktoren Tcf und LEF ermöglicht die Einleitung der Transkription von Wnt-Zielgenen. Rechts: In Abwesenheit von Wnt-Liganden ist GSK-3 β aktiv und phosphoryliert β -Catenin, was zu dessen Abbau führt. Die Transkription von Wnt-Zielgenen wird nicht eingeleitet.

Hyperphosphorylierung von Tau verhindert (Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997). Der Komplex aus PS1 und GSK-3 β könnte nun möglicherweise als Regulator für die Interaktion von GSK-3 β mit Tau fungieren. Mutationen im PS1-Gen, die Alzheimer hervorrufen, verstärken die Fähigkeit von PS1 an GSK-3 β zu binden. Die verstärkte Assoziation von PS1 und GSK-3 β könnte dazu führen, dass die Phosphorylierung von Tau-Protein durch GSK-3 β zunimmt (Takashima et al., 1998b). Falls sich diese Hypothese erhärtet, wäre der Verbindungspunkt der beiden Alzheimer-Pathologien, Amyloid-Aggregation und Neurofibrillen-Formation, gefunden.

Es gibt jedoch noch weitere Berührungspunkte zwischen dem Wnt-Signalweg und Morbus Alzheimer. Das von Wnt-Liganden über Fzd-Rezeptoren aktivierte Dvl aktiviert seinerseits die Jun-N-terminale Kinase (JNK) (Boutros et al., 1998; L. Li et al., 1999). JNK kann wiederum Tau phosphorylieren (Reynolds et al., 1997) und reguliert das Tumorsuppressorprotein p53 (Fuchs

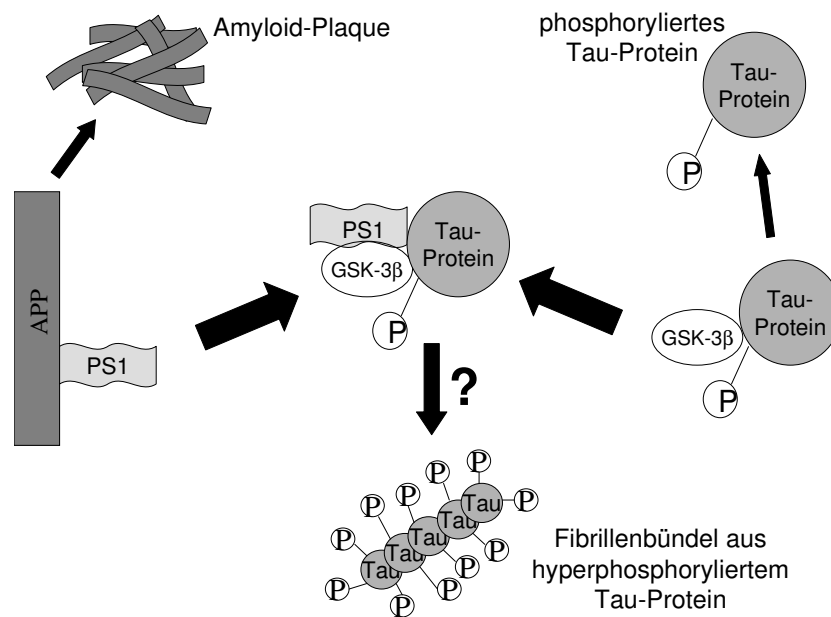


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Hypothese, wie die beiden Alzheimer Pathologien, Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündel, durch die Komplexbildung von PS1, GSK-3 β und Tau-Protein miteinander in Verbindung stehen könnten. PS1 spielt eine Rolle bei der Prozessierung von APP, welche zur Bildung der Amyloid-Plaques führt. GSK-3 β kann Tau-Protein phosphorylieren. Die Assoziation von PS1 mit GSK-3 β könnte zu einer verstärkten Phosphorylierung von Tau-Protein führen, wodurch die Bildung der Neurofibrillenbündel initiiert würde.

et al., 1998) und den Transkriptionsfaktor c-Jun (Ip und Davis, 1998). Tatsächlich findet man in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine Veränderung in c-Jun- und p53-Spiegeln (MacGibbon et al., 1997; Marcus et al., 1998; Kitamura et al., 1997). Von p53 ist bekannt, dass es die Expression von PS1 negativ beeinflusst, was zur Induktion von Apoptose führt (Roperch et al., 1998).

Viele Hinweise sprechen also dafür, dass der Wnt-Signalweg oder zumindest einige seiner Komponenten einen Einfluss auf die Alzheimer Pathologie haben könnten.

2.1.4 Selektive Neurodegeneration

Obwohl A β -Ablagerungen fast überall im Alzheimer-Gehirn in vergleichbarer Menge gefunden werden, weisen verschiedene Gehirnareale ein unterschiedliches Ausmaß an Neurodegeneration auf. Man spricht daher auch von selektivem Zelltod bzw. selektiver Resistenz. Besonders vom Zelltod betroffen sind die graue Substanz des Neocortex, der Hippocampus und die Amyg-

dala (Gomez-Isla et al., 1997). Im Cerebellum dagegen findet man fast keine degenerierten Neurone. Es scheint also ein natürliches Schutzprogramm gegen den Morbus Alzheimer bedingten Zelltod zu geben. Die Identifizierung solch schützender Signalwege könnte den Grundstein zur Entwicklung von Präventions- und Heilungsmitteln gegen diese Krankheit bilden. Ein Schwerpunkt der Alzheimer-Forschung gilt daher der Beantwortung der Frage, wie es kommt, dass einige Zellen im Gehirn der Patienten absterben und andere nicht.

In Versuchen mit der $A\beta$ - und somit Oxidations-resistenten Zelllinie PC12RC18 wurde z.B. entdeckt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B im Vergleich zu den vulnerablen parentalen PC12-Zellen überexprimiert ist (F. Lezoualc'h et al., 1998). In der Arbeit von Li und Kollegen wurden Komponenten des endosomalen-lysosomalen Systems gefunden, die in $A\beta$ -resistenten Zellen verstärkt gebildet werden (Y. Li et al., 1999) und Greeve und Kollegen fanden heraus, dass Seladin-1, eine Oxidoreduktase, zur Resistenz gegen die $A\beta$ -Toxizität beiträgt (Greeve et al., 2000). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass das Abwehrprogramm gegen den Alzheimer assoziierten oxidativen Zelltod eine genetische Grundlage hat und durch gewisse Signaltransduktionswege aufgerufen werden kann. Gene, die in eindeutigem Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit stehen, sind nur unvollständig bekannt. Zum Verständnis der Krankheit ist es erforderlich, weitere dieser Gene aufzudecken. Der Vergleich von resistenten und nicht resistenten Zellklonen ist dabei eine häufig verwendete Methode.

2.2 Oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress versteht man die Akkumulation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen, Stickstoffmonoxid und Hyperperoxydradikalen. Diese Verbindungen können die Zelle durch ihre extreme Reaktionsbereitschaft schädigen. Es kommt zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen vor allem während der mitochondrialen Atmung (auch oxidative Phosphorylierung genannt), aber auch durch die Aktivität verschiedener Oxidasen (z.B. Flavin-haltige Oxidasen) und Oxygenasen (z.B. Lipooxygenasen). In gesunden Zellen werden diese reaktiven Sauerstoffspezies durch Enzyme, wie z. B. die Superoxid-Dismutase, Katalase und Peroxidase,

in unschädliche Verbindungen umgewandelt. Von oxidativem Stress spricht man, wenn zwischen Auf- und Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies ein Ungleichgewicht eintritt, so dass die reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle akkumulieren. Das kann durch die Gabe von Toxinen, aber auch durch intrazelluläre Störungen, die beispielsweise durch Gendefekte hervorgerufen werden, verursacht werden.

Das Zentralnervensystem (ZNS) ist besonders anfällig für Störungen des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, da es einen sehr hohen Sauerstoffumsatz und einen hohen Gehalt an peroxidierbaren, ungesättigten Kohlenwasserstoffen hat. Zudem sind einige Hirnareale reich an Eisen und Kupfer (Riederer et al., 1989). Diese Metalle können die Generierung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid oder Superoxid über die Fenton-Reaktion bewirken. Viele neurodegenerative Krankheiten, wie z.B. Morbus Parkinson, Schlaganfall, amyotrophe laterale Sklerose, die Creutzfeld-Jakob Krankheit und nicht zuletzt Morbus Alzheimer, werden mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Jenner und Olanow, 1996; Dirnagl et al., 1995; Cookson und Shaw, 1999; Kim et al., 2001; Butterfield und Kanski, 2001). Es besteht möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und dem Absterben der Zellen im Verlauf dieser Krankheiten.

2.2.1 Amyloid β als Induktor von oxidativem Stress

Unterschiedliche Proteine, die im post mortem Gewebe von Alzheimer Patienten gefunden werden, können oxidative Ereignisse bewirken. Ein wichtiges dieser Proteine ist das A β -Peptid. Die Erkenntnisse, dass die A β -Gabe zur Aktivierung des durch oxidativen Stress regulierten Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, und dass eine Vorinkubation mit dem freien Radikalfänger Vitamin E neuronale Zellen vor der A β -Toxizität schützt, sind Indizien dafür, dass A β oxidativen Stress verursacht.

Ein direkter Hinweis wurde 1994 von Behl und Kollegen gefunden, die zeigen konnten, dass es in Nervenzellen, die in Anwesenheit von fibrillärem A β kultiviert wurden, zur Akkumulation von Wasserstoffperoxid und Lipidperoxiden kommt. Dies führt zur Peroxidation von Membranlipiden und schließlich zur Lyse der Zellmembran (Behl et al., 1994; Behl, 1997).

Die direkte Korrelation der durch A β induzierten reaktiven Sauerstoffspezies und der Neuro-

toxizität der A β -Fibrillen unterstützt die Annahme, dass oxidativer Stress in kausalem Zusammenhang mit dem Zelltod bei Morbus Alzheimer steht.

In neueren Arbeiten wurden deutliche Hinweise dafür gefunden, dass oxidativer Stress ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der Alzheimer Krankheit ist, da er bereits auftritt, bevor die A β -Fibrillen zu Plaques aggregieren (Pratico et al., 2001).

2.2.2 Glutamat als Induktor von oxidativem Stress

Dem Neurotransmitter Glutamat wird eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben, wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Huntington und auch Morbus Alzheimer. Glutamat kann, wenn es in pathologisch erhöhten Konzentrationen vorliegt, oxidativen Stress auslösen. Dies kann über einen rezeptorvermittelten oder einen rezeptorunabhängigen Signalweg geschehen.

Im ersten Fall bindet Glutamat an postsynaptische NMDA und nicht-NMDA Rezeptoren. Diese Bindung bewirkt einen Ca²⁺- und Na⁺-Einstrom in die Zelle. Die Ca²⁺-Ionen greifen störend in die Elektronentransportkette der Mitochondrien ein. Dies hat zur Folge, dass weniger ADP zu ATP umgesetzt werden kann. Da die Zelle jedoch auf ATP als Energieträger angewiesen ist, wird der Elektronentransport in den Mitochondrien verstärkt, wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Der Effekt wird durch die erhöhte Konzentration an Na⁺-Ionen verstärkt: Um Na⁺ über die Na⁺/K⁺ ATPase aus der Zelle zu pumpen, wird ATP benötigt. Durch den Eingriff der Ca²⁺-Ionen in die Elektronentransportkette der Mitochondrien ist der ATP-Spiegel jedoch erniedrigt. Der ATP-Bedarf kurbelt den Elektronentransport in den Mitochondrien zusätzlich an, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies entstehen.

Bei Zellen, die keine Glutamatrezeptoren besitzen (wie z.B. den in dieser Studie verwendeten HT-22 Zellen) kehrt eine hohe Glutamatkonzentration die Richtung des Cystin/Glutamat-Antiporters um. Glutamat gelangt dann in die Zelle, während Cystin hinaus transportiert wird. Cystin ist jedoch notwendig für die Bildung von Glutathion, eines zentralen Antioxidans der Zelle. Folglich bewirkt Glutamat eine Verarmung der Zelle an Glutathion, wodurch es der Zelle an einem wichtigen Antioxidans zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies mangelt. Die reaktiven Sauerstoffspezies akkumulieren und oxidativer Stress entsteht. Die endgültige Folge dieses

oxidativen Stresses ist der Zelltod durch Nekrose oder Apoptose.

2.3 Apoptose und Nekrose

Traditionell unterscheidet man zwei Formen des Zelltods: Apoptose und Nekrose. Den passiven Vorgang der Nekrose unterlaufen Zellen in Folge von akuten Verletzungen oder Vergiftungen. In ihrem Verlauf schwellen die Zellen soweit an, bis sie schließlich platzen. Dabei wird der Inhalt des Zytoplasmas in den extrazellulären Raum freigesetzt und löst eine Entzündungsreaktion aus.

Apoptose dagegen löst keine Entzündungsreaktion im Gewebe aus. Der Begriff Apoptose wurde erstmals von John Kerr und seinen Kollegen 1972 zur Beschreibung morphologischer Veränderungen unter anderem an Krebszellen verwendet (Kerr et al., 1972). Unter Apoptose versteht man den von Genen regulierten (programmierten) Zelltod, in dessen Verlauf die Zelle und ihr Nukleus schrumpfen, sich verdichten und schließlich in membrangebundene Kompartimente zerfallen. Die Zelle verändert dabei ihre Oberflächenchemie, so dass sie von Makrophagen oder anderen benachbarten Zellen erkannt und phagozytiert wird. Das erste morphologische Anzeichen der Apoptose findet sich im Nukleus. Das Chromatin kondensiert und aggregiert am Rande des Nukleus. Die DNA wird zunächst in große (50 kb), später in kleinere (Vielfache von 180 bp) Fragmente zerlegt. Die Fragmentgröße ergibt sich aus der Chromatinstruktur: Ein DNA-Fragment von 180 bp entspricht der DNA-Menge, die um einen Histonkomplex gewickelt ist. Als mögliche Endonukleasen, die die Fragmentierung der DNA bewirken, werden z.B. DNase I, DNase II und Nuc 18 diskutiert (Barry und Eastman, 1993; Peitsch et al., 1993; Montague et al., 1994; Torriglia et al., 1995).

Apoptose tritt im Gegensatz zur Nekrose nicht nur im Fall von Erkrankung oder Verletzung des Gewebes auf, sondern ist auch Teil der Entwicklung, z.B. der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) (Weller et al., 1997; Monk et al., 2001). Apoptose ist dabei der Mechanismus, durch den Neurone, die keine funktionierenden Synapsen ausbilden, eliminiert werden.

Während traditionell angenommen wurde, dass der Zelltod bei Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Krankheiten entweder ausschließlich durch Apoptose oder Nekrose her-

vorgerufen wird, geht man heute davon aus, dass beide Formen des Zelltods dabei eine Rolle spielen. Tatsächlich ist die Unterscheidung zwischen den beiden Formen des Zelluntergangs nicht trivial. Es konnten Zellen mit den morphologischen Anzeichen der Nekrose beobachtet werden, die die biochemischen Anzeichen der Apoptose aufwiesen (Portera-Cailliau et al., 1995). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ein und derselbe Auslöser sowohl zum Zelltod durch Apoptose als auch durch Nekrose führen kann (Bonfoco et al., 1995; Ankarcona et al., 1995). Für diese Beobachtungen sind mehrere Erklärungen denkbar, die sich von dem traditionellen Bild der beiden sich ausschließenden Formen des Zelltods entfernen. Es wäre z.B. denkbar, dass Apoptose und Nekrose nur die Extreme eines Kontinuums sind, das die Reaktionen von Zellen auf zytotoxische Reize darstellt. In diesem Kontinuum wären alle Zwischenformen zwischen Apoptose und Nekrose vertreten. Ein alternativer Erklärungsversuch ist, dass Apoptose und Nekrose zwar unterschiedliche Formen des Zelltods sind, es jedoch einen begrenzten Schnittbereich gibt, der Charakteristika beider Formen aufweist.

2.4 Gene im Zusammenhang mit Apoptose und oxidativem Stress

Einer wachsenden Anzahl von Genen wird eine Bedeutung bei der Regulation von durch oxidativen Stress hervorgerufener Apoptose zugeschrieben, wie sie bei Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen auftritt.

Zu diesen Genen zählt beispielsweise die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK 3 β), die im Verlauf einiger antiapoptotisch wirkender Signalwege, wie dem PI 3-Kinase / Akt-Signalweg und dem Wnt-Signalweg, inhibiert wird (Pap und Cooper, 1998; Crowder und Freeman, 2000; Hetman et al., 2000; s. auch Abschnitt 2.1.3). Dementsprechend wurde für die Aktivierung von GSK-3 β eine Funktion in der Vermittlung von Apoptose angenommen und auch nachgewiesen (Pap und Cooper, 1998; Hetman et al., 2000). Auch der nukleare Faktor κ B (NF κ B) ist im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer-assoziiertem Nervenzelltod von besonderem Interesse, da die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors durch oxidativen Stress induziert werden kann (Schreck et al., 1991). Weiterhin sind die Mitglieder der Bcl-2 / Bax Familie zu nen-

nen, die Apoptose über die Kontrolle der mitochondrialen Permeabilität und die Freisetzung von Cytochrom C regulieren (Shimizu et al., 1999) sowie die Caspasen, eine Gruppe von Proteasen, welche die Aufgabe der Exekutive beim Vorgang der Apoptose innehalten. Ein weiteres mit Apoptose in Verbindung gebrachtes Gen ist das Gen des Tumor Suppressor Proteins p53 (Yonish-Rouach et al., 1991; Shaw et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass p53 eine Rolle bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen spielt, darunter auch Morbus Alzheimer (de la Monte et al., 1997). Auch das Enzym Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist in die Regulation zellulärer Prozesse involviert, die den Zelltod einschließen (Sims et al., 1983; Lindahl et al., 1995). Berger veröffentlichte 1985 die Hypothese, dass PARP als Verbindungsglied zwischen starker DNA-Schädigung und dem Zelltod fungieren könnte. Ein erst kürzlich im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer entdecktes Gen ist Seladin-1. Seladin-1 ist in solchen Regionen des Gehirns schwächer reguliert, die bei der Alzheimer Krankheit degenerieren. Umgekehrt weisen Zellen, die gegen $A\beta$ -Toxizität resistent sind, einen etwa dreifach erhöhten Spiegel an Seladin-1-mRNA und Protein auf (Greeve et al., 2000; Iivonen et al., 2002). Schon längere Zeit sind die Hitzeschock-Proteine (Hsp) bekannt. Die Hsp werden als Reaktion der Zelle auf Stress, z.B. oxidativen Stress, gebildet. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Chaperone, die dazu beitragen, dass Proteine ihre funktionale Konfiguration erhalten bzw. wiedererhalten, falls sie diese aufgrund von Stress verloren haben (Hartl und Martin, 1995).

Diese Aufzählung möglicher Apoptose-Regulatoren im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer könnte noch lange fortgesetzt werden. Alle in diesem Abschnitt erwähnten Gene stellen interessante Untersuchungsobjekte für die in dieser Studie behandelte Fragestellung dar.

2.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Gene und zelluläre Signalwege aufzudecken, die eine Rolle bei dem mit Morbus Alzheimer assoziierten oxidativen Nervenzelltod spielen könnten. Zu diesem Zweck sollte die Gen- und Proteinexpression von gegen oxidativen Stress resistenten Neuronen mit der von sensitiven Neuronen verglichen werden. Als Modell dienten hippokampale Mausneurone der Zelllinie HT-22. Von diesen gegen oxidative Schädigungen anfälligen Zellen

wurden durch Langzeitbehandlung mit Glutamat bzw. Wasserstoffperoxid Klone isoliert, die gegen oxidativen Stress resistent sind.

Bei dem Vergleich der resistenten und sensitiven Klone im Hinblick auf Unterschiede in Signaltransduktionswegen und Genexpression wurden sowohl in der Literatur als mögliche Kandidaten beschriebene Faktoren untersucht, als auch mit Hilfe von Differential Display und Mikroarray-Analyse nach bislang nicht mit oxidativer Resistenz in Verbindung gebrachten Genen gesucht. Expressionsunterschiede zwischen den Modellklonen geben Hinweise darauf, welche Signalwege in Zelltod- bzw. Resistenzmechanismen bei Morbus Alzheimer involviert sein könnten und beinhalten somit auch mögliche Therapieansätze für mit oxidativem Stress assoziierte neurodegenerative Krankheiten.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur

Zellen wurden in DMEM Medium (Life Technologies) mit Zusatz von 10% Kälberserum, 1% Natrium Pyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Zu dem Medium der Glutamat-resistenten Zellen wurde außerdem Natriumglutamat (Sigma) in einer Endkonzentration von 40 mM zugesetzt. Zu den Wasserstoffperoxid-resistenten Zellen wurde zweimal pro Woche H_2O_2 (Aldrich) in einer Endkonzentration von 450 μM zugegeben.

3.1.1 Herstellung H_2O_2 -resistenter Zelllinien

HT-22 Zellen wurden in geringer Dichte ausplattiert und in Anwesenheit von 1,2 mM H_2O_2 in Kultur genommen. Die Zellen zeigten ein klonales Wachstum, das es ermöglichte, einzelne Klone zu isolieren und unter Anwesenheit des Toxins weiter zu kultivieren. Nach etwa 3 Wochen Wachstum unter Anwesenheit des Toxins wurden einzelne Klone in eine 24 well-Platte überführt und unter gleichen Bedingungen weiter kultiviert, bis sie schließlich wieder in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser überführt werden konnten.

3.1.2 Herstellung Glutamat-resistenter Zelllinien

HT-22 Zellen wurden in geringer Dichte ausplattiert. In das Kulturmedium wurde Glutamat in einer Endkonzentration von 2mM zugegeben. Innerhalb eines Zeitraums von vier Monaten wurde die Glutamat-Konzentration graduell erhöht (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40mM). Nach jeder Konzentrationserhöhung wurden Mischklone isoliert und im Folgenden weiter kultiviert.

3.2 Toxizitäts-Tests

Der Einfluss von Toxinen auf die Überlebensrate von Zellen wurde über die Fähigkeit der Zellen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma) zu verstoffwechseln bestimmt. Der MTT-Test fand in 96-Well Mikrotiterplatten statt, in die 10^3 Zellen in einem Volumen von 100 μ l Medium pro Well ausplattiert wurden. Nachdem die Zellen sich am Boden der Platte festgesetzt hatten, wurden ihnen Toxine (z.B. Glutamat oder H_2O_2) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Es wurden jeweils die Zellen von mindestens 5 Wells mit identischen Toxinkonzentrationen behandelt. Am nächsten Tag wurde allen Wells 10 μ l MTT-Lösung (5 mg/ml) zugesetzt. Vier Stunden später wurden 100 μ l Solubilisation-Lösung (0.1 g/ml Natrium Dodecyl Sulfat, 50 Vol.% Dimethylformamid, pH 4.1) zugegeben und nach weiteren 24 Stunden die Farbintensität in einem automatischen Mikrotiterplatten Lesegerät (Dynatech MR 7000) gemessen. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollzellen angegeben.

3.3 Wachstumskurven

Die Wachstumskurven der verwendeten Zellklone wurden mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit 10^3 Zellen pro Well beimpft und in regelmässigen Abständen MTT-Tests durchgeführt. Hierzu wurden 10 μ l MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well gegeben und nach dreistündiger Inkubationszeit bei 37°C wurden 100 μ l Solubilisation-Lösung (0.1 g/ml Natrium Dodecyl Sulfat, 50 Vol.% Dimethylformamid, pH4.1) hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurde die Farbintensität in einem automatischen Mikrotiterplatten-Lesegerät (Dynatech MR 7000) gemessen.

3.4 Western Blots

Zellen wurden in Petrischalen mit 6 cm Durchmesser ausplattiert. 24 Stunden später wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in PBS resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallpulse lysiert. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss mittels eines Bradford-Tests bestimmt.

Je 10 mg Protein in Laemmli-Puffer wurden sodann auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden nach der Auftrennung auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell) übertragen. Die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde durch eine Ponceau-Färbung verifiziert und die Membran dann für 3 h in 10% Milchpulver in TBS-T geblockt. Anschließend wurde die Membran in einer Verdünnung des Erstantikörpers zwischen 1:150 und 1:2000 in Gelnat (0.05M Tris, 5mM EDTA, 150 μ M NaCl, 0.5 mg/ml TritonX-100, 2.5 mg/ml Gelatine) über Nacht bei 4°C geschüttelt und am nächsten Tag, nach dem Waschen mit TBS-T, in einer 1:4000 verdünnten Lösung des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers (Amersham Pharmacia Biotech) für eine Stunde inkubiert. Nach dem erneuten Waschen in TBS-T wurden die markierten Banden über eine Lichtreaktion mittels „Western blotting detection reagents“ (Amersham Pharmacia Biotech) auf einem Röntgenfilm (Fuji Super RX) sichtbar gemacht.

Folgende Antikörper wurden verwendet: 22C11 (Roche Molecular Diagnostics), $A\beta_{1-16}$ (Bio-source), Anti-GSK (Transduction Laboratories), Anti-GSKtyr (Upstate Biotechnology), Anti-GSKser, Anti-MAPK, Anti-pMAPK und Anti-PARP (Cell Signaling), Anti-Bax und Anti-Bcl-2 (Trevigen).

Der Antikörper gegen Seladin-1 war ein Geschenk von Prof. Dr. I. Greeve. Der Antikörper gegen Hsp70 wurde freundlicher Weise von Dr. K. F. Winklhofer zur Verfügung gestellt und wurde ursprünglich von Stressgen bezogen.

3.5 RNA-Isolation

Konfluente Zellen von zwei Petrischalen (Durchmesser 10 cm) wurden mit kaltem PBS gewaschen und dann in jeweils 4 ml RNazolB (Wak-Chemie Medical GmbH) aufgenommen. Zu den vereinigten Zellsuspensionen wurden 0.8 ml 1-Bromo-3-Chloropropan (BCP, Wak-Chemie

Medical GmbH) gegeben. Nach heftigem Schütteln erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert (Beckman J2-MC). Die obere Phase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und nochmals für 15 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und danach in 150 μ l DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Beckman DU 640 Spectrophotometer).

3.6 RNA-Aufreinigung

50 μ l einer RNA-Lösung mit einer Konzentration von 1 μ g/ μ l wurden mit 10 Einheiten DNase I (GenHunter) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 40 μ l Phenol/Chloroform (3:1) zugegeben. Nach heftigem Schütteln und einer 10 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C. Die obere Phase wurde mit 5 μ l einer 3 M Natriumacetatlösung vermischt und nach Zugabe von 200 μ l Ethanol über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 75%igem Ethanol gewaschen, bevor es in 20 μ l DEPC-Wasser gelöst wurde. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Beckman DU 640 Spectrophotometer).

3.7 Northern Blots / Slot Blots

3.7.1 Northern Blotting

10 μ g gereinigte RNA wurden mit 12 μ l Probenpuffer (14.2 μ l 5xMOPS, 24.8 μ l Formaldehyd, 71 μ l Formamid), 1.5 μ l DEPC-Wasser und 1 μ l Ethidiumbromid versetzt, 15 min lang bei 65°C inkubiert, mit 2 μ l Agarosefarbstoff versetzt und auf Eis gestellt. Die gesamte Probe wurde auf ein Agarosegel (0.624 g Agarose, 40 ml DEPC-Wasser, 12.3 ml 5xMOPS, 11.1 ml Formaldehyd) aufgetragen und bei 100 V in 1xMOPS aufgetrennt.

Die RNA wurde dann durch Kapillarwirkung auf eine Nylon-Membran (Roti-Nylon-Plus) übertragen und in einem UV Stratalinker 1800 von Stratagene fixiert.

3.7.2 Slot Blotting

Zu 10 μl einer RNA-Lösung der Konzentration 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurden 20 μl Formamid, 7 μl Formaldehyd und 2 μl 20xSSC gegeben. Die Lösung wurde 15 min lang bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Die Öffnungen einer Slot Blot Kammer (Schleicher & Schuell) wurden mit 20xSSC gefüllt und sodann das Vakuum an die Apparatur angeschlossen. Zu den RNA-Proben wurden weitere 40 μl 20xSSC gegeben und die gesamten Proben in jeweils eine Öffnung der Apparatur pipettiert. Durch das angelegte Vakuum wurde die RNA auf die darunterliegende Nylonmembran (Hybond N von Amersham Pharmacia Biotech) gesaugt. Dann wurden die Öffnungen zweimal mit 200 μl 20xSSC gespült und die Membran anschließend luftgetrocknet. Die Fixierung der RNA auf die Membran erfolgte in einem UV Stratalinker 1800 von Stratagene. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

3.7.3 Markierung der Sonden

Die Markierung der Sonden (Herstellung der Sonden s. Abschnitt 3.11.1) erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling System von Amersham Pharmacia Biotech. 100 ng Sonden-DNA wurden mit 5 μl Primern gemischt und 5 min lang im Wasserbad gekocht. Anschließend wurde das Volumen mit Wasser auf 35 μl aufgefüllt und 10 μl 5xlabelling buffer, 3 μl $^{32}\text{PdCTP}$ sowie 2 μl Klenow Fragment zugegeben. Die Lösung wurde eine Stunde lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 5 μl 0.2 M EDTA-Lösung gestoppt. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde eine NICK Säule (NICK Column von Amersham) vorbereitet, indem sie mit TE-Puffer gespült wurde. Die Probe wurde, nachdem der Puffer durchgelaufen war, direkt mit 345 μl TE-Puffer auf den Filter der Säule gegeben. Die Fraktion wurde aufgefangen und ihr Radioaktivitätsgehalt mit einem β - γ Detektor LB122 (Berthold) gemessen. Die Säule wurde weitere fünf mal mit 400 μl TE-Puffer durchspült und der Radioaktivitätsgehalt aller Fraktionen bestimmt. Die zweite Fraktion enthielt die markierte Sonde. Ihr relativer

Radioaktivitätsgehalt wurde als Anteil an der Summe der Radioaktivitätswerte aller sechs Fraktionen ermittelt. Betrug der Anteil weniger als 20% wurde die Probe verworfen. Andernfalls wurde sie mit 5 μl Träger-DNA, 40 μl 3 M Natriumacetatlösung und 800 μl Ethanol vermischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet anschließend in 150 μl 0.1% SDS-Lösung resuspendiert.

3.7.4 Hybridisierung der Northern Blots / Slot Blots

Die Membran mit der darauf fixierten RNA wurde mit DEPC-Wasser angefeuchtet und in einer Hybridisierungsflasche plaziert. Dann wurden 10 ml von auf 65°C temperiertem Rapid Hyb Puffer (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben und die Membran für 20 min bei 65°C in einem Ofen (Hybaid Micro-4 von MWG Biotech) prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die vorbereitete Sonde 5 min im Wasserbad gekocht, bevor 50% ihres Gesamtvolumens zum Prähybridisierungspuffer in die Flasche pipettiert wurde. Nach einer zweistündigen Hybridisierung bei 65°C wurden die Blots 2 x 10 min mit 2xSSPE/0.1%SDS, 1 x 15 min mit 1xSSPE/0.1%SDS, 1 x 15 min mit 0.5xSSPE/0.1%SDS und 1 x 10 min mit 0.2xSSPE/0.1%SDS gewaschen. Alle Waschlösungen waren auf 65°C vorgewärmt. Zum Schluss wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, in eine Kassette gelegt und ein Röntgenfilm (Fuji Super RX) aufgelegt. Die Kassette wurde für ein bis fünf Tage bei -80°C aufbewahrt, bevor der Film entwickelt wurde. Die Stärke der Schwärzung auf dem Film wurde mit Hilfe der Software „Scion Image“ quantifiziert.

3.8 Reverse Transkription

10 μl einer RNA-Lösung mit einer Konzentration von 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurden 5 min bei 65°C denaturiert. Danach wurden 10 μl Mastermix (1 mM dNTP (Qiagen), 2 μM Oligo-dT Primer (Promega), 1 Einheit Rnase-Inhibitor (Promega) und 1 μl Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen)) zu der denaturierten RNA gegeben und das Gemisch 60 min bei 37°C inkubiert.

3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2 μ l cDNA-Lösung wurden mit 0.2 mM dNTP (Qiagen), 2 pM 3' Primer, 2 pM 5' Primer (MWG), 0.02 Einheiten Taq Polymerase (Qiagen) und 0.75 mM MgCl₂ in einem Thermozykler (Biometra) inkubiert. Zyklenzahl und Annealingtemperatur wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar variiert.

Die Synthese von Primern wurde bei MWG in Auftrag gegeben.

Die Primersequenzen für Glutathion Reduktase 1 lauten:

Vorwärts: AGCCTTCCGTCTTGCAATGTA

Rückwärts: AGCTGCCCAATGATGTTAC

Die Primersequenzen für 3-Oxoacid CoA Transferase lauten:

Vorwärts: GGCATGAGGTTTGGTCAAAC

Rückwärts: AGCACTCTCGGAAGGGAAAT

3.10 Gen Expression Arrays

Die Membranen aus den GEArray Kits „Mouse PathwayFinder-1“, „Mouse Apoptosis Q Series“ und „Mouse Cancer PathwayFinder Q Series“ von Biomol wurden entsprechend der Anleitung mit ³²P-markierter cDNA aus Glutamat-resistenten bzw. nicht resistenten HT-22 Zellen hybridisiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweisst und ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach ein- bzw. mehrtägiger Inkubation bei -80°C wurde der Film entwickelt und die Intensität der Schwärzung mit der Software „Scion Image“ quantifiziert. Das Signal wurde anschließend in kochender 0.5% SDS Lösung abgewaschen, um eine weitere Hybridisierung durchführen zu können. Die Membran, die vorher mit cDNA aus HT-22 N Zellen hybridisiert war, wurde dabei nun mit cDNA aus Glu-Res Zellen hybridisiert und umgekehrt.

Die nach der Quantifizierung vorliegenden Werte wurden auf den zugehörigen Wert für das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Der Vergleich der Expressionsprofile von HT-22 N und Glu-Res Zellen erfolgte dabei nur für Werte die von derselben Membran stammten, um produktionsbedingte Unterschiede in der aufbrachten cDNA Menge auszuschließen.

3.11 Differential Display (DD)

Mit RNA aus Glutamat-resistenten und nicht resistenten HT-22 Zellen wurden Reverse Transkriptionen unter Verwendung des RNAimage Kits von GenHunter durchgeführt. Bei der folgenden DD-PCR (40 Zyklen, Annealing-Temperatur: 40°C) wurde die cDNA amplifiziert und mittels α -³³P-dATP (Hartmann Analytics) markiert. Das RNAimage Kit ermöglichte 24 verschiedene Primer-Kombinationen. Die PCR-Produkte wurden als Doppelansatz auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (6% Acrylamid, 7 M Harnstoff in TBE) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 3 h bei 120 Watt. Anschließend wurde das Gel 1.5 h bei 80°C auf Wattman Papier (Schleicher & Schuell) getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach 24 h wurde der Film entwickelt und ggf. ein weiterer Film für bis zu 72 h aufgelegt.

3.11.1 Reinigung und Reamplifikation von DD-Banden

DD-Banden der gleichen Primerkombinationen, die bei Proben von resistenten und nicht resistenten Zellen unterschiedlich stark ausfielen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 10 min bei RT in 100 μ l DEPC-Wasser eingeweicht. Anschließend wurden die Gefäße mit Parafilm versiegelt und die Proben 15 min lang im Wasserbad gekocht. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 10 μ l 3 M Natriumacetat, 5 μ l Glycogen (10 mg/ml) und 450 μ l Ethanol versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei -80°C erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 4°C. Danach wurde das Pellet mit 200 μ l eiskaltem, 85%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 10 μ l DEPC-Wasser gelöst. Für die eigentliche Reamplifikation wurden 4 μ l dieser cDNA-Lösung in eine weitere PCR eingesetzt, die unter denselben Bedingungen (Primerwahl, Zyklenzahl, Annealing-Temperatur) wie die ursprüngliche DD-PCR stattfand. 30 μ l des PCR-Produkts wurden auf ein mit Ethidiumbromid versetztes 1.5%iges Agarosegel in 0.5x TBE aufgetragen. Die Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mittels Qiaex II Kit (Qiagen) extrahiert. Die so gereinigte DNA wurde als Sonde für die Northern Hybridisierung verwendet (s. Abschnitt 3.7.3).

3.11.2 Klonierung

Die Klonierung der cDNA aus den DD-Banden erfolgte mit dem „PCR TRAP Cloning System“ von GenHunter. Die cDNA wurde mittels T4 DNA Ligase in den PCR-TRAP Vector eingefügt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Thermocycler (Biometra). 10 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl kompetenter Zellen gegeben und das Gemisch 45 min lang bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 min einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und dann mit 0.2 ml LB-Medium 1 h lang bei 37°C inkubiert. 100 µl der Zellsuspension wurden auf Tetracyclin-haltigen (20 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C in der Dunkelheit inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien markiert und ein Teil der Zellen dieser Kolonien in 50 µl „colony lysis buffer“ überführt. Es folgte eine 10minütige Inkubation bei 95°C. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer wurde mit 2 µl des Lysates eine PCR unter Verwendung der Primer Lgh und Rgh durchgeführt (30 Zyklen, Annealing Temperatur 52°C). Um den Erfolg der vorangegangenen Transformation zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf ein 1.5%iges Agarosegel in 0.5x TBE aufgetragen. Konnte das Insert auf diese Weise nachgewiesen werden, wurde der Rest der jeweiligen Kolonie in 50 µl LB-Medium suspendiert. Diese Suspension wurde auf weitere Tetracyclin-haltige (20 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht in der Dunkelheit bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden am folgenden Tag in 6 ml Tetracyclin-haltiges (20 µg/ml) LB-Medium überführt und ein weiteres Mal für 24 h bei 37°C in der Dunkelheit inkubiert. Aus diesen Zellsuspensionen wurden die Plasmide mittels des „Qiaprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) isoliert. Die Sequenzierung der Inserts wurde bei MWG in Auftrag gegeben.

3.12 In Situ Hybridisierung

Mäuse der Linie FVB/N wurden decapitiert und die Gehirne tiefgefroren. Aus den Gehirnen wurden am Kryostaten (Microm HM 500 OM) sagittale, 15 µm dicke Schnitte aus dem Bereich des Hippokampus angefertigt und für die *In Situ* Hybridisierung auf Glasobjektträger (Super Frost) aufgebracht.

Die Objektträger mit den gefrorenen Hirnschnitten wurden 45 min lang bei Raumtemperatur

aufgetaut. Dann wurden sie 10 min lang in eiskaltem 4% PFA in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen in DEPC-behandeltem PBS wurden die Schnitte in 250 ml 0.1 M Triethanolamin-HCl (pH 8.0) inkubiert, dem 630 μ l Essigsäureanhydrid tropfenweise zugesetzt wurden. Die Schnitte wurden in DEPC-behandeltem 2xSSC gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Danach folgten eine fünfminütige Inkubation in Chloroform und je eine einminütige Inkubation in 100% bzw. 95% Ethanol, in deren Anschluss die Objektträger an einem staubfreien Platz getrocknet wurden. Zur Prähybridisierung wurde auf jeden Objektträger 100 μ l Hybridisierungsmix (50% Formamid, 20 mM Tris-HCL pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 10% Dextranulphat, 0.02% Ficoll 400, 0.02% Polyvinylpyrrolidon, 0.02% BSA, 0.5 mg/ml tRNA, 0.2 mg/ml Träger DNA, 200 mM DTT) aufgetragen und die Schnitte für eine Stunde bei 60°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Als Ausgangsmaterial für die Sonde diente linearisierte Plasmid-DNA. 3 μ g DNA wurden mit 6 μ l NTP-Mix (je 10 mM rATP, rCTP und rGTP von Roche Molecular Diagnostics), 2 μ l 0.5 M DTT, 2 μ l RNasin (40 U/ μ l von Promega), 26 μ l ³⁵S-thio-rUTP (12.5 mCi/mM von Hartmann Analytics) und 2 μ l T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase (20 U/ μ l von Roche Molecular Diagnostics) in einem Endvolumen von 60 μ l Transkriptionspuffer gelöst und drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die DNA durch Zugabe von 2 μ l RNase-freier DNase I (Roche Molecular Diagnostics) und 15minütiger Inkubation bei 37°C zerstört. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe eines RNeasy Kits (Qiagen) gereinigt und die Strahlung der Proben in einem Scintillation-Counter (Beckman LS 6500) gemessen. Für die Hybridisierung wurde eine Probenmenge, die 7 Millionen cpm enthielt, in 100 μ l Hybridisierungsmix gelöst und auf einem Objektträger verteilt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 60°C durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die nicht hybridisierte Sonde in 4xSSC abgewaschen. Dann wurden die Schnitte 20 min lang in NTE mit 20 μ g/ml RNaseA bei 37°C inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte in 2xSSC/1 mM DTT, 1xSSC/1 mM DTT, 0.5xSSC/1 mM DTT, 0.1x SSC/1 mM DTT bei 64°C und in 0.1xSSC. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit einem Zusatz von 300 mM Ammoniumacetat dehydriert und die trockenen Objektträger schließlich in einer Kassette plaziert und ein Röntgenfilm (BioMax MR von Ko-

dak) aufgelegt. Der Film wurde nach 24 h bei -80°C entwickelt.

Die Objektträger mit den Hirnschnitten wurden dann in KODAK NTB2 Emulsion getaucht und je nach Intensität der Schwärzung auf dem Röntgenfilm für 6 bis 8 Wochen bei 4°C in der Dunkelheit gelagert. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte in KODAK D19 developer entwickelt, fixiert (KODAK fixer), mit Toluolblau gegengefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

3.13 Chip-Hybridisierung

Die Chips wurden durch die Microarray-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie aus PCR-Produkten der zwei Mausgenbanken MMSV (Mus musculus sequence verified) und BMAP (Brain Molecular Anatomy Project) von Resgen auf Glasobjektträgern erstellt. Auf jedem Chip wurden Sequenzen von über 17000 Genen mit Hilfe eines Chipwriter Pro (Virtek) aufgebracht. Als Ausgangsmaterial für die Erstellung der Hybridisierungssonden wurden pro Chip $100\ \mu\text{g}$ „Universal Mouse Reference RNA“ (Stratagene) sowie $100\ \mu\text{g}$ DNase I (Boehringer-Roche) behandelte RNA aus entweder Glutamat-resistenten oder nicht-resistenten HT-22 Zellen in einem Volumen von $17\ \mu\text{l}$ DEPC-Wasser gelöst. Für den Versuch wurden 6 Chips mit cDNA-Sonden hybridisiert, die aus RNA von Glutamat-resistenten HT-22 Zellen gewonnen wurden und 6 Chips mit Sonden, die aus nicht-resistenten HT-22 Zellen erstellt wurden.

3.13.1 Herstellung Cy3- bzw. Cy5-markierter cDNA

Die RNA-Lösungen wurden mit $2\ \mu\text{l}$ Oligo dT Primern der Konzentration $500\ \mu\text{g/ml}$ (Amersham Pharmacia Biotech) gemischt und für 5 min bei 70°C im Thermoblock geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu jedem Ansatz wurden sodann $8\ \mu\text{l}$ 5x first strand buffer (Gibco), $4\ \mu\text{l}$ 10x low T dNTP (5 mM dGTP, 5 mM dATP, 5 mM dCTP, 2 mM dTTP von Roche Molecular Diagnostics), $4\ \mu\text{l}$ 0.1 M DTT (Gibco), $1\ \mu\text{l}$ RNase Inhibitor (Boehringer-Roche) und $2\ \mu\text{l}$ Superscript II (Gibco) pipettiert. Zu den Referenz-RNA Proben wurden außerdem $4\ \mu\text{l}$ Fluor d UTP Cy 5 (Amersham Pharmacia Biotech) zugesetzt, während die RNA aus den HT-22 Zellen mit dem gleichen Volumen Fluor d UTP Cy 3 (Amersham Pharmacia Biotech) versehen wurde. Nach heftigem Schütteln und

kurzer Zentrifugation wurden die Proben eine Stunde lang bei 42°C in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Gabe von 5 μl 500 mM EDTA-Lösung und nachfolgender einminütiger Inkubation bei 42°C gestoppt.

3.13.2 Aufreinigung der Proben

Zu den Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Ansätzen wurden 10 μl einer 1 M NaOH-Lösung gegeben und die Proben dann für 15 min bei 65°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die cDNA-Lösungen durch Zugabe von 10 μl einer 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Die Proben wurden dann auf Bio-6-Säulen (Biomol) aufgetragen und 4 min lang bei 4000 rpm zentrifugiert (Sigma 1-13). Gleiche cDNA-Proben aus den Auffanggefäßen wurden gepoolt und das Volumen mit TE-Puffer auf 480 μl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von Microcon YM-30 Säulen (Millipore) auf ein Volumen von 20 μl eingengt. Die Säulen wurden dann umgedreht auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und durch dreiminütige Zentrifugation bei 4000 rpm (Sigma 1-13 Zentrifuge) eluiert.

3.13.3 Hybridisierung

Das Volumen der Referenz-cDNA- und der Proben-cDNA-Lösungen wurde durch Pipettieren bestimmt. Gleiche Volumina an Referenz-cDNA wurden in 12 Reaktionsgefäße pipettiert (1 Gefäß pro Chip) und die unterschiedlichen Proben-Lösungen gleichmäßig auf jeweils 6 dieser Gefäße verteilt. Dann wurden die Proben mit einem Speedvac-Gerät (Eppendorf Concentrator 5301) auf ein Volumen von 5 μl eingengt und anschließend 40 μl Hybridisierungsmix (50% Formamid, 6x SSC, 5x Denhard's Solution (Sigma Aldrich), 0.5 % SDS und 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0), 1 μl murine COT1-DNA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ von Gibco) und 2 μl Poly(dA) (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben. Die Proben wurden dann 3 min bei 94°C denaturiert und 3 min auf Eis gekühlt. Jeder Probenansatz wurde mit Hilfe eines Deckglases gleichmäßig und luftblasenfrei auf je einem der Chips verteilt. Die Chips wurden dann in wasserdicht verschließbare Kammern gelegt und für 16 h bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Deckgläser durch Eintauchen der Chips in eine 2xSSC / 0.2% SDS Lösung abgespült und die Chips anschließend 15 min in einer auf 60°C temperierten 2xSSC / 0.2% SDS

Lösung unter Schütteln gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift über 15 min bei 60°C in 0.5xSSC und einer für 1 min bei RT in 0.2xSSC. Zum Schluss wurden die Chips kurz in 0.05xSSC geschwenkt und die auf den Objektträgern verbliebene Flüssigkeit abzentrifugiert. Die Hybridisierungssignale wurden in einem Laserscanner (Scanarray 4000 von Perkin Elmer) ausgelesen und die Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen den Glutamat-resistenten und nicht resistenten HT-22 Zellen von der Microarray-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie berechnet.

3.14 Geräte- und Materialliste

Tabelle 3.1: Geräte- und Materialliste

Kategorie	Produkt	Firma
Antikörper	22C11 (sAPP α)	Roche Molecular Diagnostics
	A β_{1-16} (Gesamt-APP)	Biosource
	Anti-GSK	Transduction Laboratories
	Anti-GSKtyr	Upstate Biotechnology
	Anti-GSKser	Cell Signaling
	Anti-MAPK	Cell Signaling
	Anti-pMAPK	Cell Signaling
	Anti-PARP	Cell Signaling
	Anti-Bax	Trevigen
	Anti-Bcl-2	Trevigen
	Anti-Hsp70	Stressgen
	Anti-Seladin-1	Prof. Dr. I. Greeve, Universität Hamburg
	Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper	Amersham Pharmacia Biotech
Chemikalien	Natriumglutamat	Sigma
	Wasserstoffperoxid	Aldrich
	MTT	Sigma
	Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech
	RNAzolB	Wak-Chemie Medical GmbH
	1-Bromo-3-Chloropropan (BCP)	Wak-Chemie Medical GmbH
	Rapid Hyb Puffer	Amersham Pharmacia Biotech
	NTB2 Emulsion	Kodak
	D19 Developer	Kodak
	Fixierungslösung (fixer)	Kodak
<i>Fortsetzung auf der nächsten Seite</i>		

<i>Fortsetzung von Tabelle 3.1</i>		
Kategorie	Produkt	Firma
Chemikalien	5x first strand buffer	Gibco
	Denhard's Solution	Sigma Aldrich
	DTT	Gibco
Enzyme	DNase I (Northern Blots)	GenHunter
	DNase I (Chip-Experiment)	Boehringer-Roche
	RNase-freie Dnase I (In-Situ-Hybridisierung)	Roche Molecular Diagnostics
	Rnase-Inhibitor RNasin	Promega
	RNase Inhibitor	Boehringer-Roche
	Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen
	Taq Polymerase	Qiagen
	T7 RNA-Polymerase	Roche Molecular Diagnostics
	SP6 RNA-Polymerase	Roche Molecular Diagnostics
	Superscript II	Gibco
Nukleotide	dNTP	Qiagen
	Oligo-dT Primer	Promega
	Oligo dT Primer (Chip-Experiment)	Amersham Pharmacia Biotech
	Primersynthese	MWG
	α - ³³ P-dATP	Hartmann Analytics
	³⁵ S-thio-rUTP	Hartmann Analytics
	rATP, rCTP und rGTP	Roche Molecular Diagnostics
	Universal Mouse Reference RNA	Stratagene
	dGTP, dATP, dCTP und dTTP	Roche Molecular Diagnostics
	Fluor d UTP Cy 5	Amersham Pharmacia Biotech
	Fluor d UTP Cy 3	Amersham Pharmacia Biotech
	COT1-DNA	Gibco
	Poly(dA)	Amersham Pharmacia Biotech
Molekularbiologische Kits	Megaprime DNA Labelling System	Amersham Pharmacia Biotech
	GEArray Kits „Mouse PathwayFinder-1“, „Mouse Apoptosis Q Series“ und „Mouse Cancer PathwayFinder Q Series“	Biomol
	RNAimage Kit	GenHunter
	Qiaex II Kit	Qiagen
	PCR TRAP Cloning System	GenHunter
	Qiaprep Spin Miniprep Kits	Qiagen
	Rneasy Kit	Qiagen
Säulen	NICK Column	Amersham
	Bio-6-Säulen	Biomol
	Microcon YM-30 Säulen	Millipore
Membranen	Nitrozellulose-Membran	Schleicher und Schuell
<i>Fortsetzung auf der nächsten Seite</i>		

<i>Fortsetzung von Tabelle 3.1</i>		
Kategorie	Produkt	Firma
Membranen	Nylon-Membran Roti-Nylon-Plus	Roth
	Nylonmembran Hybond N	Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme	Röntgenfilm Super RX	Fuji
	Röntgenfilm BioMax MR	Kodak
Geräte	Mikrotiterplatten Lesegerät MR 7000	Dynatech
	Spectrophotometer DU 640	Beckman
	UV Stratalinker 1800	Stratagene
	β - γ Detektor LB122	Berthold
	Hybridisierungsofen Hybaid Micro-4	MWG Biotech
	Thermozykler	Biometra
	Kryostat HM 500 OM	Microm
	Scintillation-Counter LS 6500	Beckman
	Chipwriter Pro	Virtek
	Speedvac Concentrator 5301	Eppendorf
	Laserscanner Scanarray 4000	Perkin Elmer
	Slot Blot Apparatur	Schleicher & Schuell
	Zentrifuge J2-MC	Beckman
	Zentrifuge Sigma 1-13	Sigma

Kapitel 4

Ergebnisse

Hippokampale Maus-Neurone der Linie HT-22 wurden auf Resistenz gegen die oxidativen Stressoren Glutamat und Wasserstoffperoxid selektiert. Änderungen im Expressionsprofil der resistenten gegenüber den nicht resistenten Zellen wurden untersucht, um Anhaltspunkte dafür zu finden, welche Gene und Signalwege in die Vermittlung von oxidativer Resistenz involviert sein könnten. Dabei wurden zum einen in der Literatur bereits als mögliche Kandidaten beschriebene Faktoren untersucht, zum anderen wurde mit Hilfe der Methoden des Differential Displays und der Chip-Hybridisierung nach Veränderungen in bislang nicht mit oxidativem Zelltod in Verbindung gebrachten Genen gesucht.

4.1 Das Zellmodell

4.1.1 Morphologie der neuronalen Zellen

HT-22 Neurone haben in ihrem Zellkörper einen unter dem Lichtmikroskop gut zu erkennen den Zellkern und sie besitzen axonale Fortsätze. Obwohl die resistenten HT-22 Zellen eine ähnliche Morphologie aufweisen wie die nicht resistenten Zellen, so sind doch Unterschiede feststellbar: Die Zellkörper der Glutamat- und Wasserstoffperoxid-resistenten Zellen (Glu-Res bzw. H₂O₂-Res) sind deutlich größer als die der nicht-resistenten Zellen (HT-22 N) und weisen mehr Vakuolen auf, deren Signifikanz man noch nicht kennt. Die Nuklei der resistenten Zellen sind ebenfalls größer als die der nicht resistenten Zellen. Außerdem findet man in den resisten-

ten Kulturen einen größeren Anteil an Zellen mit mehreren (bis zu fünf) Kernen. Die axonalen Fortsätze sind bei den H_2O_2 -Res Zellen besonders lang ausgebildet (vgl. Abbildungen 4.1, 4.2 und 4.3).

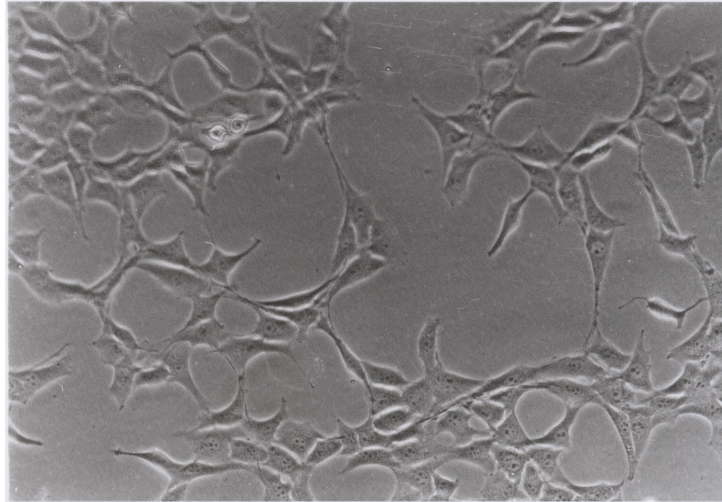


Abbildung 4.1: Phasenkontrastaufnahme der nicht-resistenten HT-22 Zellen (HT-22 N), Vergrößerungsfaktor 200. Die Zellen weisen eine neuronale Morphologie mit axonalen Fortsätzen auf.

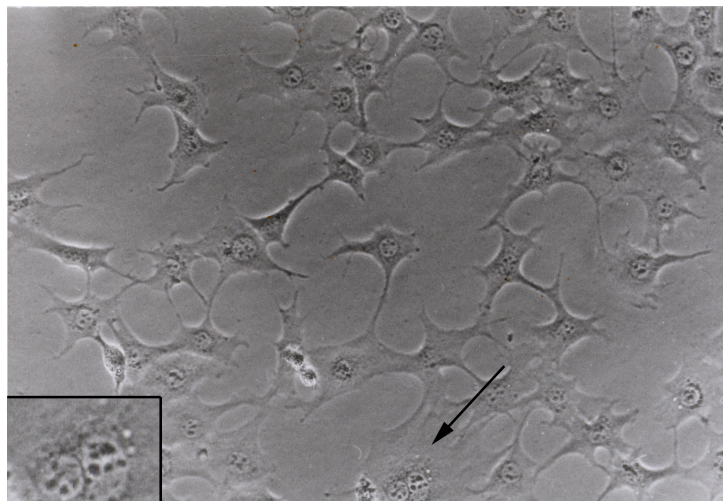


Abbildung 4.2: Phasenkontrastaufnahme der Glutamat-resistenten HT-22 Zellen (Glu-Res), Vergrößerungsfaktor 200. Auffällig sind die im Vergleich zu HT-22 N Neuronen vergrößerten Zellkörper. Man beachte außerdem die Zelle mit zwei Nuklei (Pfeilmarkierung und Ausschnittsvergrößerung am linken unteren Bildrand).

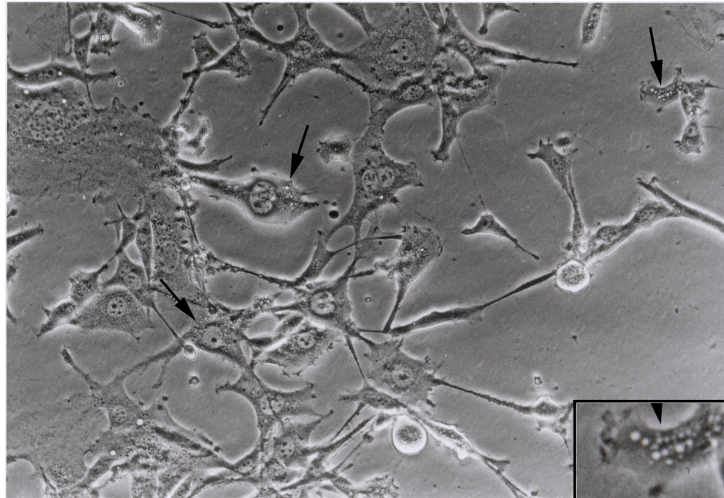


Abbildung 4.3: Phasenkontrastaufnahme der Wasserstoffperoxid-resistenten HT-22 Zellen (H_2O_2 -Res), Vergrößerungsfaktor 200. Die Zellkörper und die Zellkerne sind im Vergleich zu HT-22 N Neuronen deutlich vergrößert. Außerdem sind die axonalen Fortsätze auffällig lang ausgebildet. In vielen Zellkörpern sind zudem helle körnige Strukturen zu sehen, die wahrscheinlich Vakuolen entsprechen (Pfeilmarkierungen und Ausschnittsvergrößerung am rechten unteren Bildrand).

4.1.2 Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten

Theoretisch wäre es denkbar, dass Zellen eine Resistenz gegen Toxine entwickeln, indem sie ihre Wachstumsrate um ein Vielfaches erhöhen. Solche „Superkrebszellen“ würden sich schneller teilen, als das Toxin seine schädliche Wirkung auf sie ausüben könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Wachstumskurven erstellt. Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, wachsen die resistenten Klone nicht schneller als die HT-22 N Zellen. Für die H_2O_2 -resistenten Zellen konnte sogar ein deutlich verlangsamtes Wachstum festgestellt werden.

Das veränderte Resistenzverhalten der Zellen ist demnach nicht auf eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit zurückzuführen.

Allerdings erreichten die Glu-Res Zellen im MTT-Test am Ende der Wachstumsphase höhere Absorptionswerte als HT-22 N Zellen. Da die Absorptionswerte äquivalent zu der verstoffwechselten Menge MTT sind, könnte die Ursache für diese Beobachtung entweder in einer erhöhten Stoffwechselrate oder einem dichteren Wachstum der Glu-Res Zellen liegen. Obwohl die Glu-Res Neurone nicht schneller wachsen als die HT-22 N Neurone, ist es möglich, dass

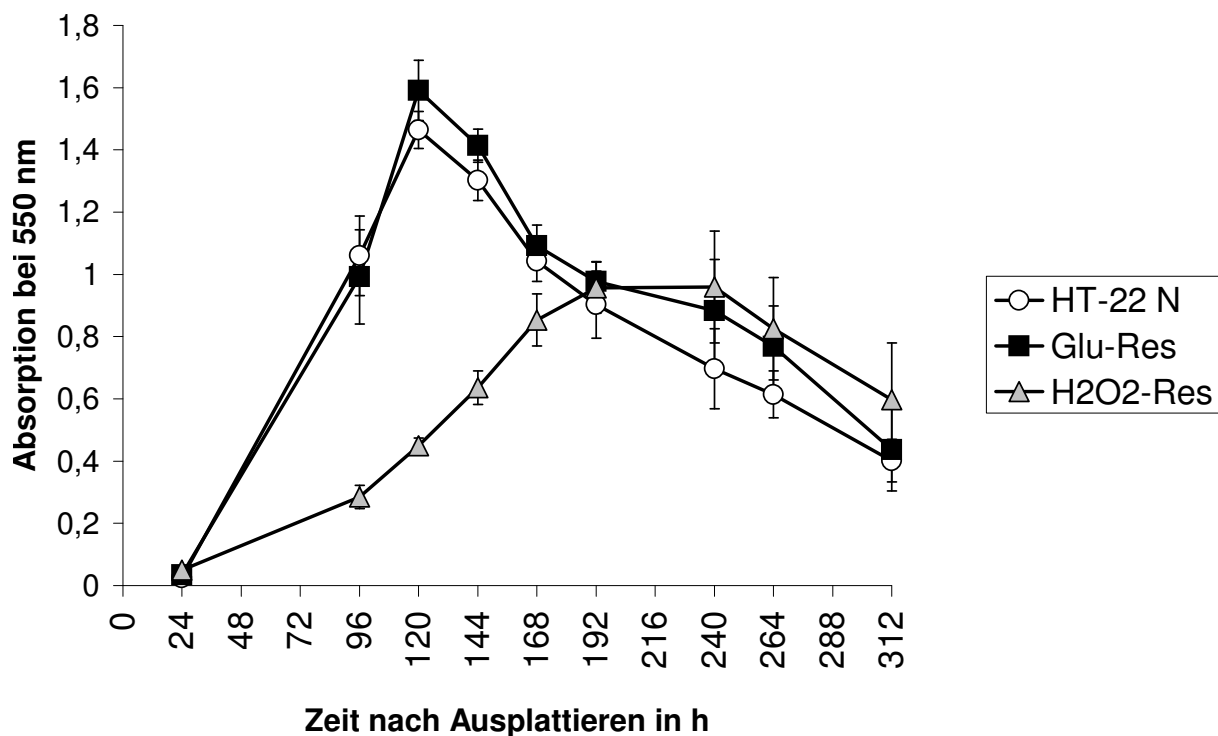


Abbildung 4.4: Wachstumskurven der resistenten und nicht resistenten HT-22 Zellen ermittelt durch MTT-Tests. Die Wachstumskurven für HT-22 N und Glu-Res Zellen stimmen weitgehend überein. Allerdings erreichen die Glu-Res Zellen insgesamt signifikant höhere Absorptionswerte für $t=120\text{h}$, 144h , 240h und 264h ($p<0.05$, Two Way ANOVA), was entweder auf eine erhöhte Stoffwechselrate oder ein zwar nicht schnelleres, aber insgesamt dichteres Wachstum schließen lässt. Die H_2O_2 -Res Zellen wachsen deutlich langsamer als die HT-22 N und Glu-Res Neurone. Die Absorptionswerte unterscheiden sich in den ersten 168 Stunden signifikant von den Werten der anderen beiden Klone ($p<0.001$, Two Way ANOVA)

sie insgesamt eine höhere Dichte erreichen. Dies bedeutet, dass während die HT-22 N Zellen bereits in die Absterbephase übergehen, die Glu-Res Zellen noch weiter wachsen. Um die Frage zu klären, ob die Zelldichte ausschlaggebend für die erhöhten Absorptionswerte im MTT-Test ist, wurde für einige Zeitpunkte die Zellzahl ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass die maximale Zellzahl bei den Glu-Res Zellen um bis zu 30% höher lag, als bei den HT-22 N Zellen. Die höheren Werte im MTT-Test spiegeln demnach wahrscheinlich ein dichteres Wachstum der Glu-Res Neurone wider und nicht unbedingt eine Veränderung der Stoffwechselrate, obwohl letzteres anhand der vorliegenden Daten nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

4.1.3 Selektive Resistenz gegen oxidative Stressoren

Gegen oxidativen Stress resistente HT-22 Klone wurden durch Langzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid bzw. Natriumglutamat etabliert (s. Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2). Um die Toleranz der so entstandenen H₂O₂-Res und Glu-Res Neurone gegenüber den oxidativen Stressoren zu testen, wurden Toxizitätstests durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.5 A zu erkennen ist, zeigen Glu-Res Zellen eine deutlich höhere Resistenz gegenüber Glutamat als die parentalen, nicht resistenten HT-22 N Zellen. Abbildung 4.5 B kann entnommen werden, dass H₂O₂-Res Zellen deutlich toleranter auf Wasserstoffperoxid-Zugabe reagieren als HT-22 N Zellen.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse des Toxizitätstests auch eine erhöhte Resistenz der H₂O₂-Res und Glu-Res Zellen gegenüber dem oxidativen Stressor, gegen den sie nicht selektiert wurden: H₂O₂-Res Zellen sind auch gegen Glutamat resistent und Glu-Res Zellen weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid auf (vgl. Abbildung 4.5). Dies ist insofern ein interessantes Ergebnis, als dass es darauf hindeutet, dass oxidativer Zelltod, obwohl durch unterschiedliche Toxine ausgelöst, letztendlich über gemeinsame Signalwege ablaufen könnte.

Eine alternative Erklärung für dieses Phänomen wäre jedoch, dass die Glu-Res und H₂O₂-Res Klone eine nicht-selektive Resistenz gegen eine Vielzahl von Toxinen entwickelt haben. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Verhalten der Zellen tatsächlich um eine selektive Resistenz gegen oxidativen Stress handelt, wurde die Reaktion der Zellen auf unterschiedliche Toxine, die nicht in Verbindung mit oxidativem Stress stehen, untersucht.

Das Sphingolipid-Zersetzungsprodukt Sphingosin ist ein Inhibitor der Protein Kinase C und ein bekannter Auslöser von Apoptose in hippokampalen Neuronen. Der in Abbildung 4.6 A gezeigte Kurvenverlauf, der die Sensibilität der Neurone für Sphingosin widerspiegelt, ist für HT-22 N, Glu-Res und H₂O₂-Res Neurone sehr ähnlich. Es wird deutlich, dass eine Sphingosin-Konzentration von 20 μ M eine nahezu vollständige Abtötung der Zellen aller drei Klone bewirkt.

Staurosporin, ein anderer, jedoch genereller Inhibitor von Protein Kinasen, ist ebenfalls in der Lage, Apoptose in Neuronen aller drei Klone auszulösen (s. Abbildung 4.6 B). Für Staurosporin-

Konzentrationen unter $5 \mu\text{M}$ war allerdings eine um 10% bis 20% erhöhte Überlebensrate der H_2O_2 -Res Zellen im Vergleich zu HT-22 N Zellen feststellbar. Bei Erhöhung der Konzentration auf $10 \mu\text{M}$ kehrte sich der Effekt jedoch um und die Überlebensrate der H_2O_2 -Res Zellen lag im Durchschnitt 12% unter der der HT-22 N Zellen. Insgesamt gleichen sich die Kurvenverläufe für den Toxizitätstest jedoch so stark, dass man kaum von einem veränderten Resistenzverhalten der H_2O_2 -Res Zellen gegenüber Staurosporin sprechen kann.

Bei Gramicidin A handelt es sich um einen Na^+/K^+ -Kanal, der aufgrund von Depolarisation partiellen Zelltod hervorrufen kann. Auch die Zugabe dieses Toxins führte bei allen drei Zellklonen zu einem vergleichbaren Absinken der Überlebensrate (s. Abbildung 4.6 C).

Die Ergebnisse der Toxizitätstests aus den Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen deutlich, dass die H_2O_2 -Res und Glu-Res Klone eine selektive Resistenz gegenüber oxidativen Stressoren aufweisen. Gegenüber anderen Toxinen sind sie in vergleichbarem Masse anfällig wie die parentalen HT-22 N Zellen.

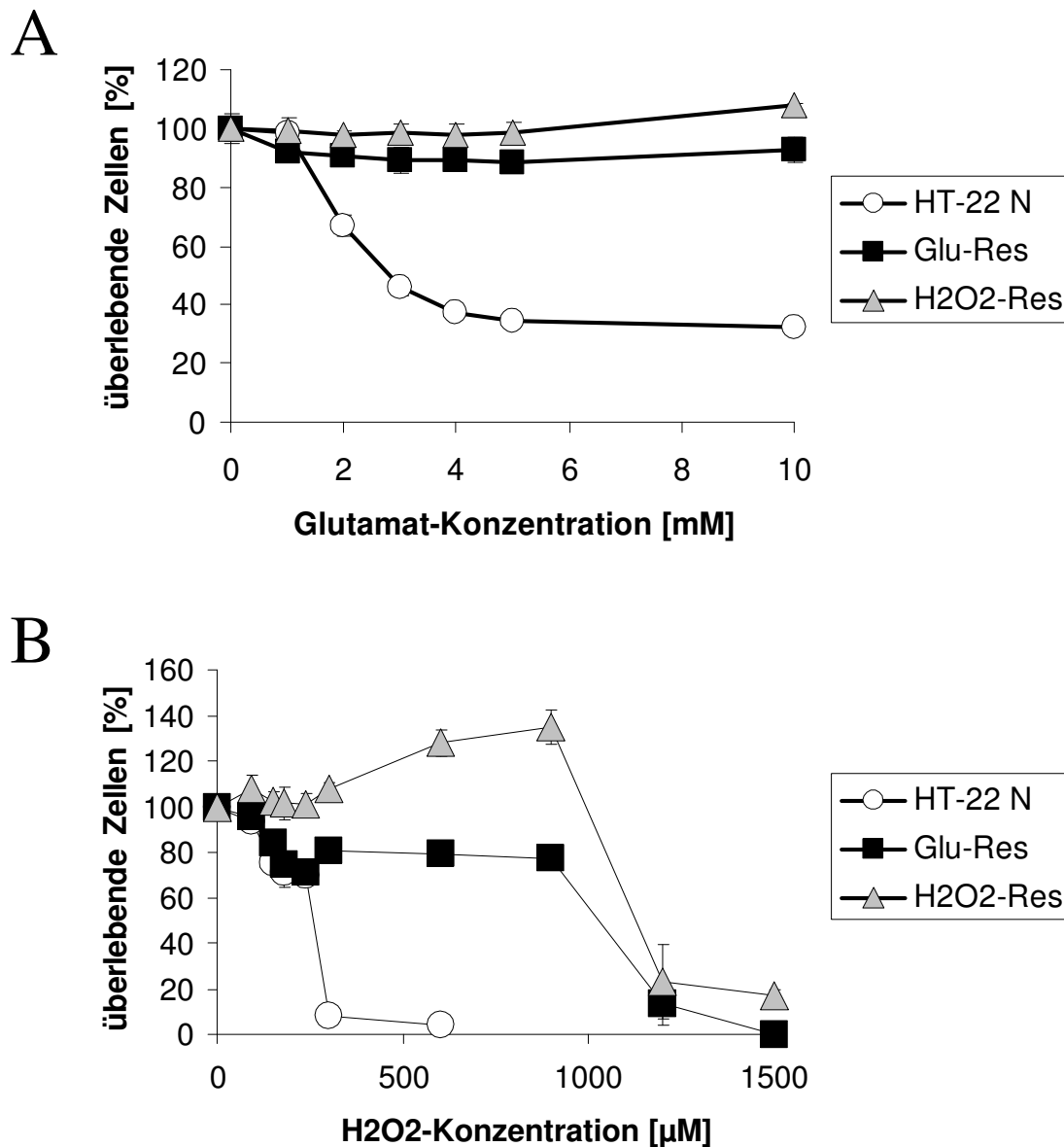


Abbildung 4.5: Ergebnis der Toxizitätstests für die drei Modellzellklone HT-22 N, Glu-Res und H₂O₂-Res mit A: Glutamat und B: Wasserstoffperoxid. Die bei unbehandelten Zellen durch die MTT-Zugabe bewirkte Farbintensität wurde mit einer Überlebensrate von 100% gleichgesetzt. Glu-Res Zellen weisen für alle getesteten Glutamatkonzentrationen eine höhere Resistenz auf als HT-22 N Zellen (Abbildung A; $p < 0.05$, Two Way ANOVA). Es ist zu erkennen, dass Glu-Res Zellen neben einer hohen Resistenz gegen Glutamat auch eine erhöhte Resistenz gegen Wasserstoffperoxid aufweisen (Abbildung B; $p < 0.001$ für Konzentrationen von 300 und 600 μM). Auch die H₂O₂-Res Zellen zeigen neben einer signifikant erhöhten Resistenz gegen Wasserstoffperoxid (Abbildung B; $p < 0.001$ für alle getesteten Konzentrationen, Two Way ANOVA) eine hohe Toleranz für Glutamat (Abbildung A, $p < 0.05$ für alle getesteten Konzentrationen über 1 mM, Two Way ANOVA). Die Glutamat-Toleranz der H₂O₂-Res Zellen übersteigt sogar die der Glu-Res Zellen ($p < 0.001$ für Konzentrationen über 1mM, Two Way ANOVA).

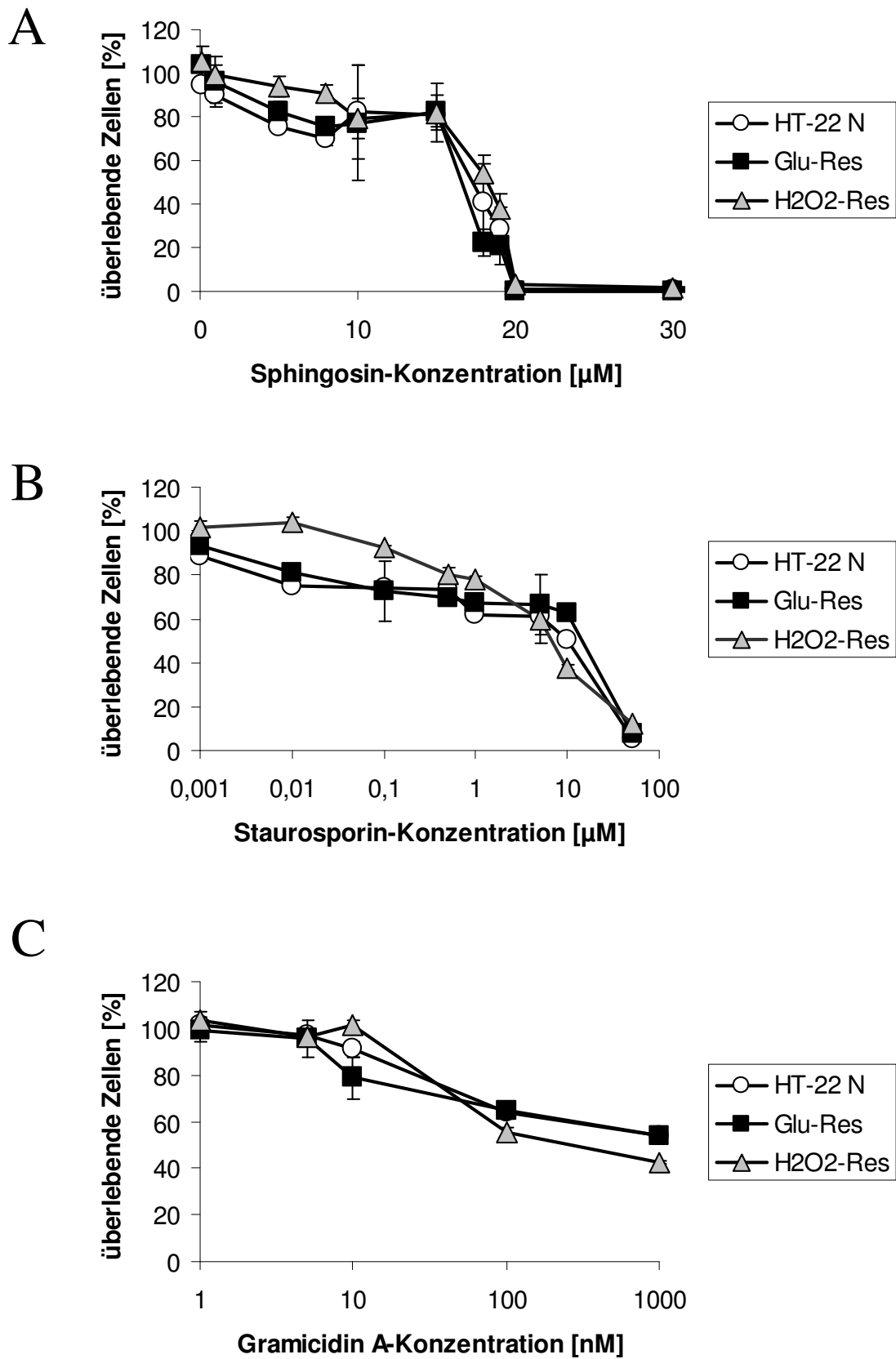


Abbildung 4.6: Ergebnis der Toxizitätstests für A: Spingosin, B: Staurosporin und C: Gramicidin A. Die drei Modellklone reagieren ähnlich auf Zugabe der drei getesteten Toxine, die keinen oxidativen Stress hervorrufen.

4.2 Untersuchung aus der Literatur bekannter Alzheimer-assoziiierter Signalwege

Viele Signalwege werden auf Grund ihrer bereits bekannten Eigenschaften mit dem Nervenzelltod bei Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Vertreter dieser Signalwege wurden untersucht um festzustellen, ob diese Signalwege in die generelle Resistenz gegen oxidativen Stress involviert sind.

4.2.1 Glykogen Synthase Kinase-3 β

Dem Enzym GSK-3 β wird im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt. Nicht nur ist es in der Lage, Tau-Protein zu phosphorylieren, was zur Entstehung eines der pathologischen Merkmale der Krankheit, den Neurofibrillenbündeln, führt, es ist auch eine wichtige Komponente anderer Signalwege wie z.B. dem Wnt-Signalweg (s. Abschnitt 2.1.3) und dem MAPK-Signalweg. Zusätzlich interagiert es direkt mit dem Östrogenrezeptor α (Dr. Sharon Goodenough, persönliche Mitteilung). Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen stellt GSK 3 β ein interessantes Untersuchungsobjekt im Rahmen der in dieser Studie bearbeiteten Fragestellung dar.

Mit Hilfe von Western Blot Experimenten wurden die Proteinspiegel für dieses Enzym in den drei Modell-Klonen verglichen. Dabei wurden drei verschiedene Antikörper zum Nachweis von entweder Gesamt-GSK, durch Phosphorylierung an einem Tyrosinrest aktiviertem GSK (GSK_{tyr}) oder durch Phosphorylierung an einem Serinrest inaktiviertem GSK (GSK_{ser}) verwendet.

Es stellte sich heraus, dass sowohl Glu-Res wie auch H₂O₂-Res Neurone weniger Gesamt-GSK Protein bilden als die nicht resistenten HT-22 N Zellen (s. Abbildung 4.7). Auch die Menge an aktivem GSK_{tyr} ist in beiden resistenten Klonen signifikant niedriger als in HT-22 N Neuronen (s. Abbildung 4.8). Die Menge an durch Serin-Phosphorylierung inaktiviertem GSK-3 β ist dagegen in den Glu-Res Zellen signifikant höher als in den HT-22 N Zellen. Auch in den H₂O₂-Res Zellen ist der Spiegel an GSK_{ser} tendentiell höher als in HT-22 N, die Erhöhung erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

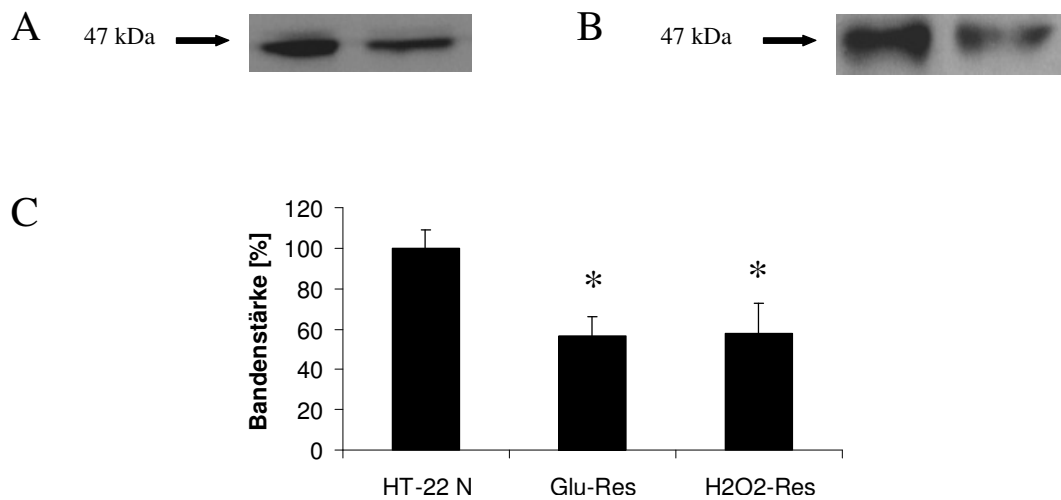


Abbildung 4.7: Western Blot Ergebnis für GSK-Protein. A,B: Typische Beispiele für Western Blots gegen GSK-Protein, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res (A), HT-22 N, H₂O₂-Res (B). C: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für GSK-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Der GSK-Spiegel ist in beiden resistenten Klonen im Vergleich zu nicht-resistenten Zellen erniedrigt (* entspricht $p < 0.001$, One Way ANOVA).

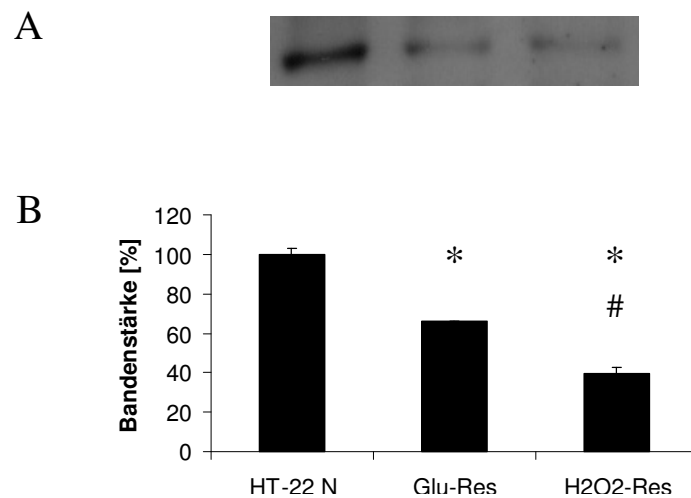


Abbildung 4.8: Western Blot Ergebnis für GSKtyr-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für GSKtyr-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Der GSKtyr-Spiegel ist in beiden resistenten Klonen im Vergleich zu nicht-resistenten Zellen erniedrigt (* entspricht $p < 0.001$, One Way Anova). Der GSKtyr-Spiegel in den H₂O₂-Res Neuronen ist zudem auch signifikant niedriger als der der Glu-Res Neurone (# entspricht $p < 0.001$, One Way ANOVA).

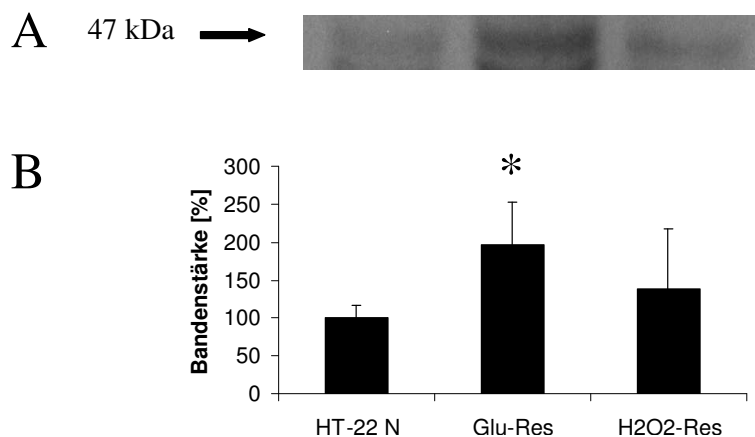


Abbildung 4.9: Western Blot Ergebnis für GSKser-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für GSKser-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Der GSKser-Spiegel ist in den Glu-Res im Vergleich zu den HT-22 N erhöht (* entspricht $p < 0.05$, One Way Anova). Auch in den H₂O₂-Res Neuronen ist der GSKser-Spiegel tendenziell höher als in HT-22 N Zellen. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Diese deutlichen Unterschiede im Phosphorylierungsstatus und in der Gesamtmenge an GSK-3 β Protein zwischen HT22 N und Glu-Res bzw. H₂O₂-Res Zellen legt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym eine Rolle bei der Resistenzvermittlung gegen oxidativen Stress spielt. Um die Hypothese, dass Inhibition von GSK-3 β zu einer erhöhten Toleranz von oxidativen Stressoren führt, näher zu untersuchen, wurde GSK 3 β in nicht resistenten HT-22 N Zellen durch Vorbehandlung mit LiCl inhibiert. Anschließend wurde Glutamat bzw. Wasserstoffperoxid zu den Zellen gegeben und am nächsten Tag ein MTT-Test durchgeführt, bei dem unbehandelte HT-22 N mit den mit LiCl-vorinkubierten Zellen verglichen wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10 dargestellt und zeigt, dass Zellen, bei denen GSK-3 β inhibiert wurde, tatsächlich eine höhere Toleranz gegenüber Glutamat und Wasserstoffperoxid aufweisen als unbehandelte Zellen. Obwohl es zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate kommt, bewirkt die LiCl-Vorbehandlung jedoch keine absolute Resistenz gegen die getesteten Toxine.

Die Inaktivierung von GSK-3 β scheint demnach zwar zu einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress zu führen, jedoch nicht der einzige Mechanismus zur Generation des Resistenzverhaltens zu sein.

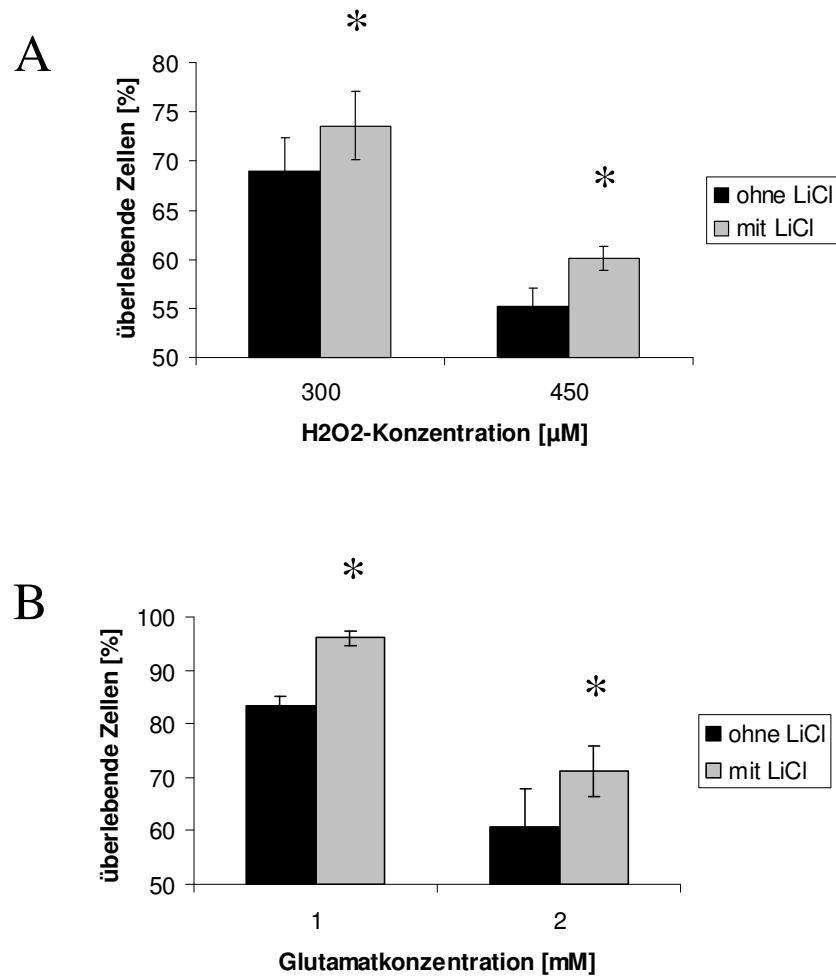


Abbildung 4.10: Toxizitätstest für HT-22 N mit und ohne LiCl-Vorbehandlung. Vorbehandlung mit LiCl (10 mM) zur Inhibition von GSK-3 β erhöht die Resistenz von HT-22 N Neuronen gegen Wasserstoffperoxid (A) und Glutamat (B). (* entspricht $p < 0.05$, Two Way ANOVA)

4.2.2 Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

APP ist ein Protein, dem bei der Alzheimer Pathologie eine entscheidende Rolle zukommt. Durch seine Prozessierung kann das $A\beta$ -Peptid entstehen, das die für die Krankheit typischen Plaques im Gehirn bildet (s. Abschnitt 2.1.1). Einem anderen Produkt der APP-Prozessierung, dem $sAPP\alpha$ wird jedoch eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (De Strooper und Annaert 2000). Es wäre also denkbar, dass eine Veränderung im APP- bzw. $sAPP\alpha$ -Spiegel zum Resistenzverhalten der Neurone gegen oxidative Schädigung beitragen könnte. Die relativen Mengen dieser Proteine wurden deshalb in den Modellzellen verglichen.

Western Blot Experimente mit Antikörpern gegen den C-Terminus des APP-Proteins ergaben keine messbaren Konzentrationsunterschiede für Gesamt-APP-Protein in resistenten und nicht-resistenten Zellen (s. Abbildung 4.11).

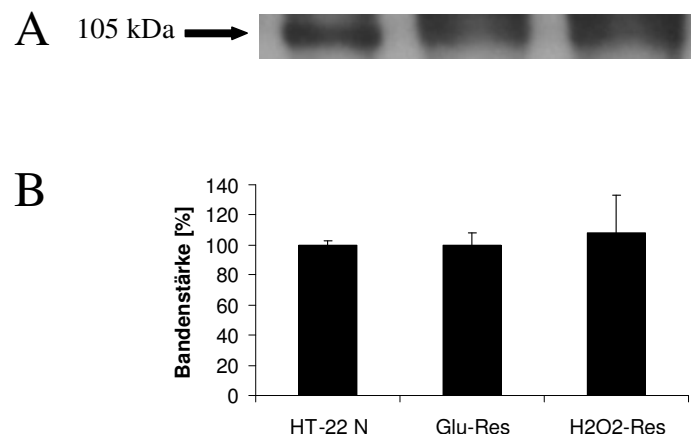


Abbildung 4.11: Western Blot Ergebnis für APP-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H_2O_2 -Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für APP-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Die Bandenstärken für die drei Klone sind nicht signifikant unterschiedlich (One Way ANOVA).

Western Blot Analysen des Zellmediums zur Detektion von $sAPP\alpha$ ergaben eine signifikante Erhöhung der Konzentration dieses Proteins im Überstand der resistenten Zellen (s. Abbildung 4.12). $sAPP\alpha$ wird demnach tatsächlich in Zellen, die gegen oxidativen Stress resistent sind, vermehrt gebildet. Die Erhöhung der $sAPP\alpha$ -Konzentration ist dabei nicht auf eine verstärkte

Bildung des Vorläuferproteins APP zurückzuführen, da die APP-Spiegel in allen drei untersuchten Zellklonen gleich sind (s. Abbildung 4.11). Es muss sich deshalb um eine Veränderung in der Aktivität der α -Sekretase handeln.

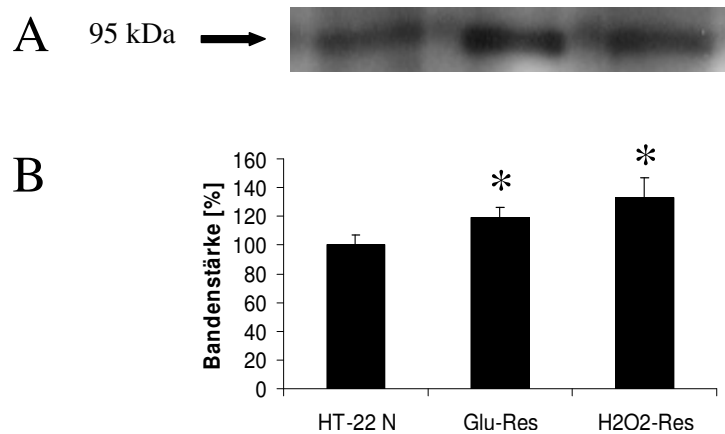


Abbildung 4.12: Western Blot Ergebnis für sAPP α -Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für sAPP-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Die Bandenstärken für Glu-Res und H₂O₂-Res sind signifikant erhöht im Vergleich zur Bandenstärke für HT-22 N (* entspricht $p < 0.05$, One Way ANOVA).

4.2.3 Bcl-2 / Bax Familie

Die Proteine der Bcl-2 / Bax Familie sind ebenfalls interessante Kandidaten für Untersuchungen im Rahmen dieser Studie, da sie in die Regulation des Zelltods involviert sind. Die Wirkungen von Bcl-2 und Bax sind gegenläufig: Während Bcl-2 protektiv wirkt, führt die Aktivität von Bax eine Zelle in die Apoptose.

Vorausgesetzt, dass in dem hier verwendeten Zellmodell Unterschiede in der Expression dieser Gene vorliegen, wäre eine nahe liegende Erwartung, dass Bcl-2-Protein verstärkt in den resistenten Zellen gebildet wird, während Bax dort in geringerer Menge vorliegt. Tatsächlich findet man sowohl auf Protein-Ebene als auch auf RNA-Ebene einen erniedrigten Bax-Spiegel in den resistenten Zellen im Vergleich zu den HT-22 N Zellen (s. Abbildung 4.13, 4.20 und 4.22). Eine verstärkte Bildung von Bcl-2 Protein in den resistenten Zellen konnte jedoch nicht

nachgewiesen werden. Erstaunlicher Weise ist der Proteinspiegel für Bcl-2 vielmehr in den resistenten Zellen deutlich niedriger als in den nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.14). Es scheint demnach so, als sei der Bcl-2 / Bax Signalweg in den gegen oxidativen Stress resistenten Modellzellen generell supprimiert. Dabei ist auffällig, dass diese Veränderung im Bcl-2 / Bax Signalweg sowohl für Glu-Res als auch für H₂O₂-Res Neurone gilt. Der Effekt ist in den H₂O₂-Res Zellen stärker als in den Glu-Res Zellen. Ob dies jedoch mit der höheren Toleranz der H₂O₂-Res Zellen für oxidative Stressoren (s. Abbildung 4.5) in Verbindung steht, ist unklar. Der Bcl-2 / Bax Signalweg ist scheinbar ein Mechanismus, dem im Zusammenhang mit Resistenzverhalten Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die gefundenen Veränderungen nicht für oxidative Resistenz selektiv sind. Untersuchungen an Zellmodellen, die gegen andere Stressoren resistent sind, sollten darüber Aufschluss geben können.

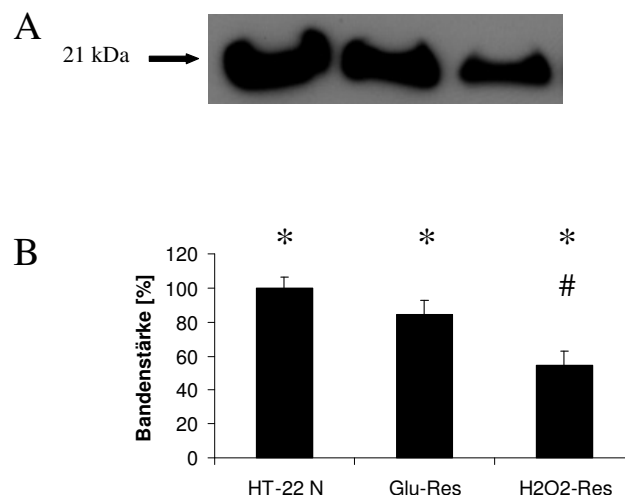


Abbildung 4.13: Western Blot Ergebnis für Bax-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für Bax-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. In den resistenten Zellen wird signifikant weniger Bax-Protein gebildet als in den nicht resistenten Zellen (* entspricht $p < 0.001$, One Way ANOVA). Der Unterschied zwischen H₂O₂-res und HT-22 N ist dabei größer als der zwischen Glu-Res und HT-22 N. Der Bax-Spiegel in den H₂O₂-Res Neuronen ist zudem auch signifikant niedriger als der in den Glu-Res Neuronen (# entspricht $p < 0.001$, One Way ANOVA).

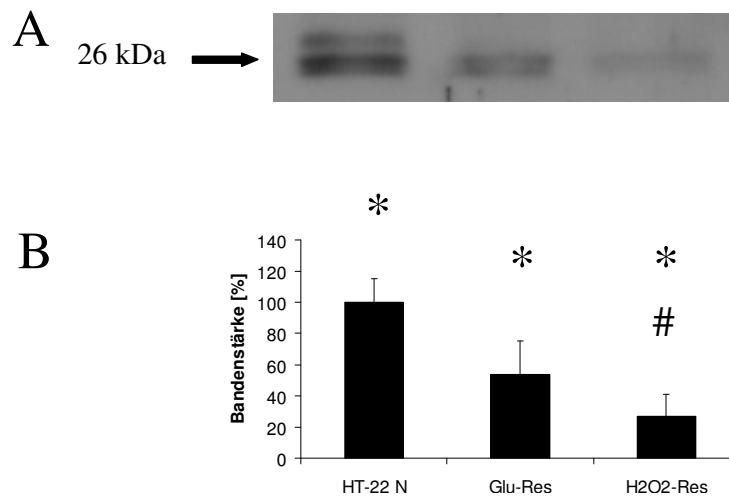


Abbildung 4.14: Western Blot Ergebnis für Bcl-2-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res. B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für Bcl-2-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. In den resistenten Zellen wird signifikant weniger Bcl-2-Protein gebildet als in den nicht resistenten Zellen (* entspricht $p < 0.001$, One Way ANOVA). Der Unterschied zwischen H₂O₂-Res und HT-22 N ist dabei größer als der zwischen Glu-Res und HT-22 N. Der Bcl-2-Spiegel in den H₂O₂-Res Neuronen ist zudem auch signifikant niedriger als der in den Glu-Res Neuronen (# entspricht $p < 0.05$, One Way ANOVA).

4.2.4 MAP Kinase

Der MAP Kinase (Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MAPK) Signalweg gehört zu den wichtigsten, durch oxidativen Stress aktivierten Signalwegen und zeichnet sich durch eine hohe Komplexität aus. MAPK reguliert die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB (cAMP response element binding protein), Elk-1 (ETS-like gene) und c-Myc (cellular homologue of myelocytomatosis virus 29 oncogene), und führt so zu einer Veränderung der Genexpression (Sweatt, 2001). MAPK kann außerdem das bereits in Abschnitt 4.2.1 erwähnte GSK-3 β Protein inaktivieren und auch zu einer verstärkten Sekretion von sAPP α führen (Dr. Sharon Goodenough, persönliche Mitteilung). Da für Glu-Res und H₂O₂-Res Neurone sowohl eine erhöhte Menge an inhibiertem GSK-3 β Protein als auch eine verstärkte Produktion von sAPP α festgestellt werden konnte (s. Abbildungen 4.9 und 4.12), scheint eine Rolle für MAPK in der Vermittlung von oxidativer Resistenz in diesem Zellmodell möglich.

Western Blot Experimente ergaben keinen Unterschied im Gesamtproteinspiegel von MAPK zwischen resistenten und nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.15). Die Menge an phos-

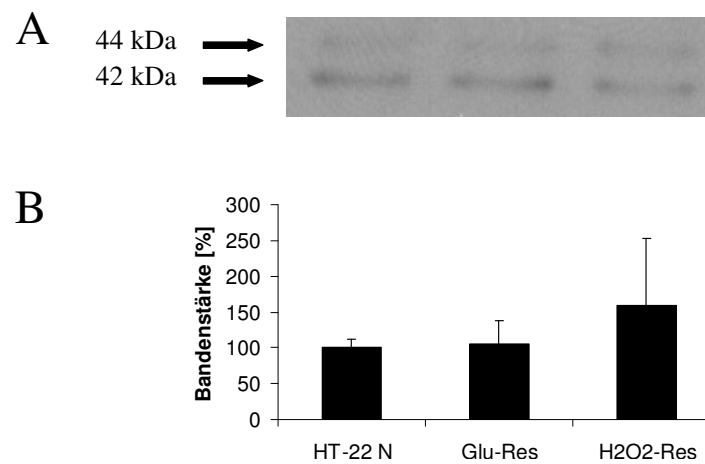


Abbildung 4.15: Western Blot Ergebnis für MAPK-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für MAPK-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Die Proteinspiegel unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (One Way ANOVA).

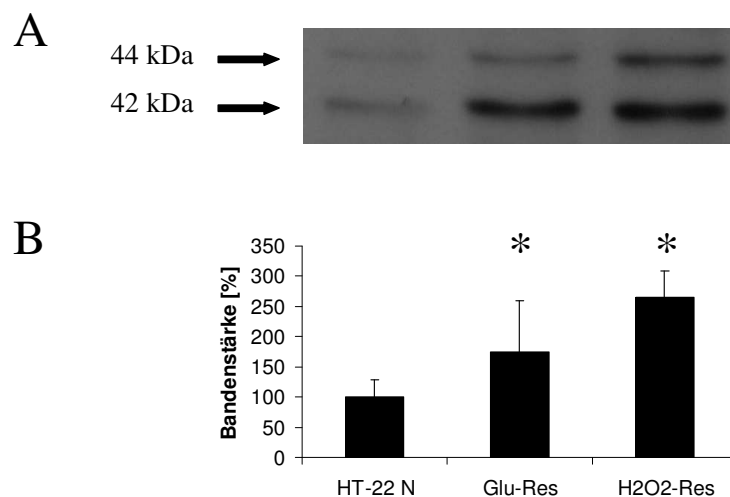


Abbildung 4.16: Western Blot Ergebnis für pMAPK-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für MAPK-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Der pMAPK Spiegel ist sowohl in den Glu-Res als auch in den H₂O₂-Res Zellen signifikant höher als in nicht resistenten Zellen (* entspricht $p < 0.05$, One Way ANOVA).

phosphorylierter und somit aktivierter MAPK war jedoch in den Glu-Res und H₂O₂-Res Neuronen signifikant größer als in den HT-22 N Neuronen (s. Abbildung 4.16).

Eine Modifikation im Phosphorylierungsstatus von MAPK könnte demnach möglicherweise zur

Entstehung von Resistenz gegen oxidativen Stress beitragen. Ob der erhöhte pMAPK-Spiegel in den resistenten Zellen tatsächlich für die beobachteten Veränderungen in GSK₃ β - und sAPP α -Protein verantwortlich ist, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.2.5 PARP

Auch das Enzym Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) wird in der Literatur mit Zelltod in Verbindung gebracht. Dabei ist umstritten, ob PARP eine pro- oder antiapoptotische Funktion ausübt. In jedem Fall ist PARP ein interessantes Untersuchungsobjekt für diese Studie.

Obwohl in einigen Western Blots für Glu-Res Zellen eine Erhöhung im PARP-Spiegel festgestellt werden konnte (s. Abbildung 4.17 A), erwies sich der Unterschied insgesamt als nicht signifikant (s. Abbildung 4.17 B). Da in den H₂O₂-Res Zellen keine tendentielle Erhöhung des PARP-Spiegels feststellbar war, scheint dieses Enzym zumindest nicht zur generellen Vermittlung von oxidativer Resistenz beizutragen.

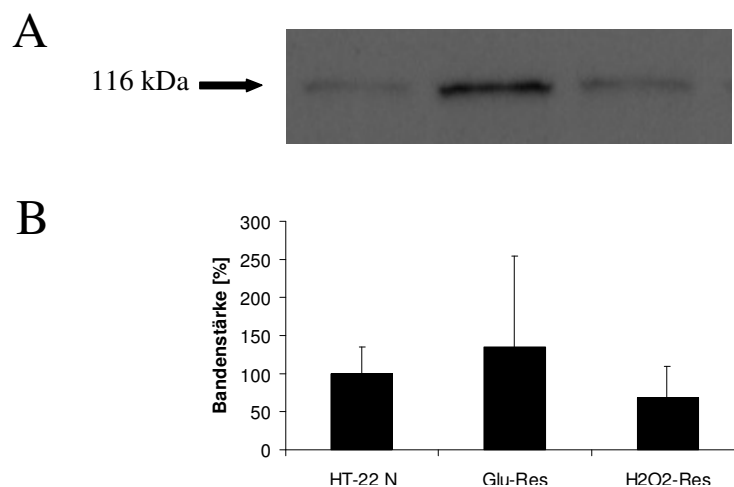


Abbildung 4.17: Western Blot Ergebnis für PARP-Protein. A: Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res; B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für PARP-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Der PARP-Spiegel ist in den Glu-Res Zellen im Vergleich zu HT-22 N und H₂O₂-Res Zellen tendentiell erhöht. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$, One Way ANOVA).

4.2.6 Seladin-1

Über das Protein Seladin-1 ist noch nicht allzu viel bekannt, da es erst vor relativ kurzer Zeit entdeckt wurde. Es erwies sich in den bislang durchgeführten Versuchen jedoch als protektiv gegen $A\beta$ -Toxizität und allgemeinen oxidativen Stress und ihm wird eine Rolle bei der Regulation des Zelltods zugeschrieben (s. Abschnitt 5.5). Die Verbindung von Seladin-1 zu oxidativem Stress im allgemeinen und Morbus Alzheimer-assoziiertem Nervenzelltod im besonderen macht diese Oxidoreduktase für die in dieser Studie untersuchte Fragestellung besonders interessant. Für die in dieser Arbeit verwendeten Glu-Res und H_2O_2 -Res Neurone konnte keine signifikante Veränderung im Proteinspiegel von Seladin-1 im Vergleich zu HT-22 N Neuronen festgestellt werden (s. Abbildung 4.18). Die Resistenz gegen oxidativen Stress scheint demnach in den hier verwendeten Modellzellen nicht über eine verstärkte Bildung von Seladin-1 vermittelt zu werden. Posttranslationale Modifikationen und damit verbundene Aktivitätsänderungen können mit dem hier verwendeten Antikörper jedoch nicht ausgeschlossen werden.

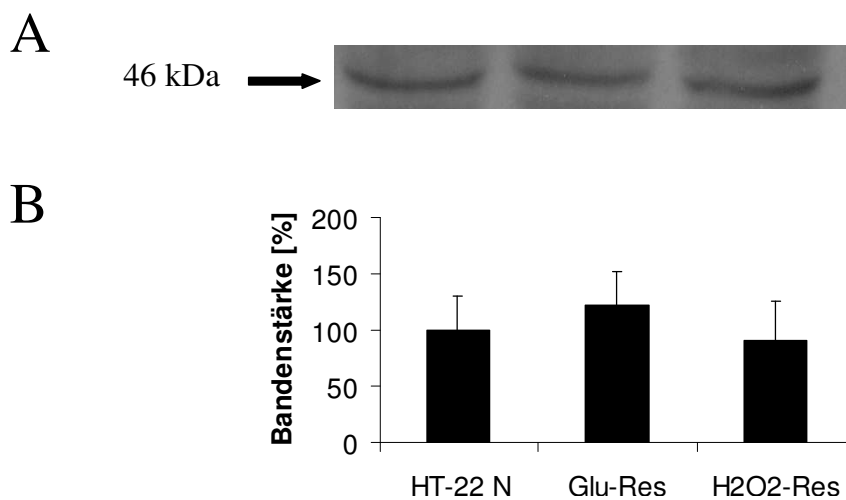


Abbildung 4.18: Western Blot Ergebnis für Seladin-1-Protein. A: Typisches Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, H_2O_2 -Res, Glu-Res; B: Zusammenfassung aller Western Blot Ergebnisse für Seladin-1-Protein. Aufgetragen ist die mittlere Bandenstärke, wobei der Wert für HT-22 N mit 100% gleichgesetzt wurde. Zwischen den Seladin-1-Spiegeln besteht kein Unterschied (One Way ANOVA).

4.2.7 Hitzeschock-Proteine

Als Antwort auf Stress bilden Zellen eine Vielzahl von Proteinen, die sogenannten Hitzeschock-Proteine (Hsp), die den durch Stress induzierten Schädigungen entgegenwirken sollen. Dies geschieht z.B., indem die Bildung von Chaperonen eingeleitet wird, welche bewirken, dass abnormal gefaltete Proteine ihre ursprüngliche Konfiguration zurück erhalten.

Bei Zellen, die unter Dauerstress gehalten werden, wie die in dieser Studie verwendeten Glu-Res und H₂O₂-Res Zellen, stellt sich die Frage, ob die Hitzeschock-Antwort in irgendeiner Form modifiziert ist. Es wäre denkbar, dass die Hsp in den gestressten Zellen als Schutzmechanismus konstitutiv gebildet werden, oder dass die Hitzeschock-Antwort stärker ausfällt als die in den nicht kontinuierlich gestressten Zellen. Ebenso ist es jedoch möglich, dass in Folge der Adaption an den Dauerstress weniger Hitzeschock-Proteine gebildet werden als in den nicht resistenten Zellen.

Die Untersuchung aller bekannten Hsp wurde im Rahmen dieser Studie nicht angestrebt, da möglichst viele verschiedene Signalwege untersucht werden sollten. Stellvertretend für die Hitzeschock-Proteine wurde deshalb nur die Bildung von Hsp70 im Western Blot überprüft.

Aus Abbildung 4.19 ist zu entnehmen, dass Glu-Res und H₂O₂-Res Neurone dieses Protein nicht konstitutiv bilden. Wie am Beispiel der Glu-Res Zellen gezeigt, ist die Induktion einer Hitzeschock-Antwort noch immer möglich. Zu einer drastischen Verstärkung der Hsp70-Bildung in den resistenten Zellen kommt es nicht, obwohl die Bande der Glu-Res Zellen in dem in Abbildung 4.19 dargestellten Western Blot etwas stärker ist als die der HT-22 N Zellen.

Ein weiteres Indiz dafür, dass eine Verstärkung der Hitzeschock-Antwort in den hier verwendeten Zellen nicht zur Resistenz gegen oxidativen Stress beiträgt, fand sich beim Vergleich der Mengen an gebildeter Hsp86-RNA in Glu-Res und HT-22 N Zellen durch das Gen Expression Array „Maus PathwayFinder-1“. Abbildung 4.20 ist zu entnehmen, dass Glu-Res Zellen deutlich weniger RNA für dieses Hsp bilden als HT-22 N Neurone.

Die Untersuchung der Hsp erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nur stichprobenartig und ist somit unvollständig. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Unterschiede in den Proteinspiegeln einzelner Hsp zwischen resistenten und nicht resistenten HT-22 Neuronen bestehen. Dass das Resistenzverhalten der hier verwendeten Modellzellen auf eine generell

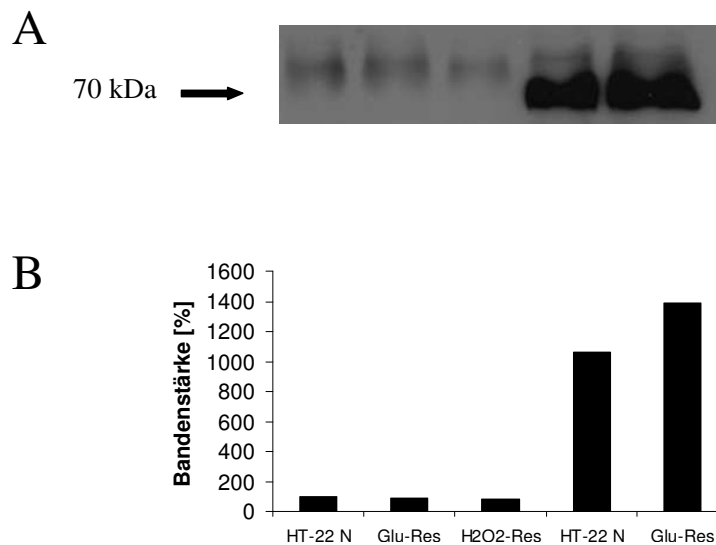


Abbildung 4.19: Western Blot Ergebnis für Hsp70-Protein. A: Beispiel eines Western Blots, Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res ohne Hitzeschock; HT-22 N, Glu-Res nach Hitzeschock (15 min bei 44°C). B: Quantifizierung des Western Blots. Resistente Zellen zeigen keine konstitutive Hitzeschock-Antwort. Allerdings kann die Hitzeschock-Antwort induziert werden.

verstärkte Hitzeschock-Antwort zurückzuführen ist, erscheint jedoch unwahrscheinlich.

4.2.8 Gen Expression Arrays

Eine Möglichkeit, die Expression vieler Gene zu vergleichen, besteht in der Verwendung von Gen Expression Arrays (GEArrays). Es handelt sich hierbei um zwei identische Membranen, auf die spezifische cDNA Fragmente einiger Gene, die im Zusammenhang mit bestimmten Signaltransduktionswegen stehen, aufgebracht sind. Indem nun die Membranen mit radioaktiv markierter cDNA aus den zu vergleichenden Zellklonen hybridisiert werden, kann das Expressionsprofil der Zellklone für die auf der Membran aufgetragenen Gene verglichen werden.

Der gleichzeitige Vor- und Nachteil dieser Methode ist die Limitierung der getesteten Gene. Ein Vorteil ist dies deswegen, weil Signalwege, die für die jeweilige Fragestellung interessant sind, gezielt untersucht werden können. Ein Nachteil entsteht daraus, dass auf diese Weise die Entdeckung neuer Gene praktisch ausgeschlossen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene GEArrays verwendet: „Mouse PathwayFinder-1“, „Mouse Cancer PathwayFinder Q Series“ und „Mouse Apoptosis Q Series“ von Biomol.

Die dazugehörigen Membranen wurden mit cDNA aus Glu-Res und HT-22 N Neuronen hybridisiert.

Maus PathwayFinder-1 GEArray

Der „Mouse PathwayFinder-1“ GEArray dient zur Auffindung von Expressionsunterschieden in acht wichtigen bekannten Signaltransduktionswegen. Diese Signalwege sind:

- der mitogene Signalweg
- Stress Signalweg
- NF κ B Signalweg
- NFAT Signalweg
- Anti-Proliferation / TGF β Signalweg
- Wnt Signalweg
- p53-Signalweg
- CREB Signalweg

Es waren cDNA Fragmente von jeweils ein bis sechs wegweisenden Genen dieser Signalwege sowie von den Haushaltsgenen GAPDH und Aktin als Ladekontrollen auf den Membranen aufgetragen. In Abbildung 4.20 A sind die hybridisierten Membranen dieses GEArrays für HT-22 N (links) und Glu-Res (rechts) gezeigt. Die Signale waren nicht für alle aufgebrachten Gene stark genug, um sinnvoll miteinander verglichen werden zu können. In Abbildung 4.20 B sind daher nur die Gene berücksichtigt, die 1. ein Signal ergaben, das für den Vergleich stark genug war und 2. einen Expressionsunterschied zwischen HT-22 N und Glu-Res aufwiesen.

Auffällig ist, dass die Expression von mindestens drei der mit dem p53 Signalweg in Verbindung gebrachten Gene in den Glu-Res Zellen schwächer ist als in HT-22 N Zellen: p53, Bax und Gadd45. p53 kann sowohl Bax als auch Gadd45 aktivieren. Während Bax apoptotische

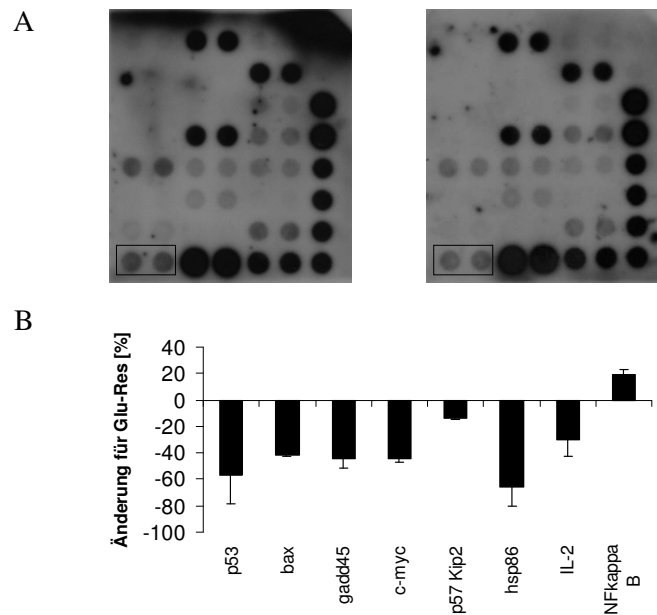


Abbildung 4.20: GEArray „Maus PathwayFinder-1“ A: Membranen des GEArray „Maus PathwayFinder-1“ hybridisiert mit ^{32}P -markierter cDNA aus HT-22 N (links) und Glu-Res Zellen (rechts). Die Hybridisierungssignale für p53 sind exemplarisch durch einen Rahmen markiert. B: Zusammenfassung der unterschiedlich exprimierten Gene

Vorgänge in der Zelle unterstützt, bewirkt Gadd45 einen Stillstand des Zellzyklus. Die geringere Menge an Bax-mRNA bestätigt das in Abbildung 4.13 gezeigte Western Blot Ergebnis. Dort wurde gezeigt, dass auch der Proteinspiegel von Bax in den Glu-Res Zellen geringer ist als in den HT-22 N Zellen.

Dem p53-Signalweg wird generell eine wichtige Rolle bei der Tumor Suppression zugeschrieben. Die schwächere Expression der dazugehörigen Gene in den hier verwendeten resistenten Zellen könnte bedeuten, dass der sonst durch oxidativen Stress über den p53-Signalweg ausgelöste Zelltod in den Glu-Res Neuronen unterdrückt wird.

Weitere mit Tumoren in Verbindung stehende Gene sind c-Myc und p57 (Kip2). Auch für diese Gene wurde eine verminderte Expression in den Glu-Res Neuronen gefunden. Das Protein, das durch das c-Myc Gen kodiert wird, ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Zielgenen sowohl aktivieren als auch unterdrücken kann. Seine Überexpression, die Merkmal vieler humaner Krebserkrankungen ist, führt zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G2-Phase

(Felsher et al., 2000). Eine Verbindung zu p53 wurde aufgezeigt, indem Felsher und Kollegen feststellten, dass ein Funktionsverlust von p53 dem c-Myc induzierten Zellzyklusstopp entgegenwirkt (Felsher et al., 2000). Auch p57 (Kip2) kann bewirken, dass der Zellzyklus angehalten wird. Der Zellzyklusstopp geschieht in diesem Falle in der G1-Phase. p57 (Kip2) ist die Bezeichnung für einen Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor. Die Inhibition von Kinasen ist ein wichtiger Mechanismus, über den der Effekt von Wachstumsfaktoren auf eine Zelle vermindert werden kann.

Eine Expressionsänderung von mit Tumorbildung in Verbindung gebrachter Gene wie z.B. p53 und c-Myc wird auch im Zusammenhang mit einer Reaktion der Zelle auf Stress diskutiert.

Die verminderte Expression dieser Gene in den Glu-Res Zellen deutet darauf hin, dass Signalwege, die bei gestressten Zellen normaler Weise zum Wachstumsstopp oder Zelltod führen, in diesen Zellen unterdrückt werden und so möglicherweise zur Resistenz gegen oxidativen Stress beitragen.

Wichtige Stressgene sind auch die bereits in Abschnitt 4.2.7 erwähnten Hitzeschock-Proteine. Obwohl für Hsp70 im Western Blot Versuch keine Änderung im Proteinspiegel zwischen Glu-Res und HT-22 N Zellen feststellbar war (s. Abbildung 4.19), wurde im „Mouse PathwayFinder-1“ GEArray eine verringerte Expression von Hsp86 in den Glu-Res Zellen festgestellt. Da die Hitzeschock-Antwort als solche recht komplex ist, stehen diese Ergebnisse nicht unbedingt im Widerspruch zueinander. Es wäre erforderlich, die Expression weiterer Vertreter der Hitzeschock-Proteine an dem Zellmodell zu testen, um sich ein Bild davon machen zu können, inwieweit dieser Signalweg für die Resistenzvermittlung von Bedeutung sein könnte.

Interleukin 2 (IL-2) ist ein Hormon, das vor allem durch seine Rolle bei der Generation und Regulation der Immunantwort bekannt wurde. Es wird jedoch auch als mögliches Wachstumshormon diskutiert (Lowenthal et al., 1985). Auch das IL-2 Gen war in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert als in den HT-22 N Zellen.

Der nukleare Faktor κ B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) war der erste entdeckte Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität durch oxidativen Stress induziert werden kann (Schreck et al., 1991). Lange war unklar, ob $\text{NF}\kappa\text{B}$ eher anti- oder proapoptotische Funktion besitzt. Mittlerweile überwiegt die Ansicht, dass es sich um einen Faktor mit protektiven Eigenschaften handelt. Die Induzierbarkeit seiner Aktivität durch oxidativen Stress macht $\text{NF}\kappa\text{B}$ zu einer interessanten Zielstruktur für die Untersuchungen an dem hier verwendeten Zellmodell.

Wie im Falle einer Expressionsänderung erwartet, wird $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert als in den HT-22 N Neuronen. Die Erhöhung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Spiegels kann also als möglicher Resistenzmechanismus der Glu-Res Zellen gegen oxidativen Stress in Betracht gezogen werden.

Maus Cancer PathwayFinder GEArray

Da der „Maus PathwayFinder-1“ GEArray viele Expressionsunterschiede in Tumor assoziierten Genen aufzeigte, erschien es sinnvoll, einen weiteren GEArray durchzuführen, mit dem speziell Tumor-assoziierte Signalwege untersucht werden konnten. In Abbildung 4.21 A ist eine der beiden Membranen des „Mouse Cancer PathwayFinder Q Series“ dargestellt. Abbildung 4.21 B zeigt eine Zusammenfassung der mit diesem Array entdeckten Expressionsunterschiede.

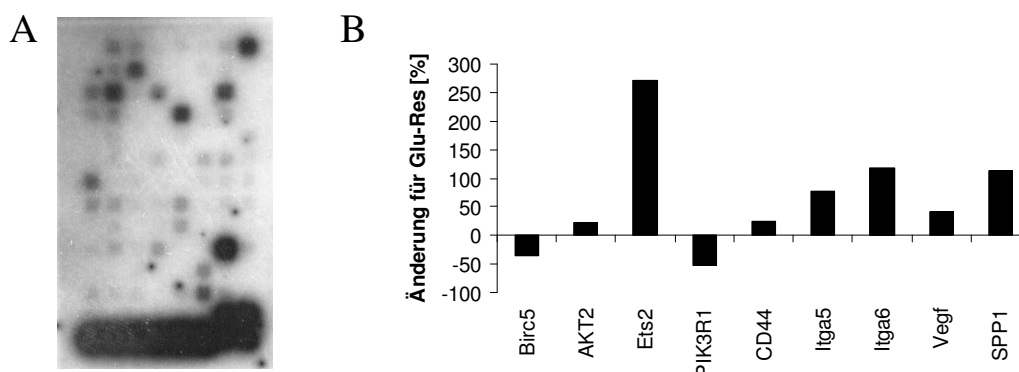


Abbildung 4.21: GEArray „Maus Cancer PathwayFinder“. A: Beispiel einer hybridisierten Membran B: Zusammenfassung der unterschiedlich exprimierten Gene. Fehlerbalken konnten nicht erstellt werden, da nur bei einer Membran die Hybridisierung für beide Klone funktioniert hat.

Birc5 (Survivin) ist ein Apoptose Inhibitor Protein, das Zellzyklus-abhängig exprimiert wird. Es assoziiert während der G2/M Phase der Mitose mit den Mikrotubuli der Kernteilungsspindel (Li et al., 1998). Wird die Interaktion zwischen Birc5 und den Mikrotubuli gestört, verliert Birc5 seine antiapoptotische Wirkung und es kommt zu einer erhöhten Aktivität von Caspase 3, einem Enzym, das in Apoptosevorgänge involviert ist (Tamm et al., 1998). Eine Überexpression von Birc5 geht mit vielen humanen Krebskrankungen einher (LaCasse et al., 1998).

Obwohl Birc5 dem Zelltod entgegenwirkt, ist seine Expression in den Glu-Res Zellen erstaunlicherweise erniedrigt. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe des Maus Apoptose GEArrays bestätigt (s. Abbildung 4.22). Das Argument, dass sich die Mehrzahl der resistenten Neurone in einer anderen Zellzyklusphase befunden haben könnten als die nicht resistenten Neurone, scheint daher eher unwahrscheinlich. Ähnlich der beobachteten verringerten Bcl-2-Bildung (s. Abbildung 4.14) widerspricht dieses Ergebnis den Erwartungen und könnte möglicherweise ein Indiz dafür sein, dass ein Zellschicksal-entscheidender Signalweg in den Glu-Res Neuronen weitgehend ausgeschaltet ist. Sowohl die Ursache als auch die Bedeutung der erniedrigten Birc5 Expression in den Glu-Res Zellen ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Protein-Serin/Threonin Kinase AKT 2 wurde als Onkogen in verschiedenen Tumoren bekannt. Kürzlich wurde jedoch auch das Verhalten von AKT 2 im Zusammenhang mit verschiedenen Arten von Stress untersucht (Yuan et al., 2002; Bacus et al., 2002). Dabei wurde festgestellt, dass AKT2 dem durch Stress bedingten programmierten Zelltod entgegen wirken kann. Es wurden Hinweise dafür gefunden, dass dies über die Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase Signalwegs geschehen kann oder indem AKT2 die Stress Kinase JNK über Aktivierung des NF κ B Signalwegs inhibiert.

In den Glu-Res Zellen wurde eine im Vergleich zu HT-22 N Zellen erhöhte Expression von AKT2 festgestellt, was möglicherweise zu der erhöhten Resistenz dieser Neurone gegen oxidativen Stress beitragen könnte.

Der größte Expressionsunterschied, der im Rahmen des „Mouse Cancer PathwayFinder“ GE-Arrays zu Tage trat, lag in dem Gen für ein Proto-Onkogen namens Ets2, das als Transkriptions-

faktor fungiert. Die Menge an Ets2-cDNA betrug in den Glu-Res Neuronen etwa 270% von der in den HT-22 N Zellen gefundenen cDNA Menge. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Expression von Ets2 Zellen vor Apoptose schützen kann (Sevilla et al., 1999). Ein Signalweg, über den Ets2 dabei dem Zelltod entgegenwirkt, ist ein Bestandteil des Bcl-2 Signalwegs. Zu den Zielgenen von Ets2 gehört Bcl-x_L, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, welches in der Lage ist, das proapoptotische Protein Bax zu inhibieren (Sevilla et al., 1999; Sevilla et al., 2001). Die erhöhte Expression von Ets2 könnte zusammen mit dem erniedrigten Bax-Proteinspiegel (s. Abbildung 4.13) dafür sprechen, dass der durch Bax vermittelte Zelltod in den Glu-Res Zellen stark reduziert wird.

Die p85 α Untereinheit der Phosphatidylinositol3 Kinase (PIK3R1) ist ein Onkogen, das in vielen Tumoren mutiert ist (Philp et al., 2001). Eine Zerstörung des PIK3R1-Gens auf einem der beiden Chromosomen führt zu einer erniedrigten Apoptoserate, die über eine verstärkte Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat Produktion ausgelöst wird und mit einer erhöhten Aktivität von Akt verbunden ist (Ueki et al., 2002).

In den Glu-Res Neuronen wurde eine schwächere Expression von PIK3R1 festgestellt als in den nicht resistenten HT-22 N Zellen. Dies entspricht den Erwartungen, die sich aufgrund der bislang durchgeführten Studien für den Fall einer Expressionsänderung zwischen den beiden Klonen ergeben.

CD44 ist ein Glykoprotein und eines der am häufigsten vorkommenden Zelladhäsionsmoleküle. Seine Verbindung zu Tumoren besteht darin, dass man bei einigen Krebszellen eine charakteristische Kombination von CD44 Varianten findet, die aus der Expression verschiedener Exons desselben Gens resultieren. Die CD44 Varianten beeinflussen die Stärke der Metastasebildung der Tumore (Wallach-Dayana et al., 2001).

Da CD44 ein Transmembranmolekül ist, wird vermutet, dass es in die Transduktion von extrazellulären Signalen ins Zellumen verantwortlich sein könnte. Eine gestörte Weiterleitung von Signalen in die Zelle kann zu der Bildung von Tumoren führen.

CD44 ist auch im Zusammenhang mit der Immunreaktion von Zellen bekannt, da in aktivierten

T-Zellen die Expression von CD44 angeregt wird. Bei der für die Glu-Res Zellen festgestellten leichten Erhöhung der CD44 Expression könnte es sich daher um einen Nebeneffekt der Stimulation der Zellen mit Glutamat handeln. Der Beitrag einer verstärkten CD44 Expression zum Aufbau von Resistenz scheint eher unwahrscheinlich, da bislang eine Ausschaltung dieses Gens und nicht seine verstärkte Expression mit einer erhöhten Resistenz in Verbindung gebracht wurde (McKallip et al., 2002).

Itga5 und Itga6 sind die alpha 5 bzw. alpha 6 Untereinheit von Integrin, einem Membranrezeptor, dem ähnlich wie CD44 eine Rolle bei der Zelladhäsion und Migration zugeschrieben wird. Auch die Expression dieser Gene ist in den Glu-Res Zellen im Vergleich zu HT-22 N Zellen erhöht. Integrin wurde bereits mehrfach eine antiapoptotische Funktion nachgewiesen (Georges-Labouesse et al., 1996; Wijesekera et al., 1997; Corley et al. 2001) und könnte daher auch zu der erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress in Glu-Res Zellen beitragen.

Vegf (vascular endothelial growth factor) spielt eine Rolle bei der Angiogenese, d.h. der Bildung neuer Blutgefäße. Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. Ischämie oder der Bildung von Tumoren, ist die Expression von Vegf oft erhöht (De Falco et al., 2002). Vegf wirkt antiapoptotisch, indem es die Expression von Hsp90 erhöht, welches wiederum die Bcl-2 Expression moduliert (Dias et al., 2002).

Die Vegf Expression ist in den Glu-Res Neuronen höher als in den HT-22 N Zellen. Eine Erhöhung des Bcl-2 Spiegels konnte bei Glu-Res Zellen zwar nicht festgestellt werden (s. Abbildung 4.14), eine protektive Wirkung von Vegf durch einen anderen Mechanismus kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Besonders interessant ist die nachgewiesene Verbindung von einer verstärkten Vegf Expression mit Ischämie, welche ebenfalls mit der Bildung von oxidativem Stress einhergeht. Die Expressionsänderung von Vegf in den gegen oxidativen Stress resistenten Glu-Res Zellen könnte also ein Teil eines zelleigenen Schutzmechanismus gegen oxidative Schädigungen sein.

Das Gen „Sekretiertes Phosphoprotein 1“ (SPP1) kodiert für das Protein Osteopontin (OPN), welches in vielen humanen Karzinoma und in beschädigtem Gewebe gebildet wird. Vergleicht man die Überlebensrate von Zellen mit und ohne OPN *in vitro*, so stellt man bei den Zellen ohne OPN eine geringere Überlebensrate fest als bei den OPN-produzierenden Zellen (Crawford et al., 1998).

In den Glu-Res Neuronen ist SPP1 stärker exprimiert als in den HT-22 N Neuronen. In Anbetracht der in der Literatur beschriebenen antiapoptotischen Wirkung des Genprodukts ist es denkbar, dass die verstärkte SPP1 Expression zur Resistenz in den Glu-Res Zellen beiträgt.

Interessant ist auch, dass OPN ein Ligand von CD44 ist, welches ebenfalls in den Glu-Res Zellen verstärkt exprimiert wird. Da die verstärkte Expression von CD44 aber auch ein Nebenprodukt der Glutamatbehandlung sein könnte, sollte auch für die erhöhte SPP1 Expression in Betracht gezogen werden, dass es sich um einen resistenzunabhängigen oder zumindest CD44-unabhängigen Effekt handelt.

Maus Apoptose GEArray

Eine weitere Gruppe von Signalwegen ist für die Suche nach Genen, die zur Resistenz gegen oxidativen Stress beitragen, ebenfalls von besonderem Interesse. Es handelt sich um Signalwege, die in direkte Verbindung mit Apoptose gebracht werden. Entsprechend wurden die Expressionsprofile für die Gene des „Maus Apoptose“ GEArrays von Glu-Res und HT-22 N Neuronen miteinander verglichen (s. Abbildung 4.22).

Ein wichtiges Resultat des „Maus Apoptose“ GEArrays bestand in der Feststellung, dass die gefundenen Expressionsänderungen die bisherigen Hinweise auf eine Beeinträchtigung des p53-Signalweges in den Glu-Res Neuronen unterstützen. Schon bei Verwendung des „Mouse PathwayFinder-1“ GEArrays wurde festgestellt, dass einige Gene des p53-Signalwegs in Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert sind als in den nicht resistenten Vergleichszellen. Dabei handelte es sich um die Gene von p53 selbst sowie von einigen Proteinen, die von p53 beeinflusst werden. Auch die Expression der Gene ATM und Mcl1 ist in Glu-Res Zellen modifiziert. Bei den Genprodukten von ATM und Mdm2 handelt es sich um Proteine, die in der Signaltransduktionskaskade oberhalb von p53 einzuordnen sind und somit das Bild des veränderten

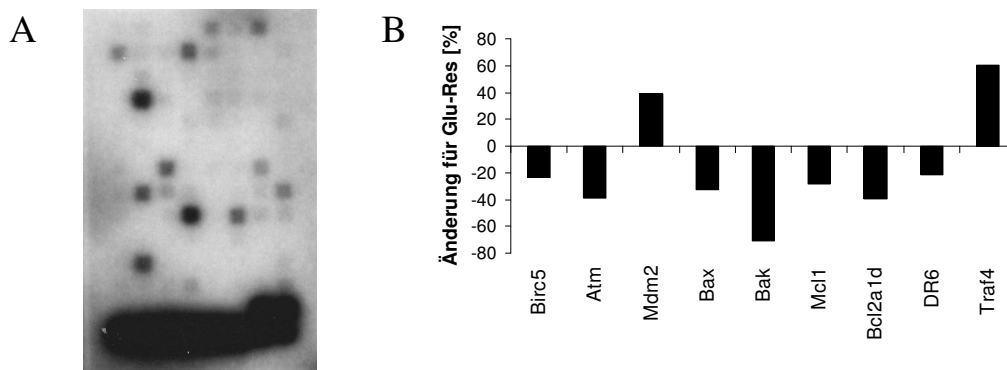


Abbildung 4.22: GEArray „Maus Apoptose“ A: Beispiel einer hybridisierten Membran B: Zusammenfassung der unterschiedlich exprimierten Gene. Fehlerbalken konnten nicht erstellt werden, da nur bei einer Membran die Hybridisierung für beide Klone funktioniert hat.

Signalweges vervollständigen.

Es wurde festgestellt, dass das Gen ATM in den Glu-Res Zellen schwächer exprimiert wird als in HT-22 N Zellen. ATM ist eine Proteinkinase, die nach toxischen Einwirkungen auf die Zelle, z.B. in Form von ionisierender Strahlung, p53 phosphorylieren und somit aktivieren kann (Canman et al., 1998). Eine verminderte Expression von ATM deutet darauf hin, dass die Aktivierung von p53 in den Glu-Res Zellen eingeschränkt wird.

Mdm2 ist ein Onkoprotein, das direkt an p53 binden kann und so dessen Aktivität beeinträchtigt (Xiao et al., 1995). Die Feststellung, dass dieses Protein in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert ist als in den HT-22 N Neuronen, passt gut zu dem bisherigen Bild der Inhibition des p53-Signalweges in den Glu-Res Neuronen.

Auch für eine verminderte Expression der Gene des Bcl-2 / Bax Signalweges wurden erneut Hinweise gefunden. Wieder wurde eine verminderte Expression von Bax festgestellt, was die bisherigen Ergebnisse aus Western Blot und Maus PathwayFinder-1 GEArray bestätigt. Ein weiteres proapoptotisches Mitglied dieses Signalweges ist Bak, das in den Glu-Res Zellen ebenfalls schwächer exprimiert ist als in HT-22 N Zellen.

Mcl1 ist ein Gen, das große Sequenz-Ähnlichkeiten mit Bcl-2 aufweist und dem genau wie Bcl-2 antiapoptotische Funktionen zugeschrieben werden (Kozopas et al., 1993). Auch für dieses Gen wurde in den Glu-Res Zellen eine verminderte Expression festgestellt, genauso wie für das

Bcl-2 verwandte Protein A1d (Bcl2A1d).

Apoptose kann durch Bindung bestimmter Cytokine, wie z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF), an ihre Rezeptoren ausgelöst werden. In der TNF-Rezeptor Familie wurden in letzter Zeit einige neue Mitglieder gefunden, darunter auch der Death Receptor-6 (DR6). Das Gen für diesen „Todesrezeptor“ erwies sich als in Glu-Res Zellen schwächer exprimiert als in HT-22 N Zellen. Es kann daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass in den Glu-Res Neuronen die Signalweiterleitung über solche Rezeptoren eingeschränkt ist und Apoptosevorgänge so gar nicht erst ausgelöst werden.

TRAF4 (TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 4) gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder mit TNF-Rezeptoren interagieren und als Verbindungsglied zwischen diesen und den von ihnen aktivierten Signalwegen fungieren. TRAF Proteine gelten als wichtige Regulatoren von Apoptose und zellulärer Stressantwort, wobei einige Mitglieder dieser Proteinfamilie proapoptotisch wirken und andere antiapoptotisch. Traf4 wird eine antiapoptotische Wirkung nachgesagt (Ye et al., 1999; Busuttill et al., 2002).

Es wurde festgestellt, dass TRAF4 in Glu-Res Neuronen stärker exprimiert wird als in HT-22 N Zellen. Damit wurde ein zweiter Hinweis darauf gefunden, dass in den Glu-Res Zellen der TNF-Signaltransduktionsweg in einer Weise moduliert sein könnte, der zum Überleben der Neurone in Stress-Situationen beiträgt.

4.3 Suche nach neuen Genen

Die bis hierhin aufgeführten Versuche dienten dazu, Modulationen zwischen resistenten und nicht resistenten Zellen in bekannten Signaltransduktionswegen aufzudecken. Es wurden dabei solche Signalwege untersucht, von denen nach heutigem Wissensstand eine Expressionsänderung am wahrscheinlichsten schien. Das nächste Ziel dieser Arbeit bestand darin, Expressionsunterschiede in Genen aufzudecken, die bislang nicht in direkten Zusammenhang mit Stress oder der Regulation von Zelltod in Verbindung gebracht werden. Zum Lösen dieser Aufgabe wurden die Methoden des Differential Displays und der Chip-Hybridisierung angewendet.

4.3.1 Differential Display

Die Idee des Differential Displays (DD) besteht darin, das Expressionprofil von Zellen zu vergleichen, indem man aus diesen Zellen RNA isoliert, daraus markierte cDNA unter gleichen Bedingungen herstellt und diese cDNA dann nebeneinander auf einem Gel aufträgt. Unterschiede in der Bandenstärke deuten auf eine veränderte Expression des Gens hin, das von dieser Bande repräsentiert wird. Die Identität des Gens wird über eine Sequenzanalyse festgestellt.

Mit der DD-Methode wurden die Expressionsprofile von HT-22 N und Glu-Res Neuronen miteinander verglichen. Banden, für die auf dem Gelphoto zwischen HT-22 N und Glu-Res deutliche Unterschiede bezüglich der Intensität zu erkennen waren (s. Abbildung 4.23), wurden aus dem Gel ausgeschnitten und analysiert.

Insgesamt wurde die cDNA aus 19 verschiedenen Banden einer weiteren Analyse unterzogen. Von den ausgeschnittenen 19 Banden waren 11 bei den HT-22 N Neuronen stärker ausgeprägt als bei den Glu-Res Neuronen, für die restlichen 8 war das Verhältnis umgekehrt. Die Länge der isolierten cDNAs betrug zwischen 100 und 500 bp.

4.3.2 Verifizierung der Gene aus dem Differential Display

Da erfahrungsgemäß die Anzahl der falschpositiven Resultate beim Differential Display recht hoch ist, war es sinnvoll, vor der Sequenzierung die Expressionsunterschiede für die 19 Kandidatengene mit Hilfe einer anderen Methode zu überprüfen.

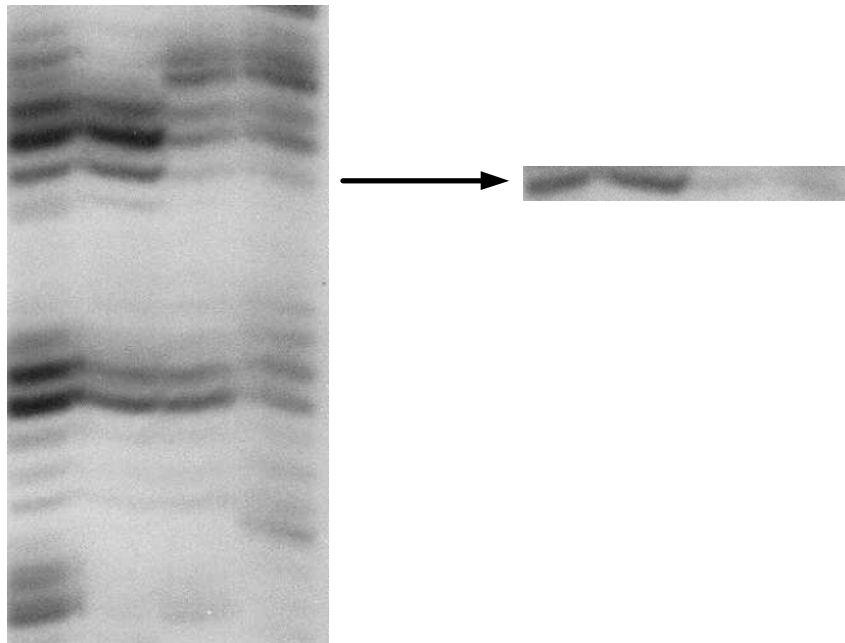


Abbildung 4.23: Auszug aus einem Differential Display Gelphoto. Die jeweils linken beiden Banden bestehen aus cDNA der HT-22 N Zellen, die rechten Banden aus cDNA der Glu-Res Zellen. Eine Bande, die für die weitere Analyse verwendet wurde, ist rechts isoliert dargestellt.

Die Überprüfung der DD-Ergebnisse erfolgte zunächst mittels Slot Blot Technik. Bei dieser Technik werden gleiche Mengen RNA aus den zu vergleichenden Zellen auf kleine Flächen einer Membran aufgebracht. Diese RNA wird mit aufgereinigter, markierter cDNA aus einer der 19 ausgeschnittenen Banden hybridisiert. Die anschließende Hybridisierung mit einer Sonde für das Haushaltsgen GAPDH dient der Ladekontrolle für die geblottete RNA. Mit Hilfe dieser Methode konnte der Expressionsunterschied für 6 der 19 DD-Genkandidaten verifiziert werden (für Beispiele siehe Abbildungen 4.24 und 4.25). Die Gene von 4 dieser bestätigten cDNAs waren in den Glu-Res Zellen schwächer exprimiert als in den HT-22 N Zellen, für 2 Gene war das Verhältnis umgekehrt.

Bei den anschließenden Sequenzierungen stellte sich heraus, dass es sich bei zwei der Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit um unterschiedliche Abschnitte desselben Gens handelt. Es handelt sich dabei um die „Mus musculus adult male cerebellum cDNA, RIKEN (AK005204)“ (AMC), das den Ergebnissen des DDs und des Slot Blots zufolge in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert ist als in den HT-22 N Neuronen. In Abbildung 4.26 ist die Sequenz dieser cDNA aufgeführt.

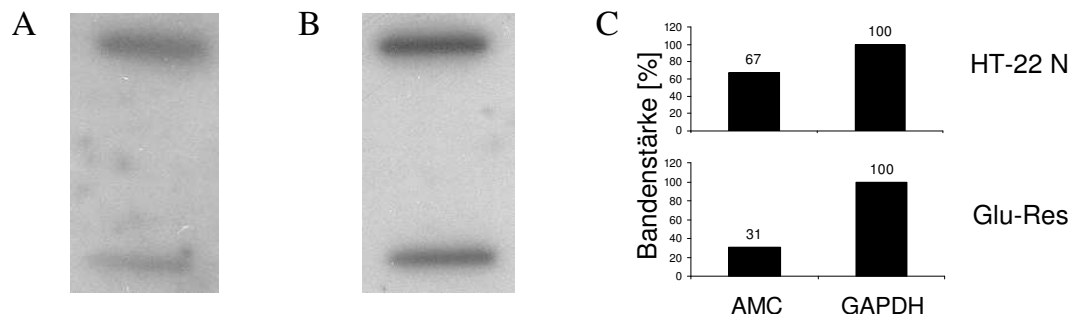


Abbildung 4.24: Verifizierung des im DD gefundenen Expressionsunterschieds für das AMC-Gen mit Hilfe der Slot Blot Technik. Oben ist jeweils die RNA aus HT-22 N Neuronen, unten RNA aus Glu-Res Neuronen auf die Membran aufgebracht. A: Ergebnis der Hybridisierung mit der cDNA-Sonde für das AMC-Gen B: Ergebnis der Hybridisierung derselben Membran wie in A mit einer GAPDH-Sonde

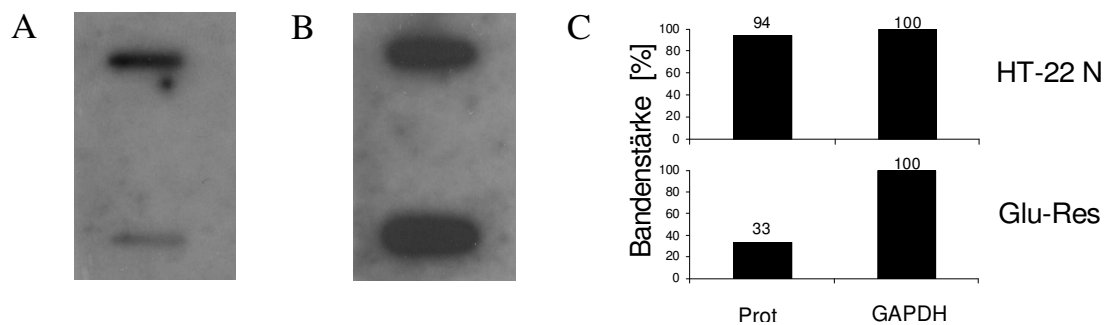


Abbildung 4.25: Verifizierung des im DD gefundenen Expressionsunterschieds für das Proteasom-Gen mit Hilfe der Slot Blot Technik. Oben ist jeweils die RNA aus HT-22 N Neuronen, unten RNA aus Glu-Res Neuronen auf die Membran aufgebracht. A: Ergebnis der Hybridisierung mit der cDNA-Sonde für das Proteasom-Gen B: Ergebnis der Hybridisierung derselben Membran wie in A mit einer GAPDH-Sonde

Eine der im DD gefundenen cDNA-Sequenzen war zu 97% mit dem AMC-Sequenzabschnitt von Base 761 bis Base 1058 identisch, die andere cDNA entsprach zu 98% den Basen 1467 bis 1562 der AMC-cDNA. Die Unterschiede zwischen den gefundenen Sequenzen und den in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen könnten entweder auf Fehler bei der Sequenzanalyse zurückzuführen sein oder auf ein mit dem AMC verwandtes, bislang in den Datenbanken jedoch nicht gespeichertes Gen hindeuten.

Mus musculus Adult Male cerebellum cDNA, RIKEN

```

1 gagagaggag cagcgggctt gtcgttggtg gcggtggcgg tggccgccat ggatcgcgat
61 gaggaacctc tgtccgcgag gccggcgctg gagaccgaga gcctgcgatt cctgcacgtg
121 acagtgggct ccctgctggc cagctatggc tggtagatcc tcttcagctg catcctactc
181 tacattgtca tccagaggct ctcccttcga ctgagggctt tgaggcagag acagctggac
241 caagccgaga ctgttctgga acctgatggt gttgttaagc ggcaagaggc ttagcagct
301 gctcgtttga gaatgcagga agatctaaat gcccaagttg aaaaacataa ggaaaaacta
361 agacagcttg aagaagagaa aagaagacag aagattgaaa tgtgggacag catgcaagaa
421 ggcagaagtt acaaaagaaa ttcaggaagg cctcaggaag aagatggtcc tggaccttct
481 acttcatctg tcatcccca aaggaaaatct gacaaaaagc ctttgcgagg aggtggttat
541 aaccctctga cgggtgaagg ggggtggaacc tgctcctgga gacctggacg caggggcca
601 tcatctggcg gctgaaacta agactcttgt tagtgctcgt ctgacattag caaggtgaac
661 ctttaaccct caactcaatt gccttacgca cactttcaca gtgactggcc aaggagaggt
721 ggggcttttc tctgttctaa actacttgta ctttaagggc tttggtcagc atgagatata
781 gacattgcc a ttaggccaca ctctagacaa gacagccatg gcttttatgg ctgctggcta
841 gttgtaggt tgaaggcttc ttgctgttta gcagacttca taaagaaggc ccagtgatga
901 tactttgggg tagaagtcc tgcctggcagg atggctctctg tgacgggatg cgttgaatga
961 tgtcttcctt ataaatggtg aaccaccag tgaggattac tgatgttcac agttgacggg
1021 qtttqcttct qtatatttat tttatqtaca qaacttttq

```

Abbildung 4.26: Datenbank-Sequenz der AMC-cDNA. Das Startcodon ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Für eine cDNA konnte keine Übereinstimmung mit in den Sequenzdatenbanken gespeicherten Genen gefunden werden. Die Sequenz dieser cDNA lautet:

```

CTGTAAGTGTGCTCATGAGTTTGTATCTCCAAAATTACAGCCACAGTCTTTCTACT
GAAAGACGGAGGGCATT TTTTGTGCATTTCTGTAGAGTGGTAAGGCTCTGGTTTTTCATG

```

Die weiteren cDNAs wiesen starke Sequenz-Homologien mit folgenden Genen auf:

- Mus musculus, proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3 (BC005783)
(100% Übereinstimmung mit Basen 1202 bis 1518)
- Mus musculus proliferin 2 (Plf2), mRNA (NM 011118.1)
(100% Übereinstimmung mit Basen 696 bis 824)
- Mus musculus adult male lung cDNA, RIKEN (AK004725)
(99% Übereinstimmung mit Basen 2701 bis 2823)

Die unterschiedliche Expression des AMC-Gens und des Proteasom-Gens (Sequenz s. Abbildung 4.27) in den Glu-Res und HT-22 N Zellen wurde mit Hilfe von Northern Blots ein weiteres Mal verifiziert. Der Vorteil der Northern Blots gegenüber den Slot Blots besteht darin, dass

unspezifische Bindungen der Sonde an die RNA anhand des Bandenmusters auf dem Membranphoto zu erkennen sind. Für einen Northern Blot wird die RNA vor der Übertragung auf eine Membran zunächst in einem Gel aufgetrennt. Bindet die Sonde spezifisch an eine RNA, so sollte auf dem Photo nur eine Bande zu sehen sein. Bindet die Sonde unspezifisch an mehrere RNA-Sequenzen, so sind auch auf dem Photo Schwärzungen an unterschiedlichen Stellen auf der Membran zu erkennen.

Mus musculus, Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3, clone MGC:12017

```

1  cggaacgctg ggcgcgtcag gaatcgccgg tgaagttctc cacgggtgga gagaagacgt
61  tgagaaaggc tgcgctgggc tccctcaggg gctcgtgcgc actcccagtt tcggcctctt
121 catgcaggaa atgaatctgc tgcgcagccc cgagagtcca gtgactcggc aggagaagat
181  ggcgaccgtg tgggatgaag ctgagcaaga tggcattggg gaggaggtgc tcaagatgtc
241  cacggaagag attgtccagc gcacacggct gttagacagc gagatcaaga tcatgaagag
301  tgaagtattg cgagtcaccc atgaactcca agccatgaaa gacaaaatca aagagaacag
361  tgagaaaatc aaagtgaaca aaaccctgcc gtaccttgtc tccaatgtca tcgagttgct
421  ggacgttgac cccaatgacc aggaggagga tggtgccaac attgacctgg actctcagag
481  gaagggcaag tgtgcggtga tcaaaacttc taccgcagac acatacttcc tgccagtgat
541  tgggttggtg gatgcagaaa agctgaagcc aggagacctg gtgggtgtga acaaagactc
601  ctatctgata ctggagaccc tgcccactga atatgactct cgggtgaagg ccatggaggt
661  ggacgagcgg cccacggagc aatacagtga catcgggggc ctggacaagc agatccagga
721  gctggtggaa gccattgtct tgctatgaa ccacaaagag aagtttgaga acttgggtat
781  ccagccccc aaggagtgct tgatgtatgg gccgcctgga acagggaaga ctctgcttgc
841  ccgagcctgt gctgctcaga ccaaggccac cttcttgaag ctggcaggcc ctgagctggt
901  acagatgttt attggagatg gcgccaagct ggtccgtgat gcttttgccc tggccaagga
961  gaaggcacca tctattatth tcatagacga attggatgcc attggtacca aacgcttcga
1021 cagtgaaaag gcaggagacc gagaggtgca gaggaccatg ctggagctac tgaaccagct
1081  ggacggcttt cagcccaaca ctcaagtgaa ggttaattgca gccactaaca gggtggacat
1141  cctggatcca gccctgctgc gctcaggccg cctagaccgc aagattgagt ttccaatgcc
1201  caacgaggag gccagagcca gaatcatgca gatccactca cggaaatgta atgtcagttc
1261  tgatgtgaac tatgaagagc tggctcgggt cactgatgac ttcaatggag cccagtgcaa
1321  ggccgtgtgt gtggaggcgg gtatgatcgc attgcccagg ggagccacgg aactcactca
1381  tgaggactac atggaggcca tcctggaggt tcaggccaag aagaaagcca acctacaata
1441  ctatgectag gggacacctc tagtctgtcc gctggtctga gggctaaagt tgataataaa
1501  agtggttttc tgttcttcaa aaaaaaaaaa aaaa

```

Abbildung 4.27: Datenbank-Sequenz der Proteasom-cDNA. Das Startcodon ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Wie in den Abbildungen 4.28 und 4.29 zu sehen ist, ergab die Northern Blot Hybridisierung mit AMC- und Proteasom-cDNA Sonden jeweils eine spezifische Bande, die die schwächere Expression der Gene in den Glu-Res Neuronen bestätigt.

Nachdem nun gezeigt war, dass die Expression des AMC- und des Proteasom-Gens in den Glu-Res Neuronen schwächer ist als in den HT-22 N Neuronen, sollte die Expression dieser Gene auch *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden In-situ-Hybridisierungen an Gehirnschnitten von Mäusen durchgeführt.

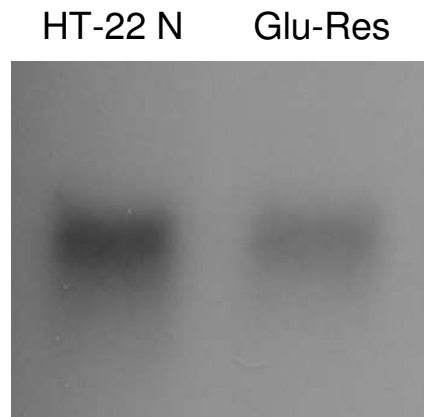


Abbildung 4.28: Verifizierung der unterschiedlichen Expression des AMC-Gens mit Hilfe der Northern Blot-Methode.

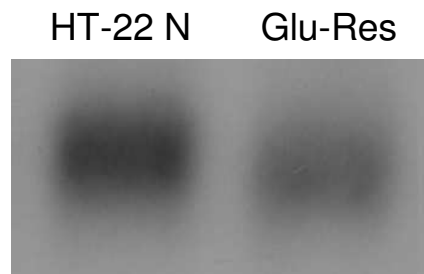


Abbildung 4.29: Verifizierung der unterschiedlichen Expression des Proteasom-Gens mit Hilfe der Northern Blot-Methode.

Die Expression des AMC-Gens erwies sich als generell schwach, während für das Proteasom-Gen in allen Gehirnarealen deutliche Signale sichtbar waren. Die stärkste Expression beider Gene wurde im Hippokampus beobachtet (s. Abbildung 4.30). Die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung lassen vermuten, dass die Gene dort sowohl in Interneuronen als auch in Pyramidenzellen exprimiert werden. Der Hippokampus ist eine Struktur, die besonders sensibel für Morbus Alzheimer-assoziierten oxidativen Nervenzelltod ist. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass AMC-Genprodukt und 26S Proteasom tatsächlich Einfluss auf die Resistenz der Neurone gegen oxidativen Stress nehmen. Neurone, bei denen eine erhöhte Sensitivität für oxidativen Stress festgestellt werden kann, zeigen eine verstärkte Expression dieser Gene, während die Expression bei resistenten Neuronen schwächer ist.

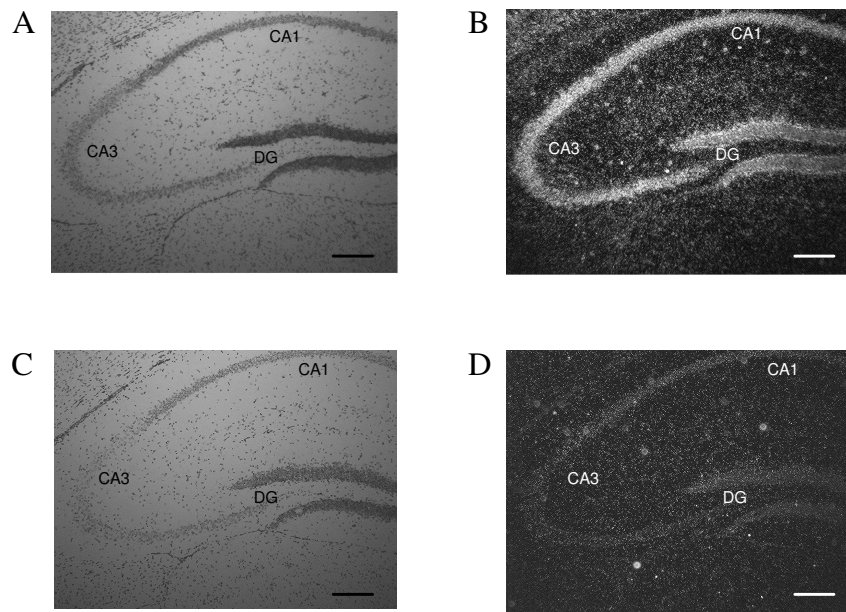


Abbildung 4.30: Ergebnisse der In situ-Hybridisierung. In A und C sind Hellfeldaufnahmen des Hippokampus dargestellt. Die Zellkerne sind mit Toluidinblau gefärbt. In B und D sind die gleichen Bildausschnitte wie in A und C als Dunkelfeldaufnahmen gezeigt. Helle Punkte entsprechen Hybridisierungssignalen für das Proteasom-Gen (B) bzw. das AMC-Gen (D). Die Gene sind sowohl in Interneuronen als auch in Pyramidenzellen exprimiert. Die Balken in A-D entsprechen 150 μm . Die CA1- und die CA3-Region sowie der Gyrus dentatus (DG) sind zur Orientierung in den Bildern beschriftet. Die Hybridisierung mit Kontrollsonden ergab kein Hybridisierungssignal. Die Ansicht im Dunkelfeld war komplett schwarz (Bilder nicht gezeigt).

4.3.3 Chip-Hybridisierung

Bei einer Chip-Hybridisierung kann die Expression von mehreren tausend Genen in zwei Zellpopulationen gleichzeitig verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glas-Chips verwendet, die Sequenzen von über 17000 verschiedenen Mausgenen aus den Genbanken MMSV (Mus musculus sequence verified) und BMAP (Brain Molecular Anatomy Project) enthielten. Die Chips wurden mit markierter cDNA aus HT-22 N bzw. Glu-Res Neuronen hybridisiert. Zur Auswertung wurden die Microarray-Daten nach einem regressionsbasierten Verfahren (Yang et al. 2002) unter Berücksichtigung der Pin-Gruppen normalisiert und arrayweise standardisiert. Globale Expressionsunterschiede zwischen Microarray-Hybridisierungen wurden nach dem für Microarraydaten modifizierten Rank Order PCA-Verfahren ermittelt (Landgrebe et al. 2002). Differenziell exprimierte Gene wurden mit dem Pitman-Permutationstest (Pitman 1937) erfasst, wobei nur Gene ausgewählt wurden, die mindestens um den Faktor 4 reguliert waren. Tabelle 4.1 zeigt die Gene, für die die Auswertung des Chip-Experiments einen signifikanten Expressionsunterschied ergab.

Tabelle 4.1: Chip-Liste

Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI837881	RIKEN cDNA 2010012N15 gene	↓	5,38	41,52
AI429516	small inducible cytokine A19	↓	5,22	37,28
AI413682	Mus musculus common-site lymphoma/leukemia GEF (Clg) mRNA, complete cds	↓	3,94	15,30
AI451582	RIKEN cDNA 0710008D09 gene	↓	3,90	14,89
AI840311	EST	↑	3,71	13,05
AI425960	expressed sequence AV019094	↓	3,22	9,31
AI850094	gelsolin 9	↑	3,20	9,20
AI414907	RIKEN cDNA 2610528K11 gene	↓	3,17	9,00
AI849101	death-associated kinase 2	↑	3,10	8,56
AI413568	complexin 1	↓	3,05	8,31
AI429294	Mus musculus, clone IMAGE:4924122, mRNA	↑	2,98	7,87
AI838267	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	↓	2,95	7,71

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI447728	RIKEN cDNA 3021401A05 gene	↓	2,85	7,20
AI323449	EST	↓	2,81	6,99
AI846508	ESTs	↓	2,79	6,93
AI413898	Mus musculus, clone MGC:27690 IMAGE:4921222, mRNA, complete cds	↓	2,73	6,63
AI325912	RIKEN cDNA 5830400A04 gene	↓	2,73	6,63
AI835246	EST	↓	2,72	6,58
AI836898	NA	↑	2,66	6,30
AI843729	ESTs	↑	2,64	6,25
AI427874	RIKEN cDNA 4930548H24 gene	↑	2,64	6,25
AI429298	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	↑	2,64	6,24
AI413853	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 759, expressed	↑	2,64	6,24
AI450989	NA	↑	2,60	6,07
AI849150	RIKEN cDNA 0610011D08 gene	↑	2,59	6,00
AI838971	signal recognition particle 14 kDa (homologous Alu RNA binding protein)	↓	2,58	6,00
AI845460	ESTs	↑	2,57	5,92
AI326263	calsequestrin 1	↓	2,52	5,75
AI429299	3-oxoacid CoA transferase	↑	2,52	5,72
AI841066	expressed sequence AU040105	↑	2,52	5,72
AI325518	glutathione reductase 1	↓	2,51	5,70
AI851566	NA	↓	2,49	5,63
AI414725	ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	↑	2,46	5,49
AI836456	RIKEN cDNA 2810028A01 gene	↓	2,45	5,48
AI841677	RIKEN cDNA 5730576P14 gene	↓	2,44	5,44
AI836623	expressed sequence AA408566	↓	2,44	5,43
AI413908	EST	↓	2,44	5,42
AI848328	deoxycytidine kinase	↓	2,44	5,42
AI415470	ESTs	↓	2,44	5,41
AI414982	expressed sequence R75174	↓	2,42	5,35
AI428312	ESTs	↑	2,40	5,28
AI413900	EST	↓	2,40	5,28
AI839117	EST	↓	2,39	5,24
AI451119	ESTs	↓	2,38	5,19
AI426520	expressed sequence AI844814	↑	2,37	5,18
AI850416	RIKEN cDNA 2310034L04 gene	↑	2,37	5,17
AI413354	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 7b (Arabidopsis thaliana)	↓	2,33	5,02

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI448380	ESTs	↓	2,32	4,99
AI835972	EST	↑	2,31	4,97
AI836548	Mus musculus, Similar to isopentenyl-diphosphate delta isomerase, clone MGC:8139 IMAGE:3589498, mRNA, complete cds	↑	2,31	4,94
AI450707	ESTs	↓	2,30	4,93
AI839703	expressed sequence AI666798	↓	2,30	4,92
AI835111	eukaryotic translation initiation factor 4A1	↓	2,28	4,85
AI846983	microtubule-associated protein 1 B	↓	2,28	4,85
AI852681	ESTs	↓	2,28	4,84
AI839936	ring finger protein 13	↓	2,27	4,83
AI447818	RIKEN cDNA 3110004L20 gene	↑	2,25	4,75
AI852977	EST	↑	2,25	4,75
AI835616	RNA binding motif protein	↓	2,24	4,74
AI844544	ESTs	↓	2,24	4,73
AI415268	ESTs	↓	2,24	4,72
AI413691	RIKEN cDNA 2010107K23 gene	↓	2,23	4,68
AI666329	expressed sequence AW240694	↓	2,22	4,67
AI843048	associated molecule with the SH3 domain of STAM	↑	2,22	4,65
AI854839	expressed sequence AI173274	↑	2,21	4,62
AI854602	expressed sequence AI854602	↑	2,21	4,61
AI449683	ESTs, Weakly similar to R10F2.5.p [Caenorhabditis elegans] [C.elegans]	↓	2,20	4,59
AI843361	EST	↓	2,19	4,56
AI848749	RAS p21 protein activator 3	↓	2,18	4,53
AI843959	EST	↓	2,17	4,49
AI451583	EST	↓	2,17	4,49
AI413899	expressed sequence AU022695	↓	2,16	4,47
AI326172	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 (zeta, 66/67 kDa)	↑	2,15	4,45
AI848748	Mus musculus, Similar to transmembrane protease, serine 4, clone MGC:29209 IMAGE:5030266, mRNA, complete cds	↓	2,14	4,40
AI839642	ESTs	↓	2,13	4,38
AI850237	solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 14	↑	2,12	4,35
AI451664	ESTs	↓	2,10	4,30
AI427574	mitsugumin 29	↑	2,09	4,27
AI415052	expressed sequence AI447437	↑	2,09	4,27

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI838577	expressed sequence AV028413	↑	2,08	4,22
AI848272	ESTs	↓	2,07	4,19
AI327152	expressed sequence AA408278	↑	2,06	4,17
AI427044	SEC61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)	↓	2,06	4,16
AI848208	ESTs, Highly similar to GLSK RAT GLUTAMINASE, KIDNEY ISOFORM PRECURSOR [R.norvegicus]	↑	2,05	4,15
AI841881	RIKEN cDNA 4432404A22 gene	↑	2,05	4,14
AI844975	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	↑	2,04	4,13
AI413862	Mus musculus, Similar to hypothetical protein FLJ12505, clone MGC:38004 IMAGE:5149750, mRNA, complete cds	↓	2,04	4,11
AI844532	chromobox homolog 3 (Drosophila HP1 gamma)	↑	2,02	4,05
AI413915	keratin complex 1, acidic, gene 4	↓	2,01	4,03
AI843289	ESTs	↑	2,00	4,01
AI662389	RIKEN cDNA 4933439C10 gene	↓	2,00	4,01
AI413603	ESTs	↓	2,00	4,00
AI849111	expressed sequence C79125	↓	1,99	3,97
AI843994	expressed sequence AI893889	↓	1,99	3,97
AI851394	RIKEN cDNA 1300002C13 gene	↑	1,99	3,96
AI413856	RIKEN cDNA 4631426J05 gene	↑	1,99	3,96
AI450704	expressed sequence AI461788	↑	1,98	3,95
AI449520	ESTs	↓	1,98	3,95
AI448386	RIKEN cDNA 6330408J20 gene	↓	1,98	3,95
AI450802	EST	↓	1,97	3,93
AI847839	EST	↑	1,96	3,88
AI853180	ESTs	↓	1,95	3,87
AI848848	RIKEN cDNA C920006C10 gene	↑	1,95	3,87
AI838871	synaptosomal-associated protein, 25 kDa	↑	1,95	3,85
AI415044	ESTs	↓	1,94	3,84
AI449041	RIKEN cDNA 2310007F21 gene	↓	1,94	3,84
AI324141	kinesin light chain 1	↓	1,94	3,84
AI841577	heat shock protein, 74 kDa, A	↑	1,94	3,83
AI835277	EST	↓	1,92	3,80
AI851706	mitogen activated protein kinase kinase kinase 12	↑	1,92	3,79
AI842716	testis lipid binding protein	↑	1,92	3,79
AI841875	ESTs	↑	1,91	3,77

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI850024	ESTs	↓	1,90	3,73
AI425946	NA	↓	1,90	3,73
AI848215	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	↓	1,89	3,71
AI838301	ESTs	↑	1,89	3,70
AI429725	ESTs	↓	1,88	3,69
AI449750	ESTs	↑	1,88	3,69
AI839271	RIKEN cDNA 0610007A03 gene	↓	1,87	3,65
AI849556	serine protease inhibitor, Kazal type 4	↓	1,86	3,63
AI842822	ESTs	↑	1,86	3,62
AI844116	ESTs	↑	1,85	3,61
AI843512	ESTs, Moderately similar to 2109260A B cell growth factor [H.sapiens]	↓	1,84	3,57
AI841895	RIKEN cDNA 9130422I10 gene	↑	1,83	3,57
AI450829	expressed sequence BB118941	↑	1,83	3,56
AI840534	expressed sequence AU042952	↓	1,83	3,55
AI849074	ESTs	↑	1,82	3,53
AI846146	Werner syndrome homolog (human)	↑	1,81	3,52
AI853254	RIKEN cDNA 5530401C11 gene	↓	1,81	3,50
AI450163	RIKEN cDNA 1190004A11 gene	↓	1,80	3,49
AI841536	NA	↓	1,80	3,49
AI661106	ESTs	↓	1,80	3,49
AI839729	bromodomain-containing 2	↓	1,80	3,48
AI836065	ESTs	↓	1,79	3,47
AI854481	ESTs	↑	1,79	3,46
AI839395	RIKEN cDNA 1500035H01 gene	↑	1,78	3,44
AI841326	adaptor protein complex AP-1, gamma 1 subunit	↓	1,78	3,43
AI843282	ESTs	↑	1,77	3,40
AI842432	ESTs, Highly similar to A56136 jagged protein precursor - rat [R.norvegicus]	↓	1,76	3,40
AI854120	RIKEN cDNA 1110020G17 gene	↓	1,76	3,39
AI848966	actin-related protein 8 homolog (S. cerevisiae)	↓	1,75	3,36
AI842856	ESTs	↑	1,75	3,36
AI841869	expressed sequence AI836081	↑	1,74	3,35
AI464383	ESTs, Moderately similar to hypothetical protein FLJ21062 [Homo sapiens] [H.sapiens]	↓	1,74	3,35

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI464479	carbohydrate sulfotransferase 2	↓	1,74	3,34
AI450148	NA	↓	1,74	3,33
AI850823	ESTs	↑	1,73	3,32
AI845153	ESTs	↑	1,73	3,31
AI452234	NA	↑	1,73	3,31
AI848968	RIKEN cDNA 1700124P09 gene	↑	1,72	3,30
AI845024	RIKEN cDNA C920006C10 gene	↑	1,72	3,29
AI839852	EST	↓	1,72	3,29
AI836718	expressed sequence AI838772	↓	1,71	3,27
AI840657	RIKEN cDNA 2810007J24 gene	↑	1,70	3,25
AI840922	phosphatidylserine synthase 2	↑	1,70	3,25
AI851888	expressed sequence AI848451	↓	1,70	3,25
AI844606	ESTs	↑	1,69	3,23
AI851102	myosin binding protein C, cardiac	↑	1,69	3,23
AI835279	EST	↓	1,69	3,22
AI846798	follistatin-like 3	↓	1,68	3,20
AI848811	ESTs	↑	1,67	3,19
AI836165	EST	↑	1,67	3,19
AI846656	ESTs	↑	1,67	3,19
AI847627	RIKEN cDNA 2810428C21 gene	↑	1,67	3,19
AI849954	EST	↓	1,66	3,17
AI430908	calpain, small subunit 1	↑	1,66	3,15
AI847830	expressed sequence AU023707	↓	1,65	3,15
AI843490	expressed sequence AI841723	↓	1,65	3,14
AI449433	trichorhinophalangeal syndrome I (human)	↑	1,65	3,14
AI841368	EST	↑	1,65	3,14
AI840013	casein kinase II, alpha 2, polypeptide	↑	1,65	3,14
AI661088	expressed sequence AI661024	↓	1,65	3,14
AI836136	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 260, expressed	↑	1,65	3,13
AI854752	radixin	↓	1,64	3,11
AI849442	expressed sequence AI848246	↓	1,63	3,11
AI852581	expressed sequence AA408257	↓	1,63	3,09
AI427461	ESTs	↓	1,62	3,07
AI846493	ESTs	↓	1,62	3,07
AI839968	NA	↓	1,62	3,07
AI835353	vaccinia related kinase 1	↓	1,61	3,06
AI325957	ESTs, Weakly similar to A55817 cyclin-dependent kinase p130-PITSLRE - mouse [M.musculus]	↑	1,61	3,06

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI839339	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	↑	1,60	3,03
AI834894	oxysterol binding protein-like 1A	↑	1,59	3,02
AI852457	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 744, expressed	↑	1,59	3,02
AI465281	NA	↑	1,59	3,01
AI451136	ESTs	↓	1,59	3,00
AI847817	tight junction protein 1	↓	1,58	2,98
AI838669	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	↑	1,58	2,98
AI835777	Mus musculus, Similar to hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit, clone MGC:7126 IMAGE:3158015, mRNA, complete cds	↓	1,57	2,97
AI854455	EST	↓	1,56	2,95
AI414278	ESTs, Moderately similar to T48683 hypothetical protein DKFZp761G0313.1 [H.sapiens]	↓	1,56	2,95
AI848040	NA	↓	1,55	2,93
AI452034	ESTs	↓	1,55	2,93
AI848893	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 10 (RNA helicase)	↑	1,55	2,92
AI839512	translocator of inner mitochondrial membrane 17 kDa, a	↓	1,54	2,91
AI840673	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	↓	1,54	2,90
AI846474	EST	↑	1,53	2,89
AI853973	expressed sequence AI853688	↓	1,53	2,89
AI324118	RIKEN cDNA 2310047B08 gene	↓	1,53	2,89
AI839119	EST AI465370	↓	1,53	2,88
AI447874	NA	↑	1,53	2,88
AI448307	ESTs	↓	1,52	2,88
AI450028	RIKEN cDNA 1810030N24 gene	↓	1,52	2,87
AI324030	expressed sequence AU067654	↑	1,52	2,86
AI854486	expressed sequence AL024003	↑	1,51	2,85
AI848469	expressed sequence AI846872	↓	1,51	2,85
AI666732	expressed sequence AI604847	↑	1,51	2,85
AI413814	NA	↓	1,51	2,84
AI851255	hypothetical protein MGC7474	↓	1,50	2,83

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI846764	biglycan	↑	1,50	2,82
AI844460	discs, large homolog 3 (Drosophila)	↓	1,49	2,82
AI451608	lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol-O-acyltransferase)	↓	1,49	2,81
AI451085	EST	↓	1,49	2,81
AI838991	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	↓	1,49	2,81
AI850636	NA	↑	1,48	2,79
AI848257	p53 regulated PA26 nuclear protein	↑	1,48	2,79
AI852654	RIKEN cDNA 1200015E15 gene	↓	1,48	2,78
AI854457	ESTs	↓	1,47	2,78
AI836048	RIKEN cDNA 2410127E16 gene	↑	1,47	2,77
AI413687	expressed sequence AI854825	↓	1,47	2,77
AI854103	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	↓	1,47	2,76
AI848253	RIKEN cDNA 2310032M22 gene	↓	1,47	2,76
AI852524	Mus musculus, Similar to nuclear receptor binding protein, clone MGC:6961 IMAGE:3154089, mRNA, complete cds	↑	1,46	2,76
AI451234	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	↓	1,46	2,76
AI449385	NA	↓	1,46	2,75
AI843671	expressed sequence AW552393	↓	1,45	2,72
AI465447	RIKEN cDNA 2610307O08 gene	↓	1,44	2,72
AI843816	exostosin (multiple) 1	↑	1,43	2,70
AI841009	EST	↑	1,43	2,70
AI426974	transcriptional regulator, SIN3A (yeast)	↓	1,43	2,70
AI843793	centromere autoantigen B	↓	1,43	2,70
AI844455	ESTs	↑	1,43	2,69
AI853630	RIKEN cDNA 1110005E01 gene	↑	1,42	2,68
AI451483	ESTs	↑	1,42	2,68
AI842993	EST	↓	1,41	2,66
AI452326	calbindin-28K	↓	1,40	2,64
AI854005	RIKEN cDNA 3732410E19 gene	↑	1,40	2,64
AI429553	RIKEN cDNA 2610042F04 gene	↑	1,40	2,63
AI429607	Mus musculus, clone MGC:7865 IMAGE:3501511, mRNA, complete cds	↑	1,39	2,63
AI849214	transforming growth factor, beta 3	↓	1,39	2,62
AI662090	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5	↑	1,39	2,62

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI846424	ESTs	↑	1,39	2,62
AI447493	RIKEN cDNA 2610034F18 gene	↓	1,39	2,62
AI325927	ESTs	↑	1,39	2,61
AI854445	G protein beta subunit-like	↑	1,38	2,61
AI854883	ESTs	↑	1,38	2,61
AI854514	ESTs, Weakly similar to A55929 zinc finger protein nocA - fruit fly [D.melanogaster]	↓	1,38	2,61
AI841835	matrilin 2	↓	1,38	2,61
AI852551	expressed sequence AI835008	↑	1,38	2,59
AI854151	ESTs	↓	1,37	2,59
AI853320	expressed sequence AI429796	↑	1,37	2,58
AI427996	Sell1 (suppressor of lin-12) 1 homolog (C. elegans)	↑	1,36	2,57
AI839784	ESTs	↑	1,36	2,57
AI414268	ESTs, Moderately similar to T48683 hypothetical protein DKFZp761G0313.1 [H.sapiens]	↓	1,36	2,57
AI851286	ESTs, Weakly similar to S12207 hypothetical protein [M.musculus]	↓	1,36	2,57
AI327112	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	↑	1,36	2,57
AI326157	EST	↓	1,36	2,56
AI845994	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 214, expressed	↓	1,35	2,56
AI851869	RIKEN cDNA 2810451E09 gene	↓	1,35	2,55
AI426169	ESTs	↓	1,34	2,54
AI852072	cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)	↑	1,34	2,53
AI842358	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	↑	1,34	2,53
AI850648	ESTs, Moderately similar to TROPOMYOSIN 5, CYTOSKELETAL TYPE [M.musculus]	↓	1,33	2,52
AI415625	expressed sequence AU016588	↓	1,33	2,52
AI839184	expressed sequence AA960392	↑	1,32	2,50
AI837410	RIKEN cDNA 2310010I22 gene	↓	1,32	2,50
AI848071	RIKEN cDNA 1200009O22 gene	↓	1,32	2,50
AI324948	secretory leukocyte protease inhibitor	↑	1,32	2,50
AI851485	spinocerebellar ataxia 10 homolog (human)	↑	1,32	2,49

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>Fortsetzung von Tabelle 4.1</i>				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI448647	expressed sequence AL024349	↓	1,32	2,49
AI414192	RIKEN cDNA 6330415M09 gene	↑	1,31	2,49
AI836154	expressed sequence AA589396	↑	1,31	2,48
AI843774	EST	↓	1,31	2,48
AI447731	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthetase	↓	1,31	2,48
AI426258	EST	↓	1,30	2,47
AI850803	EST	↑	1,30	2,46
AI854843	ESTs	↑	1,30	2,46
AI836962	ESTs	↓	1,30	2,46
AI848307	guanine nucleotide releasing protein x	↑	1,28	2,44
AI849823	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	↓	1,28	2,43
AI841751	expressed sequence BB163080	↑	1,28	2,43
AI450224	ESTs	↑	1,27	2,42
AI413229	ESTs	↓	1,27	2,40
AI852181	integrin beta 4	↑	1,26	2,39
AI848755	EST, Weakly similar to LEG6 MOUSE GALECTIN-6 [M.musculus]	↓	1,26	2,39
AI842115	DNA segment, Chr 19, Brigham and Women's Genetics 1357 expressed	↓	1,26	2,39
AI852319	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	↓	1,25	2,39
AI894196	RIKEN cDNA 5330437A18 gene	↓	1,25	2,38
AI840046	procollagen, type XVI, alpha 1	↑	1,25	2,38
AI426670	ESTs	↓	1,25	2,37
AI451949	RIKEN cDNA 2410012F02 gene	↓	1,24	2,37
AI426929	expressed sequence C87158	↓	1,24	2,36
AI449489	EST	↓	1,23	2,35
AI838823	expressed sequence AI848729	↓	1,23	2,35
AI839005	expressed sequence AA407828	↓	1,22	2,33
AI850126	RIKEN cDNA 4921506J03 gene	↓	1,21	2,31
AI449368	RIKEN cDNA 4921506J03 gene	↓	1,20	2,30
AI851866	glutathione S-transferase, pi 2	↓	1,20	2,29
AI842812	NA	↑	1,20	2,29
AI848728	H1 histone family, member 0	↑	1,20	2,29
AI413637	RIKEN cDNA 1300019C06 gene	↓	1,19	2,28
AI849416	RIKEN cDNA 1110018I21 gene	↓	1,18	2,26
AI426025	ESTs	↑	1,17	2,25
AI850802	zinc finger protein 95	↑	1,16	2,24

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.1				
Genbank-Identifizierung	Genname	Regulierungsrichtung für Glu-Res	Differenz	Signifikanz
AI451458	ESTs	↓	1,16	2,24
AI846651	ectodysplasin-A	↑	1,16	2,23
AI464514	ESTs	↑	1,14	2,21
AI846112	EST	↑	1,14	2,21
AI852566	ESTs	↓	1,14	2,20
AI847870	caspase 6	↑	1,13	2,19
AI850019	calcitonin-related polypeptide, beta	↓	1,12	2,18
AI838603	ESTs, Moderately similar to Y552 HUMAN HYPOTHETICAL PROTEIN KIAA0552 [H.sapiens]	↓	1,12	2,18
AI847244	RIKEN cDNA 2310081H14 gene	↓	1,11	2,16
AI837458	expressed sequence AI839884	↑	1,11	2,16
AI836641	RIKEN cDNA 4930427E19 gene	↓	1,11	2,16
AI835625	ribosomal protein S6	↑	1,11	2,16
AI323885	NA	↓	1,11	2,15
AI853134	RIKEN cDNA 2610016C12 gene	↑	1,10	2,15
AI836151	X-linked nuclear protein	↑	1,09	2,13
AI413123	expressed sequence AI325283	↑	1,08	2,11
AI429295	RIKEN cDNA 5031412I06 gene	↓	1,08	2,11
AI841358	EST	↑	1,07	2,11
AI847301	ribosomal protein L7a	↓	1,06	2,09
AI851537	epithelial membrane protein 3	↑	1,05	2,07
AI327224	EST	↓	1,04	2,06
AI847382	EST	↑	1,04	2,06
AI413688	NA	↓	1,04	2,05
AI842024	ESTs	↑	1,03	2,05
AI837833	ESTs	↓	1,03	2,04
AI849568	Mus musculus, clone MGC:29379 IMAGE:5051685, mRNA, complete cds	↓	1,02	2,03
AI854862	ESTs, Highly similar to KIAA0453 protein [H.sapiens]	↓	1,02	2,03
AI415393	expressed sequence C79329	↑	1,01	2,01
AI851374	expressed sequence C78376	↑	1,00	2,01
AI414825	parathyroid hormone-like peptide	↑	1,00	2,00
AI449093	EST	↑	1,00	2,00

Tabelle 4.1 zeigt die Gene, für die ein Expressionsunterschied zwischen Glu-Res und HT-22 N im Rahmen der Chip-Hybridisierung festgestellt werden konnte. Dabei steht ↓ für eine verminderte, ↑ für eine verstärkte Expression des jeweiligen Gens in den Glu-Res im Vergleich zu HT-22 N Zellen.

Von den 335 in Tabelle 4.1 aufgeführten Genen handelte es sich bei 176 um unidentifizierte Sequenzen (ESTs, „expressed sequences“ und NAs), weitere 53 entsprachen RIKEN cDNAs. 147 der aufgeführten Gene sind in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert als in den HT-22 N Neuronen, 188 schwächer.

4.3.4 Verifizierung der Gene aus der Chip-Hybridisierung

Die Ergebnisse der Chip-Hybridisierung sind ein Anhaltspunkt für Gene, die in HT-22 N und Glu-Res Neuronen unterschiedlich exprimiert sein könnten. Um sicher zu sein, dass tatsächlich ein Expressionsunterschied besteht, ist es nötig, die Ergebnisse mit Hilfe einer anderen Methode zu verifizieren.

Es wurde eine Stichprobe von sieben Genen aus der Liste ausgewählt, für die Primersequenzen ermittelt wurden, um eine semiquantitative PCR durchführen zu können. Die ausgewählten Gene waren:

- **Death-associated Kinase 2 (Dapk2)**, welche mit einer Signifikanz von 8,561 in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Dapk2 ist eine von Calmodulin regulierte Proteinkinase, welche im Cytoplasma lokalisiert ist. Der durch Dapk2 katalysierten Proteinphosphorylierung wird eine Bedeutung bei der Induktion von Apoptose zugeschrieben.
- **Calsequestrin 1 (Casq)**, welches mit einer Signifikanz von 5,745 in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Casq ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien lokalisiert ist. Bislang wurde seine Funktion hauptsächlich mit Muskelaktionen in Verbindung gebracht.
- **3-Oxoacid CoA Transferase (Oxct)**, welche mit einer Signifikanz von 5,718 in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Oxct spielt eine Rolle bei der Energiegeneration und ist in den Sterol-, Fett- und Fettsäure-Stoffwechsel integriert.

- **Glutathion Reduktase 1 (Gsr)**, welche mit einer Signifikanz von 5,703 in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Die Glutathion Reduktase ist ein Elektronentransporter. Eine Modulation ihrer Funktion wird mit der Stressantwort von Zellen in Verbindung gebracht.
- **p53 regulated PA26 nuclear protein (PA26-pending)**, welches mit einer Signifikanz von 2,792 in den Glu-Res Neuronen stärker exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
PA26-pending ist ein Mitglied der GADD-Familie, welche durch DNA-Schädigung und Wachstumsstopp induzierbare Proteine enthält. Es wird angenommen, dass PA26-pending eine Rolle bei der negativen Regulation der Zellproliferation in Folge von DNA-Schädigung spielt.
- **Transforming Growth Factor, beta 3 (Tgfb3)**, welcher mit einer Signifikanz von 2,62 in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Tgfb3 gehört zur Familie der Cytokine und überträgt Signale über transmembrane Serin/Threonin Kinasen.
- **Glutathion S-Transferase, pi 2 (Gstp2)**, welche mit einer Signifikanz von 2,293 in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert war als in HT-22 N Neuronen.
Von der Glutathion-S-Transferase wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der Stressantwort von Zellen spielt.

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR konnte der im Chip-Experiment gefundene Expressionsunterschied für Gsr und Oxct bestätigt werden (s. Abbildungen 4.31 und 4.32). Für Gsr konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression in den H₂O₂-Res Neuronen ebenfalls schwächer ist als in den HT-22 N Neuronen. Der Expressionsunterschied war sogar noch stärker als zwischen Glu-Res und HT-22 N Zellen (s. Abbildung 4.31).

Neben der Expression in den drei Modellklonen wurde grundsätzlich auch die Expression in mit LiCl behandelten HT-22 N Neuronen untersucht, um zu sehen, ob die Inhibition von GSK-3 β einen Einfluss auf den Expressionsunterschied haben könnte. Dies war jedoch für keines der untersuchten Gene der Fall.

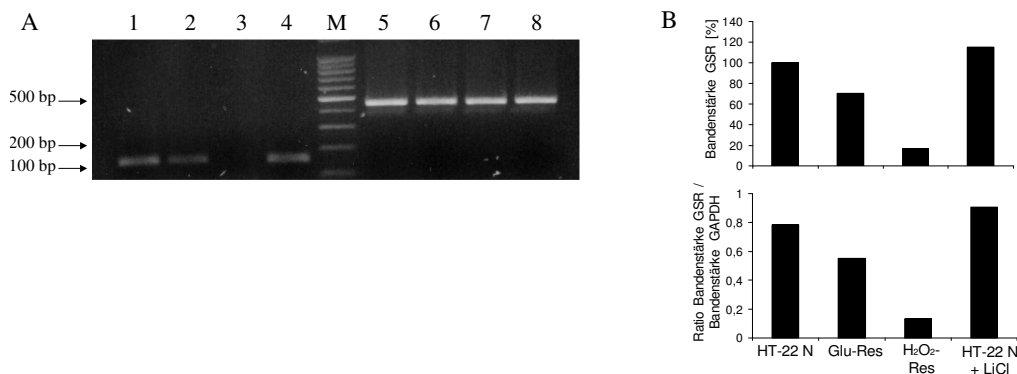


Abbildung 4.31: A: Gelphoto der Produkte der semiquantitativen PCR mit Primern für Glutathion Reduktase 1 (Gsr) (Spur 1-4) und GAPDH (Spur 5-6). Auftragung von links nach rechts: HT-22 N, Glu-Res, H₂O₂-Res, HT-22 N + LiCl. Die Markerbanden liegen jeweils in einem Abstand von 100 bp zueinander. Die stärkste sichtbare Bande hat eine Größe von 500 bp. Die Annealing-Temperatur für die PCR betrug 56,5°C. Es wurden 27 Zyklen durchgeführt. B: Im oberen Diagramm sind die Bandenstärken der Spuren 1-4 graphisch dargestellt, wobei der Wert für HT-22 N mit 100 % gleichgesetzt wurde. Im unteren Diagramm wurde die Ratio aus den Bandenstärken für GSR und GAPDH gebildet.

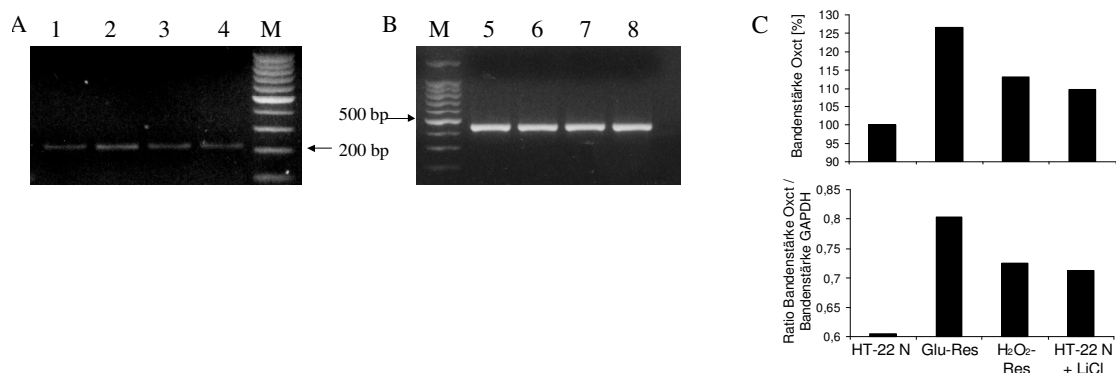


Abbildung 4.32: Gelphoto der Produkte der semiquantitativen PCR mit Primern für 3-Oxoacid CoA Transferase (Oxct)(A) und GAPDH (B). Auftragung jeweils von links nach rechts: HT-22 N (Spuren 1 und 5), Glu-Res (Spuren 2 und 6), H₂O₂-Res (Spuren 3 und 7), HT-22 N + LiCl (Spuren 4 und 8). Die Markerbanden liegen jeweils in einem Abstand von 100 bp zueinander. Die stärkste sichtbare Bande hat eine Größe von 500 bp. Die Annealing-Temperatur für die PCR betrug 55°C. Es wurden 22 Zyklen durchgeführt. C: Im oberen Diagramm sind die Bandenstärken der Spuren 1-4 graphisch dargestellt, wobei der Wert für HT-22 N mit 100 % gleichgesetzt wurde. Im unteren Diagramm wurde die Ratio aus den Bandenstärken für Oxct und GAPDH gebildet.

Die Primersequenz für Tgfb3 war offensichtlich zu unspezifisch, um eine Aussage über einen möglichen Expressionsunterschied treffen zu können. Im Gel waren viele Banden sichtbar, die zu eng aneinander lagen, um sie anhand ihrer Größe mit Sicherheit unterscheiden zu können. Für die übrigen vier Gene konnte der mit Hilfe der Chip-Hybridisierung festgestellte Expres-

sionsunterschied nicht bestätigt werden. Dies könnte jedoch in der begrenzten Sensitivität der semiquantitativen PCR begründet sein. Um einen Expressionsunterschied mit höherer Sicherheit ausschließen zu können, wäre es sinnvoll, die Expressionsstärke mit Hilfe einer weiteren Methode, z.B. einer „Real-Time PCR“, zu vergleichen.

4.4 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Signalwege anhand von unterschiedlichen Methoden untersucht. Es wurden sowohl Änderungen im Proteinspiegel als auch Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene für einige Kandidatengene untersucht. Dementsprechend komplex ist die Darstellung der Ergebnisse in diesem Kapitel. In den Tabellen 4.2 und 4.3 sind deshalb die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit abschließend zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Wesentliche Veränderungen auf Proteinebene

Name	Expressionsänderung im Vergleich zu HT-22 N in	
	Glu-Res	H ₂ O ₂ -Res
GSK	↓	↓
GSKtyr	↓	↓
GSKser	↑	(↑)
pMAPK	↑	↑
Bax	↓	↓
sAPPalpha	↑	↑

Tabelle 4.2: Das Zeichen ↓ steht für einen erniedrigten, das Zeichen ↑ für einen erhöhten Proteinspiegel in den Glu-Res bzw. H₂O₂-Res Neuronen im Vergleich zu HT-22 N Zellen. (↑) symbolisiert einen tendentiell erhöhten Proteinspiegel, dessen Erhöhung jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

Tabelle 4.3: Wesentliche Veränderungen auf RNA-Ebene

Name	Expressionsänderung im Vergleich zu HT-22 N in Glu-Res
Bax und weitere Gene der Bcl-2 Familie	↓
Est2	↑
p53	↓
Gadd45	↓
NFκB	↑
Gsr	↓
Proteasom	↓
AMC	↓

Tabelle 4.3: Das Zeichen ↓ steht für eine geringere, das Zeichen ↑ für eine verstärkte Expression des jeweiligen Gens in den Glu-Res im Vergleich zu HT-22 N Neuronen.

4.5 Zukünftige Versuche

Das Ziel dieser Arbeit war die Entdeckung von Genen und Signalwegen, die in Neuronen, die gegen oxidativen Stress resistent sind, anders exprimiert bzw. reguliert sind, als in sensitiven Neuronen. Es wurden viele Veränderungen zwischen resistenten und nicht resistenten Neuronen aufgezeigt, deren Bedeutung für den Nervenzelltod bei Morbus Alzheimer oder anderen neurodegenerativen Krankheiten es noch näher zu untersuchen gilt.

Zunächst muss ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen lediglich um Nebeneffekte der Langzeitbehandlung der Zellen mit Glutamat bzw. Wasserstoffperoxid handelt, die unabhängig von dem eigentlichen Resistenzverhalten sind.

Neben den *in vitro* Untersuchungen sind als nächster Schritt Untersuchungen im Tiermodell

sinnvoll. Dabei wären z.B. Versuche mit Tieren, die ein Kandidatengen überexprimieren bzw. bei denen die Expression eines Gens weitgehend verhindert wird, von besonderem Interesse. Mit solchen Versuchen könnte geklärt werden, ob die Expressionsänderung Einfluss auf den Grad der Neurodegeneration nach Herbeiführung von oxidativem Stress hat.

Im Hinblick auf einen Therapieansatz für Morbus Alzheimer Patienten sind auch Untersuchungen an Tiermodellen sinnvoll, die eine Alzheimer ähnliche Pathologie aufweisen, wie die von Lewis und Kollegen verwendeten Doppelmutanten für APP und Tau-Protein (Lewis et al., 2001). Veränderungen, die in diesen Tiermodellen vor einer Neurodegeneration schützen, könnten mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine vergleichbare Wirkung im Menschen haben.

Auch Untersuchungen an post mortem Geweben von Alzheimer Patienten wären höchst interessant, um beispielsweise die Expression von Kandidatengenen in Gehirnarealen mit starker und weniger starker Neurodegeneration zu vergleichen. Auf diese Weise nachgewiesene Expressionsunterschiede bilden einen vielversprechenden Therapieansatz für Morbus Alzheimer, da sie wahrscheinlich ein körpereigenes Resistenzprogramm gegen den mit dieser Krankheit assoziierten Nervenzelltod widerspielen.

Die vorliegende Arbeit dient demnach dem Aufzeigen von Signalwegen, die in gegen oxidativen Stress resistenten Zellen verändert sind. Weiterführende Experimente sind jedoch nötig, um die Bedeutung dieser Unterschiede für eine Neuroprotektion *in vivo* zu klären.

Kapitel 5

Diskussion

Die Untersuchung von Zellen mit einer selektiven Resistenz gegen eine spezielle Art von Toxinwirkung ist ein guter Ansatz, um biochemische Mechanismen aufzuzeigen, die zur Resistenz führen bzw. die in die Wirkungsweise des Toxins involviert sind.

In dieser Arbeit wurden Zellen etabliert, die eine selektive Resistenz gegen oxidativen Stress aufweisen (s. Abbildung 4.5 und 4.6). Veränderte Signalwege in diesen Zellen im Vergleich zu nicht resistenten Zellen sind relevant für Krankheiten, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, wie z.B. Morbus Alzheimer.

Für die Suche nach Signalwegen, die in gegen oxidativen Stress resistenten Neuronen verändert sind, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde auf RNA-Ebene nach Expressionsänderungen gesucht, zum anderen wurden auf Proteinebene sowohl die gebildete Menge an Protein, als auch die Modulationen im Phosphorylierungsstatus für einzelne Proteine betrachtet.

Den Ergebnissen fällt je nach Untersuchungsebene eine andere Gewichtung zu. Untersuchungen auf RNA-Ebene liefern einen wichtigen Anhaltspunkt für wahrscheinlich veränderte Vorgänge in der Zelle. In vielen Fällen ist die gebildete Menge RNA äquivalent zur gebildeten Proteinmenge und zur Aktivität dieses Proteins. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Veränderungen in der Translation oder posttranslationalen Modifikation den auf RNA-Ebene beobachteten Unterschied wieder aufheben.

Aussagen auf Proteinebene sind deshalb wesentlich bedeutender, da die nachweislich veränder-

te Proteinmenge mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einen direkten Effekt auf Vorgänge in der Zelle hat. Häufig ist jedoch die Aktivität von Proteinen abhängig von posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. dem Phosphorylierungsstatus. Eine erhöhte Proteinmenge ist deshalb zwar sehr oft, aber nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einer erhöhten Aktivität des jeweiligen Proteins, da eventuell der Großteil des Proteins durch posttranslationale Modifikation oder Inhibition durch ein anderes Protein inaktiviert sein könnte. Im Umkehrschluss sind gleiche Proteinmengen nicht unbedingt ein eindeutiger Beweis dafür, dass die damit in Verbindung stehenden Signalwege unverändert sind, da der Großteil des Proteins in einem der Zellmodelle so modifiziert sein könnte, dass seine Aktivität erhöht ist. Entsprechend ist ein Nachweis von Änderungen im Phosphorylierungsstatus von zellulären Proteinen der sicherste Beweis für eine Änderung in dem damit in Verbindung stehenden Signalweg.

5.1 GSK-3 β

Ein Enzym, für das in dieser Arbeit Unterschiede im Phosphorylierungsstatus zwischen resistenten und sensitiven Neuronen nachgewiesen werden konnten, ist die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β). Ist GSK-3 β an einem Serin-Rest phosphoryliert, ist sie inaktiv. Durch Phosphorylierung an einem Tyrosin-Rest wird sie aktiviert. GSK-3 β ist eine Serin-Threonin Kinase, die eine Schlüsselrolle in mehreren Signalwegen der Zelle spielt. Sie ist von großer Bedeutung für Apoptosevorgänge in Neuronen im Allgemeinen und ganz besonders auch für den Alzheimer-assoziierten Nervenzelltod.

Ihren Namen verdankt GSK-3 β ihrer zuerst entdeckten Funktion im Glykogen-Metabolismus, bei dem sie in der Abwesenheit von Insulin die Glykogen Synthase inhibiert (Woodgett, 1990). Ist Insulin vorhanden, resultiert dies in der Aktivierung der Proteinkinase Akt, welche wiederum GSK-3 β an einem Serin-Threonin-Rest phosphoryliert und somit inhibiert (Cross et al., 1995; Moule et al., 1997). Dies ermöglicht es der Glykogen Synthase, Glukose in Glykogen umzuwandeln.

Die Inhibition von GSK-3 β über die Proteinkinase Akt kann in Folge der Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) geschehen (Pap und Cooper, 1998; Crowder und

Freeman, 2000; Hetman et al., 2000). Der PI3-Kinase / Akt-Signalweg ist eine zentrale Komponente der Überlebensmaschinerie von Neuronen (Yao und Cooper, 1995; Dudek et al., 1997; Miller et al., 1997; Philpott et al., 1997; Crowder und Freeman, 1998). Dementsprechend wurde für die Aktivierung von GSK-3 β eine Funktion in der Vermittlung von Apoptose angenommen und auch nachgewiesen (Pap und Cooper, 1998; Hetman et al., 2000).

Es wurden auch Hinweise dafür gefunden, dass GSK-3 β durch PI-3 Kinase abhängige, aber Akt unabhängige Signalwege reguliert werden kann (Delcommenne et al., 1998; Kobayashi und Cohen, 1999).

Ein anderer Signalweg, bei dem GSK-3 β eine Rolle spielt, ist der Wnt-Signalweg (s. Abschnitt 2.1.3). Sind Wnt-Liganden anwesend, so ist GSK-3 β inaktiv, sind keine Wnt-Liganden vorhanden, liegt GSK-3 β in seiner aktiven Form vor. In seiner aktiven Form ist GSK-3 β Teil eines Multiproteinkomplexes, der das zytoplasmatische Protein β -Catenin für die Degradierung markiert. Dies führt letztendlich dazu, dass die Wnt-Zielgene nicht exprimiert werden (s. Abbildung 2.2).

1993 entdeckten Ishiguro und Kollegen, dass GSK-3 β identisch mit der Tau-Protein Kinase I (TPK I) ist, einem Enzym, das aufgrund seiner Fähigkeit Tau-Protein *in vitro* zu phosphorylieren Aufmerksamkeit erregt hatte. GSK-3 β ist eines der besten Kandidatenenzyme, das für die Hyperphosphorylierung von Tau zur Bildung von Morbus Alzheimer typischen Fibrillenbündeln verantwortlich sein könnte. Es konnte sowohl *in vitro* also auch *in vivo* gezeigt werden, dass GSK-3 β Tau Protein an den meisten Stellen phosphorylieren kann, die bei den Fibrillenbündeln im Gehirn von Morbus Alzheimer Patienten ebenfalls phosphoryliert sind (Lovestone et al., 1994; Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997). Außerdem akkumuliert GSK 3 β im Zytoplasma von Zellen, die eine beginnende Bildung von Fibrillenbündeln aufweisen und seine Verteilung im Gehirn korreliert mit den Veränderungen des Tau-Proteins (Shiurba et al., 1996; Pei et al., 1999).

Interessant ist auch die Beobachtung, dass die Inkubation von Zellen mit A β die Aktivierung von GSK-3 β zur Folge hat (Takashima et al., 1996). Inhibition der GSK-3 β Aktivität oder Blockierung seiner Expression verhindern die durch A β induzierte Neurodegeneration von kortikalen und hippokampalen Primärzellkulturen (Takashima et al., 1993; Alvarez et al., 1999b).

Zusammengefasst ist GSK-3 β ein Enzym mit proapoptotischen Eigenschaften, dessen Relevanz aufgrund seiner Induzierbarkeit durch A β und seiner Funktion im Wnt-Signalweg und der Tau-Phosphorylierung speziell für den Alzheimer-assoziierten Nervenzelltod von Bedeutung zu sein scheint.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist daher die Erkenntnis, dass zwischen resistenten und nicht resistenten HT-22 Neuronen Unterschiede sowohl im Gesamtspiegel von GSK-3 β als auch im Phosphorylierungsstatus bestehen (s. Abschnitt 4.2.1). Sowohl Glu-Res als auch H₂O₂-Res Neurone bilden weniger GSK 3 β Protein als HT-22 N Neurone (s. Abbildung 4.7). Die aktive Form des Enzyms GSK-3 β , GSK_{tyr}, liegt in den resistenten Zellen ebenfalls in geringerer Menge vor als in HT-22 N Zellen (s. Abbildung 4.8). Der Spiegel der inaktiven Form, GSK_{ser}, dagegen ist in den resistenten Zellen tendentiell höher als in den nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.9).

Entsprechend der eingangs angestellten Überlegungen bezüglich posttranslationalen Modifikationen muss der Beobachtung, dass der Phosphorylierungsstatus von GSK-3 β in resistenten und sensitiven Zellen unterschiedlich ist (vgl. Abschnitt 4.2.1), eine große Bedeutung beigemessen werden. Tatsächlich konnte ein direkter Effekt von GSK-3 β auf das Resistenzverhalten der Zellen nachgewiesen werden. Inhibition von GSK-3 β durch LiCl erhöhte die Toleranz der HT-22 N Neuronen für Glutamat und Wasserstoffperoxid (s. Abbildung 4.10).

Der inhibitorische Effekt von LiCl auf GSK-3 β ist in der Literatur beschrieben (Klein und Melton, 1996; Stambolic et al., 1996), allerdings sind Kreuzreaktionen von LiCl mit anderen zellulären Proteinen nicht ganz auszuschließen. Deshalb sollte auch die Wirkung eines spezifischen GSK-3 β Inhibitors auf das Resistenzverhalten der HT-22 N Neurone getestet werden. Es stellte sich dabei heraus, dass der verwendete GSK 3 β Inhibitor (von Calbiochem) selbst eine beträchtliche toxische Wirkung auf die Zellen hatte (Daten nicht gezeigt), so dass aus diesem Experiment keine Rückschlüsse auf eine mögliche Bedeutung der GSK-3 β Inhibition auf das Resistenzverhalten der Zellen gezogen werden konnten.

Die Hypothese, dass die GSK-3 β Inhibition eine Rolle bei der Resistenzvermittlung gegen oxidativen Stress spielt, wird jedoch auch noch auf andere Weise gestützt: MAPK ist ein Enzym, das GSK-3 β an einem Serinrest phosphorylieren und somit inhibieren kann und auch bezüglich

dieses Enzyms wurden Änderungen in Glu-Res und H₂O₂-Res Neuronen gefunden, die mit den beobachteten Phosphorylierungszuständen von GSK-3 β korrespondieren. Auch die Aktivität der MAPK spiegelt sich in ihrem Phosphorylierungszustand wider. Die Menge an phosphorylierter und somit aktiver MAPK ist in den resistenten Zellen deutlich größer als in nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.16). Ob zwischen dem erhöhten pMAPK-Spiegel und den Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von GSK-3 β ein direkter Zusammenhang besteht, müsste in Zukunft allerdings noch nachgewiesen werden.

Alles in allem wurden in dieser Arbeit deutliche Hinweise dafür gefunden, dass die erhöhte Resistenz gegen oxidative Stressoren in dem verwendeten Zellmodell zum Teil auf eine Inhibition von GSK 3 β zurückgeführt werden kann.

Die Tatsache, dass diese Veränderungen sowohl in Glu-Res als auch in H₂O₂-Res Neuronen beobachtet wurden, impliziert, dass es sich um einen Resistenzmechanismus handeln könnte, der in vielen Zellen aktiviert werden kann. Inwiefern dieser Mechanismus für oxidativen Stress spezifisch ist, müsste anhand von Untersuchungen mit anderen Toxinen oder mittels anderer Zellmodelle noch geklärt werden.

5.2 APP

Alle soweit untersuchten genetisch bedingten Alzheimer Erkrankungen haben gemeinsam, dass die Gendefekte zu einer qualitativen oder quantitativen Veränderung der A β -Produktion führen. A β entsteht durch Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP (s. Abschnitt 2.1.1). Ein anderes Prozessierungsprodukt von APP ist sAPP α , dem im Gegensatz zu A β neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden (De Strooper und Annaert, 2000). Entsprechend interessant ist die Beobachtung, dass der sAPP α -Spiegel in Glu-Res und H₂O₂-Res Neuronen höher ist als in HT-22 N Neuronen (s. Abbildung 4.12). Die Ursache hierfür könnte eventuell in dem erhöhten pMAPK-Spiegel liegen, da für pMAPK gezeigt werden konnte, dass es zu einer verstärkten Sekretion von sAPP α führen kann (Dr. Sharon Goodenough, persönliche Mitteilung). Der erhöhte sAPP α -Spiegel im Medium der resistenten Neuronen bestätigt, dass eine Modulation der APP-Prozessierung nicht nur zu krankhaften Veränderungen im Organis-

mus führen, sondern möglicherweise auch vor toxischen Schäden schützen kann, je nachdem, ob mehr $A\beta$ oder mehr $sAPP\alpha$ gebildet wird.

Die Idee, die APP-Prozessierung in dem Sinne zu modulieren, dass die Bildung von $A\beta$ vermindert und die Entstehung von $sAPP\alpha$ verstärkt wird, ist im Hinblick auf einen möglichen Therapieansatz für Morbus Alzheimer Patienten nicht neu. Es fehlen jedoch Kenntnisse über die Funktion von APP und $sAPP\alpha$ im gesunden Organismus. Die erhöhte $sAPP\alpha$ -Sekretion in Glu-Res und H_2O_2 -Res Neuronen lässt vermuten, dass die APP-Prozessierung auch für andere, mit oxidativem Stress in Verbindung stehende neurodegenerative Erkrankungen von Bedeutung sein könnte. Ob die verstärkte Bildung von $sAPP\alpha$ tatsächlich einen direkten Einfluss auf das Resistenzverhalten von Neuronen hat, bleibt zu untersuchen. Der Klärung der Funktion von APP, seinen Prozessierungsmechanismen und der Wirkungsweise von $sAPP\alpha$ sollte in Zukunft jedenfalls hohe Aufmerksamkeit geschenkt werden.

5.3 Bcl-2 / Bax-Signalweg

Die Familie der Bcl-2 Proteine reguliert einen in der Evolution konservierten Signalweg, der über das Zellschicksal entscheidet. Die Regulation der Apoptose erfolgt über die Kontrolle der mitochondrialen Permeabilität und der Freisetzung von Cytochrom C. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern die Cytochrom C Freisetzung. Die proapoptotischen Proteine Bax, Bid, Bad und Bim sind im Zytosol lokalisiert. Als Antwort auf sogenannte Todesstimuli bewegen sich diese Proteine jedoch auch zu den Mitochondrien, wo sie die Freisetzung von Cytochrom C wahrscheinlich durch einen spannungsabhängigen Anionenkanal bewirken (Shimizu et al., 1999). Das freigesetzte Cytochrom C initiiert die Aktivierung von Caspasen und den Abbau spezifischer Proteinsubstrate, was letztendlich zur Apoptose führt.

Der genaue Mechanismus zur Regulierung des Zellschicksals durch Bcl-2 und Bax ist noch unklar. Es wird angenommen, dass die relativen Mengen der beiden Proteine dabei eine entscheidende Rolle spielen. Die Mitglieder der Bcl-2 / Bax Familie können aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit ähnliche Konformationen einnehmen und sowohl Homo- als auch Heterodime-

re bilden. Durch die Interaktion in Form der Heterodimer-Bildung könnte entweder Bcl-2 die apoptotische Wirkung von Bax inhibieren oder umgekehrt, Bax die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 aufheben. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die beiden Proteine das Zellschicksal unabhängig voneinander regulieren (Knudson und Korsmeyer, 1997).

Stimuli, die Apoptose über den Bcl-2 / Bax Signalweg auslösen, sind z.B. Signale des Todesrezeptors Fas oder der Entzug von Überlebensfaktoren. Der Transkriptionsfaktor p53, der als Folge von DNA-Schädigung aktiviert wird, leitet die Transkription von Bax ein.

Für die antiapoptotische Wirkungsweise von Bcl-2 wurden mehrere mögliche Mechanismen vorgeschlagen: Bcl-2 könnte als Antioxidans wirken oder die Entstehung freier Sauerstoffradikale inhibieren (Wiedau-Pazos et al., 1996; Tyurina et al., 1997). Es könnte auch in den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle eingreifen (Lam et al., 1994; Marin et al., 1996) oder eine Rolle im Transport von Proteinen wie p53 haben (Ryan et al., 1994).

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass der von Glutamat ausgelöste Nervenzelltod durch eine Überexpression von Bcl-2 inhibiert werden kann (Behl et al., 1993; Kane et al., 1995). In den in dieser Arbeit verwendeten Glu-Res und H_2O_2 -Res Zellen konnte kein erhöhter Bcl-2 Spiegel festgestellt werden. Entgegen den Erwartungen war der Bcl-2 Spiegel sogar im Vergleich zu den nicht resistenten HT-22 N Zellen erniedrigt (s. Abbildung 4.14). Interessanterweise wurde auch für die antiapoptotischen Gene Mcl1 und Bcl2A1d des Bcl-2 / Bax-Signalwegs in den Glu-Res Neuronen eine verminderte Expression im Vergleich zu HT-22 N Neuronen gefunden (s. Abbildung 4.22 B). Ein von Bcl-2 vermittelter neuroprotektiver Mechanismus scheidet also in diesen Zellmodellen sicherlich aus. Welche Bedeutung die erniedrigte Expression der genannten antiapoptotischen Faktoren in den resistenten Neuronen hat, ist unklar. Möglicherweise handelt es sich um einen Nebeneffekt der Langzeitbehandlung mit Glutamat bzw. Wasserstoffperoxid.

Unabhängig von den hier verwendeten Zellklonen wurden auch im Labor von David Schubert am Salk Institute for Biological Studies, Kalifornien, Glutamat resistente HT-22 Klone etabliert. In diesen Zellen wurde ebenfalls keine verstärkte Expression von Bcl-2 oder Mcl1 festgestellt (Sagara et al., 1998). Allerdings war in jener Arbeit auch für Bax keine Expressionsänderung in den resistenten Neuronen feststellbar. Die Expression dieses Gens sowie des ebenfalls in diesen Signalweg involvierten proapoptotischen Gens Bak war in den hier verwendeten Glutamat-

resistenten Zellen schwächer als in den nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.13, 4.20 B und 4.22 B).

Demzufolge scheint der Bcl-2 / Bax-Signalweg als Ganzes in den resistenten Zellen inhibiert zu sein. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich deshalb auch bei der geringeren Expression der proapoptotischen Gene um einen Nebeneffekt der Langzeitbehandlung mit dem Toxin handelt, könnte die verringerte Expression der proapoptotischen Gene auch Teil eines Schutzprogramms gegen oxidative Schädigungen sein. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Ets2 in den Glu-Res Neuronen (s. Abbildung 4.21 B), zu dessen Zielgenen Bcl- x_L gehört, welches wiederum Bax inhibieren kann. Es ist also denkbar, dass die Inhibition von Bax und Bak unabhängig von den erniedrigten Bcl-2-, Mcl1- und Bcl2A1d-Spiegel geschieht.

Es wäre ebenfalls denkbar, dass die verminderte Expression von Bax mit der beobachteten verminderten p53-Expression in Verbindung steht. p53 kann die Transkription von Bax einleiten und es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von p53 mit einer erniedrigten Bax-Expression einhergeht (Culmsee et al., 2001).

Auch wenn nicht klar ist, wie die gefundenen Expressionsunterschiede zu deuten sind, stellt der Bcl-2 / Bax Signalweg dennoch einen interessanten potentiellen Ansatzpunkt für neuroprotektive Wirkstoffe dar.

5.4 PARP

Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist ein Enzym, dem eine bedeutende Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse wie z.B. der DNA-Reparatur und dem Zelltod zugeschrieben wird. PARP wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert und katalysiert den Transfer von ADP-Ribose von dem Substrat NAD⁺ zu Kernproteinen. Man nimmt an, dass die Bildung langer verzweigter Poly(ADP-Ribose)-Polymere an den Zielproteinen zu Struktur- bzw. Funktionsänderungen dieser Proteine führt, die den DNA-Reparaturprozess erleichtern (Lindahl et al., 1995).

Der erste Hinweis darauf, dass PARP auch in Zelltod-Prozesse involviert sein könnte, bestand in der Beobachtung, dass schwere DNA-Schäden zu einer massiven Aktivierung von PARP

führen. Das hat dramatische Änderungen in den Konzentrationsspiegeln von metabolischen Zwischenprodukten wie z.B. NAD^+ und ATP zur Folge (Sims et al., 1983). PARP könnte folglich als Verbindungsglied zwischen starker DNA-Schädigung und dem Zelltod fungieren und somit beispielsweise die Verbreitung fehlerhaft reparierter DNA verhindern. Berger stellte diese Hypothese unter dem Namen „PARP suicide hypothesis“ erstmalig vor (Berger, 1985).

Seitdem wurde die Rolle von PARP im Zelltod-Prozess anhand vieler Modelle untersucht. Je nach verwendeter Zelllinie und Todes-Stimulus wurde dem Fehlen von PARP ein protektiver Effekt gegen Schädigungen, z.B. durch freie Radikale, oder eine Erhöhung der Anfälligkeit der Zelle gegen alkylierende Agenzen bzw. γ -Strahlung zugeschrieben. Der Befund, dass das Fehlen von PARP Neuronen vor Schäden durch Ischämie schützt, unterstützt jedoch klar die „suicide“-Hypothese (Eliasson et al., 1997; Endres et al., 1997).

Die genaue Rolle, die PARP im apoptotischen Prozess spielt, ist nach wie vor nicht ganz geklärt. Man weiß bislang, dass PARP in einer frühen Phase der Apoptose zunächst aktiviert wird (Rosenthal et al., 1997; Simbulan-Rosenthal et al., 1998) und später von Caspasen spezifisch gespalten wird (Kaufmann, 1989; Kaufmann et al., 1993). Es bleibt zu klären, ob die Aktivierung von PARP und / oder seine Spaltung eine spezifische Rolle bei der Einleitung von Apoptose spielen.

Für die Resistenzvermittlung in den in dieser Arbeit verwendeten Neuronen scheint PARP von geringer Bedeutung zu sein. Obwohl vereinzelt in den Glu-Res Neuronen eine erhöhte Konzentration dieses Proteins festgestellt werden konnte, ergab der statistische Vergleich jedoch keine generellen Unterschiede zwischen den Proteinspiegeln in resistenten und sensitiven Neuronen.

5.5 Seladin-1

Seladin-1 ist ein kürzlich entdecktes Gen, das in solchen Regionen des Gehirns schwächer reguliert ist, die bei der Alzheimer Krankheit degenerieren. Umgekehrt weisen Zellen, die gegen $A\beta$ -Toxizität resistent sind, einen etwa dreifach erhöhten Spiegel an Seladin-1-mRNA und -Protein auf (Greeve et al., 2000; Iivonen et al., 2002). Das Protein Seladin-1 ist hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und teilweise auch in Strukturen des Golgi-Apparates

lokalisiert (Greeve et al., 2000). Die verminderte Seladin-1 Transkription bei Morbus Alzheimer wurde als mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein assoziiert beschrieben (Iivonen et al., 2002). Die genaue Funktion von Seladin-1 ist noch nicht endgültig geklärt. Hinweise auf die Funktion ergeben sich aus der Gensequenz, die große Ähnlichkeit mit der von Flavin-Adenin-Dinukleotid-(FAD-) abhängigen Oxidoreduktasen aufweist. Außerdem verhindert die funktionale Expression von Seladin-1 in humanen Neuroglioma H4 Zellen die Aktivierung von Caspase 3 nach $A\beta$ -Toxizität bzw. oxidativen Stress (Greeve et al. 2000).

Seladin-1 scheint demnach ein wichtiger Faktor zum Schutz von Zellen gegen $A\beta$ -Toxizität und oxidativen Stress zu sein und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation des Zelltods. Die genaue Bedeutung von Seladin-1 für Morbus Alzheimer und / oder die Inhibition von Apoptose allgemein ist jedoch noch unklar.

In diesem Zusammenhang interessant ist die Beobachtung, dass sich der Seladin-1 Proteinspiegel der in dieser Arbeit verwendeten Glu-Res und H_2O_2 -Res Neurone nicht von dem der sensitiven Neurone unterscheidet. Seladin-1 scheint demnach kein essentieller Faktor zur Vermittlung von oxidativer Resistenz oder zur Inhibition von Apoptose zu sein. Um jedoch eine Beteiligung von Seladin-1 an dem Resistenzverhalten der Glu-Res und H_2O_2 -Res Neurone völlig ausschließen zu können, müsste die Aktivität dieses Enzyms in den drei verwendeten Modellklonen verglichen werden.

5.6 Hitzeschock-Proteine

Stress, darunter auch oxidativer Stress, kann Zellen direkt oder indirekt schädigen und dabei zur Denaturierung von Proteinen führen. Zellen reagieren auf Stress mit einer Stressantwort, die durch sogenannte Hitzeschock-Proteine (Hsp) vermittelt wird. Der Name dieser Proteine hat seinen Ursprung in dem zuerst entdeckten Stressor Hitze, der diese Reaktion der Zelle auslöst (Ritossa, 1962). Zu den Hsp gehören unter anderem die Chaperone, die dazu beitragen, dass Proteine ihre funktionale Konfiguration erhalten bzw. wiedererhalten, falls sie diese z.B. aufgrund von Stress verloren haben (Hartl und Martin, 1995).

Denaturierte Proteine können ihre Funktion nicht oder nur mit geringer Effizienz ausüben. Au-

Berdem neigen sie dazu, zu aggregieren und zu präzipitieren, wie es bei einigen Krankheiten, den sogenannten Proteinopathien, der Fall ist. Morbus Alzheimer gehört zu dieser Gruppe der Proteinopathien. Im Verlauf der Krankheit aggregiert das A β Peptid zu senilen Plaques (s. Abschnitt 2.1). Oxidativer Stress, der im Verlauf der Krankheit ständig entsteht (s. Abschnitt 2.2.1), kann die Vorgänge zusätzlich beschleunigen, indem er zu Protein-Missfaltungen oder -Entfaltungen führt, die die Proteinaggregation fördern.

Aus diesem Grunde bilden die Hsp interessante Untersuchungsobjekte beim Studium von Proteinopathien wie z.B. Morbus Alzheimer sowie der Reaktion von Zellen auf Stress im Allgemeinen.

Von Hsp70 konnte gezeigt werden, dass seine Überexpression Fibroblasten vor Strahlung und Wasserstoffperoxid schützen kann (Simon et al., 1995). Deshalb wurde die Expression von Hsp70 in dem hier verwendeten Zellmodell untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder Glu-Res noch H₂O₂-Res Zellen Hsp 70 konstitutiv stärker exprimieren als HT-22 N Zellen (s. Abbildung 4.19). Die Resistenz gegen oxidativen Stress ist also nicht auf eine verstärkte Bildung dieses Proteins zurückzuführen. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen an anderen Glutamat resistenten HT-22 Zellen, in denen ebenfalls keine vermehrte Expression von Hsp70 festgestellt werden konnte (Sagara et al., 1998).

Die Gruppe der Hsp ist heterogen, deshalb ist die Untersuchung eines ihrer Vertreter nicht repräsentativ für die gesamte Gruppe. Dies zeigt sich auch in der Arbeit von Sagara und Kollegen, die ebenfalls in ihren Glutamat-resistenten HT-22 Neuronen keinen erhöhten Hsp70 Spiegel, jedoch eine verstärkte Expression von Hsp32 fanden (Sagara et al., 1998). Entsprechend ist die innerhalb dieser Arbeit festgestellte veränderte Expression von Hsp86, einem Chaperon mit ATPase Aktivität, in Glu-Res Zellen nicht als Inkonsistenz zu betrachten, wenngleich es zumindest auf den ersten Blick erstaunlich ist, dass Hsp86 in den resistenten Zellen schwächer exprimiert wird als in nicht resistenten Zellen (s. Abbildung 4.20). Eine erhöhte Expression hätte als Schutzmechanismus für die Zellen gegen die Einwirkung von oxidativem Stress gedeutet werden können. Eine Verringerung der Expression ist jedoch als Adaption der Neurone auf die anhaltende Toxineinwirkung ebenfalls erklärbar. Würden zu viele antiapoptotisch wirkende Moleküle in den permanent gestressten Zellen gebildet, so würden diese die Einleitung

von Apoptose grundsätzlich, also auch in Folge anderer Einwirkungen als oxidativem Stress, verhindern oder zumindest sehr verzögern. Die Möglichkeit, geschädigte Zellen zu eliminieren, wäre damit in erheblichem Maße verringert. In Abbildung 4.6 wurde jedoch gezeigt, dass Glu-Res und H₂O₂-Res Zellen nicht gegen jede Art von Toxineinwirkung resistent sind und Abbildung 4.19 zeigt, dass Glu-Res Neurone in der Lage sind, auf Hitzestress mit einer normalen Hitzeschock-Antwort zu reagieren. Diese Ergebnisse sprechen für die Selektivität des Zellmodells: Es wurden keine Zellen erschaffen, deren Signalwege alle so verändert sind, dass Apoptose verhindert wird, sondern es handelt sich um Neurone, die selektiv gegen oxidativen Stress resistent sind und daher nur Veränderungen in bestimmten Signalwegen aufweisen.

5.7 p53 und andere Tumor-assoziierte Signalwege

p53 ist ein Tumor Suppressor Protein, das neben seiner Bedeutung bei der Kontrolle des Zellzyklus (Reich und Levine, 1984), der Differenzierung (Oren et al., 1982) und der DNA-Reparatur (Kastan et al., 1991) auch eine Rolle bei der Apoptose spielt (Yonish-Rouach et al., 1991; Shaw et al., 1992). p53 kann zudem als Transkriptionsfaktor fungieren und so die Expression von Genen regulieren, die in die genannten Vorgänge involviert sind (Fields und Jang, 1990; Raycroft et al., 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass p53 eine Rolle bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen spielt, darunter auch Morbus Alzheimer (de la Monte et al., 1997), Morbus Parkinson (Blum et al., 1997) und Schlaganfall (Crumrine et al., 1994). In post mortem Gewebe von Alzheimer Patienten konnte ein erhöhter p53-Spiegel im Vergleich zu Geweben gleichaltriger Personen gefunden werden (de la Monte et al. 1997). Eine erhöhte p53 Immunoreaktivität wurde vor allem in dystrophischen Fibrillen, welche die Amyloid-Plaques umgeben und in vielen Tauhaltigen Neuriten beobachtet. Die Daten deuten darauf hin, dass der erhöhte p53-Spiegel die Anfälligkeit der Neurone für den induzierten „Selbstmord“ durch Apoptose widerspiegelt.

Entsprechend könnte eine erniedrigte p53-Expression mit einer erhöhten Resistenz einhergehen. Dieser Annahme entsprechend wurde mit Hilfe der Gen Expression Arrays eine verminderte Expression für p53 in Glu-Res Neuronen (s. Abschnitt 4.2.8) festgestellt. Eine Korrela-

tion zwischen der Expression von p53 und neuronalem Zelltod, ausgelöst durch Glutamat und DNA-zerstörende Toxine, konnte auch schon in anderen Studien aufgezeigt werden (Hughes et al., 1997; Sakhi et al., 1997; Uberti et al., 1998; Xiang et al., 1998; Inamura et al., 2000).

Die Verbindung zwischen p53 und Apoptose wurde durch die Arbeit von Culmsee und Kollegen erhärtet, in der neuronale Zellen durch Gabe eines spezifischen p53-Inhibitors vor Apoptose, ausgelöst durch DNA-zerstörende Toxine, A β -Peptid bzw. Glutamat, geschützt werden konnten (Culmsee et al., 2001). Der erniedrigte p53 Spiegel ging dabei einher mit einer erniedrigten Expression des p53 Zielgens Bax, für das auch in dieser Arbeit eine erniedrigte Expression in den Glu-Res Neuronen festgestellt wurde. Auch andere Arbeiten zeigten, dass p53 die Produktion und / oder die mitochondriale Translokation des proapoptotischen Bax Proteins stimuliert (Wood and Youle, 1995; Jordan et al., 1997; Chen et al., 1999; Sheikh und Fornace, 2000).

Die Hinweise darauf, dass p53 in Apoptose involviert ist, sind sehr stark. Allerdings scheint p53 auch in protektive Signalwege, wie z.B. die bereits erwähnte DNA-Reparatur, involviert zu sein (Kastan et al., 1991). Nach welchen Mechanismen p53 agiert, ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist denkbar, dass eine Zelle, deren DNA geschädigt wurde, zunächst versucht, diesen Schaden durch einen p53-vermittelten Prozess zu reparieren. Wenn das fehlschlägt, induziert p53 den Zelltod durch Apoptose.

Mit Hilfe der Gen Expression Arrays wurde neben der verminderten Expression für p53 auch eine reduzierte Expression anderer Tumor assoziierter Gene in Glu-Res Neuronen festgestellt. Diese Gene kodieren für die Proteine Bax, Gadd45, c-Myc und p57 (Kip2) (s. Abschnitt 4.2.8). Dies lässt die genannten Proteine auf den ersten Blick als guten Ansatzpunkt für neuroprotektive Wirkstoffe erscheinen. Bei der Überlegung, diese Entdeckungen für einen Therapieansatz zu nutzen, darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass p53 und die anderen genannten Genprodukte auch Teile von Signalwegen sind, die bei Tumorzellen verändert sind. Diese Tatsache als solche ist nicht besonders verwunderlich, da Tumorzellen ebenfalls Zellen sind, die sich als gegen Stress resistent erweisen. Bei Tumoren richtet sich die Resistenz gegen die körpereigene Abwehr und u.U. sogar einige Therapieformen.

Das Eingreifen in diese Tumor-assoziierten Signalwege, um Neuronen gegen oxidativen Stress zu schützen, wie z.B. bei Alzheimer- oder Schlaganfallpatienten, ist demnach jedoch extrem

kritisch. Schnell könnte das Eingreifen in diese Signalwege in einer unkontrollierten Zellteilung resultieren. Um irgendwann in der Lage zu sein, solche Signalwege als Therapieansatz in Erwägung zu ziehen, ist es erforderlich, die Tumor assoziierten Signalwege noch besser zu verstehen. Erst wenn das komplexe Netzwerk der Signaltransduktionswege in einer Zelle weiter aufgeklärt ist, ist es u.U. möglich, gezielte Veränderungen in Tumor-assoziierten Signalwegen vorzunehmen, die die Resistenz der Neuronen gegen toxische Einwirkungen erhöhen ohne gleichzeitig das Risiko katastrophaler Nebenwirkungen in sich zu bergen.

5.8 NF κ B

Der nukleare Faktor κ B (NF κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der ursprünglich in seiner Funktion als Aktivator von Genen des Immunsystems bei Entzündungsprozessen entdeckt wurde (Sen und Baltimore, 1986). Später wurde ihm besonderes Interesse zuteil, da NF κ B der erste identifizierte Transkriptionsfaktor war, dessen Aktivität auch durch oxidativen Stress induziert werden kann (Schreck et al., 1991). Dies macht ihn zur potentiellen pharmazeutischen Zielstruktur für mit oxidativem Stress assoziierte Krankheiten, also auch für Morbus Alzheimer.

Der NF κ B Signalweg wird heute zu den wichtigsten antiapoptotischen Signalwegen der Zelle gezählt. Zu seinen Zielgenen zählen u.a. die Gene für Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsfaktoren (Baldwin, 1996). In dieser Studie wurde eine verstärkte Expression von NF κ B in den Glu-Res Neuronen im Vergleich zu HT-22 N festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass auch in den hier verwendeten resistenten Neuronen eine Protektion über diesen Signalweg stattfinden könnte.

NF κ B ist ein heterodimeres Protein, das aus zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 50 kDa bzw. 65 kDa zusammengesetzt ist. In seiner inaktiven Form ist es mit dem zytoplasmatischen Protein I κ B assoziiert. Verschiedene Stimuli, wie z.B. IL-1, Glutamat oder A β , bewirken eine Phosphorylierung und somit den Abbau der inhibitorischen Einheit I κ B. Dadurch wird NF κ B freigesetzt und kann in den Zellkern übergehen, wo es durch Bindung an κ B-responsive Elemente auf der DNA die Transkription von Zielgenen induziert.

Die Expression sowie der Proteinspiegel von I κ B sind in den Glu-Res im Vergleich zu den sensi-

tiven HT-22 Neuronen nicht verändert (nicht gezeigte Daten aus GEArray „Maus PathwayFinder-1“ und Western Blots). Wäre dies der Fall gewesen, hätte das die Bedeutung der beobachteten erhöhten NF κ B Expression (s. Abbildung 4.20) deutlich vermindert.

Zur weiteren Klärung der Bedeutung des NF κ B-Signalweges für die Resistenzvermittlung in dem hier verwendeten Zellmodell wären zusätzliche Untersuchungen auf Proteinebene nötig. Unabhängig von deren Ausgang stellt NF κ B jedoch in jedem Fall eine interessante Zielstruktur für neuroprotektive Wirkstoffe dar.

5.9 Differential Display

Mit Hilfe der Methode des Differential Display wurde ein Expressionsunterschied in zwei interessanten Genen, dem AMC-Gen und der 26S Untereinheit des Proteasoms, festgestellt. Außerdem konnte mittels In-Situ-Hybridisierungen eine starke Expression dieser Gene im Hippokampus der Maus nachgewiesen werden. Der Hippokampus ist besonders anfällig für oxidativen Zelltod und weist im Gehirn von Alzheimer-Patienten einen großen Teil degenerierender Neurone auf.

Über die Funktion des AMC-Gens ist bislang nichts bekannt, folglich kann über die Bedeutung seiner schwächeren Expression in Glu-Res Neuronen im Vergleich zu HT-22 N Neuronen nur spekuliert werden. Im idealen Falle wäre das Genprodukt von AMC in Signalwege involviert, die Apoptose in Folge von oxidativem Stress auslösen. Um diese Frage zu klären, müsste die Expression von AMC auch in anderen Modellen getestet und der Einfluss von Inhibition bzw. Überexpression von AMC auf das Resistenzverhalten von Zellen untersucht werden.

Weiterhin ist zu klären, ob für dieses Gen auch ein humanes Homolog existiert, da ein solches in den Sequenzdatenbanken nicht aufgeführt ist. Ein erster Versuch, ein solches Homolog durch Southern Blot Analyse nachzuweisen, deutet darauf hin, dass dieses tatsächlich existiert (Resultate nicht gezeigt). Die Sonde hybridisierte mit einem humanen DNA-Fragment, das durch Behandlung der DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst I* entstanden ist sowie mit einem Maus-DNA-Fragment, das durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym *Eco RV* entstand. Die Existenz eines humanen AMC-Homologs hat eine entscheidende Bedeutung für die Relevanz

des hier gefundenen Ergebnisses für neurodegenerative Erkrankungen beim Menschen.

Die 26S Untereinheit des Proteasoms ist ebenso wie das AMC-Gen in Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert als in HT-22 N Neuronen. Über die Funktion der ATP-abhängigen Ubiquitin / Proteasom Kaskade ist mehr bekannt als über das AMC-Gen. Das 26S Proteasom entsteht, indem das 20S Proteasom über einen ATP-abhängigen Weg mit anderen Untereinheiten assoziiert (Eytan et al., 1989). Das 26S Proteasom ist im Zytoplasma und im Nukleus aller eukaryontischen Zellen lokalisiert und ist in der Lage, ubiquitinylierte Proteine zu hydrolysieren. Die Proteasom Aktivität ist für die Aufrechterhaltung des normalen Zellzyklus wichtig, indem es die zeitlich abgestimmte Degradierung verschiedener Zellzyklusinhibitoren und Transkriptionsfaktoren bewirkt. Zu diesen zählen verschiedene Cycline (Sudakin et al., 1995), das Tumorsuppressorprotein p53 (Maki et al., 1996) sowie die Transkriptionsfaktoren c-Jun (Treier et al., 1994) und c-Myc (Ciechanover et al., 1991).

Die verminderte Expression des Proteasom-Gens scheint jedoch keine gravierenden Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung des Zellzyklus in Glu-Res Neuronen zu haben, da sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Glu-Res Neuronen nicht von der der HT-22 N Zellen unterscheidet (s. Abbildung 4.4). Die Anreicherung der genannten Zellzyklusregulatoren wird in den Glu-Res Neuronen wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus als die Proteasom abhängige Degradierung verhindert. Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte die Inhibition der Transkription sein, da zumindest für p53 und c-Myc eine verminderte Expression dieser Gene in Glu-Res im Vergleich zu HT-22 N Neuronen festgestellt werden konnte (s. Abbildung 4.20). Dem Proteasom konnte in früheren Arbeiten auch eine Rolle bei Stress-induzierten Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden, indem es z.B. eine Rolle bei der Signal-induzierten Degradierung von $I\kappa B\alpha$, dem zytoplasmatischen Inhibitor von $NF\kappa B$, spielt (Palombella et al., 1994). In den Glu-Res Zellen führt die verminderte Proteasom Expression jedoch nicht zu einem erhöhten $I\kappa B\alpha$ -Spiegel, wie anhand von Western Blot Experimenten festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn aus dieser Arbeit nicht hervorgeht, ob und auf welche Weise die geringe Expression des 26S Proteasoms zur Resistenz gegen oxidativen Stress beiträgt, so ist das Ergebnis als solches doch sehr interessant. Das Proteasom ist generell ein wichtiger Koordinator von

Zellzyklus- und Apoptose-Vorgängen und erwiesener Maßen auch in die Reaktion von Zellen auf Stress involviert. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Relevanz der erniedrigten Expression dieses Gens in den Glu-Res Zellen abschätzen zu können.

5.10 Chip-Hybridisierung

Für die Chip-Hybridisierung wurden Mikroarrays benutzt, die von Mikroarray-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie hergestellt wurden, indem PCR-Produkte der Mausgenbanken MMSV (Mus musculus sequence verified) und BMAP (Brain Molecular Anatomy Project) auf Glasobjektträger aufgebracht wurden. Die Identität der auf die Objektträger aufgebrachten cDNAs wurde nicht durch Sequenzierung überprüft. Da erfahrungsgemäß die Sequenzen der klonierten cDNAs nicht immer mit den angegebenen Namen übereinstimmen, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der aufgeführten Gennamen nicht mit den tatsächlich unterschiedlich exprimierten Genen übereinstimmt. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass nur zwei von sieben Expressionsunterschieden mit Hilfe der semiquantitativen PCR bestätigt werden konnten, da die Primer für die PCR anhand der in den Datenbanken unter dem jeweiligen Gennamen aufgeführten Sequenzen generiert wurden.

Um eine verlässliche Aussage über Expressionsunterschiede in den in Tabelle 4.1 aufgeführten Genen treffen zu können, ist es notwendig, die Sequenz der auf den Chip aufgebrachten cDNAs zu überprüfen. Außerdem muss der Expressionsunterschied mit Hilfe anderer Methoden, wie z.B. der semiquantitativen PCR oder der Realtime PCR, verifiziert werden. Die Realtime PCR ist dabei die sensitivere Methode. Ein dafür erforderliches Gerät stand jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung, so dass nicht nachgewiesene Expressionsunterschiede eventuell auch auf die relativ geringe Sensitivität der semiquantitativen PCR zurückzuführen sein können. Nachgewiesen werden konnten bislang Expressionsunterschiede in den Genen der Glutathion Reduktase 1 (Gsr) und der 3-Oxoacid CoA Transferase (Oxct). Während Gsr in den Glu-Res Neuronen schwächer exprimiert ist als in den HT-22 N Neuronen, ist das Verhältnis für Oxct umgekehrt. Ob diese Expressionsunterschiede Einfluss auf das Resistenzverhalten der Zellen nehmen oder ob sie lediglich einen Nebeneffekt der Langzeitinkubation mit Glutamat darstel-

len, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Es wären zum Beispiel Transfektions-Experimente denkbar, bei denen die genannten Gene in gegen oxidativen Stress sensitiven Zellen überexprimiert werden bzw. Knock-out-Experimente, bei denen dieses Gene gezielt ausgeschaltet werden. Eine Behandlung dieser Zellen mit oxidativen Stressoren wie beispielsweise Glutamat oder Wasserstoffperoxid würde Aufschluss darüber geben, ob das Resistenzverhalten der Zellen durch Expressionsunterschiede in den Kandidatengenen verändert wird.

Besonders interessant ist die beobachtete Expressionsänderung für Gsr, da dieses Gen sowohl in den Glu-Res als auch den H₂O₂-Res Neuronen schwächer exprimiert ist als in den HT-22 N Neuronen (s. Abbildung 4.31). Da in der Literatur jedoch bislang nicht eine geringere, sondern eher eine verstärkte Expression von Gsr mit einer erhöhten Resistenz gegen oxidative Stressoren in Verbindung gebracht wird (Mockett et al., 1999; White et al., 1999; Pena-Llopis et al., 2001), liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen resistenzunabhängigen Nebeneffekt handelt. Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Inkubation von Zellen mit oxidativem Stress hervorrufenden Substanzen zu einer Reduktion der Glutathion Reduktase führen kann (Montilla-Lopez et al., 2002; Dincer et al., 2002).

Die Funktion von über einem Drittel der in Tabelle 4.1 aufgeführten Gene ist bislang unbekannt. Dies sind sehr interessante Kandidaten für die Suche nach Genen, die in gegen oxidativen Stress resistenten und sensitiven Zellen differentiell reguliert sind, da sie möglicherweise in bislang unbekannt Signalwege involviert sind. Es ist durchaus möglich, dass ein oder mehrere dieser Gene einen Ansatzpunkt für eine Therapie von mit oxidativem Stress in Verbindung stehenden neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Morbus Alzheimer darstellen könnten.

Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. (1997), ' β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway', *EMBO J* **16**, 3797–3804.
- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A. & Maccioni, R. (1999a), 'Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death', *FEBS Lett.* **459**, 421–426.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. & Diaz-Nido, J. (1999b), 'Lithium protects cultured neurons against β amyloid-induced neurodegeneration', *FEBS Lett.* **453**, 260–264.
- Alzheimer, A. (1907), 'Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde', *Allg. Zschr. Psychiatr. Psychisch-Gerichtl. Mediz.* **64**, 146–148.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. & Nicoterra, P. (1995), 'Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function', *Neuron* **15**, 961–973.
- Bacus, S., Altomare, D., Lyass, L., Chin, D., Farrell, M., Gurova, K., Gudkov, A. & Testa, J. (2002), 'AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival', *Oncogene* **21**, 3532–3540.
- Baldwin, A. (1996), 'The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights', *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649–681.
- Barry, M. & Eastman, A. (1993), 'Identification of desoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis', *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 385–696.

- Behl, C. (1997), 'Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease', *Cell and Tissue Res* **290**, 471–480.
- Behl, C., Davis, J., Lesley, R. & Schubert, D. (1994), 'Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity', *Cell* **77**, 817–827.
- Behl, C., Hovey, L., Krajewski, S., Schubert, D. & Reed, J. (1993), 'Bcl-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid β protein', *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 949–956.
- Berger, N. (1985), 'Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage', *Radiat. Res.* **101**, 4–15.
- Blum, D., Wu, Y., Nissou, M., Arnaud, S., Alim-Louis-Benabid & Verna, J. (1997), 'p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells', *Brain Res* **751**, 139–142.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. (1995), 'Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures', *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7162–7166.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. & Mlodzik, M. (1998), 'Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling', *Cell* **94**, 109–118.
- Braak, E., Braak, H. & Mandelkow, E. (1994), 'A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads', *Acta Neuropathol.* **87**, 554–567.
- Braak, H. & Braak, E. (1998), 'Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease', *J. neural Transm.* **105 (Suppl. 53)**, 127–140.

- Busuttill, V., Bottero, V., Frelin, C., Imbert, V., Ricci, J., Auberger, P. & Peyron, J. (2002), 'Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector', *Oncogene* **21**, 3213–3224.
- Butterfield, D. & Kanski, J. (2001), 'Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins', *Mechanisms of Aging and Development* **1222**, 945–962.
- Canman, C., Lim, D., Cimprich, K., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. & Siliciano, J. (1998), 'Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53', *Science* **281**, 1677–1679.
- Chen, R., Saunders, P., Wei, H., Li, Z., Seth, P. & Chuang, D. (1999), 'Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53', *J Neurosci* **19**, 9654–9662.
- Ciechanover, A., DiGiuseppe, J., Bercovich, B., Orian, A., Richter, J., Schwartz, A. & Brodeur, G. (1991), 'Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro', *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 139–143.
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., Winblad, B., Venizelos, N., Lannfelt, L. & Selkoe, D. (1994), 'Excessive production of amyloid β -protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the swedish familial Alzheimer disease mutation', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11993–11997.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P. S. G. & Selkoe, D. (1997), 'Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice', *Nat. Med.* **3**, 67–72.
- Cookson, M. & Shaw, P. (1999), 'Oxidative stress and motor neurone disease', *Brain Pathol.* **9**, 165–186.

- Corley, S., Ladiwala, U., Besson, A. & Yong, V. (2001), 'Astrocytes attenuate oligodendrocyte death in vitro through an alpha(6) integrin-laminin-dependent mechanism', *Glia* **36**, 281–294.
- Crawford, H., Matrisian, L. & Liaw, L. (1998), 'Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo', *Cancer Res* **58**, 5206–5215.
- Cross, D., Alessi, D., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. (1995), 'Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B', *Nature* **378**, 785–789.
- Crowder, R. & Freeman, R. (1998), 'Phosphatidylinositol 3-kinase and akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth-dependent sympathetic neurons', *J. Neurosci.* **18**, 2933–2943.
- Crowder, R. & Freeman, R. (2000), 'Glykogen synthase kinase-3 β activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or akt but nor for death caused by nerve growth factor withdrawal', *J. Biol. Chem.* **275**, 34266–34271.
- Crumrine, R., Thomas, A. & Morgan, P. (1994), 'Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice', *J Cereb Blood Flow Metab* **14**, 887–891.
- Culmsee, C., Zhu, X., Yu, Q.-S., Chan, S., Camandola, S., Guo, Z., Greig, N. & Mattson, M. (2001), 'A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid β -peptide', *Journal of Neurochemistry* **77**, 220–228.
- de la Monte, S., Sohn, Y. & Wands, J. (1997), 'Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease', *Journal of Neurological Sciences* **152**, 73–83.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. & Dedhar, S. (1998), 'Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glykogen synthase kinase 3 and protein kinase B / AKT by the integrin-linked kinase', *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11211–11216.

- Dias, S., Shmelkov, S., Lam, G. & Rafii, S. (2002), 'VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression apoptosis inhibition', *Blood* **99**, 2532–2540.
- Dincer, Y., Akcay, T., Alademir, Z. & Ilkova, H. (2002), 'Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus', *Metabolism* **51**, 1360–1362.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Schreiber, S., Pfister, H.-W., Koedel, U., Reszka, R., Freyer, D. & Villringer, A. (1995), 'Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence *in vivo*', *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 929–940.
- Dudek, H., Datta, S., Franke, T., Birnbaum, M., Yao, R., Cooper, G., Segal, R., Kaplan, D. & Greenberg, M. (1997), 'Regulation of neuronal survival by the serin-threonine protein kinase Akt', *Science* **275**, 661–665.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. & Younkin, S. (1996), 'Increased amyloid- β 42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1', *Nature* **383**, 710–713.
- Eliasson, M., Sampei, K., Mandir, A., Hurn, P., Traystman, R., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z., Dawson, T., Snyder, S. & Dawson, V. (1997), 'Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia', *Nat Med* **3**, 1089–1095.
- Endres, M., Wang, Z., Namura, S., Waeber, C. & Moskowitz, M. (1997), 'Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase', *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 1143–1151.
- Esler, W. & Wolfe, M. (2001), 'A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces', *Science* **293**, 1449–1454.

- Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T. & Hershko, A. (1989), 'ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin', *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **86**, 7751–7755.
- Falco, S. D., Gigante, B. & Persico, M. (2002), 'Structure and function of placental growth factor', *Trends Cardiovasc Med* **12**, 241.
- Felsher, D., Zetterberg, A., Thu, J., Tlsty, T. & Bishop, J. (2000), 'Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts', *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10544–10548.
- Ferrari, G. D. & Inestrosa, N. (2000), 'Wnt signaling function in Alzheimer's disease', *Brain Research Reviews* **33**, 1–12.
- Fields, S. & Jang, S. (1990), 'Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein', *Science* **249**, 1046–1049.
- Flood, D., Reaume, A., Dorfman, K., Lin, Y., Lang, D., Trusko, S., Savage, M., Annaert, W., Strooper, B. D., Siman, R. & Scott, R. (2002), 'FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: Increased A beta 42 and A beta deposition without APP overproduction', *Neurobiol Aging* **23**, 335–348.
- Fuchs, S., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S. & Ronai, Z. (1998), 'JNK targets p53 ubiquitination and degradation in non-stressed cells', *Genes Dev.* **12**, 2658–2663.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Soriano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B. & Zhao, J. (1995), 'Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717 β -amyloid precursor protein', *Nature* **373**, 523–527.

- Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A. & Meur, M. L. (1996), 'Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice', *Nat Genet* **13**, 370–373.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J., Petersen, R., Parisi, J. & Hyman, B. (1997), 'Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Ann Neurol* **41**, 17–24.
- Greeve, I., Hermans-Borgmeyer, I., Brellinger, C., Kasper, D., Gomez-Isla, T., Behl, C., Levkau, B. & Nitsch, R. (2000), 'The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress', *The Journal of Neuroscience* **20**, 7345–7352.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J. & Nitsch, R. (2001), 'Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils', *Science* **293**, 1491–1495.
- Haass, C. (1997), 'Presenilins: Genes for life and death', *Neuron* **18**, 687–690.
- Hardy, J. (1996), 'Molecular genetics of Alzheimer's disease', *Acta Neurol Scand Suppl* **165**, 13–17.
- Hardy, J. & Higgins, G. (1992), 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', *Science* **256**, 184–185.
- Hartl, F. & Martin, J. (1995), 'Molecular chaperones in cellular protein folding', *Curr. Biol.* **5**, 92–102.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L. & Strooper, B. D. (2000), 'Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells', *Nature Cell Biology* **2**, 461–462.
- Hetman, M., Cavanaugh, J., Kimelman, D. & Xia, Z. (2000), 'Role of glycogen synthase kinase-3b in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal', *The Journal of Neuroscience* **20**, 2567–2574.

- Hong, M., Chen, D., Klein, P. & Lee, V.-Y. (1997), 'Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3', *J. Biol. Chem.* **272**, 25326–25332.
- Hughes, P., Alexi, T. & Schreiber, S. (1997), 'A role for the tumour suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis', *Neuroreport* **8**, v–xii.
- Hwang, D., Chae, K., Kang, T., Hwang, J., Lim, C., Kang, H., Goo, J., Lee, M., Lim, H., Min, S., Cho, J., Hong, J., Song, C., Paik, S., Cho, J. & Kim, Y. (2002), 'Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease', *FASEB J* **16**, 805–813.
- Iivonen, S., Hiltunen, M., Alafuzoff, I., Mannermaa, A., Kerokoski, P., Puoliväli, J., Salminen, A., Helisalmi, S. & Soininen, H. (2002), 'Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease', *Neuroscience* **113**, 301–310.
- Inamura, N., Araki, T., Enokido, Y., Nishio, C., Aizawa, S. & Hatanaka, H. (2000), 'Role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice culture from the cerebellum', *J Neurosci Res* **60**, 450–457.
- Ip, Y. & Davis, R. (1998), 'Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK): From inflammation to development', *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205–219.
- Irizarry, M., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K. & Hyman, B. (1997), 'APPsw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities but no neuronal loss in CA1', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 965–973.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. & Imahori, K. (1993), 'Glycogen synthase kinase 3 β is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments', *FEBS Lett.* **325**, 167–172.
- Jenner, P. & Olanow, C. (1996), 'Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease', *Neurology* **47**, S161–S170.
- Joachim, C., Morris, J. & Selkoe, D. (1989), 'Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease', *Am. J. Pathol.* **135**, 309–319.

- Jordan, J., Galindo, M., Prehn, J., Weichselbaum, R., Beckett, M., Ghadge, G., Roos, R., Leiden, J. & Miller, R. (1997), 'p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures', *J Neurosci* **17**, 1397–1405.
- Kane, D., Ord, T., Anton, R. & Bredesen, D. (1995), 'Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death', *J. Neurosci. Res.* **40**, 269–275.
- Kang, J., Lemaire, H., Unterbeck, A., Salbaum, J., Masters, C., Grzeschik, K., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Muller-Hill, B. (1987), 'The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor', *Nature* **325**, 733–736.
- Kastan, M., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R. (1991), 'Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage', *Cancer Res* **51**, 6304–6311.
- Kaufmann, S. (1989), 'Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note', *Cancer Res.* **49**, 5870–1878.
- Kaufmann, S., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. & Poirier, G. (1993), 'Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis', *Cancer Res* **53**, 3976–3985.
- Kerr, J., Wyllie, A. & Currie, A. (1972), 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics', *Br. J. Cancer* **26**, 239–257.
- Kim, J., Choi, S., Kim, N., Jin, J., Choi, E., Carp, R. & Kim, Y. (2001), 'Oxidative stress and neurodegeneration in prion diseases', *Ann N Y Acad Sci* **928**, 182–186.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., Matsuoka, Y., Nomura, Y. & Taniguchi, T. (1997), 'Changes in p53 in the brains of patients with Alzheimer's disease', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 418–421.
- Klein, P. & Melton, D. (1996), 'A molecular mechanism for the effect of lithium on development', *Proc. Natl Acad Sci USA* **93**, 8455–8459.

- Knudson, C. & Korsmeyer, S. (1997), 'Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death.', *Nat Genet* **16**, 358–363.
- Kovacs, D., Fausett, H., Page, K., Kim, T., Moir, R., Merriam, D., Hollister, R., Hallmark, O., Mancini, R., Felsenstein, K., Hyman, B., Tanzi, R. & Wasco, W. (1996), 'Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells', *Nat. Med.* **2**, 224–229.
- Kozopas, K., Yang, T., Buchan, H., Zhou, P. & Craig, R. (1993), 'MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2', *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3516–3520.
- LaCasse, E., Baird, S., Korneluk, R. & MacKenzie, A. (1998), 'The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer', *Oncogene* **17**, 3247–3259.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R. & Distelhorst, C. (1994), 'Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes', *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6569–6573.
- Landgrebe, J., Wurst, W. & Welzl, G. (2002), 'Permutation validated principal components analysis of microarray data', *Genome Biology* **3**, research19.1–19.11.
- Lewis, J., Dickson, D., Lin, W., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. & McGowan, E. (2001), 'Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP', *Science* **293**, 1487–1491.
- Lezoualc'h, F., Sagara, Y., Holsboer, F. & Behl, C. (1998), 'High constitutive NF- κ b activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells', *The Journal of Neuroscience* **18**, 3224–3232.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. & Altieri, D. (1998), 'Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin', *Nature* **396**, 580–584.

- Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A., McMahon, A., Sussman, D. & Wu, D. (1999), 'Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells.', *J. Biol. Chem.* **274**, 129–134.
- Li, Y., Xu, C. & Schubert, D. (1999), 'The up-regulation of endosomal-lysosomal components in amyloid β -resistant cells', *Journal of Neurochemistry* **73**, 1477–1482.
- Lindahl, T., Satoh, M., Poirier, A. & Klunglad, A. (1995), 'Posttranslational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks', *Trends Biochem. Sci.* **20**, 405–411.
- Lovestone, S., Hartley, C., Pearce, J. & Anderton, B. (1996), 'Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules', *Neuroscience* **73**, 1145–1157.
- Lovestone, S., Reynolds, C., Latimer, D., Davis, D., Anderton, B., Gallo, J., Hanger, D., Mullet, S., Marquardt, B., Stabel, S. & Woodgett, J. (1994), 'Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells', *Curr. Biol.* **4**, 1077–1086.
- Lowenthal, J., Zubler, R., Nabholz, M. & MacDonald, H. (1985), 'Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes', *Nature* **315**, 669–672.
- MacGibbon, G., Lawlor, P., Walton, M., Sirimanne, E., Faull, R., Synek, B., Mee, E., Connor, B. & Dragunow, M. (1997), 'Expression of Fos, Jun and Krox family proteins in Alzheimer's disease', *Exp. Neurol.* **147**, 316–332.
- Maki, C., Huibregtse, J. & Howley, P. (1996), 'In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1)', *Cancer Res* **56**, 2649–2654.
- Marcus, D., Strafacci, J., Miller, D., Masia, S., Thomas, C., Rosman, J., Hussain, S. & Freedman, M. (1998), 'Quantitative neuronal c-fos and c-jun expression in Alzheimer's disease', *Neurobiol. Aging* **19**, 393–400.

- Marin, M., Fernandez, A., Bick, R., Brisbay, S., Buja, L., Snuggs, M., McConkey, D., von Eschenbach, A., Keating, M. & McDonnell, T. (1996), 'Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺', *Oncogene* **12**, 2259–2266.
- McKallip, R., Do, Y., Fisher, M., Robertson, J., Nagarkatti, P. & Nagarkatti, M. (2002), 'Role of CD44 in activation-induced cell death: CD44-deficient mice exhibit enhanced T cell response to conventional and superantigens', *Int Immunol* **14**, 1015–1026.
- Miller, T., Tansey, M., Johnson, E. & Creedon, D. (1997), 'Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells', *J Biol Chem* **272**, 9847–9853.
- Mockett, R., Sohal, R. & Orr, W. (1999), 'Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia', *FASEB J* **13**, 1733–1742.
- Monk, C., Webb, S. & Nelson, C. (2001), 'Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change', *Dev Neuropsychol* **19**, 211–236.
- Montague, J., Gaido, M., Frye, C. & Cidlowski, J. (1994), 'A calcium dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin: recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity', *J. Biol. Chem.* **269**, 18877–18880.
- Montilla-Lopez, P., Munoz-Agueda, M., Lopez, M. F., Munoz-Castaneda, J., Bujalance-Arenas, I. & Tunez-Finana, I. (2002), 'Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells', *Eur J Pharmacol* **451**, 237–243.
- Moule, S., Welsh, G., Edgell, N., Foulstone, E., Proud, C. & Denton, R. (1997), 'Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms', *J Biol Chem* **272**, 7713–7719.

- Mudher, A. & Lovestone, S. (2002), 'Alzheimer's disease - do tauists and baptists finally shake hands?', *TINS* **25**, 22–26.
- Munoz-Montano, J., Moreno, F., Avila, J. & Diaz-Nido, J. (1997), 'Lithium inhibits Alzheimer's disease like tau protein phosphorylation in neurons', *FEBS Lett.* **411**, 183–188.
- Nagy, Z., Esiri, M., Jobst, K., Morris, J., King, E., McDonald, B., Litchfield, S., Smith, A., Barnetson, L. & Smith, A. (1995), 'Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria.', *Dementia* **6**, 21–31.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K., Davies, P., Greengard, P. & Buxbaum, J. (2000), 'Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline', *J. Amer. med. Assoc.* **283**, 1571–1577.
- Neve, D., McPhie, Y. & Chen, Y. (2000), 'Alzheimer's disease: A dysfunction of the amyloid precursor protein', *Brain Res* **886**, 54–56.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R. & Varmus, H. (1991), 'A new nomenclature for int-1 and related genes: the wnt gene family', *Cell* **64**, 231–232.
- Oren, M., Reich, N. & Levine, A. (1982), 'Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny', *Mol Cell Biol* **2**, 443–449.
- Palombella, V., Rando, O., Goldberg, A. & Maniatis, T. (1994), 'The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B', *Cell* **78**, 773–785.
- Pap, M. & Cooper, G. (1998), 'Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase / Akt cell survival pathway', *J. Biol. Chem.* **273**, 19929–19932.
- Pei, J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B. & Cowburn, R. (1999), 'Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes', *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 1010–1019.

- Peitsch, M., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H., Mannherz, H. & Tschopp, J. (1993), 'Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death)', *EMBO J.* **12**, 371–377.
- Pena-Llopis, S., Pena, J., Sancho, E., Fernandez-Vega, C. & Ferrando, M. (2001), 'Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate', *Chemosphere* **45**, 671–681.
- Philp, A., Campbell, I., Leet, C., Vincan, E., Rockman, S., Whitehead, R., Thomas, R. & Phillips, W. (2001), 'The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors', *Cancer Res* **61**, 7426–7429.
- Philpott, K., McCarthy, M., Klippel, A. & Rubin, L. (1997), 'Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons', *J Cell Biol* **139**, 809–815.
- Pitman, E. (1937), 'Significance tests which may be applied to samples from any populations', *Journal of the Royal Statistical Society (Series B)* **4**, 119–130.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J., Price, D. & Koliatsos, V. (1995), 'Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models', *J Neurosci* **15**, 3775–3787.
- Pratico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. & Lee, V.-Y. (2001), 'Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis', *The Journal of Neuroscience* **21**, 4183–4187.
- Raycroft, L., Wu, H. & Lozano, G. (1990), 'Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene', *Science* **249**, 1049–1051.
- Reich, N. & Levine, A. (1984), 'Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in non-transformed cells', *Nature* **308**, 199–201.
- Reynolds, C., Utton, M., Gibb, G., Yates, A. & Anderton, B. (1997), 'Stress-activated protein kinase / c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau-protein', *J. Neurochem.* **68**, 1736–1744.

- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W., Schmidt, B., Reynolds, G., Jellinger, K. & Youdim, M. (1989), 'Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in Parkinsonian brains', *J. Neurochem.* **52**, 515–520.
- Ritossa, F. (1962), 'A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila', *Experientia* **18**, 571–573.
- Roperch, J., Alvaro, V., Prieur, S., Tuynder, M., Nemani, M., Lethrosne, F., Piouffre, L., Gendron, M., Israeli, D., Dausset, J., Oren, M., Amson, R. & Telerman, A. (1998), 'Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression', *Nat. Med.* **4**, 835–838.
- Rosenthal, D., Ding, R., Simbulan-Rosenthal, C., Vaillancourt, J., Nicholson, D. & Smulson, M. (1997), 'Intact cell evidence for the early synthesis, and subsequent late apoptosis-mediated suppression, of poly(ADP-ribose) during apoptosis', *Exp Cell Res* **232**, 313–321.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S., Henry, A., McKinstry, W., Galatis, D., Hesse, L., Mulhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. & Parker, M. (1999), 'Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein', *Nat Struct Biol* **6**, 327–331.
- Ryan, J., Prochownik, E., Gottlieb, C., Apel, I., Merino, R., Nunez, G. & Clarke, M. (1994), 'c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle', *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5878–82.
- Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. & Maher, P. (1998), 'Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress', *Free Radical Biology & Medicine* **24**, 1375–1389.
- Sakhi, S., Bruce, A., Sun, N., Tocco, G., Baudry, M. & Schreiber, S. (1997), 'Induction of tumor suppressor p53 and DNA fragmentation in organotypic hippocampal cultures following excitotoxin treatment', *Exp Neurol* **145**, 81–88.

- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. & Younkin, S. (1996), 'Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the Presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease', *Nature Med.* **2**, 864–870.
- Schlondorf, J. & Blobel, C. (1999), 'Metalloprotease-disintegrins: Modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding', *J Cell Sci* **112**, 3603–3617.
- Schreck, R., Zorbas, H., Winnacker, E. & Bäuerle, P. (1991), 'Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1', *EMBO J.* **10**, 2247–2258.
- Sen, R. & Baltimore, D. (1986), 'Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences', *Cell* **46**, 705–706.
- Sevilla, L., Aperlo, C., Dulic, V., Chambard, J., Boutonnet, C., Pasquier, O., Pognonec, P. & Boulukos, K. (1999), 'The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism', *Mol Cell Biol* **19**, 2624–2634.
- Sevilla, L., Zaldumbide, A., Carlotti, F., Dayem, M., Pognonec, P. & Boulukos, K. (2001), 'Bcl-xL expression correlates with primary macrophage differentiation, activation of functional competence, and survival and results from synergistic transcriptional activation by Ets2 and PU.1', *J Biol Chem* **276**, 17800–17807.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B. & Costa, J. (1992), 'Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line', *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4495–4499.
- Sheikh, M. & Jr, A. F. (2000), 'Role of p53 family members in apoptosis', *J Cell Physiol* **182**, 171–181.

- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999), 'Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC', *Nature* **399**, 483–487.
- Shiurba, R., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock, T., Yanagawa, H., Imahori, K. & Nixon, R. (1996), 'Immunocytochemistry of tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology', *Brain Res* **737**, 119–132.
- Shizuka-Ikeda, M., Matsubara, E., Ikeda, M., Kanai, M., Tomidokoro, Y., Ikeda, Y., Watanabe, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., Maruyama, K., Castano, E., George-Hyslop, P. S. & Shoji, M. (2002), 'Generation of amyloid beta protein from a presenilin-1 and beta APP complex', *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 571–578.
- Simbulan-Rosenthal, C., Rosenthal, D., Iyer, S., Boulares, A. & Smulson, M. (1998), 'Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis', *J Biol Chem* **273**, 13703–13712.
- Simon, M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T., Jäättelä, M. & Schwarz, T. (1995), 'Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts', *J. Clin. Invest.* **95**, 926–933.
- Sims, J., Berger, S. & Berger, N. (1983), 'Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis', *Biochemistry* **22**, 5188–5194.
- Stambolic, V., Ruel, L. & Woodgett, J. (1996), 'Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells', *Curr. Biol.* **6**, 1664–1668.
- Steiner, H. & Haass, C. (2000), 'Intramembrane proteolysis by presenilins', *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 217–224.
- Strooper, B. D. & Annaert, W. (2000), 'Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein', *J. Cell Sci.* **113**, 1857–1870.

- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F., Ruderman, J. & Hershko, A. (1995), 'The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis', *Mol Biol Cell* **6**, 185–197.
- Suzuki, N., Cheung, T., Cai, X.-D., Odaka, A., Otvos, J., Eckman, C., Golde, T. & Younkin, S. (1994), 'An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants', *Science* **264**, 1336–1340.
- Sweatt, J. (2001), 'The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory', *Journal of Neurochemistry* **76**, 1–10.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. & Yamaguchi, H. (1998a), 'Activation of tau protein kinase I glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons', *Neurosci. Res.* **31**, 317–323.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. & Wolozin, B. (1998b), 'Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9637–9641.
- Takashima, A., Noguchi, K., Michel, G., Mercken, M., Hoshi, M., Ishiguro, K. & Imahori, K. (1996), 'Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta', *Neurosci Lett* **203**, 33–36.
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T. & Imahori, K. (1993), 'Tau protein kinase I is essential for amyloid β -protein-induced neurotoxicity', *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7789–7793.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I. & Mori, H. (1994), 'APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and A beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain', *J. Biol. Chem.* **269**, 32721–32724.

- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D., Vigna, N., Oltersdorf, T. & Reed, J. (1998), 'IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs', *Cancer Res* **58**, 5315–5320.
- Terry, R., Katzmann, R. & (eds.), K. B. (1994), *Alzheimer's disease*, New York: Raven press.
- Torriglia, A., Chaudun, E., Chany-Fournier, F., Jeanny, J., Courtois, Y. & Counis, M. (1995), 'Involvement of Dnase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation', *Biol. Chem.* **270**, 28579–28585.
- Treier, M., Staszewski, L. & Bohmann, D. (1994), 'Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain', *Cell* **78**, 787–798.
- Tyurina, Y., Tyurin, V., Carta, G., Quinn, P., Schor, N. & Kagan, V. (1997), 'Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells', *Arch Biochem Biophys* **344**, 413–423.
- Uberti, D., Belloni, M., Grilli, M., Spano, P. & Memo, M. (1998), 'Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat neurones triggered by excitatory amino acids', *Eur J Neurosci* **10**, 246–254.
- Ueki, K., Fruman, D., Brachmann, S., Tseng, Y., Cantley, L. & Kahn, C. (2002), 'Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival', *Mol Cell Biol* **22**, 965–977.
- und P Cohen, T. K. (1999), 'Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2', *Biochem J* **339**, 319–328.
- Vassar, R. & Citron, M. (2000), 'Abeta-generating enzymes: Recent advances in beta- and gamma-secretase research', *Neuron* **27**, 419–422.
- Wallach-Dayana, S., Grabovsky, V., Moll, J., Sleeman, J., Herrlich, P., Alon, R. & Naor, D. (2001), 'CD44-dependent lymphoma cell dissemination: a cell surface CD44 variant, rather than standard CD44, supports in vitro lymphoma cell rolling on hyaluronic acid sub-

- strate and its in vivo accumulation in the peripheral lymph nodes', *J Cell Sci* **114**, 3463–3477.
- Weller, M., Schulz, J., Wullner, U., Loschmann, P., Klockgether, T. & Dichgans, J. (1997), 'Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death', *J Neural Transm Suppl* **50**, 115–23.
- White, A., Collins, S., Maher, F., Jobling, M., Stewart, L., Thyer, J., Beyreuther, K., Masters, C. & Cappai, R. (1999), 'Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity', *Am J Pathol* **155**, 1723–1730.
- Wiedau-Pazos, M., Trudell, J., Altenbach, C., Kane, D., Hubbell, W. & Bredesen, D. (1996), 'Expression of bcl-2 inhibits cellular radical generation', *Free Radic Res* **24**, 205–212.
- Wijesekera, D., Zarama, M. & Paller, M. (1997), 'Effects of integrins on proliferation and apoptosis of renal epithelial cells after acute injury', *Kidney Int* **52**, 1511–1520.
- Wodarz, A. & Nusse, R. (1998), 'Mechanisms of Wnt signaling in development', *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 59–88.
- Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J., Lacana, E., Sunderland, T., Zhao, B., Kusiak, J., Wasco, W. & D'Adamio, L. (1996), 'Participation of presenilin 2 in apoptosis: Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation', *Science* **274**, 1710–1713.
- Wood, K. & Youle, R. (1995), 'The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo', *J Neurosci* **15**, 5851–5857.
- Woodgett, J. (1990), 'Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A', *EMBO J* **9**, 2431–2438.
- Xiang, H., Kinoshita, Y., Knudson, C., Korsmeyer, S., Schwartzkroin, P. & Morrison, R. (1998), 'Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death', *J Neurosci* **18**, 1363–1373.

- Xiao, Z., Chen, J., Levine, A., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. & Livingston, D. (1995), 'Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2', *Nature* **375**, 694–698.
- Xu, X., Yang, D., Wyss-Coray, T., Yan, J., Gan, L., Sun, Y. & Mucke, L. (1999), 'Wild-type but not Alzheimer mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis', *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7547–7552.
- Yamatsuji, T., Okamoto, T., Takeda, S., Muryama, Y., Tanaka, N. & Nishimoto, I. (1996), 'Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait phenotype', *EMBO J* **15**, 498–509.
- Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D., Peng, V., Ngai, J. & Speed, T. (2002), 'Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation', *Nucleic Acids Res* **30**, e15.
- Yao, R. & Cooper, G. (1995), 'Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor', *Science* **267**, 2003–2006.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C., Reed, J. & Bredesen, D. (1999), 'TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction', *J Biol Chem* **274**, 30202–30208.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. & Oren, M. (1991), 'Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6', *Nature* **352**, 345–347.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J., Huang, E., Kimelman, D. & Moon, R. (1996), 'The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3', *Genes Dev* **10**, 1443–1454.
- Yuan, Z., Feldman, R., Sun, M., Olashaw, N., Coppola, D., Sussman, G., Shelley, S., Nicosia, S. & Cheng, J. (2002), 'Inhibition of JNK by cellular stress- and tumor necrosis factor

alpha-induced AKT2 through activation of the NF kappa B pathway in human epithelial cells', *J Biol Chem* **277**, 29973–29982.

Zheng-Fischhofer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E., Illenberger, S., Godemann, R. & Mandelkow, E. (1998), 'Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like confirmation', *Eur. J. Biochem.* **252**, 542–552.

Dank

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Christian Behl, der mir diese Arbeit in seiner Gruppe ermöglichte. Er fand immer die Zeit, auftretende Probleme zu diskutieren und ermutigte mich dazu, die gewonnenen Ergebnisse vor Fachpublikum zu präsentieren.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Sharon Goodenough, die mich in die Methoden der Molekularbiologie einführte und mir bei allen Fragen geduldig weiterhalf. Ihre humorvolle Art schuf eine sehr angenehme Atmosphäre, bei der der Spass während der Arbeit nicht zu kurz kam.

Ich danke auch Dr. Bernd Moosmann für die Etablierung der Glutamat-resistenten Zellen, sowie Dr. Dieter Manthey für die Hilfe beim Differential Display. Ebenso geht ein Dank an alle weiteren Gruppenmitglieder für kritische Diskussionen und Anregungen. Den technischen Angestellten Isabel Birg und Barbara Berning möchte ich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft herzlich danken.

Der Mikroarray-Gruppe des MPI für Psychiatrie danke ich für die Hilfe bei dem Chip-Experiment. Herrn PD Dr. Lutz und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Neuweiler danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an meinen Freund Oliver Bibel, der immer grosses Verständnis für meine Arbeit und damit verbundene Einschränkungen der Freizeit aufbrachte. Bei Schwierigkeiten mit dem Textverarbeitungsprogramm konnte ich immer auf seine Hilfe zählen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Monika Schäfer
Geburtsdatum: 12. April 1974
Geburtsort: Jülich
Nationalität: deutsch

Schulbildung

August 1980 - Juni 1984 Katholische Grundschule Jülich
August 1984 - Juni 1993 Mädchengymnasium Jülich
Abschluss: Abitur
Gesamtnote: 1.2

Studium

Oktober 1993 - April 2000 Rheinisch Westfälische Technische Hochschule (RWTH), Aachen
Oktober 1993 - Juni 1994 Fächer: Mathematik, Biologie (Lehramt, Sekundarstufe II)
Oktober 1994 - April 2000 Fach: Biologie
Abschluss: Diplom mit Auszeichnung
Juni 2000 - Dezember 2002 Ludwig-Maximilians-Universität, München
Promotion am Max-Planck Institut für Psychiatrie