

# **Schlüsselfunktion der Mitochondrien in der Pathogenese der Alzheimer Demenz**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Apothekerin  
Uta Keil  
aus Weinheim

Frankfurt am Main 2005  
(D F 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. W. E. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec

Datum der Disputation: 29. März 2005

---

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Mitochondrien .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Aufbau der Mitochondrien .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.1. Äußere und innere mitochondriale Membran .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.2. Mitochondriale Matrix .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Funktion der Mitochondrien .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2.1. Zitronensäurezyklus.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2.2. Mitochondriale Atmungskette .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Mitochondriales Genom .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4. Mitochondrien als Quelle und Target von reaktiven Sauerstoffspezies .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.5. Mitochondrien und Stickstoffmonoxid .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.6. Mitochondrien als Zelltodregulatoren.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.7. Mitochondriale Erkrankungen .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.7.1. Morbus Parkinson .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.7.2. Amyotrophe Lateralsklerose .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.7.3. Chorea Huntington .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Alzheimer-Demenz.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1. Definition und charakteristische Merkmale.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2. Amyloid-Plaques.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2.1. Bildung von A<math>\beta</math> aus dem Amyloidvorläuferprotein (APP) ..</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2.2. Physiologische Funktion von APP/A<math>\beta</math>.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3. Neurofibrilläre Bündel .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4. Genetik und Risikofaktoren .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.5. Alzheimer-Demenz und oxidativer Stress .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.6. Alzheimer-Demenz und Apoptose.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.7. Alzheimer-Demenz und mitochondriale Fehlfunktion .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.8. Therapeutische Interventionsstrategien.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.8.1. Acetylcholinesterasehemmstoffe .....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.8.2. Memantin.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.8.3. Ginkgo-biloba-Extrakt .....</b>	<b>35</b>

1.2.8.4.	Piracetam .....	37
1.2.8.5.	Neue Therapieoptionen.....	39
1.2.9.	Ziel der Arbeit.....	42
2.	Material und Methoden.....	44
2.1.	Material .....	44
2.1.1.	Geräte und Materialien .....	44
2.1.2.	Chemikalien.....	45
2.1.3.	Kits und Antikörper .....	47
2.1.4.	Puffer und Lösungen.....	47
2.2.	Zellkultur.....	50
2.2.1.	Bestimmung der Zellzahl .....	51
2.2.2.	Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff.....	51
2.2.3.	Auftauen der Zellen .....	51
2.3.	beta-Amyloid (A $\beta$ ) Peptide .....	52
2.4.	Sammeln von konditioniertem Medium .....	52
2.5.	Bestimmung von intrazellulären NO-Spiegeln .....	53
2.6.	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials .....	54
2.7.	Bestimmung der ATP-Spiegel .....	59
2.8.	Inkubation mit Ginkgo-biloba-Extrakt und Piracetam .....	60
2.9.	Isolierung von Mitochondrien.....	61
2.10.	Protein-Bestimmung nach Lowry.....	61
2.11.	Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität .....	62
2.12.	Bestimmung der Anzahl der Mitochondrien mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers .....	63
2.13.	Konfokale Laserscanmikroskopie.....	64
2.14.	Caspase-9-Assay .....	66
2.15.	Statistische Auswertung .....	68
3.	Ergebnisse .....	69
3.1.	Charakterisierung der Zellmodelle .....	69
3.1.1.	A $\beta$ -Spiegel der APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen.....	69
3.2.	Amyloid beta erhöht die NO-Produktion und führt zu mitochondrialer Fehlfunktion bei Alzheimer-Demenz .....	70
3.2.1.	Erhöhte NO-Spiegel in APPsw-PC12- und APPsw-HEK- Zellen .....	70

3.2.2.	Erhöhte NO-Synthase-Aktivität in APPsw-PC12-Zellen.....	71
3.2.3.	Erniedrigte NO-Toleranz in APPsw-PC12-Zellen.....	73
3.2.4.	Aß verändert das mitochondriale Membranpotential .....	75
3.2.5.	Erniedrigte ATP-Spiegel in APPsw PC12- und APPsw-HEK-Zellen .....	77
3.2.6.	Behandlung von Kontroll-PC12-Zellen mit konditioniertem Medium von Kontroll-PC12-Zellen, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen .....	78
3.2.7.	Der $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT normalisiert NO-Spiegel, ATP-Spiegel und stabilisiert das mitochondriale Membranpotential.....	80
3.2.8.	APPsw-Zellen haben eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien..	84
3.2.9.	APP ist im Mitochondrium lokalisiert.....	86
3.2.10.	Geschädigte mitochondriale Atmungskette in APPsw-PC12-Zellen .....	87
3.2.11.	Oxidativer Stress schädigt die Mitochondrien.....	90
3.2.12.	Nitrosativer Stress schädigt die Mitochondrien .....	92
3.2.13.	Serumentzug führt zu mitochondrialer Fehlfunktion.....	93
3.3.	Überprüfung von Antidementiva, Antipsychotika und Antidepressiva auf ihre protektiven Eigenschaften auf mitochondrialer Ebene .....	95
3.3.1.	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress.....	95
3.4.	Schützender Effekt von Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761) auf die Mitochondrien .....	98
3.4.1.	Effekte auf untransfizierte PC12-Zellen .....	98
3.4.1.1.	EGb 761 schützt Mitochondrien vor dem Angriff von Natriumnitroprussid.....	98
3.4.1.2.	EGb 761 schützt Mitochondrien vor dem Angriff von Wasserstoffperoxid.....	101
3.4.1.3.	EGb 761 stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug.....	103
3.4.1.4.	Ginkgo-biloba-Extrakt stabilisiert die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe .....	104

3.4.1.5.	<b>Protektive Effekte von EGb 761 auf die Tributyltin-induzierte mitochondriale Dysfunktion .....</b>	<b>107</b>
3.4.2.	<b>Effekte von EGb 761 auf transfizierte PC12-Zellen .....</b>	<b>108</b>
3.4.2.1.	<b>Protektiver Effekt von EGb 761 bei nitrosativem Stress in APP-transfizierten PC12-Zellen.....</b>	<b>108</b>
3.4.2.2.	<b>Protektiver Effekt von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe in APP-transfizierten PC12-Zellen .....</b>	<b>110</b>
3.4.3.	<b>Ginkgo-biloba-Extrakt verringert Caspase-9-Aktivität .....</b>	<b>112</b>
3.5.	<b>Schützender Effekt von Piracetam auf die Mitochondrien.....</b>	<b>113</b>
3.5.1.	<b>Effekte auf untransfizierte Zellen .....</b>	<b>113</b>
3.5.1.1.	<b>Piracetam schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch nitrosativen Stress .....</b>	<b>113</b>
3.5.1.2.	<b>Piracetam schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch oxidativen Stress.....</b>	<b>119</b>
3.5.1.3.	<b>Piracetam stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug.....</b>	<b>121</b>
3.5.1.4.	<b>Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Atmungskette .....</b>	<b>124</b>
3.5.1.5.	<b>Keine protektiven Effekte von Piracetam auf die durch Tributyltin induzierte mitochondriale Dysfunktion.....</b>	<b>126</b>
3.5.1.6.	<b>Protektive Effekte von Piracetam nach extrazellulärer Inkubation mit A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> .....</b>	<b>127</b>
3.5.2.	<b>Effekte von Piracetam auf transfizierte Zellen .....</b>	<b>128</b>
3.5.2.1.	<b>Protektiver Effekt von Piracetam nach nitrosativem Stress in APP-transfizierten PC12-Zellen.....</b>	<b>128</b>
3.5.2.2.	<b>Piracetam schützt die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe in APP-transfizierten PC12-Zellen.....</b>	<b>129</b>
3.5.3.	<b>Piracetam verringert Caspase-9-Aktivität.....</b>	<b>131</b>
4.	<b>Diskussion.....</b>	<b>132</b>
4.1.	<b>Effekte der schwedischen Doppelmutation auf die NO-Produktion und die mitochondriale Funktion .....</b>	<b>132</b>
4.1.1.	<b>Vorteile der APP<sup>sw</sup>-Transfektion im Vergleich zu extrazellulärer A<math>\beta</math>-Inkubation .....</b>	<b>132</b>

4.1.2.	Effekte von A $\beta$ auf den NO-Stoffwechsel .....	133
4.1.3.	Effekte von A $\beta$ auf die mitochondriale Atmungskette.....	135
4.1.4.	Effekte von A $\beta$ auf die ATP-Spiegel .....	138
4.1.5.	Einfluss von A $\beta$ auf das mitochondriale Membranpotential..	140
4.1.6.	Einfluss eines sekundären Insults auf die mitochondriale Funktion.....	145
4.1.7.	Führt intra- und/oder extrazelluläres A $\beta$ zu mitochondrialer Fehlfunktion? .....	148
4.1.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse an den APP- transfizierten PC12- und HEK-Zellen.....	150
4.2.	Effekte von Ginkgo-biloba-Extrakt auf die mitochondriale Funktion.....	154
4.2.1.	EGb 761 schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch oxidativen und nitrosativen Stress .....	154
4.2.2.	EGb 761 schützt vor Serumentzug.....	157
4.2.3.	Protektive Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe .....	157
4.2.4.	Effekte von EGb 761 auf die Tributyltintoxizität.....	159
4.2.5.	EGb 761 reduziert die Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress .....	161
4.2.6.	Protektive Effekte von EGb 761 auf die A $\beta$ -Toxizität.....	162
4.2.7.	Zusammenfassung EGb 761.....	163
4.3	Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Funktion .....	165
4.3.1.	Piracetam schützt die Mitochondrien vor oxidativem und nitrosativem Stress .....	165
4.3.2.	Piracetam schützt vor Serumentzug.....	167
4.3.3.	Schutz der mitochondrialen Atmungskette durch Piracetam.....	169
4.3.4.	Piracetam schützt die Mitochondrien vor toxischen A $\beta$ - Effekten.....	170
4.3.4.1.	Extrazelluläre A $\beta$ -Inkubation .....	170
4.3.4.2.	APP-transfizierte PC12-Zellen .....	170
4.3.5.	Effekte von Piracetam auf die Caspase-9-Aktivität.....	171
4.3.6.	Zusammenfassung Piracetam .....	172

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>174</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>177</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>212</b>
<b>8.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>215</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>219</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>222</b>



**Abkürzungsverzeichnis:**

ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer-Demenz
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease Family</i>
AICD	<i>APP Intracellular Domain</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AK	Antikörper
AMPA	<i>Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid</i>
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANT	<i>Adenin-Nukleotid-Translokator</i>
APO E	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APP <sup>sw</sup>	APP mit schwedischer Doppelmutation
APP <sup>wt</sup>	Humanes Wildtyp-APP
A $\beta$	Amyloid-beta-Peptid
ATP	Adenosin-Triphosphat
BACE	<i><math>\beta</math>-Site APP Cleaving Enzyme</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CLSM	<i>Confocal Laserscan Microscopy</i>
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
DAF-2DA	<i>4,5-diaminofluorescein diacetate</i>
DAPT	<i>N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGb 761	Ginkgo-biloba-Extrakt der Firma Schwabe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FAD	Familiäre Form der Alzheimer Demenz
FCS	<i>Fetal Cow Serum</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid

GSH	Reduziertes Glutathion
GSK-3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HBSS	HEPES <i>buffered saline solution</i>
HEK	<i>Human embryonal kidney</i> [Zelllinie]
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HS	<i>Horse Serum</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
L-NAME	<i>N<sup>6</sup>-Nitro-L-arginine Methylester, Hydrochloride</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP Kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MPT	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mtDNA	Mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NFT	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
P <sub>a</sub>	Anionisches Phosphat
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PC12	Phäochromozytom 12 [Zelllinie]
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGC-1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha</i>
PHF	<i>Paired Helical Filaments</i>
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
R123	Rhodamine 123

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
sAPP	<i>Soluble APP</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SMAC	<i>Second mitochondrial-derived activator of caspase</i>
SNP	Natriumnitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
TMRE	Tetramethylrhodamineethylester
TTFA	Thenoyltrifluoroacetone
UQ	Ubiquinon
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

# 1. Einleitung

## 1.1. Mitochondrien

### 1.1.1. Aufbau der Mitochondrien

#### 1.1.1.1. Äußere und innere mitochondriale Membran

Mitochondrien haben einen Durchmesser von ca. 0,5-1  $\mu\text{M}$ . Sie sind von zwei hochspezialisierten Membranen, der inneren Membran und der äußeren Membran, umgeben (Abb. 1.1). Dadurch entstehen zwei getrennte Mitochondrienkompartimente: die interne Matrix und ein viel schmalerer Intermembranraum. Die Außenmembran ist für Moleküle mit einer Größe von 5000 Dalton oder weniger durchlässig. Dies kommt durch das Transportprotein Porin zustande, das große, wasserhaltige Kanäle in der Lipiddoppelschicht bildet (Lloreta-Trull, J. and Serrano, S., 1998). Die Innenmembran ist hoch spezialisiert. Sie ist zur Vergrößerung der Oberfläche in zahlreiche Cristae gefaltet. In diesen Cristae befinden sich die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette. Die Lipiddoppelschicht der inneren mitochondrialen Membran enthält Cardiolipin, das die Membran besonders undurchlässig für Ionen macht (Capaldi, R. A. et al., 1983). Sie ist nur durchlässig für Moleküle, für die spezielle Transportproteine vorhanden sind.

#### 1.1.1.2. Mitochondriale Matrix

Dieser große Innenraum enthält eine hochkonzentrierte Mischung hunderter Enzyme, wie z.B. Enzyme des Zitronensäurezyklus und für die Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren. Die Matrix enthält auch das mitochondriale Genom, spezielle mitochondriale Ribosomen, transferRNAs und vielfältige Enzyme, die für die Expression der mitochondrialen Gene notwendig sind.

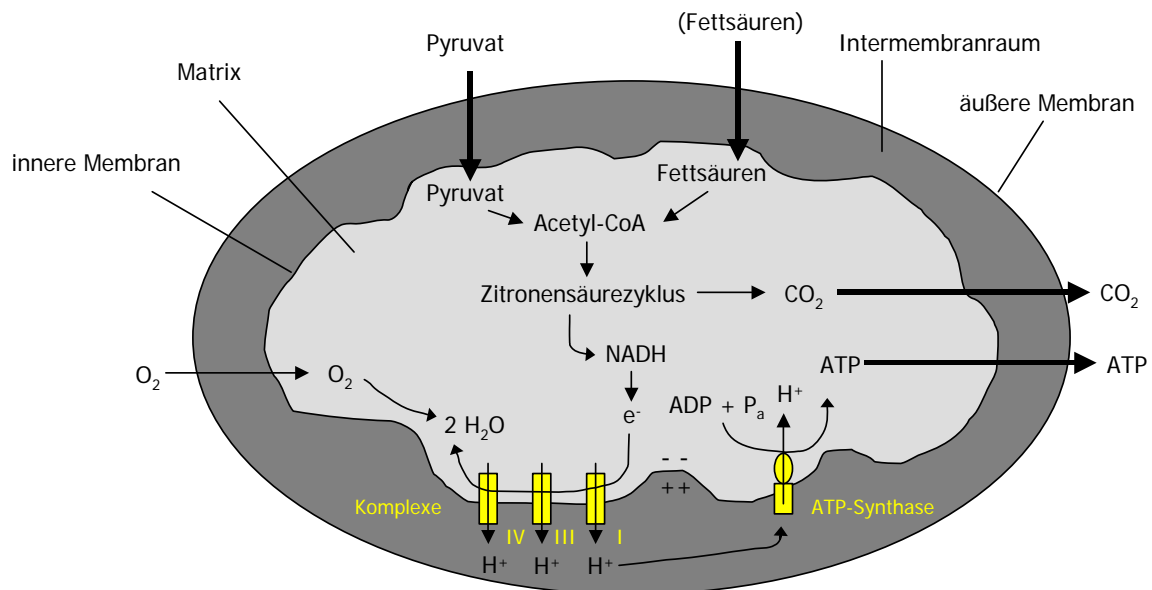


Abb. 1.1: Aufbau und Funktion der Mitochondrien

## 1.1.2. Funktion der Mitochondrien

### 1.1.2.1. Zitronensäurezyklus

Mitochondrien können sowohl Pyruvat als auch Fettsäuren als Brennstoff benutzen. Pyruvat entsteht im Zytosol durch Glykolyse aus Glukose. Im Gehirn erfolgt die Energiegewinnung ausschließlich über den Glukose/Pyruvatweg. Das Gehirn weist einen hohen Energiebedarf auf, weshalb ein hoher Glukosebedarf besteht.

Pyruvat und Fettsäuren werden über die innere mitochondriale Membran transportiert und in der mitochondrialen Matrix in Acetyl-CoA verwandelt. Die Acetylgruppen werden dann im Zitronensäurezyklus oxidiert. Im Verlauf des Zitronensäurezyklus werden energiereiche Elektronen erzeugt, die von NAD<sup>+</sup> und FAD übernommen werden unter Bildung von NADH und FADH<sub>2</sub>. Die gebildeten energiereichen Elektronen werden dann auf die Atmungskette übertragen.

### 1.1.2.2. Mitochondriale Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Atmungsketten-Komplexen: Komplex I (NADH-Dehydrogenase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-C-Reduktase; Cytochrom-b-c<sub>1</sub>-Komplex), Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase) (Abb. 1.2). Der NADH-Dehydrogenase-Komplex ist der größte Atmungskettenkomplex. Er enthält mehr als 40 Polypeptidketten. Er empfängt die energiereichen Elektronen aus dem Zitratzyklus von NADH und lenkt sie durch ein Flavin (FMN) und wenigstens sieben Eisen-Schwefelzentren zum Ubichinon (UQ) (Abb. 1.2). Ubichinon überträgt die Elektronen auf die Cytochrom-C-Reduktase. Die Cytochrom-C-Reduktase enthält mindestens elf Polypeptidketten und arbeitet als Dimer. Jedes Monomer enthält drei Hämkomponenten und ein Eisen-Schwefel-Protein. Die Hämkomponenten sind jeweils an Cytochrome gebunden. Die empfangenen Elektronen werden auf Cytochrom C übertragen, welches das Elektron auf den Cytochrom-C-Oxidase-Komplex überträgt. Der Cytochrom-C-Oxidase-Komplex stellt ebenfalls ein Dimer da. Jedes Monomer enthält 13 verschiedene Polypeptidketten sowie zwei Cytochrome und zwei Kupferatome. Der Komplex empfängt ein Elektron von Cytochrom C, speichert vier Elektronen und gibt sie an Sauerstoff ab. Der Elektronentransfer ist gekoppelt an einen Protonentransport von der Matrix in den Intermembranraum. Dieser Transport der Protonen hat zwei wichtige Folgen: 1) Es wird ein pH-Gradient erzeugt. Dabei ist der pH-Wert in der Matrix größer als im Cytosol, wo der pH-Wert nahe 7 liegt. Der pH-Wert im Intermembranraum gleicht dem des Cytosols, weil die äußere mitochondriale Membran durchlässig für kleine Moleküle ist. 2) Es wird ein Spannungsgradient über der inneren mitochondrialen Membran erzeugt (Membranpotential), dabei wird die Innenseite negativ und die Außenseite positiv. Das Membranpotential beträgt ungefähr  $-140$  mV. Zusammengenommen bilden der pH-Gradient und das Membranpotential einen elektrochemischen Protonengradienten.

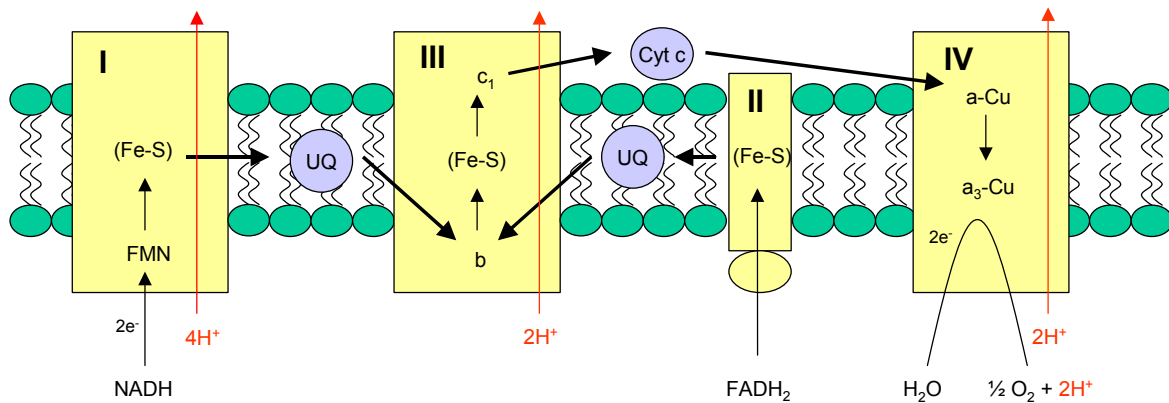


Abb. 1.2.: Mitochondriale Atmungskette: Komplexe I-IV

Der elektrochemische Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran wird zum Antreiben der ATP-Synthese in dem entscheidenden Prozess der oxidativen Phosphorylierung genutzt. Dazu wird der Komplex V der mitochondrialen Atmungskette, die ATP-Synthase, benötigt. Das Enzym bildet eine Art Pore, durch die die Protonen entlang ihres elektrochemischen Gradienten fließen können. Die Energie aus dem Protonenfluss wird verwendet, um die energetisch ungünstige Reaktion zwischen ADP und  $P_i$  zu ATP anzutreiben.

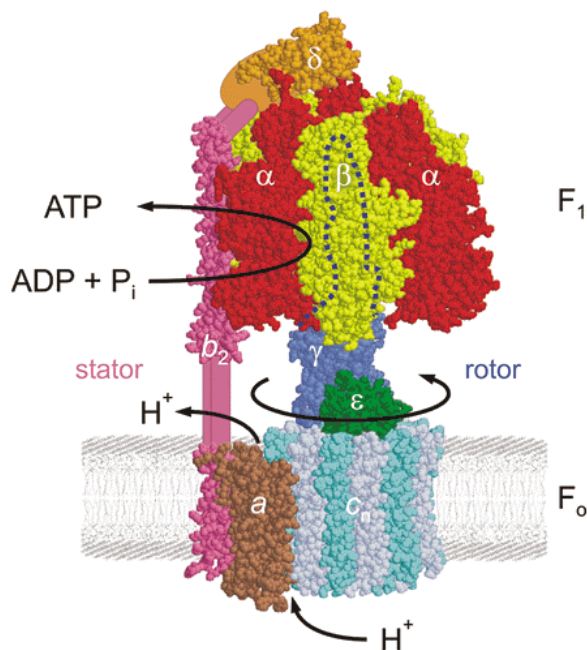


Abb. 1.3: ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette)

Die ATP-Synthase wird auch häufig als  $F_0F_1$ -ATPase bezeichnet. Der große enzymatische Teil ( $F_1$ -ATPase) ragt in die mitochondriale Matrix und besteht aus 6 Untereinheiten (Abb. 1.3). Dieser Teil wird durch einen längeren Arm an einer Gruppe von Transmembranproteinen ( $F_0$ ) verankert. Diese Gruppe dient als Stator. Der Stator ist mit dem Rotor verbunden, der aus 10 – 14 identischen Transmembranuntereinheiten besteht. Wenn Protonen den Kanal passieren, veranlasst ihre Bewegung den Rotor sich zu drehen. Diese Drehbewegung dreht nun einen Stiel. Dieser Stiel innerhalb des großen enzymatischen Teils (Kopf) gerät dabei in rasche Drehbewegung. Die Energie des Protonenflusses wird dabei in mechanische Energie umgewandelt: Die rotierenden „Stielproteine“ reiben nun gegen einen stationären Ring von Kopfproteinen. Zur Bildung von ATP wird mechanische Energie in chemische Energie umgewandelt. Drei der sechs Untereinheiten in dem Kopf enthalten Bindungsstellen für ADP und anionisches Phosphat und dienen somit der Gewinnung von ATP.

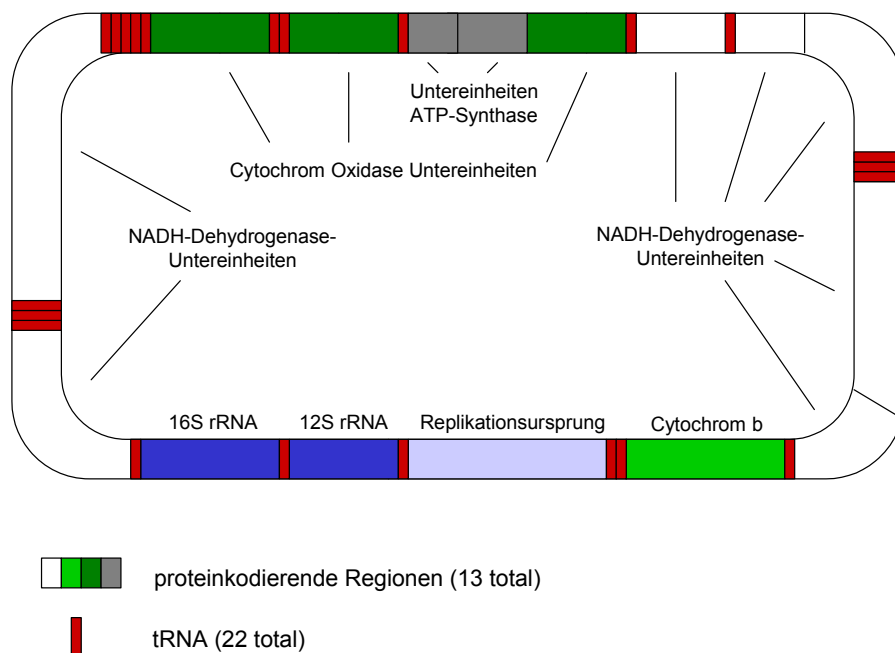
Ein weiteres Enzym der mitochondrialen Atmungskette stellt die Succinat Ubichinon Oxidoreduktase dar. Sie ist ein Enzymkomplex, der Elektronen von  $FADH_2$  auf Ubichinon überträgt. Bei dieser Elektronenübertragung werden jedoch keine Protonen durch die innere Membran gepumpt, weil nur wenig Energie erzeugt wird. Die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase ist vollständig in die innere Mitochondrienmembran integriert und aus fünf Untereinheiten aufgebaut. Ihre größte Komponente stellt die membrangebundene Succinat-Dehydrogenase dar, die im Zitronensäurezyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. Das bei der Oxidation im Enzym-Komplex entstehende  $FADH_2$  überträgt unter Beteiligung von Eisen-Schwefel-Zentren seine Elektronen aufs Ubichinon.

### **1.1.3. Mitochondriales Genom**

Mitochondrien sind die einzigen Organellen außer dem Zellkern, die eine eigene DNA (mtDNA) und eine eigene biosynthetische Maschinerie zur Herstellung von RNA und Proteinen enthalten. Es gibt Hunderte bis Tausende von Mitochondrien in der Zelle und jedes Mitochondrium enthält ca. 5 mitochondriale Genome. Das humane mitochondriale Genom enthält 16.569 Basenpaare, ist doppelsträngig, ringförmig und enthält 37 Gene (Abb. 1.4). 24 dieser Gene werden zur Translation der mtDNA (2 ribosomale RNAs und 22 transfer RNAs) benötigt, die restlichen 13 Gene kodieren für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette (DiMauro, S.



and Schon, E. A., 2003). Sieben Untereinheiten des Komplexes I, eine Untereinheit des Komplexes III, drei Untereinheiten des Komplexes IV und zwei Untereinheiten des Komplexes V werden von mitochondrialen Genen kodiert. Die restlichen Untereinheiten und weitere mitochondriale Proteine werden von nukleärer DNA kodiert. Diese Proteine werden nach ihrer Synthese an zytosolischen Ribosomen aus dem Zytosol ins Mitochondrium transportiert.



**Abb. 1.4: Humanes mitochondriales Genom**

Mitochondriale Gene werden über einen nicht Mendel'schen Mechanismus vererbt: Die mitochondriale DNA des Menschen wird mütterlicherseits (maternal) vererbt. Eine Mutter, die eine mtDNA Mutation trägt, überträgt also diese Mutation auf ihre Kinder, jedoch nur die Töchter vererben sie weiter an ihre Nachkommen. Mutationen der mtDNA sind zumeist nicht in allen Mitochondrien enthalten: so gibt es Zellen, die Mitochondrien mit normaler und mutierter DNA enthalten. Dieses Phänomen bezeichnet man als Heteroplasmie. Die Schwelle für mitochondriale Erkrankungen bedingt durch mtDNA-Mutationen ist niedriger in Geweben, die sehr stark abhängig sind vom oxidativen Metabolismus, wie z.B. dem Gehirn, dem Herz und der

Skelettmuskulatur. Diese Gewebe sind somit besonders empfindlich für mitochondriale DNA-Mutationen. Sehr seltene Erkrankungen wie z.B. das Leigh-Syndrom oder die Lebersche Optikusatrophie gehen auf vererbte mtDNA Mutationen zurück (siehe Kapitel 1.1.7.).

#### **1.1.4. Mitochondrien als Quelle und Target von reaktiven Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Koppenol, W. H., 1990) umfassen das Superoxidradikalanion ( $O_2^-$ ), das extrem aggressive Hydroxylradikal (Croft, S. et al., 1992), Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Das Superoxidradikalanion ist das primäre Endprodukt einer Ein-Elektronenübertragung auf Sauerstoff (Cross, A. R. and Jones, O. T., 1991). Die mitochondriale Atmungskette ist eine sehr wichtige Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Ca. 1 – 4 % des Sauerstoffs werden von der mitochondrialen Atmungskette nicht vollständig zu Wasser reduziert (Chance, B. et al., 1979). Die mitochondriale Atmungskette ist zwar ein sehr effizientes System, doch kommt es immer wieder zu einem ungewollten Austreten von Elektronen aus der mitochondrialen Atmungskette, die dann auf Sauerstoff übertragen werden und zur Bildung von ROS führen können. Zwei der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe sind besonders an der Bildung von ROS beteiligt: der Komplex I (NADH-Reduktase) (Turrens, J. F. and Boveris, A., 1980) und der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (Ubichinon-Cytochrom-C-Reduktase) (Cadenas, E. et al., 1977). Mitochondrien enthalten aber auch antioxidative Enzyme, z.B. die Mangan-Superoxiddismutase (SOD) (Autor, A. P., 1982), die Glutathionperoxidase (Oshino, N. and Chance, B., 1977), die Katalase, lipidlösliche Antioxidantien wie z.B. Vitamin E (Vatassery, G. T. et al., 1984), Thioredoxin, Glutathion (GSH) und das reduzierte Coenzym Q (Aberg, F. et al., 1992). Der Einfluss von all diesen Faktoren limitiert die Konzentration von intrazellulären ROS. Die SOD stellt ein Metalloprotein dar, das Kupfer oder Mangan als Redoxmetall enthält. Die Mangan-SOD (Mn-SOD) ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Neuere Befunde weisen daraufhin, dass die Kupfer/Zink-SOD (Cu/Zink-SOD) im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist, zusätzlich zur Lokalisation im Zytosol. Die SOD ist verantwortlich für die Umwandlung des Superoxidanionradikals in Wasserstoffperoxid. Das wichtigste Enzym in

Mitochondrien, das  $H_2O_2$  abbaut, ist die Glutathionperoxidase. Dieses Glutathion-abhängige antioxidative System schützt vor dem Angriff von  $H_2O_2$  durch die Umwandlung von GSH in GSSG. Zur Regeneration von GSSG zu GSH wird die Glutathionreduktase benötigt. Die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase ist die wichtigste Glutathionperoxidase in Mitochondrien. Sie wird in einer langen und einer kurzen Form synthetisiert. Die lange Form enthält eine Sequenz, die benötigt wird zum Transport ins Mitochondrium. Das Glutathionperoxidase-System ist häufig limitiert durch das in zu geringer Konzentration vorhandene GSH. Die Katalase stellt ebenfalls ein wichtiges Enzym zur Entgiftung von  $H_2O_2$  dar. Sie ist allerdings zum Großteil im Zytosol lokalisiert. Nur im Rattenherz konnte die Katalase in Mitochondrien gefunden werden. Dieses Fehlen von Katalase in Mitochondrien führt zum verminderten Abbau von  $H_2O_2$  und kann somit mitochondriale Schäden begünstigen. Ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Entgiftung durch antioxidative Enzyme führt zur Entstehung von oxidativem Stress.

Mitochondrien stellen die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies dar. Aus diesem Grund sind sie sehr hohen Konzentrationen von ROS ausgesetzt und reagieren gleichzeitig sehr empfindlich darauf. Auch außerhalb des Mitochondriums gebildete ROS, wie z.B. durch oxidative Desaminierung von biogenen Aminen durch Monoaminoxidasen, können Mitochondrien schädigen und somit zu Störungen der mitochondrialen Funktion führen. ROS können eine Vielzahl von Molekülen im Mitochondrium und in den restlichen Teilen der Zelle schädigen, z.B. die DNA, mehrfachungesättigte Fettsäuren und Proteine (Tappel, A. L., 1973). Mitochondriale DNA ist besonders anfällig gegenüber oxidativen Schäden, denn sie ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und enthält keine Introns oder schützenden Histone (Richter, C. et al., 1988). Oxidative Schäden an mitochondrialer DNA sind aus diesem Grund sehr viel stärker ausgeprägt als bei nukleärer DNA. Die Folge dieser oxidativen Schäden sind häufig mitochondriale DNA Mutationen. ROS sind außerdem potente Stimulatoren der Lipidperoxidation (Babbs, C. F. and Steiner, M. G., 1990). Die innere mitochondriale Membran enthält viele ungesättigte Fettsäuren. Ein Hauptbestandteil der inneren mitochondrialen Membran stellt Cardiolipin dar (Capaldi, R. A., 1982). Dieses Peptid spielt eine entscheidende Rolle für die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität (Robinson, N. C., 1993). Oxidative Schäden an mehrfachungesättigtem Cardiolipin können also direkt die Cytochrom-C-Oxidase-

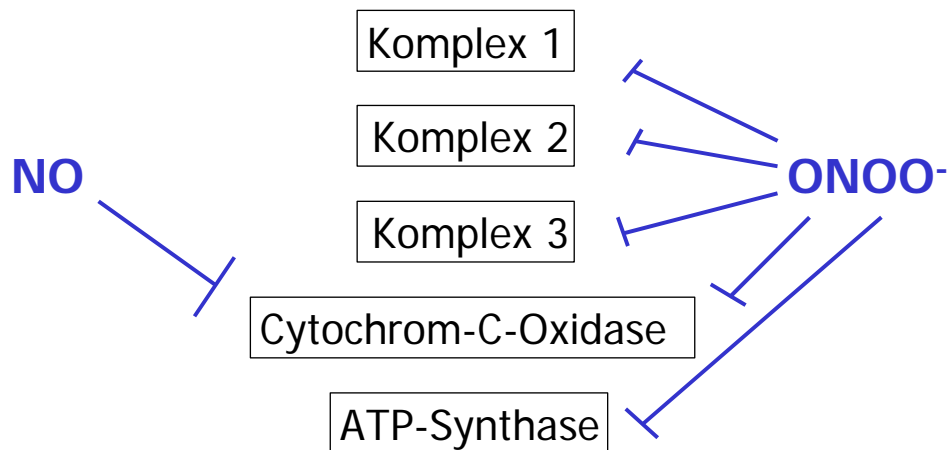
Aktivität vermindern. ROS Schäden an der inneren mitochondrialen Membran können dementsprechend direkt einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials hervorrufen. Proteinoxidation kann entweder direkt oder als Konsequenz von Lipidperoxidation durch ROS hervorgerufen werden (Stadtman, E. R., 1992). Proteinoxidation führt zu Störungen der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe (Forsmark-Andree, P. et al., 1997), der ATPasen (Forsmark-Andree, P. et al., 1997), des Adenin Nukleotid Translokators (Forsmark-Andree, P. et al., 1995) und begünstigt die Öffnung der mitochondrialen Pore (Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P., 1995).

### **1.1.5. Mitochondrien und Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid (NO) wird, ausgehend von L-Arginin, durch drei verschiedene NO-Synthasen (NOS) synthetisiert. Zwei der drei Isoformen werden konstitutiv exprimiert (endotheliale und neuronale NOS) und werden durch Calcium/Calmodulin und Phosphorylierung reguliert. Die dritte Isoform (induzierbare NOS) wird durch Entzündungsprozesse aktiviert und ruft sehr hohe NO-Spiegel hervor.

Man geht heute davon aus, dass darüber hinaus noch eine mitochondriale NOS existiert (Loesch, A. et al., 1994). Zu Beginn dachte man, dass sie einer der bekannten Isoformen entspricht. Lacza et al. konnten jedoch zeigen, dass keine der bekannten NOS-Isoformen in den Mitochondrien vorhanden ist (Lacza, Z. et al., 2003). NO überwindet Membranen sehr schnell und kann somit leicht von einer Zelle zur anderen diffundieren. Die physiologische NO-Konzentration beträgt ca. 0,1 – 100 nM. NO selbst ist relativ unreaktiv, wohingegen an zweiwertige Eisenionen gebundenes NO, z.B. in der Hämkomponente der löslichen Guanylatzyklase, zur Aktivierung und zur cGMP Produktion führt. NO kann jedoch auch in sehr reaktive Moleküle umgewandelt werden, in sogenannte reaktive NO-Spezies. NO reagiert beispielsweise mit Sauerstoff, wobei  $\text{NO}_2$  gebildet wird. Dieses ist in der Lage mit einem zweiten NO zu  $\text{N}_2\text{O}_3$  zu reagieren.  $\text{N}_2\text{O}_3$  kann Thiole wie z.B. Glutathion nitrosylieren. NO kann außerdem mit dem Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^-$ ) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) reagieren. NO und Peroxynitrit üben einen hemmenden Effekt auf die mitochondriale Atmungskette aus (Abb. 1.5). NO führt zu einer schnellen, selektiven und reversiblen Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase, wohingegen Peroxynitrit zu einer langsamen, nichtselektiven und irreversiblen Hemmung von mehreren

Atmungsketten-Komplexen führt (Cassina, A. and Radi, R., 1996; Brown, G. C., 1999; Brown, G. C., 2001).



**Abb. 1.5: Effekte von NO und Peroxynitrit auf die mitochondriale Atmungskette.**

Die reversible Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase durch NO tritt im nanomolaren Bereich auf (Brown, G. C. and Cooper, C. E., 1994). Man geht heute davon aus, dass NO über zwei verschiedene Wege die Cytochrom-C-Oxidase (Abb. 1.6) hemmt: 1) NO bindet an die reduzierte Häm- $a_3$ -Untereinheit der Cytochrom-C-Oxidase und es entsteht  $a_3^{2+}$ -NO oder 2) es bindet an die oxidierte  $Cu_B^{2+}$ -Untereinheit und es entsteht  $Cu_B^+-NO^+$ . Das  $NO^+$  kann schnell hydratisieren und  $Cu_B^+-NO_2^-$  bilden (Torres, J. et al., 1995; Giuffre, A. et al., 1996). Beide Formen der Hemmung sind schnell und reversibel. Bei der ersten Form der Hemmung liegt eine kompetitive Hemmung gegenüber Sauerstoff vor, wohingegen die zweite Hemmung nicht kompetitiv ist. In vitro kommen beide Hemmformen vor, die erste Form ist bevorzugt bei hohen Cytochrom-Reduktionsspiegeln und bei niedrigem Sauerstoffangebot, die zweite Form bei den entgegengesetzten Bedingungen (Sarti, P. et al., 2000).

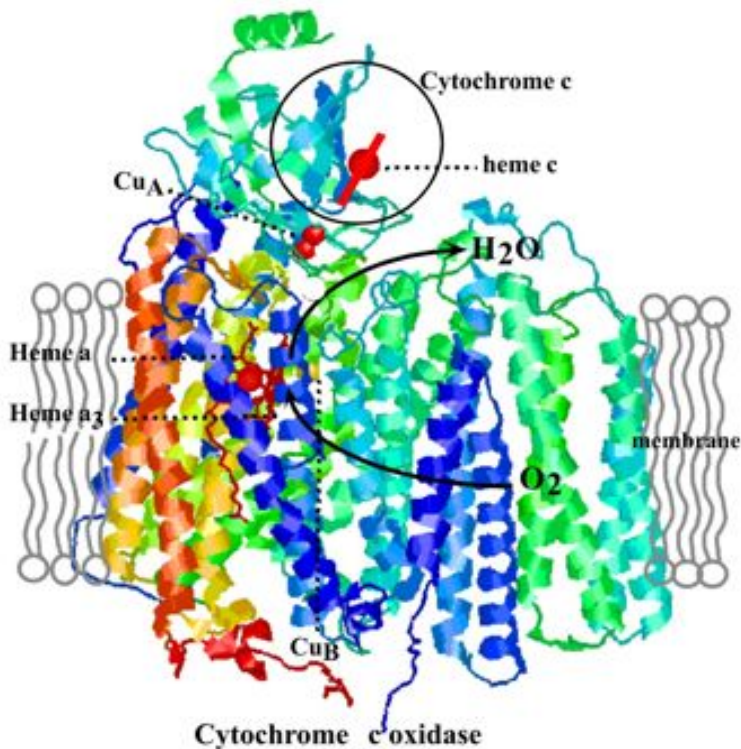


Abb. 1.6: Struktur der Cytochrom-C-Oxidase (Bild vom Michigan Center for Structural Biology).

Peroxynitrit ist in der Lage die Komplexe I, II, III IV und V, die Aconitase und die Mn-SOD zu hemmen (Brown, G. C. and Borutaite, V., 2002). Ein schneller Effekt von Peroxynitrit stellt die Hemmung des Komplexes I dar. Diese Hemmung wird hervorgerufen durch S-Nitrosylierung (Clementi, E. et al., 1998). Die Hemmung des Komplexes II und III wird kontrovers diskutiert: einige Autoren zeigen eine Hemmung des Komplexes II bei geringer Hemmung des Komplexes III (Cassina, A. and Radi, R., 1996), wohingegen andere Autoren eine Hemmung des Komplexes III ohne Hemmung des Komplexes II zeigen konnten (Pearce, L. L. et al., 2001). Die Hemmung des Komplexes IV wird ebenfalls kontrovers diskutiert. An isolierten Gehirn-Mitochondrien konnte keine Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase durch Peroxynitrit beobachtet werden (Bolanos, J. P. et al., 1995), wohingegen an intakten Zellen eine deutliche Hemmung gezeigt werden konnte (Bolanos, J. P. et al., 1994). Peroxynitrit ist auch in der Lage den Komplex V der Atmungskette zu hemmen. Diese Hemmung kommt zustande durch Oxidation von kritischen Thiolgruppen im ATP-Synthase-Komplex (Radi, R. et al., 1994).

### 1.1.6. Mitochondrien als Zelltodregulatoren

Zelltod stellt ein sehr wichtiges Ereignis in der Biologie dar. Es können zwei verschiedene Formen des Zelltods unterschieden werden: Apoptose und Nekrose. Unter Apoptose versteht man programmierten Zelltod. Bei der Apoptose kommt es zur Aktivierung von katabolen Enzymen und zu charakteristischen Veränderungen der Zellkernmorphologie (Chromatinkondensierung) und letztendlich zur DNA-Fragmentierung. Im Gegensatz dazu beinhaltet die Nekrose keine geregelten DNA- und Proteinabbauvorgänge. Die mitochondriale Matrix und das Zytoplasma schwellen an, was letztendlich zur Ruptur der Zelle führt.

Die Apoptose kann unterteilt werden in den extrinsischen und den intrinsischen Weg (Abb. 1.7). Der extrinsische Apoptoseweg spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und bei der Tumorabwehr. Aktivierte zytotoxische Lymphozyten töten virusinfizierte Zellen, indem sie diesen Apoptoseweg induzieren. Der extrinsische Weg (Todesrezeptor-Weg) beginnt mit einer Aktivierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche wie z.B. des FAS/CD95 Rezeptors oder des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 1 (TNFR1). Beide Rezeptoren gehören zur Gruppe der TNF-Rezeptoren. Alle Rezeptoren der TNF-Familie besitzen sogenannte Death-Domänen (DDs). Die Aktivierung dieser Rezeptoren wird ausgelöst durch Bindung des FAS-Liganden oder von Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) an die zugehörigen Rezeptoren. Durch die Bindung kommt es zur Trimerisierung der Rezeptoren. Die DD des Rezeptors assoziiert mit der DD des Adaptorproteins. Der Fas-Rezeptor assoziiert mit dem Adaptorprotein FADD, und TNFR1 assoziiert mit FADD und TRADD. FADD weist zusätzlich zur DD noch eine Death-Effektor-Domäne auf (DED). Über diese DED bindet FADD an die DED von Procaspase 8 und führt zu deren Autoaktivierung (Reed, J. C., 2000). Der Komplex aus Todesrezeptor, FADD und Procaspase 8 wird als Death-Induced-Signaling-Complex (DISC) bezeichnet. Aktivierte Caspase 8 kann andere Caspasen direkt (Caspase 3) oder indirekt über die Freisetzung von Bid aus truncated Bid (t-Bid) aktivieren. Die Freisetzung von Bid durch die Caspase 8 führt zur Stimulation des intrinsischen Weges (Li, H. et al., 1998).

Der intrinsische (mitochondriale) Weg wird durch Stressoren wie z.B. UV-Strahlung, zytotoxische Substanzen, freie Sauerstoffradikale, Stress im endoplasmatischen Retikulum oder Wachstumsfaktor- bzw. Serumentzug hervorgerufen. Er wird reguliert durch Proteine der Bcl<sub>2</sub>-Familie (Kuwana, T. and Newmeyer, D. D., 2003). Einige Proteine der Bcl<sub>2</sub>-Familie: Bcl<sub>2</sub>, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und A1 hemmen den

Apoptoseprozess, wohingegen Bax, Bak, Bok, Bid, Bik, Bim, Bad, Bnf, Hrk, BNIP3, Noxa und Puma proapoptotisch wirken (Reed, J. C. et al., 1998; Green, D. R. and Evan, G. I., 2002). Antiapoptotische Proteine weisen 4 Bcl<sub>2</sub>-Homologie-Domänen (BH4) auf. Die proapoptotischen Proteine können nochmals unterteilt werden, je nachdem ob sie nur eine Bcl<sub>2</sub>-Homologie-Domäne (BH<sub>3</sub> only) oder drei Domänen (BH1-3 Proteine) enthalten. Die BH<sub>3</sub>-only Proteine benötigen die Anwesenheit eines BH1-3 Proteins (Wei, M. C. et al., 2001), um Apoptose auslösen zu können. Bid und Bim aktivieren Bax und Bak, wohingegen Bad und Bik Bcl<sub>2</sub> und Bcl<sub>XL</sub> inaktivieren (Letai, A. et al., 2002). Bax und Bak translozieren während des Apoptoseprozesses vom Zytosol zum Mitochondrium. Diese Translokationen werden begleitet von einer Konformationsänderung, Einlagerung in die mitochondriale Membran und Oligomerisierung (Wei, M. C. et al., 2000; Antonsson, B. et al., 2001). Bid ist ebenfalls im Zytosol lokalisiert und kann von aktivierter Caspase 8 zu „truncated“ Bid (t-Bid), einem proapoptotischen Molekül gespalten werden. Die Anlagerung von proapoptotischen Bcl<sub>2</sub>-Proteinen ans Mitochondrium und eine damit verbundene Porenbildung führt zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie z.B. Cytochrom C (Newmeyer, D. D. and Ferguson-Miller, S., 2003) oder Smac (Du, C. et al., 2000; Adams, J. M., 2003) und Omi/HtrA2. Omi/HtrA2 weist Serinprotease-Aktivität auf, die bei Caspase-unabhängigem Zelltod eine wichtige Rolle spielt (Wang, X., 2001). Freigesetztes Cytochrom C reagiert dann mit Apaf-1 und Procaspase 9. Cytochrom C bindet über eine WD-Domäne an monomeres Apaf-1 (Green, D. R. and Evan, G. I., 2002). Dies führt zur Oligomerisierung von Apaf-1. Caspase-recruitment-Domänen (CARDs) am oligomeren Apaf binden an CARDs der Procaspase 9 und führen zu deren Aktivierung. Es bildet sich also ein sogenannter Apoptosomenkomplex aus. Die aktivierte Caspase 9 führt zur Aktivierung der Effektorcaspase 3, die dann letztendlich Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auslöst. Smac und Omi/HtrA2 interagieren mit Inhibitoren der Apoptose (IAP's) und vermindern somit den hemmenden Effekt der IAP's auf Caspase 9, was ebenfalls zur verstärkten Aktivierung der Caspase 9 führt. Zwei weitere mitochondriale Proteine, die ins Zytosol freigesetzt werden sind Apoptose-induzierender Faktor (AIF) und Endonuklease G (Penninger, J. M. and Kroemer, G., 2003). Die Freisetzung von AIF aus dem Intermembranraum führt jedoch nicht zur Aktivierung von Caspasen (Daugas, E. et al., 2000). AIF transloziert vom Mitochondrium zum Nukleus, wo es Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung



auslöst. Ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials stellt ein sehr frühes Ereignis in der mitochondrialen Zelltodkaskade dar (Green, D. R. and Reed, J. C., 1998; Green, D. R. and Kroemer, G., 2004). Dieser Abfall kann hervorgerufen werden durch eine Blockade der mitochondrialen Atmungskette oder durch die Ausbildung einer mitochondrialen Pore. Diese Pore bildet sich an der Kontaktseite zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran aus. Sie setzt sich zusammen aus dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT), dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) und dem peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR) (Zamzami, N. and Kroemer, G., 2001). Bax und Bcl<sub>2</sub> sind an der Bildung der mitochondrialen Pore beteiligt. Durch die Öffnung der mitochondrialen Pore können Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kD die mitochondrialen Membranen überwinden, was zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel führt. Ein leichter Abfall des mitochondrialen Membranpotentials wird mit Apoptose in Verbindung gebracht, wohingegen ein drastischer Abfall Nekrose begünstigt (Martinou, J. C. and Green, D. R., 2001).

Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER), wie z.B. eine Anreicherung von Calcium kann Apoptose durch Aktivierung der Caspase 12 hervorrufen. Aktive Caspase 12 kann wiederum die Caspasen 9 und 3 aktivieren.

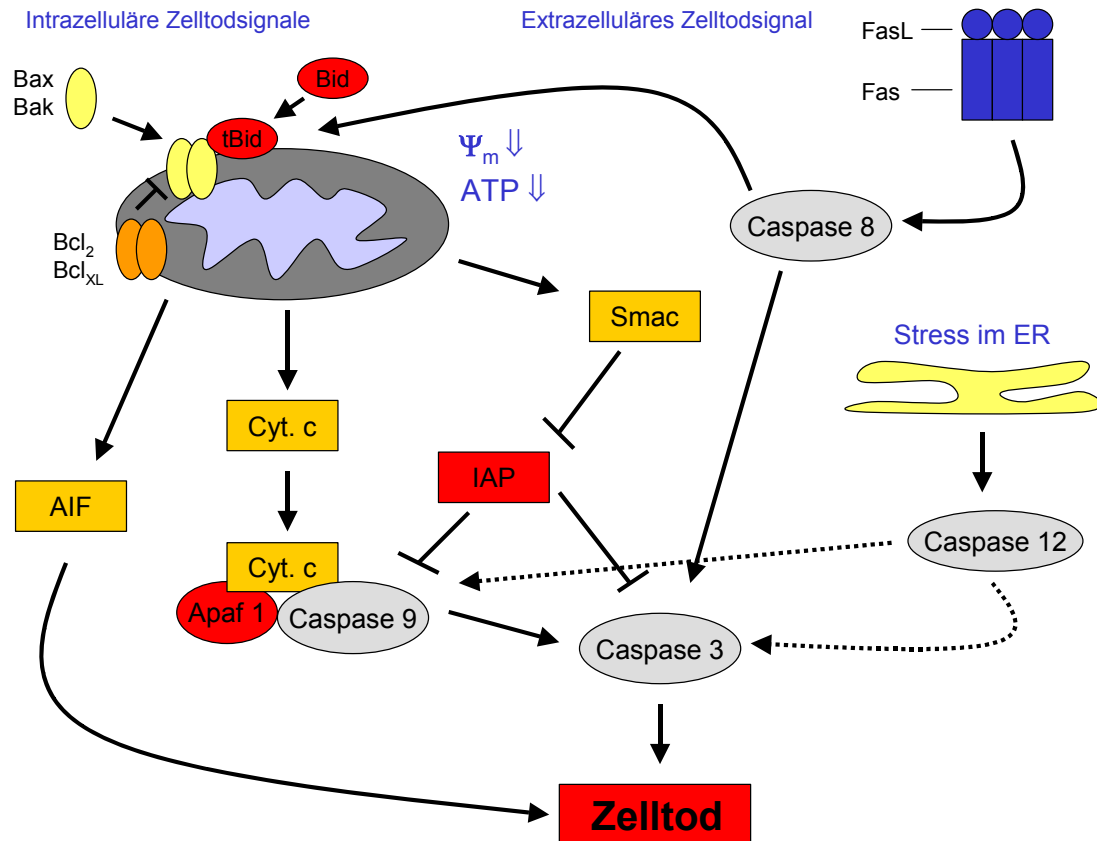


Abb. 1.7: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg

### 1.1.7. Mitochondriale Erkrankungen

Mitochondriale Erkrankungen können hervorgerufen werden durch sporadische oder spontane Mutationen in der mitochondrialen DNA oder durch Mutationen nukleärer DNA (nDNA) in Genen, die für mitochondriale Enzyme, Strukturen, Kanäle oder Rezeptoren kodieren (DiMauro, S., 1996). Es handelt sich aber um sehr seltene Erkrankungen. Mehr als 95 % der mitochondrialen Erkrankungen werden durch nDNA-Mutationen hervorgerufen und nur 5 % durch Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA). MtDNA-Mutationen können vererbt werden oder somatisch bedingt sein. Es können Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen vorliegen. Proteine der mitochondrialen Atmungskette sind am häufigsten von mitochondrialen Mutationen betroffen. Mitochondrien kommen in allen Körperzellen vor. Aus diesem Grund können mitochondriale Mutationen auch in allen Geweben vorkommen. Mitochondriale Erkrankungen stellen daher multisystemische Erkrankungen dar. Besonders betroffen sind Organe oder Gewebe mit hohem Sauerstoffverbrauch wie z.B. die Skelettmuskulatur, das Gehirn, das Herz, die Augen, die Ohren, das

endokrine System, das gastrointestinale System und die Nieren. Typische mitochondriale Erkrankungen, die auf mitochondriale Mutationen zurückzuführen sind, sind: Enzephalomyopathie, FBSN (Familiäre bilaterale striatale Nekrose); Lebersche Optikusatrophie, Leigh-Syndrom, MELAS (Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden), MERRF (Myoklonus-Epilepsie mit *ragged-red fibers*), MILS (Maternal vererbtes Leigh-Syndrom), NARP (Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa), Kearns-Sayre-Syndrom und Keratoderma palmo-plantaris (Abb. 1.8) (Finsterer, J., 2004). Obwohl diese Erkrankungen sehr verschieden sind, haben sie doch einige gemeinsame Merkmale: Laktatazidose, massive Proliferation der Mitochondrien im Muskel und Cytochrom-C-Oxidase Defekt. Eine Zusammenstellung aller bisher bekannter mtDNA-Mutationen findet man bei (Finsterer, J., 2004).

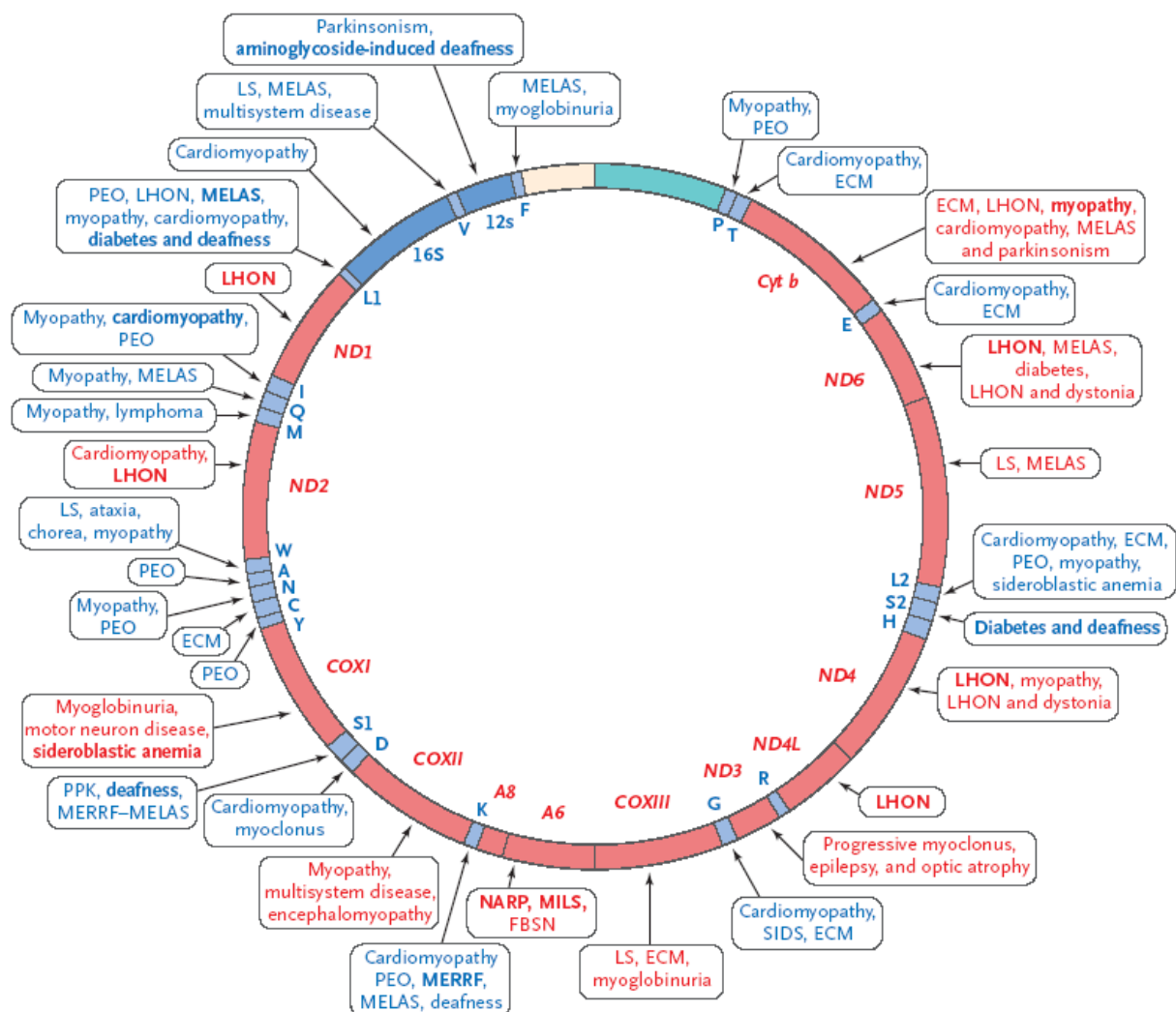


Abb. 1.8: Mutationen im humanen mitochondrialen Genom, die Erkrankungen hervorrufen können; aus (DiMauro, S. and Schon, E. A., 2003).

Mutationen in nDNA sind auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. dem Leigh-Syndrom, der Friedreich-Ataxie und der Wilson-Krankheit beschrieben worden. Beim Leigh-Syndrom findet man Mutationen in den Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes und in nukleär kodierten Untereinheiten des Komplexes I und Komplexes II der mitochondrialen Atrmungskette (Schon, E. A. and Manfredi, G., 2003). Bei der Friedreich-Ataxie liegen Mutationen im FRDA-Gen vor, das für Frataxin, ein mitochondriales Eisenspeicherprotein, kodiert. Bei der Wilson-Krankheit konnten Mutationen im ATP7B-Gen beobachtet werden, das für eine Kupfer-transportierende P-Typ ATPase kodiert. Weitere neurodegenerative Erkrankungen werden mit mitochondrialer Fehlfunktion in enge Verbindung gebracht: Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Alzheimer-Demenz. Man geht davon aus, dass Punktmutationen in mtDNA bei diesen Erkrankungen mit der Zeit akkumulieren und dass zusätzliche Faktoren wie z.B. das Altern und erhöhter oxidativer Stress die mitochondrialen Funktionsstörungen begünstigen. Aus diesem Grund spricht man bei diesen Erkrankungen auch von einer sekundären Involvierung der Mitochondrien, wohingegen bei vererbten mitochondrialen Erkrankungen wie MELAS oder MERFF von primärer mitochondrialer Involvierung gesprochen wird. Auf die mitochondriale Fehlfunktion bei der Alzheimer-Demenz wird in Kapitel 1.2.7. näher eingegangen.

#### 1.1.7.1. Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist gekennzeichnet durch einen Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra Pars compacta. Vor 20 Jahren konnte gezeigt werden, dass 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-Pyridin (MPTP) parkinson-ähnliche Symptome beim Menschen hervorruft (Langston, J. W. et al., 1983). Im Jahre 1987 gab es Befunde, dass MPTP den Komplex I der mitochondrialen Atrmungskette inhibiert (Nicklas, W. J. et al., 1987). Weitere Studien konnten zeigen, dass bei Parkinson-Patienten eine Beeinträchtigung des Komplexes I der mitochondrialen Atrmungskette vorliegt (Greenamyre, J. T. et al., 2001). Die Schädigung des Komplexes I war jedoch nicht auf das Gehirn beschränkt, sondern konnte auch in Thrombozyten von Parkinson-Patienten gefunden werden (Parker, W. D., Jr. et al., 1989). Cybrid-Zelllinien, die mitochondriale DNA von Thrombozyten von Parkinson-Patienten enthielten, zeigten eine Beeinträchtigung des Komplexes I der

Atmungskette (Swerdlow, R. H. et al., 1996). Mitochondriale Fehlfunktion scheint also eine entscheidende Rolle beim Morbus Parkinson zu spielen.

#### 1.1.7.2. Amyotrophe Lateralsklerose

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist gekennzeichnet durch eine selektive und progressive Degeneration der Vorderhornzellen des Rückenmarks und motorischer Hirnnervenkerne sowie einzelner Abschnitte der Pyramidenbahn. Die meisten Fälle sind sporadischer Natur, bei 15 % der Fälle handelt es sich um familiäre Formen, die durch Mutationen im SOD-1-Gen, das für die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu,Zn-SOD) kodiert, hervorgerufen werden. Früher ging man davon aus, dass die Cu,Zn-SOD sich nur im Zytosol befindet, neuere Befunde weisen jedoch daraufhin, dass die Cu,Zn-SOD auch im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Mutierte Cu,Zn-SOD könnte also einen direkten schädigenden Effekt auf die Mitochondrien ausüben, was für mitochondriale Fehlfunktion bei der familiären Form der ALS sprechen würde. Diese Befunde bestätigten sich im transgenen Tiermodell. Transgene Mäuse mit mutierter Cu/Zn-SOD zeigten einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und eine Aktivierung der mitochondrialen Apoptosekaskade (Kruman, I. I. et al., 1999). Interessanterweise findet man auch bei einigen Patienten mit sporadischer ALS abnormale Mitochondrien in den Vorderhornzellen (Sasaki, S. and Iwata, M., 1996). Eine reduzierte mitochondriale Atmungskettenaktivität konnte zusätzlich im Kortex von sporadischen ALS-Patienten gefunden werden (Borthwick, G. M. et al., 1999; Wiedemann, F. R. et al., 2002). Diese Reduktion korrelierte mit dem Abfall an mitochondrialer DNA, was für eine verminderte Mitochondrienanzahl spricht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei der familiären als auch bei der sporadischen ALS mitochondriale Defizite eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Menzies, F. M. et al., 2002).

#### 1.1.7.3. Chorea Huntington

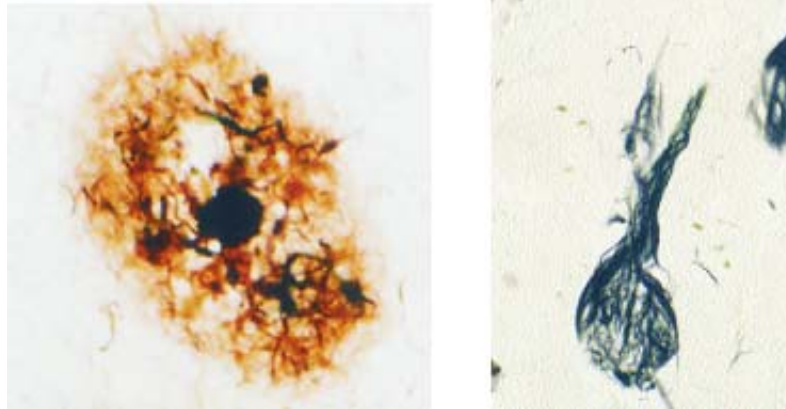
Chorea Huntington (HD) ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung. Pathologisch gesehen, findet man einen selektiven Verlust von Neuronen im Striatum und im Kortex. HD ist eine Krankheit, die durch häufige Wiederholungen des Trinukleotids CAG im HD-Gen verursacht wird. Das HD-Gen kodiert für Huntingtin, ein zytoplasmatisches Protein unbekannter Funktion. Defekte

des Komplexes II und III der mitochondrialen Atmungskette und der Aconitase konnten in postmortem HD-Gehirnen gefunden werden (Brennan, W. A., Jr. et al., 1985). Mitochondriale Atmungsketteninhibitoren, wie z.B. Malonat induzierten Gehirnläsionen in Tieren (Beal, M. F. et al., 1993), die der Krankheit sehr gut entsprachen. Okzipitaler Kortex und Basalganglien wiesen erhöhte Lactatspiegel auf (Jenkins, B. G. et al., 1993), was auf einen verstärkten anaeroben Energiemetabolismus hinweist. Lymphoblasten-Mitochondrien von HD-Patienten zeigten ein signifikant erniedrigtes mitochondriales Membranpotential. Dieser Befund konnte auch in Gehirnmitochondrien von transgenen Mäusen, die mutiertes Huntingtin exprimieren, gefunden werden (Panov, A. V. et al., 2002). Mitochondriale Fehlfunktion scheint also auch bei Chorea Huntington eine sehr wichtige Rolle zu spielen.

## 1.2. Alzheimer-Demenz

### 1.2.1. Definition und charakteristische Merkmale

Alzheimer-Demenz (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, gekennzeichnet durch einen starken Gedächtnisverlust und Verlust der kognitiven Fähigkeiten. Zur Zeit leiden 4 Millionen Amerikaner unter AD und diese Zahl wird sich wahrscheinlich aufgrund der stark alternden Gesellschaft bis zur Mitte des 21. Jahrhunderts vervierfachen (Brookmeyer, R. et al., 1998). Das Risiko an AD zu erkranken, verdoppelt sich alle 5 Jahre ab einem Lebensalter von 65 Jahren. 50 – 75 % aller Demenzfälle werden durch AD hervorgerufen. Das Altern stellt somit den Hauptrisikofaktor für Demenz dar. Die erste Beschreibung der Alzheimer-Demenz erfolgte im Jahr 1907 durch den bayrischen Psychiater Alois Alzheimer. Er hatte eine 50-jährige Patientin, Auguste D., die durch progredienten Gedächtnisverlust, gestörte kognitive Funktion, verändertes Verhalten wie z.B. Paranoia und Wahnvorstellungen und eine gestörte Sprachfunktion auffiel. Das Gehirn war gekennzeichnet durch eine massive Atrophie der Hirnrinde und durch zwei histopathologische Charakteristika: 1) Fibrillenbildung innerhalb der Neurone und 2) Ablagerungen von Stoffwechselprodukten in Form von Plaques in der gesamten Hirnrinde (Alzheimer, A., 1907). Diese Befunde werden auch heute noch als Hauptcharakteristika der Alzheimer-Demenz beschrieben: extrazelluläre Plaques, bestehend aus dem Amyloid-beta-Peptid (A $\beta$ ) (Hardy, J. A. and Higgins, G. A., 1992) und neurofibrilläre Bündel (Tangles), bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau (Garcia, M. L. and Cleveland, D. W., 2001) (Abb. 1.9). Darüber hinaus findet man synaptische Dysfunktion und massiven Neuronenverlust im Hippocampus und im gesamten Kortex (Selkoe, D. J., 2002).



**Abb. 1.9:** links: extrazellulärer Plaque, zum Großteil bestehend aus A $\beta$  (Methamin Färbung)  
rechts: intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau (Abbildung aus (Bogdanovic, N., 2000)).

### 1.2.2. Amyloid-Plaques

Das Amyloid-beta-Peptid (A $\beta$ ) wurde erstmals vor 20 Jahren aus Hirnhautblutgefäßen von AD-Patienten und Down-Syndrom-Patienten isoliert und sequenziert (Glenner, G. G. and Wong, C. W., 1984a; Glenner, G. G. and Wong, C. W., 1984b). Ein Jahr später wurde dieses Peptid als Hauptbestandteil der senilen neuritischen Plaques identifiziert (Masters, C. L. et al., 1985). Im Jahre 1987 wurde das APP-Gen (*Amyloid Precursor Protein*), das für A $\beta$  kodiert, kloniert (Kang, J. et al., 1987). APP beschreibt eine heterologe Gruppe von Polypeptiden mit Molekulargewichten von 110 – 140 kD. Diese Heterogenität wird verursacht durch alternatives Splicing, sowie durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. durch Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung. Drei verschiedene Splicevarianten konnten gefunden werden: Isoform 695, Isoform 751 und Isoform 770. Die Isoformen 751 und 770 konnten in Neuronen und in nichtneuronalen Zellen im ganzen Körper gefunden werden. Neurone exprimieren jedoch wesentlich höhere Level der Isoform 695, die in nichtneuronalen Zellen nur in geringer Konzentration vorhanden ist (Neve, R. L. et al., 1988; Haass, C. et al., 1994).

#### 1.2.2.1. Bildung von A $\beta$ aus dem Amyloidvorläuferprotein (APP)

APP stellt ein Typ I-Transmembranprotein dar. Der N-Terminus befindet sich im Extrazellulärraum und der C-Terminus ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Spaltung von



APP geschieht durch Proteasen, auch Sekretasen genannt. Drei Sekretasen sind bekannt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zur Bildung von A $\beta$  führen, verhindert die  $\alpha$ -Sekretase die A $\beta$ -Bildung, indem sie APP in der Mitte der A $\beta$ -Domäne (Aminosäure 17 von A $\beta$ ) spaltet.

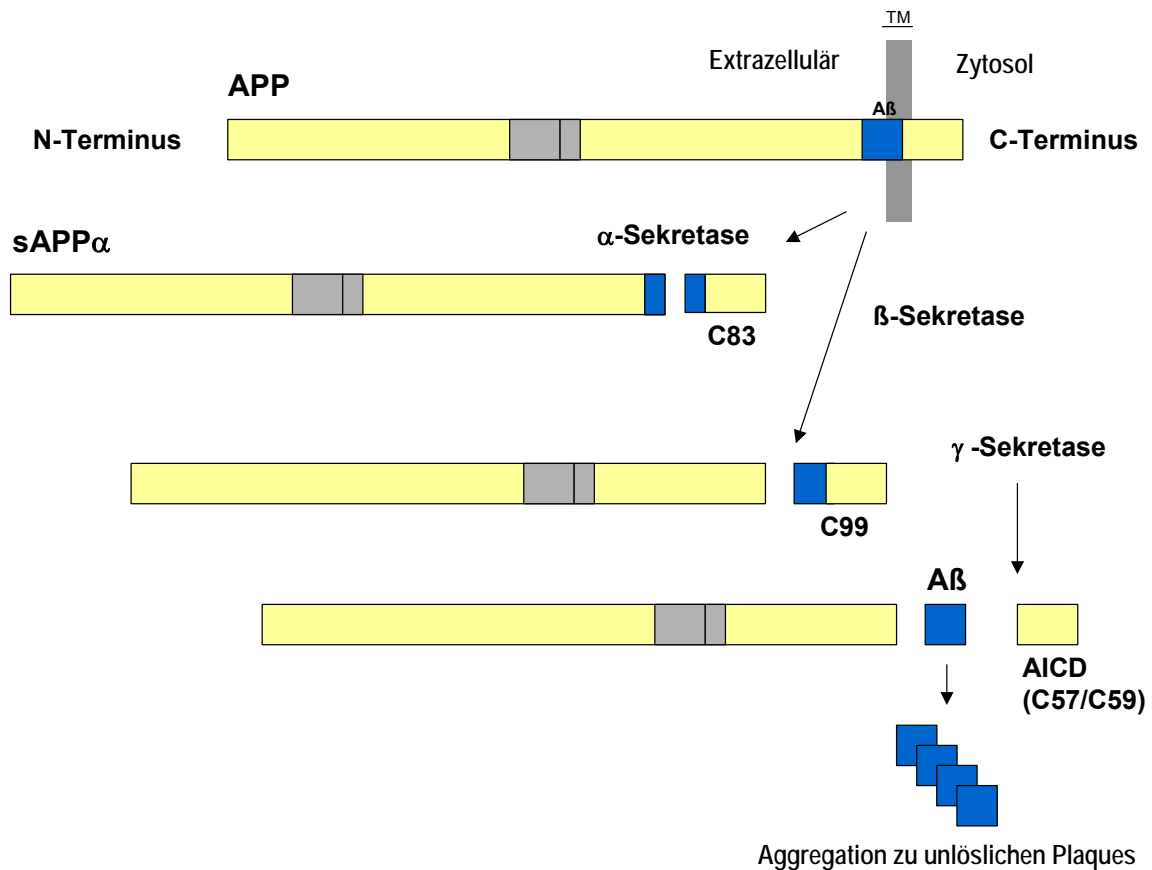


Abb. 1.10: Spaltung von APP durch  $\alpha$ -Sekretase oder  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase.

Die meisten APP-Moleküle werden in der Nähe der Zelloberfläche durch die membranständige  $\alpha$ -Sekretase gespalten (Esch, F. S. et al., 1990; Kamenetz, F. et al., 2003). Durch diese Spaltung entstehen ein großes lösliches Ectodomänen-Fragment (sAPP $\alpha$ ), das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird, und ein membrangebundenes C83-Fragment. Dieses Fragment kann durch einen nachfolgenden  $\gamma$ -Sekretase-Angriff in ein p3- und ein p7-Fragment gespalten werden. sAPP $\alpha$  weist neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften auf (Small, D. H. et al., 1994; Furukawa, K. et al., 1996). Drei Mitglieder der ADAM Familie (*a disintegrin and metalloproteinase*), ADAM 9, ADAM 10, und ADAM 17 können als  $\alpha$ -Sekretase in verschiedenen Zellsystemen agieren (Lammich, S. et al., 1999). Besonders wichtig

bei der Spaltung des APPs scheint ADAM 10 zu sein. Die Expression von mutiertem ADAM 10 führte in APP-kotransfizierten Mäusen zu einer Vermehrung und Vergrößerung der Amyloid-Plaques (Postina, R. et al., 2004).

APP-Moleküle, die nicht durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten wurden, werden in Endosomen internalisiert und unterliegen der Spaltung durch die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Sekretase (Abb. 1.10). Ein Teil der A $\beta$ -Peptide wird auch im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum gebildet. A $\beta$ -Peptide, die im Golgi-Apparat gebildet werden, können in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Zum Großteil wird A $\beta_{1-40}$  sezerniert. Die  $\beta$ -Sekretase, auch BACE genannt ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*) stellt ein Typ I-Membranprotein mit Aspartyl-Protease-Aktivität dar (Vassar, R., 2001). Es existieren zwei verschiedene BACE-Isoformen. BACE 1 weist  $\beta$ -Sekretase-Aktivität auf, wohingegen BACE 2  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität besitzt. BACE 1 und APP weisen ähnliche Verteilungsmuster in der Zelle auf. Sie sitzen in der Plasmamembran und können in Endosomen aufgenommen werden, in denen die Spaltung von APP durch BACE 1 erfolgt (Vassar, R., 2001). Die Spaltung führt zur Bildung eines membrangebundenen C99-Fragments und eines löslichen Fragments, sAPP $\beta$ , das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Das C99-Fragment kann durch die  $\gamma$ -Sekretase intramembranär weiter gespalten werden. Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex setzt sich aus 4 Proteinen zusammen (Abb. 1.11): Präsenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN 2 (De Strooper, B., 2003). Die Präseniline scheinen die aktive Pore des Proteasekomplexes zu sein.

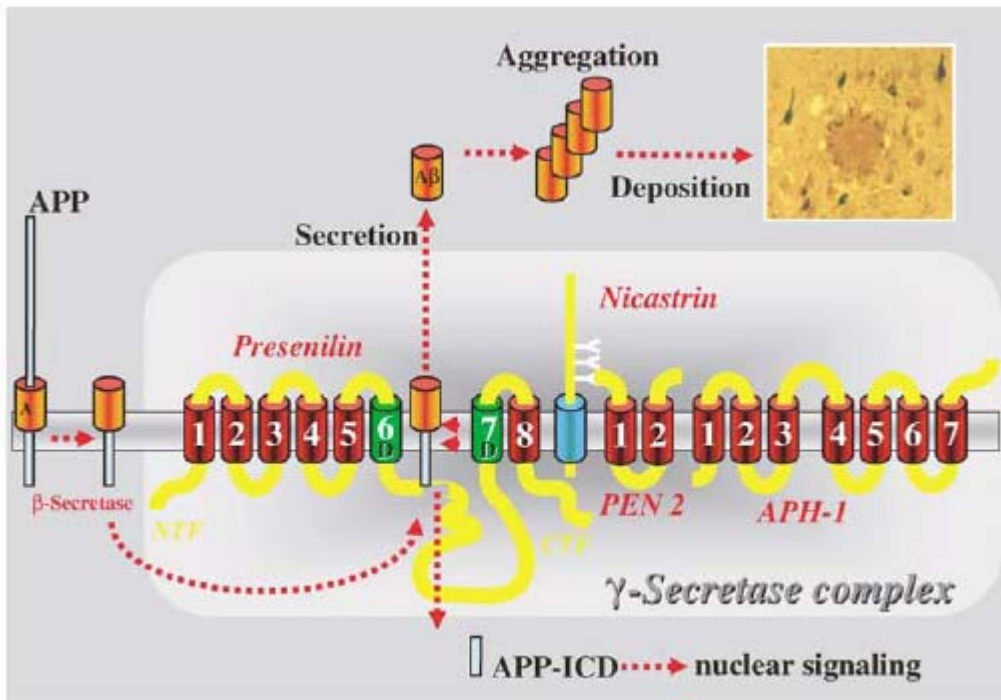


Abb. 1.11: Zusammensetzung und Funktion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes (aus (Haass, C., 2004)).

Zwei verschiedene Homologe des Präsenilins existieren: PS 1 und PS 2. Sie durchspannen die Plasmamembran mehrere Male. Zwei Aspartatreste in der Transmembrandomäne 6 und 7 scheinen für die Proteaseaktivität verantwortlich zu sein.

Die Spaltung des C99-Fragmentes führt zur Bildung von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$ . Bei  $A\beta$  handelt es sich um ein hydrophobes Peptid, das in der Lage ist zu aggregieren und Oligomere zu bilden. Wenn sich die Oligomere noch vergrößern, bilden sich Fasern und letztendlich die für die Alzheimer-Demenz charakteristischen  $A\beta$ -Plaques. Der Großteil des  $A\beta$  stellt  $A\beta_{1-40}$  dar,  $A\beta_{1-42}$  wird nur zu 5 –10 % gebildet.  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  weisen unterschiedliche intrazelluläre Produktionsorte auf (Hartmann, T. et al., 1997).  $A\beta_{1-40}$  wird vor allem im trans-Golgiapparat gebildet, wohingegen  $A\beta_{1-42}$  im endoplasmatischen Retikulum gebildet wird.  $A\beta_{1-42}$  aggregiert wesentlich schneller und ist toxischer als  $A\beta_{1-40}$ . Früher ging man davon aus, dass die  $A\beta$ -Toxizität vom Aggregationsstatus abhängt (Pike, C. J. et al., 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass  $A\beta$ -Oligomere und Protofibrillen ebenfalls toxische Effekte auslösen und somit u.U. die toxischere Form von  $A\beta$  darstellen (Walsh, D. M. et al., 1999; Klein, W. L. et al., 2001; Walsh, D. M. et al., 2002). Die  $A\beta$ -Oligomerisierung beginnt wahrscheinlich intrazellulär in Neuronen (Walsh, D. M. et al., 2000). Die intrazelluläre Anreicherung von  $A\beta$  konnte bereits in humanen Gehirnen bzw. in transgenen

Mäusen gefunden werden (Takahashi, R. H. et al., 2002; Oddo, S. et al., 2003). Sie wurde in Zusammenhang gebracht mit synaptischer Dysfunktion, einem frühen Ereignis bei AD (Selkoe, D. J., 2002). Interessanterweise korreliert auch der Schweregrad der synaptischen und kognitiven Dysfunktion im Vergleich zu den unlöslichen A $\beta$ -Spiegeln besser mit den löslichen A $\beta$ -Spiegeln (McLean, C. A. et al., 1999; Lue, L. F. et al., 1999). Außer der A $\beta$ -Bildung entsteht bei der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung ein intrazelluläres Fragment, die APP-intrazelluläre-Domäne (*APP intracellular domain, AICD*). Das AICD-Fragment enthält einige Aminosäuren der Transmembrandomäne und den C-Terminus des APPs. AICD bildet einen multimeren Komplex mit dem nukleären Adapterprotein Fas 65 und der Histonacetyltransferase Tip 60 (Cao, X. and Sudhof, T. C., 2001). AICD wirkt in ausdifferenzierten PC12-Zellen über eine verstärkte Expression der Glycogen Synthase Kinase-3beta neurotoxisch (Kim, H. S. et al., 2003).

#### 1.2.2.2. Physiologische Funktion von APP/A $\beta$

Die physiologische Funktion von APP ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise auf eine Rolle in der extrazellulären Signaltransduktionskaskade. Es bildet beispielsweise einen Komplex mit einem GTP-bindenden Protein, G<sub>0</sub> (Nishimoto, I. et al., 1993). Des Weiteren ist es beteiligt am axonalen Transport über eine Interaktion mit Kinesin I (Kamal, A. et al., 2000). Die Deletion des APP-Gens in mutierten Mäusen führt jedoch nicht zu einer Verkürzung des Lebensalters (Zheng, H. et al., 1995).

A $\beta$  wird zumeist als toxisches Nebenprodukt der APP-Prozessierung bezeichnet. Interessanterweise kommt es aber auch in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Blutplasma gesunder Personen vor (Seubert, P. et al., 1992). Kamenetz et al. konnten kürzlich eine physiologische Funktion von A $\beta$  aufklären. Demnach reduziert A $\beta$  die exzitatorische Neurotransmission über NMDA-Rezeptoren (Kamenetz, F. et al., 2003). Dadurch wird die neuronale Aktivität herabgesetzt. Die A $\beta$ -Bildung ist jedoch abhängig von der neuronalen Aktivität. Substanzen, die die neuronale Aktivität herabsetzen, führen zu einer Reduktion der A $\beta$ -Bildung über eine Hemmung der  $\beta$ -Sekretase. Bei Patienten mit AD scheint diese negative Rückkopplung gestört zu sein (Kamenetz, F. et al., 2003).

### 1.2.3. Neurofibrilläre Bündel

Der Hauptbestandteil der neurofibrillären Bündel (Tangles) ist das tau-Protein. Das tau-Protein stellt ein neuronales Mikrotubuli assoziiertes Protein (MAP) dar. Eine seiner Funktionen ist die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli (Drubin, D. G. and Kirschner, M. W., 1986). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion (Jenkins, S. M. and Johnson, G. V., 1998) und beim Neuritenwachstum (Biernat, J. and Mandelkow, E. M., 1999). Bei Alzheimer-Demenz akkumuliert tau in Neuronen und aggregiert zu gepaarten helikalen Filamenten (PHFs), die Bindung an Mikrotubuli geht verloren und letztendlich kommt es zur Degeneration von Neuronen (Garcia, M. L. and Cleveland, D. W., 2001). Das tau-Protein liegt bei Alzheimer-Demenz in einer hyperphosphorylierten Form vor. Die Hyperphosphorylierung kann durch eine Vielzahl von Kinasen durchgeführt werden. Man geht heute davon aus, dass Fehlregulationen der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (*cyclin-dependent kinase 5, cdk 5*), der Glycogen-Synthase-Kinase-3beta (GSK-3beta), der c-Jun-Kinase (JNK), p38 oder ERK die Hyperphosphorylierung von tau hervorrufen können (Liu, F. et al., 2002; Noble, W. et al., 2003). Durch die Phosphorylierung kommt es zur Dissoziation von den Mikrotubuli und somit zu einem Anstieg des löslichen tau-Pools. Dieser Anstieg könnte eine Erklärung für die Bildung der PHFs bei Alzheimer-Demenz sein.

### 1.2.4. Genetik und Risikofaktoren

Man unterscheidet zwei Formen der Alzheimer-Demenz: 1. die sporadische Form, von der die große Mehrzahl der Patienten betroffen ist und für die das Altern der wichtigste Risikofaktor ist, und 2. die seltene familiäre Form der Alzheimer-Demenz (FAD), bei der spezifische Genmutationen identifiziert worden sind. FAD ist eine autosomal dominant erbliche Form der Erkrankung mit 100%iger Penetranz. Beide Formen der AD sind jedoch gekennzeichnet durch gemeinsame klinische und neuropathologische Befunde wie Amyloid-Plaques, Akkumulation von intrazellulären neurofibrillären Bündeln (Tangles), synaptischer Dysfunktion und ausgeprägtem Neuronenverlust. Die familiäre Form der Alzheimer-Demenz tritt bereits vor dem 65. Lebensjahr auf. Bisher konnten bei FAD drei verschiedene pathogenetisch relevante Gene identifiziert werden: 1) Mutationen im APP-Gen, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist, 2) Mutationen im Präsenilin-1-Gen auf Chromosom 14 und 3)

Mutationen im Präsenilin-2-Gen auf Chromosom 1. Derzeit sind 16 APP-Mutationen, 136 Präsenilin-1-Mutationen und 10 Präsenilin-2-Mutationen beschrieben worden (<http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>). Bei Personen mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) kommt es durch die zusätzliche Kopie des Chromosoms 21 zu sehr frühzeitiger Entstehung von AD, was auf einen Gendosiseffekt hinweist. Besonders frühzeitig, im Alter von 40-50 Jahren, erkranken Personen mit Präsenilin-1-Mutationen. Allen Mutationen ist eines gemeinsam: sie führen zu einer stark erhöhten A $\beta$ -Produktion. Die A $\beta$ -Konzentrationen waren beispielsweise im Serum von Patienten mit APP-, PS1- oder PS2-Mutationen erhöht (Scheuner, D. et al., 1996). Die Mutationen verstärken die A $\beta$ -Bildung, indem sie die proteolytische Spaltung der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase erhöhen (Citron, M. et al., 1992; Suzuki, N. et al., 1994).

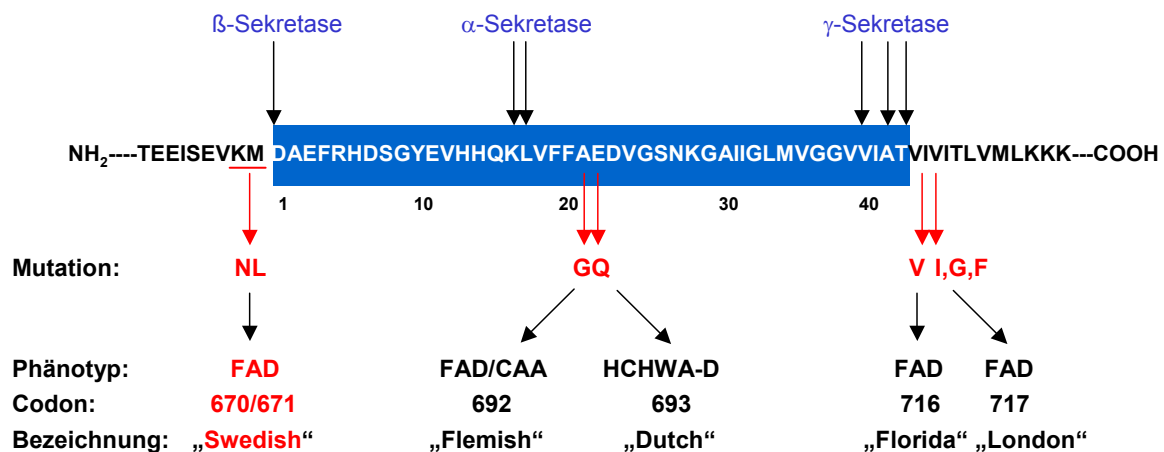


Abb. 1.12: Schnittstellen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase im APP-Gen. Bekannte APP-Mutationen

Mutationen an der  $\beta$ -Sekretase-Schnittstelle führen zu einer erhöhten Produktion von A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>, wohingegen Mutationen an der  $\gamma$ -Sekretase-Schnittstelle selektiv die Bildung von A $\beta$ <sub>1-42</sub> erhöhen.

Die „Schwedische Doppelmutation“ im APP-Gen (K670N/M671L) direkt vor der  $\beta$ -Sekretase-Schnittstelle, die zum ersten Mal in einer schwedischen Familie gefunden wurde, begünstigt beispielsweise die APP-Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase (Haass, C. et al., 1995) und führt somit zur 6- bis 8fach erhöhten A $\beta$ -Produktion (Citron, M. et

al., 1992; Cai, X. D. et al., 1993). Hierbei werden beide A $\beta$ -Peptide (A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub>) verstärkt produziert.

Die Mehrzahl der Patienten leidet an der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz. Einen wichtigen genetischen Risikofaktor für die sporadische Form stellt das Apolipoprotein-E-Gen dar, das für das Apolipoprotein E kodiert, einen Bestandteil der *low-density* Lipoproteine. Drei verschiedene Genvarianten kommen im Menschen vor. Die Unterschiede liegen in Veränderungen von zwei Aminosäuren (APOE  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 und  $\epsilon$ 4). Die  $\epsilon$ 2-Isoform enthält zwei Cysteine, die  $\epsilon$ 3-Isoform ein und die  $\epsilon$ 4-Isoform kein Cystein. Genetische Analysen konnten zeigen, dass das APO $\epsilon$ 4-Allel im Vergleich zur Normalbevölkerung gehäuft bei AD-Patienten vorkommt. Homozygote Träger des APOE $\epsilon$ 4-Allels weisen ein besonders hohes Risiko auf, an Alzheimer-Demenz zu erkranken (Corder, E. H. et al., 1993; Saunders, A. M. et al., 1993). APO $\epsilon$ 4 führt darüber hinaus zu einem früheren Beginn der Erkrankung im Vergleich zu APO $\epsilon$ 2- und APO $\epsilon$ 3-Trägern. Interessanterweise führt die Vererbung des APO $\epsilon$ 2-Allels zu einem Schutz gegenüber Alzheimer-Demenz (Corder, E. H. et al., 1994). Der genaue Mechanismus, warum das APO $\epsilon$ 4-Protein das Risiko an AD zu erkranken erhöht, ist noch unklar. AD-Patienten mit einem oder zwei APO $\epsilon$ 4-Allelen haben jedoch eine höhere Plaquedichte im Gehirn im Vergleich zu Personen, die kein APO $\epsilon$ 4-Allel tragen (Schmechel, D. E. et al., 1993). APO $\epsilon$ 4 scheint also entweder die A $\beta$ -Aggregation zu beschleunigen oder die Clearance zu verhindern.

Weitere AD-Kandidatengene befinden sich auf den Chromosomen 10 und 12. Auf Chromosom 12 befinden sich zwei Gene, die mit AD in Verbindung gebracht werden:  $\alpha$ <sub>2</sub>-Makroglobulin und sein Rezeptor, *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP1). Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der A $\beta$ -Clearance und beim Abbau von A $\beta$  spielen (Tanzi, R. E., 1999). Auf Chromosom 10 befindet sich ein Gen, das für das *Insulin-degrading enzyme* (IDE) kodiert. IDE ist eine Thiol-Zink-Metalloendopeptidase und spielt zusammen mit Neprilysin und anderen Proteasen eine sehr wichtige Rolle bei A $\beta$ -Clearance und Abbau (Selkoe, D. J., 2001). IDE Mutationen führten beispielsweise in einem Rattenmodell zu einem 15 – 30%igen Defizit des Insulin- und A $\beta$ -Abbaus (Farris, W. et al., 2004).

### 1.2.5. Alzheimer-Demenz und oxidativer Stress

Es gibt viele Hinweise, dass oxidativer Stress eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese der AD spielt (Markesbery, W. R., 1997; Butterfield, D. A. et al., 1999; Christen, Y., 2000; Nunomura, A. et al., 2001). In Gehirnen von Patienten mit sporadischer AD konnten im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpatienten oxidative Stressmarker gefunden werden: erhöhte Spiegel von Lipidperoxydationsprodukten, oxidierte Proteine und oxidierte DNA und RNA (Smith, C. D. et al., 1991; Lovell, M. A. et al., 1995; Lyras, L. et al., 1997). Untersuchungen von antioxidativen Enzymen wie z.B. der Superoxiddismutase, der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase weisen uneinheitliche Ergebnisse auf. Der überwiegende Teil der Studien zeigt jedoch Erhöhungen der Enzymaktivitäten in AD-Gehirnen als Antwort auf erhöhten oxidativen Stress (Schuessel, K. et al., 2004).

Es existiert ein dualer Mechanismus zwischen A $\beta$  und der Produktion von ROS. Oxidativer Stress kann zum einen die Produktion von intrazellulärem A $\beta$  (Misonou, H. et al., 2000) und von sezerniertem A $\beta$  (Olivieri, G. et al., 2001) erhöhen und zum anderen stellt A $\beta$  eine Quelle für ROS dar (Butterfield, D. A. et al., 1999). Zwischen der Toxizität von A $\beta$  und oxidativem Stress scheint also ein enger Zusammenhang zu bestehen.

APP-Mutationen führen, wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, zu erhöhter A $\beta$ -Produktion. APP-transgene Mäuse weisen hohe A $\beta$ -Spiegel auf und zeigen darüber hinaus erhöhte oxidative Stress-Marker (Blanchard, V. et al., 2003). PC12-Zellen, transfiziert mit der „Schwedischen Doppelmutation“, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Zelltod induziert durch oxidativen Stress (Marques, C. A. et al., 2003).

NO und seine Derivate gehören ebenfalls zur Gruppe der ROS. In den letzten Jahren konnte eine Beteiligung von NO an der Pathogenese der AD gezeigt werden (Dorheim, M. A. et al., 1994; Norris, P. J. et al., 1996; Law, A. et al., 2001b). In AD-Gehirnen konnten 2- bis 3fach erhöhte Spiegel des Lipidnitrierungsproduktes 5-Nitro- $\gamma$ -tocopherol nachgewiesen werden, was auf erhöhte NO-Spiegel bzw. Peroxynitritspiegel hinweist (Williamson, K. S. et al., 2002). Weitere Studien konnten zeigen, dass Gehirne von AD-Patienten erhöhte Proteinnitrierungslevel aufweisen (Smith, M. A. et al., 1997; Hensley, K. et al., 1998). Außerdem konnte sowohl bei Patienten mit sporadischer AD als auch in APP-transgenen Mäusen (APP23 Mäuse) eine erhöhte iNOS- und eNOS-Expression gefunden werden, was ebenfalls auf



erhöhte NO-Spiegel hinweist (Luth, H. J. et al., 2001). In einer weiteren Studie konnten Lüth et al. zeigen, dass bei AD-Patienten alle drei NO-Synthase-Isoformen überexprimiert werden und dass die Lokalisation der NO-Synthasen übereinstimmt mit der Nitrotyrosinbildung (Luth, H. J. et al., 2002). Darüber hinaus ruft A $\beta$  die Stimulation der NO-Produktion in Gliazellen hervor (Akama, K. T. et al., 1998). Stimulation von kortikalen Neuronen aus der Ratte mit A $\beta$ <sub>1-42</sub> führte ebenfalls zu einer erhöhten NO-Freisetzung und zu einem Verlust der Zellviabilität (Law, A. et al., 2001a). Die Reduktion der A $\beta$ -induzierten NO-Freisetzung durch iNOS- und nNOS-Inhibitoren weist auf eine Beteiligung der iNOS und der nNOS am A $\beta$ -induzierten NO-Anstieg hin (Law, A. et al., 2001a). In Ergänzung hierzu zeigten Neurone von AD-Patienten eine Überexpression der eNOS (NOS-3), was zu mitochondrialer Fehlfunktion und Zelltod führte (de la Monte, S. M. et al., 2003).

### **1.2.6. Alzheimer-Demenz und Apoptose**

Die Alzheimer-Demenz ist gekennzeichnet durch synaptische Dysfunktion und das Absterben von Neuronen (Selkoe, D. J., 2002). Viele Daten weisen daraufhin, dass das Absterben der Neurone durch apoptotischen Zelltod erfolgt (Behl, C., 2000). DNA-Fragmentierung, ein verändertes Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen und Caspase-Aktivität konnten in Gehirnen von AD-Patienten gefunden werden (Su, J. H. et al., 1994; Masliah, E. et al., 1998; Kitamura, Y. et al., 1998; Yang, F. et al., 1998; Engidawork, E. et al., 2001). Interessanterweise zeigten auch periphere Gewebe, wie z.B. Lymphozyten von Patienten mit sporadischer AD, eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Schindowski, K. et al., 2003).

Darüber hinaus ruft A $\beta$  Neurotoxizität in Primärkulturen der Ratte und in neuronalen Zellkulturen hervor (Yankner, B. A. et al., 1989). Die Behandlung von primären Rattenneuronen oder SK-N-BE-Neuronen mit A $\beta$  führt zu apoptotischem Zelltod (Estus, S. et al., 1997; Tamagno, E. et al., 2003). Die Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 konnte mit der A $\beta$ -Toxizität in Verbindung gebracht werden (Roth, K. A., 2001). Auch genetische Faktoren scheinen am Apoptoseprozess beteiligt zu sein: Die „Schwedische Doppelmutation“ im APP-Gen ruft in PC12-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zelltod nach oxidativem Stress und nach Serumreduktion hervor (Eckert, A. et al., 2001b; Leutz, S. et al., 2002). Die Aktivität der Caspasen 3, 8 und 9 war in den APP<sup>sw</sup>-PC12-Zellen signifikant erhöht im Vergleich zu

Kontrollzellen (Marques, C. A. et al., 2003). Außerdem wiesen die APPsw-PC12-Zellen eine erhöhte JNK-Aktivität nach oxidativem Stress auf (Marques, C. A. et al., 2003). Lymphozyten von PS1-mutierten transgenen Mäusen zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zelltod (Eckert, A. et al., 2001a).

### **1.2.7. Alzheimer-Demenz und mitochondriale Fehlfunktion**

Mitochondriale Fehlfunktion scheint bei der Pathogenese der AD eine sehr wichtige Rolle zu spielen (Swerdlow, R. H. and Kish, S. J., 2002). Morphologische Untersuchungen von frontalem und temporalem Kortex von AD-Patienten zeigten, dass die neuronalen Mitochondrien in der Anzahl reduziert und in der Größe verändert sind (Hirai, K. et al., 2001). Gehirne von AD-Patienten weisen darüber hinaus auch eine erniedrigte Pyruvat-Dehydrogenase- und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität auf (Gibson, G. E. et al., 1998). Zusätzlich zeigten AD-Patienten eine erniedrigte Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase (COX) im ZNS (Parker, W. D., Jr. et al., 1990; Parker, W. D., Jr., 1991; Kish, S. J. et al., 1992; Parker, W. D., Jr. et al., 1994a; Parker, W. D., Jr. et al., 1994b; Maurer, I. et al., 2000; Cardoso, S. M. et al., 2004). Dieses Phänomen war auch in Thrombozyten von AD-Patienten nachweisbar (Bosetti, F. et al., 2002). Zusätzlich zu Cytochrom-C-Oxidase-Aktivitätsmessungen wurden auch Proteinspiegel und Proteinuntereinheiten bei AD-Patienten untersucht. Western-Blot-Untersuchungen zeigten hierbei erniedrigte Cytochrom-C-Proteinspiegel bei allen 4 Untereinheiten im parietalen und temporalen Kortex von AD-Patienten (Kish, S. J. et al., 1999). Ojaimi et al. fanden eine Erniedrigung der COX-Untereinheit 2 und Untereinheit 4 in Purkinje-Fasern von AD-Patienten (Ojaimi, J. et al., 1999). Eine andere Studie zeigte, dass die Komplex-3-Core-Protein-1-Spiegel im Kortex von AD-Patienten vermindert sind (Kim, S. H. et al., 2000). Zusätzlich fand diese Arbeitsgruppe heraus, dass die 24-kD-Untereinheit des Komplexes 1 im temporalen und okzipitalen Kortex und die 75-kD-Untereinheit im parietalen Kortex von AD-Patienten signifikant reduziert waren (Kim, S. H. et al., 2001).

Es gibt außerdem Hinweise, dass die mitochondriale DNA in AD-Gehirnen geschädigt ist (de la Monte, S. M. et al., 2000). So fanden Hirai et al. eine Deletion von 5 kb in der mtDNA ( $\Delta$ mtDNA<sup>4977</sup>) (Hirai, K. et al., 2001). Andere Arbeitsgruppen

konnten diese Deletion nicht finden (Chang, S. W. et al., 2000). Chang et al. zeigten jedoch eine erhöhte Anzahl somatischer Punktmutationen in der mtDNA von AD-Gehirnen (Chang, S. W. et al., 2000). Lin et al. konnten vermehrt somatische Punktmutationen in mtDNA im Alter und bei AD-Patienten finden (Lin, M. T. et al., 2002). Es war jedoch kein Unterschied zwischen alten Kontrollpatienten und AD-Patienten erkennbar. Allerdings korrelierte die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität negativ mit der Anzahl an Punktmutationen. Ob mitochondriale DNA-Schäden eine spezielle Störung bei AD darstellen oder einen Alterseffekt, müssen noch weitere Studien klären.

Viele Erkenntnisse über mitochondriale Fehlfunktion bei AD konnten mit Hilfe der *cytoplasmic hybrid* Technik gewonnen werden. Dabei wird die mitochondriale DNA von Zellkulturen mit Hilfe von Ethidiumbromid entfernt. Zellen, bei der die eigene mitochondriale DNA entfernt ist, werden p0 Zellen genannt. Die Zellen werden anschließend repopuliert aus mtDNA von Thrombozyten. *Cybrid*-Zelllinien, die mitochondriale DNA aus Thrombozyten von Patienten mit sporadischer AD enthielten, zeigten eine reduzierte COX-Aktivität, bei gleichbleibender Komplex 1-Aktivität (Swerdlow, R. H. et al., 1997; Davis, R. E. et al., 1997). Das mitochondriale Membranpotential dieser AD-*Cybrid*-Mitochondrien war signifikant erniedrigt (Khan, S. M. et al., 2000). Außerdem waren die Mitochondrien in AD-*Cybrids* morphologisch verändert (Trimmer, P. A. et al., 2000). In der neuesten Studie dieser Arbeitsgruppe wurde die *Cybrid*-Zelllinie von AD-Patienten nach verschiedenen Passagezeitpunkten untersucht (Trimmer, P. A. et al., 2004). Die Untersuchung der frühen Passage zeigte keine morphologischen Unterschiede zu den Kontroll-*Cybrids*. Nach sechs Passagen waren jedoch deutliche Unterschiede erkennbar: eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien, eine reduzierte Größe und 8fach mehr morphologisch veränderte Mitochondrien als in Kontroll-*Cybrids*. Das mitochondriale Membranpotential war erniedrigt und die mtDNA-Synthese gesteigert. Die AD-*Cybrids* wiesen intra- und extrazellulär erhöhte A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> Konzentrationen auf, was auf Beteiligung von A $\beta$  an der mitochondrialen Fehlfunktion hinweist (Khan, S. M. et al., 2000).

Diese Hypothese wird weiterhin bestätigt durch den Befund, dass die Inkubation von isolierten Rattengehirn-Mitochondrien mit A $\beta$ <sub>25-35</sub> zu einem Verlust der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität führt (Canevari, L. et al., 1999). In primären Neuronenkulturen konnte eine Verminderung der Aktivität aller Atmungsketten-Komplexe durch A $\beta$ <sub>25-35</sub>

gefunden werden (Casley, C. S. et al., 2002b). Darüber hinaus wiesen die primären Neuronenkulturen erniedrigte ATP-Spiegel und reduzierte Glutathionspiegel auf. Die Inkubation von A $\beta$ <sub>25-35</sub> führte zusätzlich zu einer Reduktion der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität und der Pyruvat-Dehydrogenase Aktivität (Casley, C. S. et al., 2002a). In einer weiteren Studie wurde der Effekt von A $\beta$ <sub>25-35</sub> auf Rattenleber-Mitochondrien untersucht. A $\beta$ <sub>25-35</sub> führte zu einer Öffnung der mitochondrialen Pore, zu einer Abnahme der COX-Aktivität und zu erhöhtem oxidativem Stress (Parks, J. K. et al., 2001). Die Autoren gehen hierbei davon aus, dass NMDA-Rezeptoren und NO-Synthasen am A $\beta$ -induzierten oxidativen Stress beteiligt sind. Interessanterweise ruft A $\beta$  nur an Zellen mit funktionstüchtiger Atmungskette eine Cytochrom-C-Freisetzung und Caspaseaktivierung hervor, was dafür spricht, dass funktionstüchtige Mitochondrien die schädigenden Effekte von A $\beta$  vermitteln (Cardoso, S. M. et al., 2001).

Kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass APP in neuronalen Mitochondrien von APP-transgenen Mäusen lokalisiert ist. Mitochondriales APP steht hierbei in direktem Kontakt mit dem mitochondrialen Translokaseprotein TOM 40. Die Arbeitsgruppe geht deshalb davon aus, dass die Hemmung der mitochondrialen Transportproteine durch APP zu mitochondrialer Dysfunktion und zur Hemmung der ATP-Synthese führt (Anandatheerthavarada, H. K. et al., 2003). Lustbader et al. konnten A $\beta$  in Mitochondrien von AD Gehirnen und von APP-transgenen Mäusen nachweisen (Lustbader, J. W. et al., 2004). Sie zeigten, dass A $\beta$  im Mitochondrium an A $\beta$ AD (A $\beta$ -binding alcohol dehydrogenase) gebunden ist und somit in APP-transgenen Mäusen zu Cytochrom-C-Freisetzung, ROS-Bildung und erhöhter Apoptoserate führt.

### **1.2.8. Therapeutische Interventionsstrategien**

Die Ursachen für das Absterben von Neuronen bei AD sind außerordentlich vielfältig: die Anhäufung von A $\beta$ , vermehrt gebildete Sauerstoffradikale, mitochondriale Fehlfunktion gefolgt von apoptotischem Zelltod, Störung der cholinergen, dopaminergen und glutamatergen Neurotransmission. Aus diesem Grund sind die Wirkmechanismen bekannter Antidementiva auch sehr unterschiedlich. Zur Behandlung der Alzheimer-Demenz werden Acetylcholinesterasehemmstoffe, der NMDA-Antagonist Memantin, das Nootropikum Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt

verwendet. Die Wirkmechanismen von Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt sind jedoch noch nicht genau geklärt.

#### 1.2.8.1. Acetylcholinesterasehemmstoffe

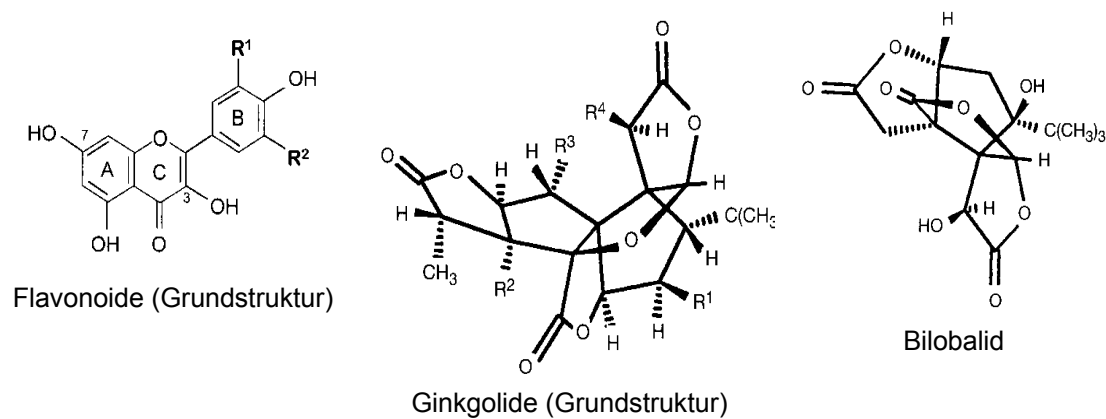
Ein selektiver Verlust von cholinergen Neuronen konnte bei AD-Patienten gefunden werden (Davies, P. and Maloney, A. J., 1976). Um das cholinerge Defizit auszugleichen, werden Acetylcholinesterasehemmstoffe eingesetzt. Der erste Ach-Esterase Hemmstoff war Tacrin. Tacrin wird aufgrund der kurzen Halbwertszeit und des leberschädigenden Effektes nur selten eingesetzt. Drei weitere Ach-Esterase Hemmstoffe werden heute zur Therapie der AD verwendet: Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Alle drei Arzneistoffe sind zugelassen zur Behandlung der milden bis moderaten AD. Sie zeigen in erster Linie eine Verbesserung der kognitiven Leistungen. In einer im Jahr 2003 veröffentlichten Metaanalyse konnte der Nutzen der Ach-Esterasehemmstoffe bei der AD gezeigt werden (Lanctot, K. L. et al., 2003). Ach-Esterasehemmstoffe bekämpfen jedoch in erster Linie die Symptome der AD, können jedoch den Krankheitsprogress nicht hinauszögern. Bei Galantamin konnten zusätzlich neuroprotektive Effekte nach Sauerstoff- und Glukoseentzug in hippocampalen Schnitten von Rattengehirnen beobachtet werden (Sobrado, M. et al., 2004).

#### 1.2.8.2. Memantin

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Glutamaterge Überstimulation kann zu neuronalen Schäden führen, auch Exzitotoxizität genannt. Glutamat bindet an viele Rezeptoren unter anderem auch an den NMDA-Rezeptor. Der NMDA-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei Gedächtnisvorgängen, Demenz und in der Pathologie der Alzheimer-Demenz (Lipton, S. A. and Rosenberg, P. A., 1994; Olney, J. W. et al., 1998; Shimizu, E. et al., 2000). Memantin ist ein nicht-kompetitiver NMDA-Antagonist. Seit 2003 ist Memantin zur Behandlung der moderaten bis schweren AD zugelassen. Es ist der einzige Arzneistoff, der für dieses Indikationsgebiet zugelassen ist. Memantin konnte über einen Zeitraum von 28 Wochen das Fortschreiten der AD vermindern (Reisberg, B. et al., 2003).

### 1.2.8.3. Ginkgo-biloba-Extrakt

Der standardisierte Extrakt aus getrockneten Blättern von *Ginkgo biloba* (EGb 761) steht ebenfalls als Antidementivum zur Verfügung. Der EGb 761-Extrakt ist definiert als Trockenextrakt aus getrockneten *Ginkgo-biloba*-Blättern (Droge-Extrakt-Verhältnis 35 – 67:1), extrahiert mit Aceton/Wasser. Er besteht zu 22 – 27 % aus Flavonglykosiden, zu 5 – 7 % aus Terpenlaktonen (2,8 – 3,4 % Ginkgolide A, B und C und 2,6 – 3,2 % Bilobalid) und höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren (Monographie, Bundesanzeiger 46, 1994). Die Flavonoidfraktion besteht in erster Linie aus Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin-Glykosiden.



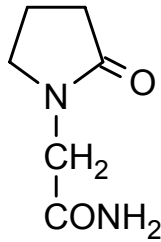
**Abb. 1. 13: Strukturformeln der Inhaltsstoffe von Ginkgo-biloba-Extrakt**

Viele Studien konnten zeigen, dass EGb 761 wirksam ist bei der Demenz vom Alzheimer-Typ, bei vaskulärer Demenz und bei gemischten Formen (Kleijnen, J. and Knipschild, P., 1992a; Kleijnen, J. and Knipschild, P., 1992b; Kanowski, S. et al., 1996; Le Bars, P. L. et al., 1997; Oken, B. S. et al., 1998; DeFeudis, F. V. and Drieu, K., 2000; Le Bars, P. L. et al., 2000; Le Bars, P. L. et al., 2002). In der Studie von Kanowski im Jahre 1996 wurden Patienten mit milder bis moderater präseniler und seniler Demenz 24 Wochen mit EGb 761 (240 mg/Tag) behandelt. Der klinische Gesamteindruck besserte sich nach EGb 761-Gabe um 32 % (Kanowski, S. et al., 1996). Die Alltagsbewältigung wurde signifikant verbessert. In der Studie von Le Bars im Jahre 1997 wurden AD-Patienten für 52 Wochen mit EGb 761 (120 mg/Tag) behandelt. Auch hier zeigte sich eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im Vergleich zu Placebo und eine Steigerung der Alltagskompetenz

(Le Bars, P. L. et al., 1997). Diese Studien, zusammen mit zahlreichen Metaanalysen von Doppelblindstudien, weisen daraufhin, dass EGb 761 ein wichtiges Medikament in der Therapie der AD darstellt. Darüber hinaus konnten Andrieu et al. zeigen, dass die Behandlung mit EGb 761 das Risiko an AD zu erkranken bei älteren Frauen vermindert (Andrieu, S. et al., 2003). Auch im APP-transgenen Mausmodell verbesserte die chronische Gabe von Ginkgo-biloba-Extrakt altersabhängige Gedächtnisverluste (Stackman, R. W. et al., 2003). Zusätzlich war EGb 761 in der Lage, die durch intrazerebroventrikuläre A $\beta$ <sub>1-40</sub>-Injektion induzierten Gedächtnisstörungen zu vermindern (Tang, F. et al., 2002).

Über den Wirkmechanismus von EGb 761 bzw. seiner einzelnen Bestandteile bei AD herrscht noch Unklarheit. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass EGb 761 und seine Bestandteile antioxidative Effekte aufweisen (Rong, Y. et al., 1996; Wei, T. et al., 2000; Bastianetto, S. et al., 2000b; Schindowski, K. et al., 2001). Darüber hinaus zeigt EGb 761 neuroprotektive Effekte (Ahlemeyer, B. and Krieglstein, J., 2003a). Es schützt beispielsweise hippocampale Neurone von Ratten gegen A $\beta$ -induzierten Zelltod (Bastianetto, S. et al., 2000b; Bastianetto, S. and Quirion, R., 2002) und Rattenneuronenkulturen vor Glutamat-induziertem Zelltod (Chandrasekaran, K. et al., 2002). Gleichermäßen weist es antiapoptotische Effekte in ausdifferenzierten PC12-Zellen auf (Smith, J. V. et al., 2002). EGb 761 hemmt die durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung hervorgerufene Cytochrom-C-Freisetzung, Caspase-3-Aktivierung und DNA-Fragmentierung (Luo, Y. et al., 2002; Smith, J. V. et al., 2002; Massieu, L. et al., 2004). Zusätzlich scheint EGb 761 ganz speziell schützende Effekte auf die Mitochondrien auszuüben (Sastre, J. et al., 2000; Sastre, J. et al., 2002a; Sastre, J. et al., 2002b). EGb 761 schützt beispielsweise isolierte Lebermitochondrien bei Sauerstoffmangel (Du, G. et al., 1999). In PC12-Zellen erhöht Bilobalid die durch mitochondriale DNA kodierten mRNA- und Proteinlevel der COX-Untereinheiten (Chandrasekaran, K. et al., 2002). EGb 761 und Bilobalid schützen die mitochondriale Atmungskettenaktivität und verhindern den Abfall der ATP-Spiegel durch Hypoxie (Janssens, D. et al., 1995; Janssens, D. et al., 1999; Janssens, D. et al., 2000). Des Weiteren verbessert EGb 761 das adrenerge, dopaminerge, cholinerge, serotonerge und GABAerge Neurotransmittersystem (Ahlemeyer, B. and Krieglstein, J., 2003a). EGb 761 und seine Bestandteile üben dementsprechend zahlreiche Effekte auf Funktionen des zentralen Nervensystems aus (DeFeudis, F. V. and Drieu, K., 2000).

## 1.2.8.4. Piracetam

**Abb. 1. 14: Strukturformel von Piracetam**

Piracetam (2-oxo-1-pyrrolidineacetamid) ist ein zyklisches Derivat von GABA, ohne jedoch GABA-Aktivität aufzuweisen. Es ist ein sehr hydrophiler Arzneistoff. Piracetam ist zu 100 % bioverfügbar und wird nicht metabolisiert. Die Plasmalevel betragen 200 – 2000  $\mu\text{M}$ . Piracetam wurde vor mehr als 30 Jahren zum ersten Mal synthetisiert. Im Jahre 1971 wurde es verwendet zur Behandlung des Schwindels und von Erkrankungen, die mit dem Alterungsprozess einhergehen. Heute wird es eingesetzt zur symptomatischen Therapie von Hirnleistungsstörungen in einem Dosisbereich von 4 – 8 g pro Tag, zur Behandlung von zerebrovaskulären Beschwerden in Dosen von 12 g pro Tag und zur Behandlung des kortikalen Myoklonus werden bis zu 24 g pro Tag verabreicht. Piracetam ist ein nootropischer Arzneistoff (Giurgea, C. E., 1982), das heißt, er erhöht sowohl beim Tier als auch beim Mensch die Funktion von kognitiven Prozessen wie z.B. Lernen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit, ohne sedative oder psychostimulierende Effekte aufzuweisen (Waegemans, T. et al., 2002). Im Jahre 1993 konnte eine Studie an 33 Patienten mit milder AD zeigen, dass Piracetam in einer Dosis von 8 g pro Tag über ein Jahr hinweg die Progression von kognitiven Störungen reduzieren kann (Croisile, B. et al., 1993). Tsolaki et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass Piracetam die gleiche Wirksamkeit wie Acetylcholinesterasehemmstoffe aufweist (Tsolaki, M. et al., 2001). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2002, in der 19 doppelblinde, placebokontrollierte Studien an älteren Patienten mit Demenz und kognitiven Störungen eingeschlossen waren, zeigte für Piracetam ein positives Ergebnis: Piracetam war im Vergleich zur Placebobehandlung wirksam bei älteren Patienten mit kognitiven Störungen (Waegemans, T. et al., 2002). Darüber hinaus erhöhte Piracetam die mit dem Alter abnehmende Membranfluidität im menschlichen Gehirn, in der Maus und in der Ratte (Muller, W. E. et al., 1997a). Die Verbesserung der Membranfluidität führte zusätzlich



zu Veränderungen auf Rezeptorebene. Piracetam erhöhte die Dichte der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren bei alten Ratten im frontalen Kortex und Striatum und die der NMDA-Rezeptoren im Hippocampus (Scheuer, K. et al., 1999a) und führte gleichzeitig zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten (Scheuer, K. et al., 1999a). In hippocampalen Membranen von Patienten mit sporadischer AD und gleichaltrigen Kontrollpersonen erhöhte Piracetam ebenfalls die Membranfluidität (Eckert, G. P. et al., 1999). Der Effekt war allerdings im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollpersonen in AD-Patienten stärker ausgeprägt. Piracetam verbesserte in der Maus auch die Membranfluidität synaptosomaler und mitochondrialer Membranen (Muller, W. E. et al., 1999b). Der Effekt war in alten Mäusen stärker ausgeprägt im Vergleich zu jungen Mäusen. Piracetam scheint dementsprechend im Alter, wenn schon eine Beeinträchtigung der Membranfluidität vorliegt, besonders wirksam zu sein. Neuere Befunde weisen darauf hin, dass Piracetam neuroprotektive Effekte auf Rattenastrozyten nach Hypoxie besitzt und apoptotischen Zelltod verhindert (Gabryel, B. et al., 2002). Piracetam verbesserte in diesem Modell die MTT-Reduktion, erhöhte die ATP-Spiegel, verhinderte die LDH-Freisetzung und reduzierte die Caspase-3-Aktivität (Gabryel, B. et al., 2002). Zusätzlich schützten Piracetam und sein Analogon GVS-111 normale humane kortikale Neurone und Neurone von Down-Syndrom-Patienten vor oxidativen Schäden und Apoptose nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation (Pelsman, A. et al., 2003). Das neuronale Überleben wurde verbessert und die Lipidperoxidation vermindert. Die Effekte von GVS-111 waren jeweils stärker ausgeprägt als die von Piracetam. Bei Patienten mit sporadischer AD konnte der erniedrigte zerebrale Glukoseverbrauch durch Piracetam gesteigert werden (Heiss, W. D. et al., 1988). Naftalin et al. konnten in einer aktuellen Studie an Erythrozyten zeigen, dass Piracetam den hemmenden Effekt von Barbituraten, Diazepam, Melatonin und Galanin auf den D-Glukose-Transport antagonisiert, was die Erhöhung der Glukosespiegel erklären könnte (Naftalin, R. J. et al., 2004). Die Arbeitsgruppe von Mingeot-Leclercq konnte zeigen, dass Piracetam die Membrandestabilisierung durch A $\beta$ <sub>29-42</sub> verhindern kann (Mingeot-Leclercq, M. P. et al., 2003), was ebenfalls auf einen protektiven Effekt von Piracetam bei AD hinweist.

### 1.2.8.5. Neue Therapieoptionen

#### 1.2.8.5.1. Statine

Der Zusammenhang zwischen Cholesterin und Alzheimer-Demenz ist schon lange bekannt. Apo E4, ein Protein, das am Transport von Cholesterin beteiligt ist, stellt einen Risikofaktor für AD dar. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die Einnahme von Statinen mit einem reduzierten Risiko an AD zu erkranken einherging (Wolozin, B. et al., 2000; Jick, H. et al., 2000). Zwei kürzlich publizierte prospektive randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien konnten jedoch keinen Nutzen bei Patienten mit altersbedingten kognitiven Defiziten zeigen (Shepherd, J. et al., 2002; Wald, N. and Law, M., 2002). Statine weisen in vitro Effekte auf die APP-Prozessierung auf. In neuronalen und peripheren Zellen erhöhten Statine die  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung und somit die Bildung des neuroprotektiven sAPP $\alpha$  bei einer gleichzeitigen Reduktion der A $\beta$ -Produktion (Fassbender, K. et al., 2001; Kojro, E. et al., 2001).

#### 1.2.8.5.2. Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs)

Epidemiologische Studien zeigten, dass Patienten, die lange NSAIDs, in erster Linie Hemmstoffe der Cyclooxygenase 1, einnahmen, ein niedrigeres AD-Risiko aufwiesen (in, t., V et al., 2001). Auch eine aktuelle Metaanalyse zeigte den protektiven Effekt von NSAIDs auf die Entwicklung von AD (Etminan, M. et al., 2003). Der protektive Effekt könnte hervorgerufen werden durch die Tatsache, dass NSAIDs in Zellkultursystemen und in APP-transgenen Tieren die  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung modifizieren und somit zu einem Abfall der A $\beta_{1-42}$ -Produktion führen, bei jedoch gleichbleibenden Gesamt-A $\beta$ -Spiegeln (Weggen, S. et al., 2001). Dieser Effekt erwies sich als unabhängig vom Ausmaß der Cyclooxygenase-Hemmung. Prospektive Studien mit NSAIDs zeigten jedoch keinen Nutzen in der Therapie der AD (Aisen, P. S. et al., 2003; Reines, S. A. et al., 2004), weshalb man davon ausgehen kann, dass sie eher zur Prophylaxe der AD geeignet sind.

#### 1.2.8.5.3. A $\beta$ -Vakzine

Im Jahre 1999 wurde ein immunologischer Ansatz die A $\beta$ -Monomere, Oligomere und Aggregate zu senken am APP-transgenen Mausmodell getestet. Die parenterale Immunisierung von APP-transgenen Mäusen mit synthetischem, humanem A $\beta_{1-42}$

fürte zur Antikörperbildung, die einherging mit einer Clearance von A $\beta$ -Ablagerungen und bei Immunisierung von sehr jungen Mäusen mit einem Verhindern von A $\beta$ -Ablagerungen (Schenk, D. et al., 1999). Weitere Studien zeigten, dass A $\beta$ -Immunisierung die A $\beta$ -Konzentration im Gehirn verminderte und zur Verbesserung von Lerndefiziten in diesen Mäusen führte (Janus, C. et al., 2000; Morgan, D. et al., 2000). Im Mausmodell wurden keine unerwünschten Antigen-Antikörperreaktionen beschrieben. Die Verabreichung der A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Vakzine an Patienten mit milder bis moderater AD führte bei 6 % der Patienten zu inflammatorischen Reaktionen im Sinne einer postvakzinalen Meningoenzephalitis (Selkoe, D. J. and Schenk, D., 2003; Check, E., 2003). Dies führte zum Abbruch der Studie. Eine Nachuntersuchung der AD-Patienten mit hohen Antikörperspiegeln gegen A $\beta$  zeigte jedoch ein langsames Fortschreiten der kognitiven Defizite bei diesen Patienten (Hock, C. et al., 2003). Aus diesem Grund werden gegenwärtig präklinische Studien mit anti-A $\beta$ -Antikörpern durchgeführt.

#### 1.2.8.5.4. Modulation der Sekretasen

Ein weiterer Ansatzpunkt bei frühen Formen der AD könnten Substanzen sein, die die Bluthirnschranke überwinden und zu einem Anstieg der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität oder einem Abfall der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität führen. Durch die Gabe von  $\alpha$ -Sekretasestimulatoren wird die Bildung von löslichem, neuroprotektivem sAPP $\alpha$  gefördert.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Hemmstoffe führen zu einer verminderten A $\beta$ -Produktion. Einige neue Substanzen konnten als  $\gamma$ -Sekretase-Hemmstoffe identifiziert werden: Peptid-Aldehyde (Calpain), Difluoroketone, Cathepsin-D-Inhibitoren und Cathepsin-Y-Blocker (Allain, H. et al., 2003).  $\gamma$ -Sekretase-Hemmstoffe könnten zu einer 30 – 40%igen Absenkung der A $\beta$ -Spiegel führen. Ob der therapeutische Nutzen eher durch  $\gamma$ -Sekretase-Hemmstoffe bewirkt wird, die die aktive Seite (Präsenilin) des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes hemmen oder durch Substanzen, die die Kofaktoren (Nicastrin, Aph-1 oder Pen-2) hemmen, müssen noch weitere Untersuchungen zeigen (Selkoe, D. J., 2004). Präsenilindoppelknockout-Mäuse sterben jedoch in der Embryonalphase (Donoviel, D. B. et al., 1999), was auf eine wichtige Rolle der Präseniline in der Embryonalphase hinweist. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass doppelknockout-Mäuse, denen beide Präseniline in den postnatalen Vorderhirnzellen fehlten, Beeinträchtigungen des Gedächtnisses und der synaptischen Plastizität

aufwiesen, was auf die wichtige Rolle der Präseniline bei Gedächtnisvorgängen und bei der synaptischen Funktion hinweist (Saura, C. A. et al., 2004). Die Hemmung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes am Präsenilin erscheint aus diesem Grund als Therapieoption als problematisch.

Die Entwicklung von Substanzen, die die aktive Seite der  $\beta$ -Sekretase hemmen, scheint schwieriger zu sein als die Entwicklung von  $\gamma$ -Sekretase-Hemmstoffen. Erst nachdem die Kristallstruktur der  $\beta$ -Sekretase aufgeklärt wurde (Hong, L. et al., 2000), konnten effektive Inhibitoren entwickelt werden. Auf Hydroxyethylen basierende peptidometrische Inhibitoren konnten vor Kurzem synthetisiert werden (Hom, R. K. et al., 2004). Interessanterweise zeigen knockout Mäuse für die  $\beta$ -Sekretase keine offensichtlichen Defizite, aber ein verändertes Verhalten (Roberds, S. L. et al., 2001; Harrison, S. M. et al., 2003).

### 1.2.9. Ziel der Arbeit

Hauptcharakteristika der AD sind extrazelluläre Plaques bestehend aus dem Amyloid-beta-Peptid (A $\beta$ ) und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Viele Daten weisen daraufhin, dass A $\beta$  zu mitochondrialer Fehlfunktion führt. In den bisherigen Studien wurde A $\beta$  immer extrazellulär und in unphysiologisch hohen mikromolaren Konzentrationen verwendet. Die hier vorliegende Arbeit hatte daher folgendes zum Ziel: Es sollte der Effekt der schwedischen Doppelmutation im APP-Gen (APP<sup>sw</sup>) auf den NO-Stoffwechsel und die mitochondriale Funktion untersucht werden. Die schwedische Doppelmutation wurde in einer unter der familiären Form der AD leidenden Familie in Schweden identifiziert und führt zu 6- bis 8fach erhöhten A $\beta$ -Spiegeln. Zur Untersuchung von mitochondrialen Funktionsstörungen durch die schwedische Doppelmutation im APP-Gen (APP<sup>sw</sup>) wurden PC12-Zellen und HEK-Zellen stabil mit humanem Wildtyp-APP bzw. APP<sup>sw</sup> transfiziert. Zusätzlich wurden untransfizierte PC12-Zellen mit extrazellulärem A $\beta$ <sub>1-42</sub> behandelt. Es sollten zum einen dosisabhängige Effekte von A $\beta$  untersucht werden und zum anderen die Frage geklärt werden, ob in erster Linie intra- oder extrazelluläre A $\beta$ -Effekte an der mitochondrialen Fehlfunktion beteiligt sind. Um sicher zu gehen, dass mögliche Effekte auf den NO-Stoffwechsel bzw. auf die mitochondriale Funktion durch A $\beta$  und nicht durch eine Überexpression von APP hervorgerufen werden, wurden beide Zelllinien mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT über 48 h behandelt und anschließend die NO-Spiegel und die mitochondriale Funktion bestimmt. Die intrazellulären NO-Spiegel wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA gemessen. Zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion dienten die mitochondriale Membranpotentialmessung mit den Fluoreszenzfarbstoffen R123 und TMRE, die Messung der ATP-Spiegel mit Hilfe eines Biolumineszenzassays und die Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität. Außerdem wurde die Anzahl der Mitochondrien mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs *Mitotracker Red* bestimmt. Zusätzlich wurde mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie das intrazelluläre Verteilungsmuster von APP untersucht. Um eine zusätzliche Aussage über die Beteiligung von nitrosativem bzw. oxidativem Stress bei mitochondrialer Fehlfunktion zu treffen, wurden die Zellen zusätzlich mit Natriumnitroprussid bzw.

Wasserstoffperoxid versetzt und anschließend das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Antidementiva, Antipsychotika und Antidepressiva auf ihre Fähigkeit untersucht werden, Mitochondrien vor oxidativem und nitrosativem Stress zu schützen. Zur Überprüfung der protektiven Effekte auf die Mitochondrien wurden mitochondriale Membranpotentialmessungen und Bestimmungen der ATP-Spiegel durchgeführt. Substanzen, die protektive Effekte zeigten, sollten in zusätzlichen Stressexperimenten wie z.B. nach Serumentzug oder nach A $\beta$ -Inkubation weiter untersucht werden. Zusätzlich sollten die Substanzen auch auf antiapoptische Effekte wie z.B. auf eine Verminderung der Caspase-Aktivität getestet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Materialien

Brutschrank Heraeus, Typ BB 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Chamberslides (Lab-Tek Chambered Coverglass, 8 well)	Nalge Nunc International USA
Combitips 0.1 ml, 0.5 ml, 1.0 ml, 2.5 ml, 10 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Deckgläser für Haemocytometer (Neubauer Kammer)	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Fluoreszenz Mikroskop, Eclipse E 800	Nikon, Japan
Fluoreszenz Spektrometer, SLM Aminco Bowman Series 2	Firma SLM Instruments, Urbana, USA
Inversionsmikroskop, Modell TMS, Typ I04	Nikon, Japan
Konfokales Laserscanmikroskop	Firma Leica Lasertechnik Heidelberg
Kryo-Röhrchen, Modell Cryo-S, 2 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Modell J2-21 mit JA-20 und JA-20.1 Rotor	Beckmann, München
Kulturschalen, Corning® 25 cm <sup>2</sup> , Polystyren	Dunn Labortechnik, Asbach
Laminar flow Bank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Latex Handschuhe	Ansell GmbH, München
Magnetrührer, Typ Poly 15, H + P Labortechnik	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Mikrotiterplatten (24 well; 96 well Platten)	IWAKI Dunn Labortechnik, Greiner Labortechnik Frickenhausen
Mikrozentrifuge, Modell GS-6R Zentrifuge	Beckman, Krefeld
Multipette® plus 4981, Eppendorf	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Neubauer Kammer Superior	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Parafilm® M,	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Pasteurpipetten	Firma Merck, Darmstadt
pH-Meter, Modell CG 825	Schott, Hofheim
Photometer für Mikrotiterplatten, Modell Digiscan	Firma Asys Hightech, Eugendorf
Pipetus®-akku, Hirschmann	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt

Pipetus®-classic, Hirschmann	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Plastibrand® Tip-Rack, 5 – 300 µl, Brand	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Plastik-Einmal-Pipette	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pipetten Model Pipetman 10, 20, 200, 1000 und 5000 µl	Abimed, Langenfeld
Pipetten, 10, 20, 200, 1000 und 5000 µl	Eppendorf-Netheler- Hinz-GmbH, Hamburg
Pipetten steril, 5, 10 and 25 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Quarzküvetten Modell 101-QS 10 mm	Firma Helma, Mühlheim
Schüttler Modell ST5	Firma Zipper GmbH Staufen
Transferpette®-8, 10 - 100 µl, Brand	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Transferpette®-8, 30 - 300 µl, Brand	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Ultraschallbad, Sonorex RK105H	Firma Bandelin, Berlin
UV/VIS Photometer, Modell U-2000	Hitachi, Düsseldorf
Spectrophotometer	
Victor Multilabel Counter	Perkin Elmer, Jügesheim
(Fluoreszenz, Lumineszenz, Photometrie)	
Vortexer Modell Reax 2000	Firma Heidolph, Kelkheim
Wasserbad, Modell Thermomix 1441	B. Braun-Melsungen, Düsseldorf
Wasserbad, Modell 1003, GFL	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Waagen, Modell Ab204 und AT261	Mettler, Gießen
Zentrifuge, Modell GS-6R	Beckman, München

### 2.1.2. Chemikalien

Antimycin A	Fluka, München
β-Amyloid <sub>25-35</sub> , Lot:0539704	Bachem, Heidelberg
β-Amyloid <sub>1-42</sub> , Lot:0535120	Bachem, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Caspase-9 Substrate II, Colorimetric	Merck Biosciences, Darmstadt
Carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)	Fluka, München
(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane- sulfonate) (CHAPS)	Sigma, München
4,5-Diaminofluorescein-Diacetat (DAF-2DA)	Merck Biosciences, Darmstadt
1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma München



N-N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT)	Merck Biosciences, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Fetales Kälberserum, Mycoplasmen-getestet (FCS)	Sigma, München
Fluoxetin-Hydrochlorid	Biotrend, Köln
Galanthamin-Hydrobromid	Biotrend, Köln
Geneticinsulfat (G418)	PAA Laboratories, Cölbe
Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761)	Schwabe, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Haloperidol-Hydrochlorid	Biotrend, Köln
Hank's Balanced Salt, Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei (HBSS)	Sigma, München
Hydroxyethylpiperazinethansulfonat (HEPES)	Merck, Darmstadt
Horse Serum, Mycoplasmen-getestet (HS)	Invitrogen, Karlsruhe
Imipramin-Hydrochlorid	Sigma, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
JC-1	Fluka, München
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Memantin-Hydrochlorid	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Mitotracker Red	Molecular Probes, Leiden
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumnitroprussid	Sigma, München
Oligomycin	Fluka, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, München
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin-Lösung, lyophilisiert (PenStrep)	Invitrogen, Karlsruhe
Piracetam	UCB, Belgien
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma, München
Rhodamine 123 (R123)	Molecular Probes, Leiden
Rotenon	Sigma, München
Tetramethylrhodamineethylester (TMRE)	Molecular Probes, Leiden
2-Thenoyltrifluoroacetone	Fluka, München
Tris (hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, München
Triton X- 100	Sigma, München
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe
Valinomycin	Fluka, München
Wasserstoffperoxid, 3 %, 30 %	Sigma, München

### 2.1.3. Kits und Antikörper

#### Kits

Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry)	Bio Rad, München
Cytochrome C Oxidase Assay Kit	Sigma, München
ViaLight™ HT (ATP Biolumineszenzassay)	Cambrex, Belgien

#### Antikörper

Primär-Antikörper:

Amyloid Precursor Protein, a.a. 44-63	Chemicon, Hofheim
ATP-Synthase-β	BD, Heidelberg

Sekundär-Antikörper

Goat IgG Donkey, Fluorescein gekoppelt	Chemicon, Hofheim
Mouse IgG Goat, Rhodamine gekoppelt	Chemicon, Hofheim

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Millipore-Wasser angesetzt und der pH-Wert mit dem pH-Meter überprüft.

#### Puffer:

##### HBSS-Puffer:

Das HBSS-Fertigpulvermedium wurde in 990 ml Millipore-Wasser gelöst. Anschließend wurden je 5 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (200 mM) und MgSO<sub>4</sub>-Lösung (200 mM) und 2,358 g HEPES hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

##### PBS-Puffer:

Das 10fach Konzentrat wurde mit Millipore-Wasser 1:10 verdünnt, anschließend der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

##### Tris-Puffer 5 mM:

Es wurden 1,21 g/ml in 2 l Millipore-Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Mitochondrienisolations-Lysepuffer 50 ml:

75 mM NaCl  
1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
250 mM Sucrose  
1 mM PMSF  
0.05% Digitonin  
6 Tabletten Mini Complete  
Millipore-Wasser

Caspase-9-Lysepuffer:

10 mM HEPES  
1 mM DTT  
0,1 mM EDTA  
0,1 % CHAPS  
0,1 % Triton X 100  
1 mM PMSF  
1 µg/ml Pepstatin  
1 µg/ml Leupeptin

Caspase-9-Assay-Puffer:

100 mM NaCl  
50 mM HEPES  
10 mM DTT  
1 mM EDTA  
10 % Glycerol  
0,1 % CHAPS

**Lösungen:**

Paraformaldehydlösung 2 %:

Paraformaldehyd (PFA)	2,0 g
PBS-Puffer	100 ml

Der Ansatz wurde alkalisch gemacht und das PFA wurde bei ca. 90 °C im Wasserbad gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### Mowiollösung:

Glycerol	6,0 g
Mowiol (4-88)	2,4 g
Millipore Wasser	6,0 ml
0,2 M Tris Puffer	12,0 ml
DABCO	2,5 %

6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol (4-88) und 6 ml Millipore-Wasser wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 12 ml Tris 0.2 M hinzugefügt und 1-2 Stunden bei 50 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Die Mowiollösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zu dem Mowiolstock wurde am Tag der Messung DABCO 2,5 % hinzugefügt. Die Lösung bleibt bei Raumtemperatur über mehrere Wochen stabil.

### Rhodamine 123-Stammlösung:

Rhodamine 123 wurde in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst. Die weiteren Verdünnungen erfolgten in HBSS.

### TMRE- / DAF-2DA-Stammlösung:

TMRE wurde in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst. Die weiteren Verdünnungen erfolgten in DMSO. DAF-2DA wurde als Stammlösung in DMSO in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt.

### Caspase-9-Substrat-Lösung:

Das Caspase 9-Substrat wurde in einer Konzentration von 2 mM in DMSO gelöst.

## 2.2. Zellkultur

Als Zellkulturmodelle dienten in dieser Arbeit zum einen PC12-Zellen und zum anderen HEK-Zellen. PC12-Zellen sind Phäochromozytom-Zellen aus der Ratte (Greene, L. A. and Tischler, A. S., 1976). HEK-Zellen stellen eine menschliche epitheliale Nierenzelllinie dar (Graham, F. L. et al., 1977). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen. PC12-Zellen wurden in Dulbecco's Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 5 % Pferdeserum (HS) und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. HEK-Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10 % FCS und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 – 3 Tage gesplittet, das heißt von der Platte abgelöst, vereinzelt, mit frischem Medium verdünnt und in neue Petrischalen überführt.

Die Transfektionen der Vektor-, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen und der HEK-Zellen wurden von Frau Dr. Barbara Steiner durchgeführt (Eckert, A. et al., 2001b). Die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich der humanen APP-Expression und der Aβ-Spiegel erfolgte durch Astrid Bonert. Zur Bestimmung der APP-Expression wurden Westernblots durchgeführt, zur Bestimmung der Aβ-Spiegel ein Aβ-ELISA. Die PC12-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Plasmiden kotransfiziert, die einen pCMV-Promotor enthielten: Das Plasmid pCMV695 enthält die DNA-Sequenz für humanes wildtyp-APP (APPwt) bzw. für die schwedische Doppelmutation von APP (APPsw, KM670/671NL), das Plasmid pCMVneo überträgt eine Neomycinresistenz. Resistenzvektor und APP-Vektor wurden in einem Verhältnis von 1:10 unter Verwendung des FuGene<sup>®</sup> Transfection Reagent (Roche, Mannheim) zu PC12-Zellen gegeben. Zur Selektion wurde dem Medium das Neomycinderivat G418 zugesetzt. Die Transfektion der HEK-Zellen erfolgte auf die gleiche Art.

Die transfizierten PC12-Zellen und HEK-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die untransfizierten PC12- und HEK-Zellen. Dem Medium wurde jedoch zusätzlich G418 zugesetzt.

Folgende Klone wurden in dieser Arbeit verwendet:

### **PC12-Zellen:**

PC12 vct: NEO-01

PC12 APPwt: M5

PC12 APPsw: Q8

### **HEK-Zellen:**

HEK 293 untransfiziert

HEK 269 wt

HEK 269 sw

### **2.2.1. Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen von der Platte abgelöst und in ein Falcon überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Medium aufgenommen und gut resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurde mit 90 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % gemischt. 10 µl dieser Suspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl auf 1 Mio Zellen pro ml eingestellt.

### **2.2.2. Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff**

Die Zellen wurden von einer mittelstark bewachsenen Platte ab gespült und in ein Falcon überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (40 % Medium, 10 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe einer Einfrierbox bei -80 °C eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.3. Auftauen der Zellen**

Der Auftauvorgang muss sehr schnell erfolgen. Die Kryoröhrchen wurden bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Falcon mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt und anschließend für 5 min bei 1000

Umdrehungen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine Petrischale mit 10 ml Medium überführt.

### **2.3. beta-Amyloid (A $\beta$ ) Peptide**

Die A $\beta$ <sub>1-42</sub> Peptide wurden als lyophilisiertes Pulver von der Firma Bachem, Heidelberg bezogen. Um Spontanaggregation zu vermeiden, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Das lyophilisierte Pulver wurde in eiskaltem Millipore-Wasser, dessen pH-Wert mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt wurde, gelöst, so dass eine 1 mM Stammlösung entstand. Um den Lösungsprozess zu beschleunigen, wurden die Peptide nach Zugabe des Wassers in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad gegeben. Die Stammlösungen wurden sofort nach dem Auflösen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die A $\beta$ <sub>25-35</sub>-Peptide wurden ebenfalls als lyophilisiertes Pulver von der Firma Bachem, Heidelberg bezogen. Die Stammlösungen wurden in Tris-Puffer hergestellt. Der Aggregationszustand von A $\beta$  scheint einigen Studien zu Folge maßgeblich für dessen Toxizität zu sein (Pike, C. J. et al., 1991; Lorenzo and Yankner, 1994). Aus diesem Grund wurden die Peptide vor Beginn der Experimente für 24 h voraggregiert. Hierzu wurden die Stammlösungen in Tris-Puffer verdünnt und anschließend für 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Vor der Zugabe zu den Zellen wurden die aggregierten Peptide auf einem Vortexer homogenisiert, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.

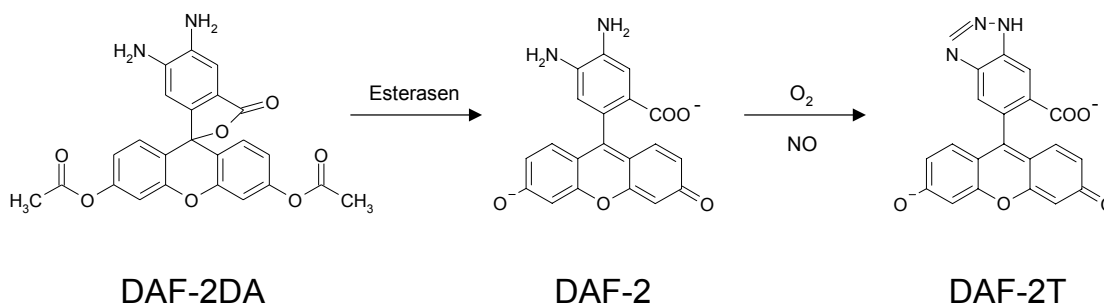
### **2.4. Sammeln von konditioniertem Medium**

5 Mio Kontrollzellen, APPwt-Zellen und APPsw-Zellen wurden in einer Petrischale ausgesäht. Zusätzlich wurde noch eine 24-Well-Platte und eine 96-Well-Platte mit Kontrollzellen ausgesäht. Nach 24 h wurden die Zellen in den Petrischalen abgelöst, in ein Falcon überführt und für 5 min bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Medium der 24-Well-Platte und der 96-Well-Platte wurde in der Zwischenzeit vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l (ATP-Messung) und 500  $\mu$ l (Membranpotential) des im Überstand befindlichen Mediums der verschiedenen Zelllinien auf die einzelnen Wells der 96-Well-Platte bzw. der 24-Well-Platte verteilt. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-

Spiegel erfolgte nach 24-stündiger und nach 48-stündiger Inkubation mit dem konditionierten Medium.

## 2.5. Bestimmung von intrazellulären NO-Spiegeln

Die Bestimmung der intrazellulären NO-Spiegel erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA (Kojima, H. et al., 2001). Als unpolares Molekül passiert DAF-2DA die Zellmembran. Im Zytoplasma wird der Acetatrest durch Esterasen abgespalten, wodurch die nichtfluoreszierende Muttersubstanz DAF-2 intrazellulär akkumuliert (Abb. 2.1). Nach Reaktion mit NO und Sauerstoff entsteht das fluoreszierende DAF-2-Triazol (DAF-2T). DAF-2 reagiert nicht mit stabilen oxidierten Formen von NO wie z.B. Nitrat, Nitrit oder mit reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Superoxidationradikal, Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit. Es ist also sensitiv für NO und kann sehr niedrige NO-Spiegel im Bereich von 2 – 5 nM detektieren. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Victor<sup>®</sup> Multilabel Counters.



**Abb. 2.1: Strukturformel von DAF-2DA, Spaltung durch Esterasen, Anlagerung von NO**

Die 24-Well-Platten wurden mit Polylysin (0.1 mg/ml) beschichtet, um ein Ablösen der Zellen bei den Waschschrinen zu vermeiden. Zur Beschichtung wurden in jedes Well 200 µl Polylysin pipettiert, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und 3mal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die PC12-Zellen und die HEK-Zellen in die 24-Well-Platte ausgesät. Dabei wurden pro Well 200.000 Zellen in 500 µl Medium aufgenommen. Um die NO-Synthaseaktivität zu hemmen, wurde mit NO-Synthasehemmstoffen über einen Zeitraum von 48 h vorinkubiert. Bei L-NAME



(20 mM) handelt es sich um einen unselektiven NO-Synthasehemmstoff, der alle drei Formen gleichermaßen hemmt. 1400 W (1 mM) ist ein selektiver Hemmstoff der induzierbaren NO-Synthase (Garvey, E. P. et al., 1997), N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (1 mM) stellt einen selektiven Hemmstoff der neuronalen NO-Synthase dar (Babu, B. R. and Griffith, O. W., 1998). Am Versuchstag wurden die Zellen mit DAF-2DA in einer Konzentration von 10 μM für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig komplett abgesaugt und anschließend 500 μl HBSS pro Well hinzugefügt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen wurde erneut abgesaugt und 500 μl HBSS hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (Einstellung: Rhodamine Bottom).

Als NO-Donoren wurden Papa-NONOate (Keefer, L. K. et al., 1996) und Spermine-NONOate verwendet (Abb. 2.2). Bei den NONOaten handelt es sich um NO-Donoren, die spontan pH-abhängig nach einer Reaktion 1. Ordnung dissoziieren und 2 Moleküle NO freisetzen. Papa-NONOate setzt NO bei 37 °C mit einer Halbwertszeit von 13 min frei, wohingegen Spermine-NONOate bei 37 °C eine Halbwertszeit von 37 min aufweist.

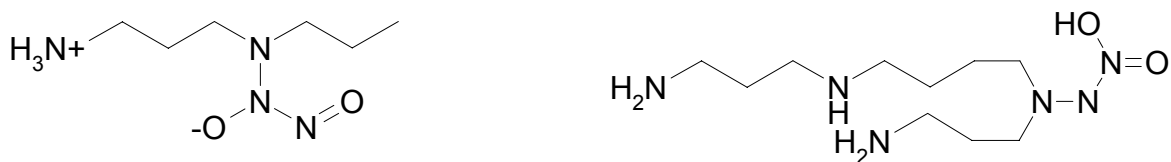


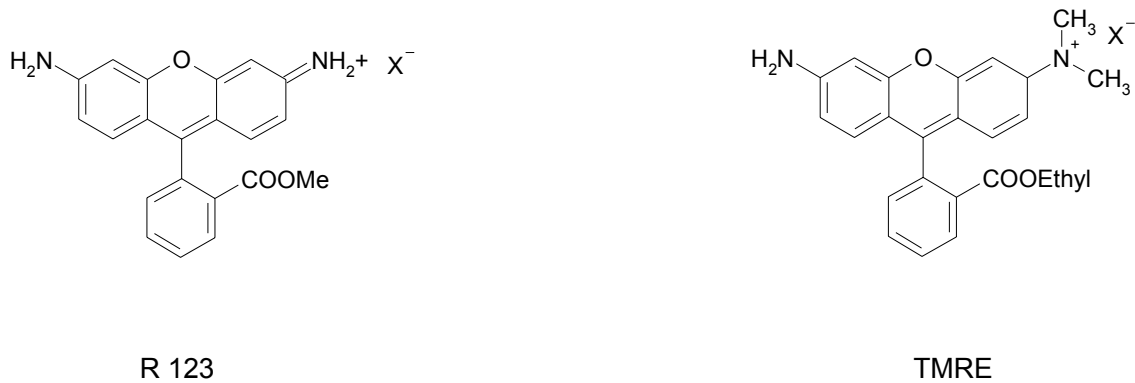
Abb. 2.2: Strukturformeln von Papa-NONOate (links) und Spermine-NONOate (rechts).

Nach Aufnahme des Basalwertes wurde mit den beiden NO-Donoren stimuliert und anschließend bei 37 °C über 1 h gemessen.

## 2.6. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mit Hilfe von zwei Fluoreszenzfarbstoffen, Rhodamine 123 (R123) (Baracca, A. et al., 2003) und Tetramethylrhodamineethylester (TMRE) (Collins, T. J. et al., 2002). Bei beiden Farbstoffen handelt es sich um Kationen, die sich in Abhängigkeit vom Membranpotential selektiv in die mitochondriale Matrix einlagern (Abb. 2.3). Je höher

die Fluoreszenzintensität ist, desto stärker negativ ist das mitochondriale Membranpotential.

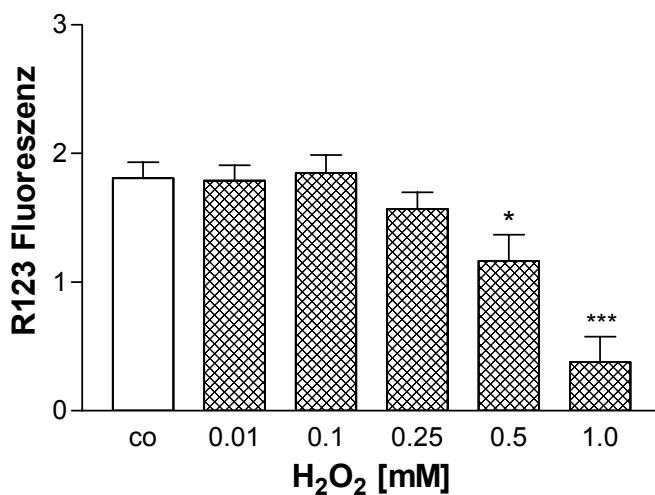


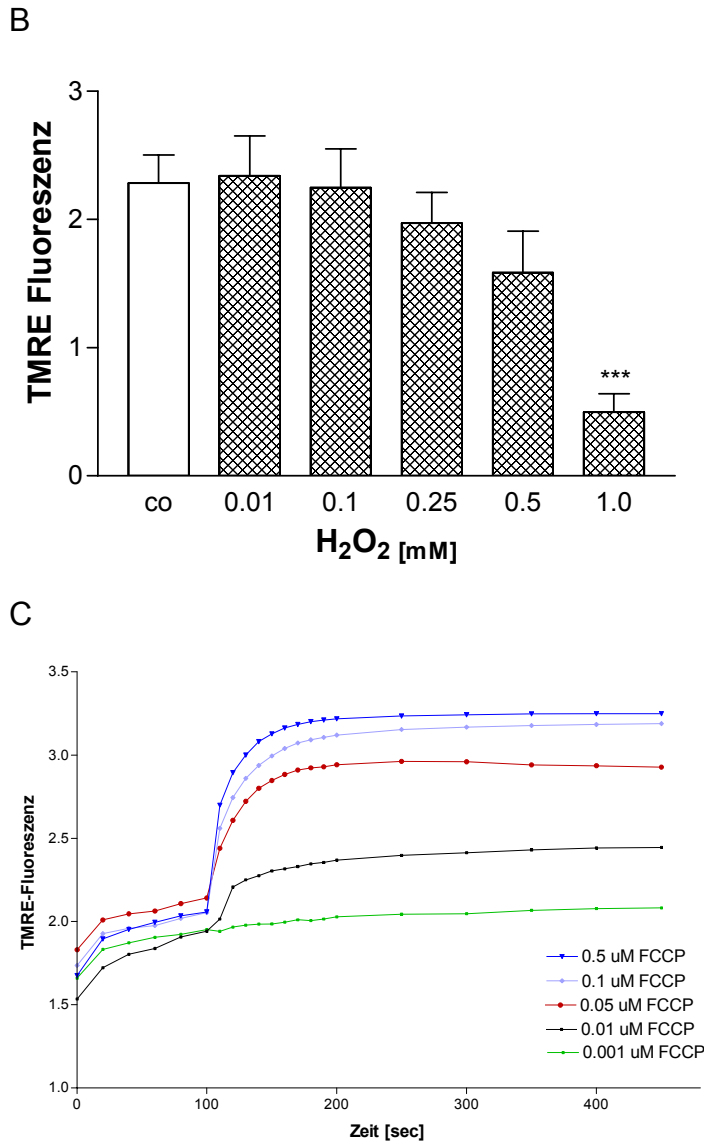
**Abb. 2.3: Strukturformeln von R123 und TMRE**

Die Etablierung der mitochondrialen Membranpotentialmessung wurde am Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Hierzu wurden 2,5 Millionen Zellen in einer Petrischale ausgesät. Am folgenden Tag wurde mit Rhodamine 123 oder TMRE 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Abspülen der Petrischale geerntet, in ein Falcon überführt und 5 min bei 1000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1000  $\mu$ l HBSS resuspendiert. Danach wurden weitere 3 ml HBSS hinzugefügt und wiederum bei 1000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der Waschschritt wurde nochmals wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1000  $\mu$ l HBSS resuspendiert und die Fluoreszenzintensität in einer Quarzküvette am Fluoreszenzspektrometer bei einer Exzitationswellenlänge von 507 nm und einer Emissionswellenlänge von 529 nm bestimmt. Als Kontrollstimulantien wurden  $\text{H}_2\text{O}_2$  und der mitochondriale Entkoppler FCCP verwendet.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde über den Zeitraum von 6 h inkubiert, FCCP wurde direkt in die Küvette gespritzt. Man erkennt einen dosisabhängigen Abfall der Rhodamine-123-Fluoreszenz mit steigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, was gleichbedeutend ist mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 2.4 A). Die Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde auch mit TMRE als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt (Abb. 2.4 B). Man erkennt ebenfalls eine Abnahme der TMRE-Fluoreszenz mit steigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, das heißt eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Die Messschwankungen waren jedoch stärker

ausgeprägt als bei Rhodamine 123. Zur Durchführung von spontanen Stimulationen mit FCCP war der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamine 123 nicht geeignet, denn Rhodamine 123 zeigte keine spontane Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Salvioli et al., die ebenfalls zeigen, dass Rhodamine 123 nicht für Spontanstimulationen geeignet ist (Salvioli, S. et al., 1997). Nach dem Anfärben mit TMRE führte jedoch die Stimulation mit FCCP zu einem dosisabhängigen Anstieg der TMRE-Fluoreszenzintensität, was gleichbedeutend ist mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 2.4 C). TMRE reagiert bei spontaner Stimulation mit einem charakteristischen Anstieg der Fluoreszenz, wenn mit Substanzen, die das Membranpotential erniedrigen, stimuliert wird (Krohn, A. J. et al., 1999). Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach spontaner Stimulation führt zu einem Austreten des Farbstoffs aus dem Mitochondrium ins Zytosol, was zur Folge hat, dass der Farbstoff weniger abgeschirmt ist und somit eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist.

A



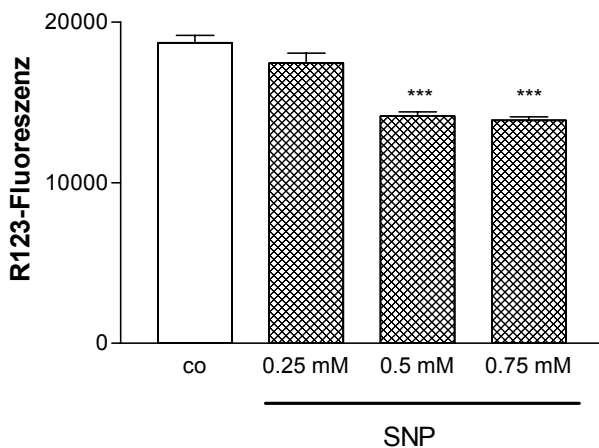


**Abb. 2.4: Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und FCCP auf das mitochondriale Membranpotential.**

**A**, 6 h Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit R123; man erkennt eine konzentrationsabhängige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. **B**, 6 h Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit TMRE; man erkennt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, aber größere Schwankungen. **C**, spontane Stimulation mit FCCP nach 100 Sekunden, Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit TMRE, konzentrationsabhängiger Anstieg der TMRE-Fluoreszenz, was gleichbedeutend ist mit einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (ungepaarter student's t-test, \*\*\*p<0.001, \*p<0.05 versus Kontrolle). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 4 – 6 Experimenten.

In den Vorversuchen zeigte sich, dass Rhodamine 123 besser für Langzeitversuche und TMRE besser für Spontaneffekte geeignet ist. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass TMRE nach Stimulation schneller Membranen überwindet und sich nicht an Strukturen der mitochondrialen Matrix anlagert. Aus diesem Grund wurde

Rhodamine 123 für die Langzeitversuche und Tetramethylrhodamineethylester für Spontaneffekte verwendet. Die Membranpotentialmessung wurde zusätzlich am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter etabliert. Hierzu wurden die PC12-Zellen (200.000 Zellen pro 500 µl Medium pro Well) in einer 24-Well-Platte am Vortag des Versuchs ausgesät. Am Versuchstag wurden die Zellen mit dem jeweiligen Stimulus wie z.B. Wasserstoffperoxid 500 µM für 6 h oder Natriumnitroprussid 500 µM für 24 h inkubiert. 15 min vor Beendigung der Inkubation wurde Rhodamine 123 (0,4 µM) hinzugefügt und auf dem Schüttler Stufe 5 inkubiert. Nach der Inkubation wurden pro Well 500 µl HBSS hinzugefügt und anschließend bei 1500 Umdrehungen für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und erneut 500 µl HBSS hinzugefügt. Nach weiterer Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen für 5 min wurde wieder abgesaugt und danach 500 µl HBSS hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (Einstellung: Rhodamine Bottom). Zur Etablierung der Methode am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter wurde mit verschiedenen Natriumnitroprussid (SNP)-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Man erkennt auch hier eine dosisabhängige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5: Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach SNP-Inkubation.**

PC12 Zellen wurden für 24 h mit SNP inkubiert, anschließend Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit R123; man erkennt einen dosisabhängigen Abfall der R123-Fluoreszenz, was gleichbedeutend ist mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (ungepaarter student's t-test, \*\*\* $p < 0.001$  versus Kontrollzellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

Das Versuchsprotokoll wurde bei der Messung mit Tetramethylrhodamineethylester dahingehend verändert, dass nur ein Waschschrift mit HBSS durchgeführt wurde. Die Messung erfolgte dann ebenfalls am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Einstellung: TMRE Bottom). Nach Aufnahme des Basalwertes wurde mit den verschiedenen Komplexeinhibitoren (Rotenon 2 µM, TTFA 10 µM, Antimycin 2 µM, NaN<sub>3</sub> 10 mM und Oligomycin 10 µM) stimuliert und anschließend über einen Zeitraum von 8 min gemessen. Nach 8 min wurde das Plateau erreicht. Die Delta-Werte wurden durch Subtraktion des Basiswertes vom 8-min-Wert bestimmt.

## 2.7. Bestimmung der ATP-Spiegel

ATP-Spiegel wurden mit Hilfe des ViaLight HT<sup>®</sup> Kits der Firma Cambrex bestimmt. Die Zellen wurden hierzu mit einem Gemisch aus Nukleotid-Releasing-Reagenz und ATP-Monitoring-Reagenz versetzt. Das Nukleotid-Releasing-Reagenz dient der Lyse der Zellen, das ATP-Monitoring-Reagenz dient der Bestimmung der ATP-Spiegel. Das Testprinzip des Kits beruht auf folgender Reaktion (Crouch, S. P. et al., 1993):



**Abb. 2.6: Biolumineszenzreaktion**

Die Intensität des emittierten Lichtes ist hierbei proportional zur ATP-Konzentration (Crouch, S. P. et al., 1993). Die ATP-Konzentration kann mit Hilfe eines ATP-Standards bestimmt werden. Der Biolumineszenzassay stellt ein sehr sensitives Verfahren zur Bestimmung der ATP-Spiegel dar und ist selektiv für ATP.

Die PC12-Zellen wurden in einer Dichte von 20.000 Zellen in 100 µl Medium pro Well in einer weißen 96-Well-Platte am Vortag ausgesät. Am Versuchstag wurde mit einem Stressor wie z.B. Wasserstoffperoxid 100 µM oder Natriumnitroprussid 500 µM inkubiert. Vor dem Ende der Inkubation wurden 200 µl ATP-Monitoring-Reagenz und 9,8 ml Nukleotid-Releasing-Reagenz gemischt und 15 min inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl des Gemisches aus Nukleotid-Releasing-Reagenz und ATP-Monitoring-Reagenz pro Well zu pipettiert. Die Messung erfolgte am Victor<sup>®</sup>

Multilabel Counter mit Hilfe der Biolumineszenzeinstellung. Als ATP-Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit 6 verschiedenen ATP-Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$ ) hergestellt. Je 10  $\mu\text{l}$  dieses Standards wurden in 90  $\mu\text{l}$  Medium pipettiert.

Mit Hilfe einer Standardgerade der verschiedenen ATP-Konzentrationen wurden die Lumineszenzwerte in ATP-Konzentrationen umgerechnet.

Zur Etablierung der Methode wurde eine Zeitreihe mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt (Abb. 2.7). Bei einer Konzentration von 50 bzw. 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kam es zu einem zeit- und dosisabhängigen Abfall der ATP-Spiegel. Der Maximaleffekt war nach 30 min erreicht. Nach längerer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubationsdauer waren die Zellen in der Lage, das Defizit an ATP wieder zu kompensieren.

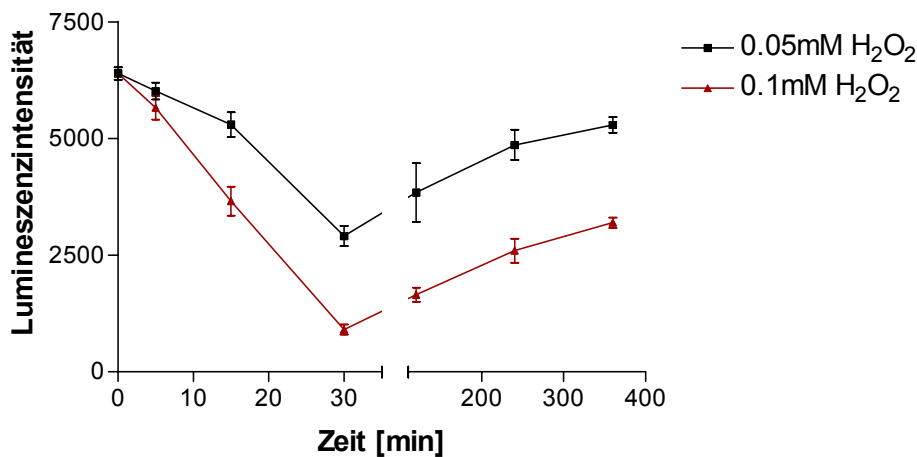


Abb. 2.7: Abnahme der Lumineszenzintensität nach Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 2.8. Inkubation mit Ginkgo-biloba-Extrakt und Piracetam

Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761) und Piracetam wurden auf ihre Fähigkeit, die mitochondriale Funktion zu stabilisieren, untersucht. Hierzu wurden das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach Stimulation mit einem Stressor wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder SNP bei gleichzeitiger Anwesenheit von EGb 761 oder Piracetam bestimmt. EGb 761 wurde in DMSO gelöst, die weiteren Verdünnungen erfolgten in Medium. Piracetam wurde in Wasser gelöst und in Wasser weiterverdünnt. Folgende Inkubationsschemata wurden verwendet:

- 1) eine Stunde Vorinkubation von EGb 761 und Piracetam, danach Zugabe des Stressors ( $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Natriumnitroprussid)
- 2) Vorinkubation mit dem Stressor, 30 min nach Insult Zugabe von EGb 761 oder Piracetam

- 3) Vorinkubation mit dem Stressor, 30 min nach Insult Mediumwechsel, 23 h Inkubation mit EGb 761 oder Piracetam
- 4) 6 h Vorinkubation mit EGb 761 oder Piracetam, anschließend akute Stimulation mit Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette

### **2.9. Isolierung von Mitochondrien**

Die Mitochondrien aus PC12-Zellen wurden mit Hilfe der Digitoninlyse isoliert (Gottlieb, R. A. and Granville, D. J., 2002). Zur Mitochondrienisolierung wurden 5 Mio Zellen pro 10 ml Medium ausgesäht. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und bei 1000 Umdrehungen für 5 min abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde mit 250 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 200 µl Mitochondrienisolationslysepuffer versetzt, resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 800 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei Höchstgeschwindigkeit (20.000 g) erneut für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen.

### **2.10. Protein-Bestimmung nach Lowry**

Der Proteingehalt der erhaltenen mitochondrialen Fraktion wurde mit dem Proteinassay der Firma BioRad bestimmt. Er beruht auf der Bestimmungsmethode nach Lowry. Bei der Lowry-Methode wird ein Kupfer-Proteinkomplex in alkalischer Lösung gebildet, der ein Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) reduziert. Hieraus resultiert eine intensiv blaue Färbung, die photometrisch vermessen wird.

In eine 96-Well-Platte wurden 5 µl der mitochondrialen Fraktion bzw. des Standards (BSA-Lösung) oder 5 µl PBS pipettiert. Anschließend wurden 25 µl Kupfertartratlösung (Reagenz A) und 200 µl des Folin-Ciocalteu-Reagenzes (Reagenz B) zugefügt. Die Platte wurde 15 min geschüttelt und anschließend die Absorption bei 620 nm vermessen. Die Werte der mitochondrialen Fraktion wurden mit Hilfe der Standardgerade (0,05 mg/ml bis 0,5 mg/ml BSA) in Proteinkonzentrationen umgerechnet.



### 2.11. Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität

Die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität wurde mit Hilfe des Cytochrom-C-Oxidase-Assay-Kits der Firma Sigma bestimmt (Rasmussen, U. F. and Rasmussen, H. N., 2000). Die Absorption von Cytochrom C bei einer Wellenlänge von 550 nm ändert sich mit dem Oxidationsstatus. Diese Erkenntnis wird im Cytochrom-C-Oxidase-Kit als Messprinzip verwendet. Cytochrom C wird durch Natriumhydrosulfit reduziert zu Ferrocycytochrom C und anschließend reoxidiert durch die Cytochrom-C-Oxidase zu Ferricytochrom C. Die Oxidation von Ferrocycytochrom C durch die Cytochrom-C-Oxidase ist eine biphasische Reaktion mit einem schnellen Anstieg der Aktivität gefolgt von einer langsamen Reaktionsrate. Die schnelle Reaktion läuft innerhalb von 45 Sekunden ab.

Die mitochondrialen Fraktionen wurden mit PBS auf einen Proteingehalt von 80 µg Protein eingestellt. An jedem Messtag wurden die Natriumhydrosulfitlösung und die Ferrocycytochrom-C-Substrat-Lösung frisch hergestellt. Zur Herstellung der Ferrocycytochrom-C-Lösung wurde Cytochrom C in Wasser gelöst und anschließend Natriumhydrosulfitlösung hinzupipettiert (12,4 bis 25 µl), um das Cytochrom C zu reduzieren. Die Farbe der Lösung veränderte sich hierbei von dunkelrot nach hellrot. Das Verhältnis der Absorptionen von  $A_{550\text{ nm}}$  und  $A_{565\text{ nm}}$  einer 1:20-Verdünnung in Assay-Buffer sollte zwischen 10 und 20 liegen. Als Positivkontrolle diente reine Cytochrom-C-Oxidase.

Folgendes Reaktionsschema wurde durchgeführt:

Probe	Assay-Buffer	Enzyme-Dilution-Buffer	Probenvolumen	Cytochrom-C-Lösung
Leerwert	950 µl	100 µl	---	50 µl
Probe	950 µl	(100-x) µl	x µl	50 µl
Positivkontrolle	950 µl	60 µl	40 µl	50 µl

Assay-Buffer wurde jeweils in einer Küvette vorgelegt, anschließend die Probe bzw. die Cytochrom-C-Positivkontrolle zupipettiert und gemischt. Anschließend wurde der Enzyme-Dilution-Buffer hinzugefügt und gemischt. Die Küvette wurde ins Photometer gestellt, Cytochrom-C-Lösung zupipettiert und die Messung bei 550 nm bei Raumtemperatur gestartet. Die Messdauer betrug 60 Sekunden. Die Positivkontrolle oder die mitochondriale Fraktion führten zu einem Abfall der Absorption bei 550 nm.

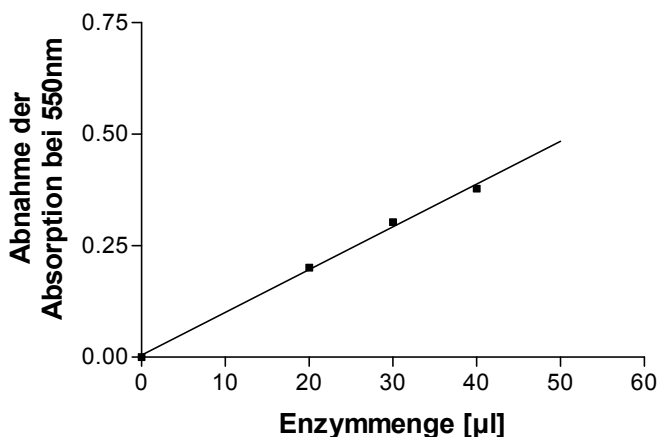
Die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$U/ml = \frac{(\Delta A/min_{Probe} - \Delta A/min_{Leerwert}) \times dil \times 1.1}{(\text{Volumen des Enzyms}) \times 21.84}$$

**Abb. 2.8: Formel zur Berechnung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität**

( $\Delta A$ : Abnahme der Absorption bei 550 nm, dil: Verdünnung, 21.84: Differenz der Extinktionskoeffizienten zwischen reduziertem und oxidiertem Cytochrom c bei 550 nm)

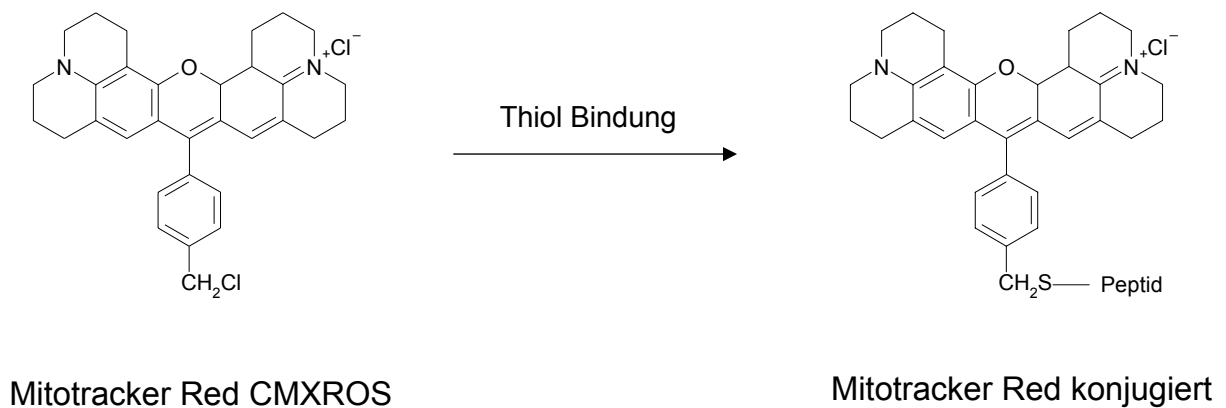
Zur Etablierung der Methode wurde der Assay mit verschiedenen Konzentrationen der Cytochrom-C-Oxidase-Positivkontrolle durchgeführt und der Abfall der Absorption bei 550 nm beobachtet. Es kam zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der Absorption bei 550 nm (Abb. 2.9).



**Abb. 2.9: Abnahme der Absorption bei 550 nm in Abhängigkeit von der zugefügten Enzymmenge.**

## 2.12. Bestimmung der Anzahl der Mitochondrien mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers

Die Anzahl der Mitochondrien wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Mitotracker Red CMXRos bestimmt. Mitotracker Red CMXRos lagert sich unabhängig vom mitochondrialen Membranpotential selektiv in die Mitochondrien ein. Der Farbstoff enthält eine thiol-reaktive Chloromethylgruppe (Abb. 2. 10). Diese Gruppe ist in der Lage, mit Thiolgruppen von mitochondrialen Proteinen zu reagieren.

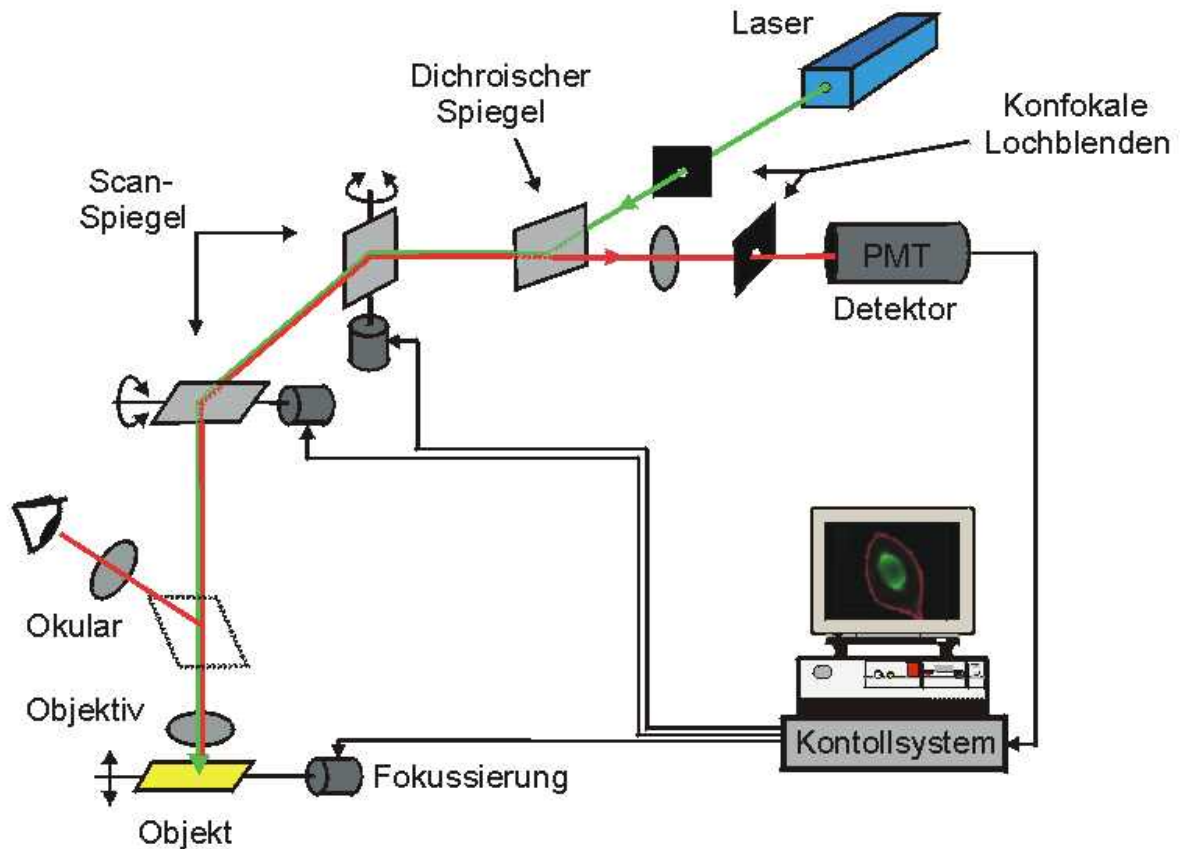


**Abb. 2. 10: Strukturformel von Mitotracker Red und Bindung in der Zelle**

Zur Bestimmung der Mitochondrienanzahl wurden 2,5 Millionen Zellen in einer Petrischale ausgesät. Am folgenden Tag wurde mit Mitotracker Red 100 nM bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Abspülen der Petrischale geerntet, in ein Falcon überführt und 5 min bei 1000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1000 µl HBSS resuspendiert. Danach wurden weitere 3 ml HBSS hinzugefügt und wiederum bei 1000 Umdrehungen abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1000 µl HBSS resuspendiert und die Fluoreszenzintensität am Fluoreszenzspektrometer bei einer Exzitationswellenlänge von 579 nm und einer Emissionswellenlänge von 599 nm bestimmt. Je höher das Fluoreszenzsignal, desto größer ist die Anzahl der Mitochondrien.

### 2.13. Konfokale Laserscanmikroskopie

Die Verwendung des konfokalen Laserscanmikroskops bietet die Möglichkeit, dreidimensionale Bilder aufzunehmen (Pawley 1995), was eine Aussage über die intrazelluläre Architektur erlaubt. Die Kombination aus Argon-Krypton-Laser und den vorhandenen Filtern erlaubt die Anregung bei drei diskreten Wellenlängen (488 nm, 568 nm und 647 nm).



**Abb. 2.11: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie**

Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop zunächst nur einen Bildpunkt, der genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektes darstellt. Um ein vollständiges Bild des Objektes zu erhalten, muss das Objekt Punkt für Punkt gescannt werden. Zum Scannen des Objektes muss der Anregungsstrahl (grün) nacheinander auf viele Punkte des Objektes gelenkt werden (Abb. 2.11). Laserlicht ist hierfür besonders geeignet, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. Zum Scannen werden zwei Scanspiegel benötigt: einer für die Punkte einer Zeile (X-Richtung) und einer für die Zeilen eines Bildes (Y-Richtung). Das Fluoreszenzlicht (rot) wird ebenfalls über diese Spiegel zum Detektor geleitet. Der Rechner rekonstruiert aus der gemessenen Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Punktes ein Bild des Objektes. Das Objekt kann darüber hinaus auch in Richtung des Strahlenganges (Z-Richtung) bewegt werden. Dadurch können mehrere Schichten des Objektes gescannt werden und somit vom Rechner ein dreidimensionales Bild erzeugt werden.

Am Tag vor der Messung wurden 100.000 Zellen/300 µl Medium in Polylysin-beschichteten Chamber Slides ausgesät. Am Messtag wurden folgende Färbungen vorgenommen:

### 1) Anfärbung mit Mitotracker Red (100 nM) oder Rhodamine 123 (1 µM)

Hierzu wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit Mitotracker Red oder 15 min bei RT mit Rhodamine 123 inkubiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 2 % Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Zellen mit Mowiol, das 2,5 % DABCO enthielt, eingedeckelt. Bei der Doppelfärbung mit Rhodamine 123 und Mitotracker Red wurde zuerst mit Rhodamine 123 für 15 min inkubiert, 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit Mitotracker Red für 30 min inkubiert und wiederum 3x mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte genauso wie bei der Einzelfärbung.

### 2) Antikörperfärbung mit anti-APP/ bzw. anti-ATP-Synthase-β-Antikörper

Die Zellen wurden nach Fixierung mit 2 % Paraformaldehyd (15 min bei RT) mit 1 % Triton / PBS (15 min) permeabilisiert. Die Blockierung erfolgte mit 5 % BSA/PBS für 20 min. Die Inkubation des ersten Primärantikörpers (anti-APP-AK) und des zweiten Primärantikörpers (anti-ATP-Synthase-β-Antikörper) erfolgte gleichzeitig über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS der erste Sekundärantikörper hinzugefügt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Gleich im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und die Zellen mit Mowiol, das 2,5 % DABCO enthielt, eingedeckelt.

Nachdem die Zellen in Mowiol eingedeckelt waren, wurden sie mit dem Laserscanmikroskop (CLSM; Firma Leica Lasertechnik, Heidelberg) vermessen. Es wurde das 100fache Ölinversionsobjektiv verwendet. Die gespeicherten Informationen wurden mit Hilfe der Imaris- und Selima-Software bearbeitet.

## 2.14. Caspase-9-Assay

Der Caspase-9-Assay beruht auf dem Prinzip der Kolorimetrie. Die Spaltung von Ac-LEHD-pNA durch Caspase 9 zu p-Nitroanilin kann kolorimetrisch bei 405 nm über 30 min am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter vermessen werden. Ein Anstieg der Absorption bei 405 nm stellt ein Maß für die Caspase-9-Aktivität dar.

5 Mio Zellen pro Petrischale wurden am Tag vor der Messung ausgesät. Zur Etablierung der Methode wurden die PC12-Zellen für 2, 4, und 6 h mit SNP 0,5 mM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgelöst, in ein Falcon überführt und bei 1000 Umdrehungen für 5 min abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem PBS gewaschen und erneut bei 1000 Umdrehungen 5 min zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte auf Eis die 30-minütige Lyse in 100 µl Lysepuffer (10 mM HEPES, 0.1 % Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Leupeptin, 0.1 % CHAPS, pH 7.4). Das Lysat wurde anschließend bei 20.000 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgetrennt und bei -20 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der Caspase-9-Aktivität wurde folgendes Reaktionsschema verwendet:

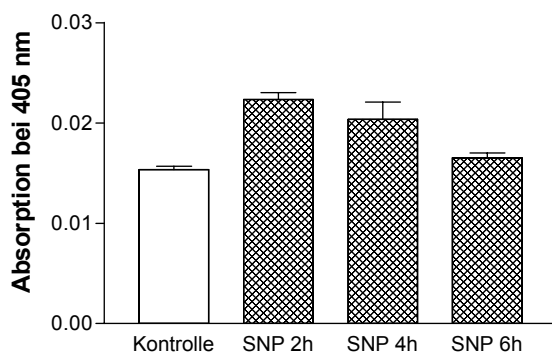
Negativkontrolle: 90 µl Assaypuffer + 10 µl Caspase-9-Substrat

Positivkontrolle: 100 µl einer 50 µM p-Nitroanilin-Lösung in Assaypuffer

Proben: 80 µl Assaypuffer + 10 µl Zellextrakt + 10 µl Caspase-9-Substrat

Der Assaypuffer setzt sich wie folgt zusammen: NaCl 100 mM, HEPES 50 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, Glycerol 10 %, CHAPS 0.1 %.

Die Mischung aus Assaypuffer und Zellextrakt wurde 10 min stehen gelassen, anschließend wurden 10 µl Caspase-9-Substrat hinzugefügt und die Messung am Victor<sup>®</sup> Multilabel Counter bei 405 nm gestartet. Die Messung wurde über einen Zeitraum von 30 min durchgeführt.



**Abb. 2.12: Zunahme der Absorption bei 405 nm nach SNP-Inkubation.**

Bei einer 2-stündigen Natriumnitroprussidinkubation war die Caspase-9-Aktivität maximal (Abb. 2.12). Celio Marques konnte bei einer 2-stündigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation ebenfalls eine maximale Aktivierung der Caspase 9 beobachten (Marques, C. A. et al., 2003).

Zur Untersuchung der Effekte von EGb 761 und Piracetam auf die Caspase-9-Aktivität wurde mit EGb 761 bzw. Piracetam für 24 h inkubiert. 2 Stunden vor dem Ende der Inkubation wurde mit Natriumnitroprussid stimuliert und anschließend die Caspase-9-Aktivität bestimmt.

Die Berechnung der Caspase-9-Aktivität erfolgte mit folgender Formel:

Caspase-9-Aktivität (pmol/min) = Steigung (pro min) x Konversionsfaktor x Assay-Volumen (100 µl)

Konversionsfaktor = 50 µM / Mittelwert der Absorption von p-Nitroanilin (50 µM)

### 2.15. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der Prism 3<sup>®</sup>-Software der Firma GraphPad. Angegebene Messwerte sind Mittelwerte mit Standardfehler vom Mittelwert ( $\pm$  S.E.M.). Zur Prüfung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen zwei Messgruppen wurde ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit nur einer Messvariablen wurde eine einseitige (*one-way*) ANOVA (Varianzanalyse) mit anschließendem Tukey's posthoc Test durchgeführt oder eine Repeated Measures ANOVA. Bei zwei veränderlichen Messvariablen wurde eine zweiseitige (*two-way*) ANOVA gerechnet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Charakterisierung der Zellmodelle**

#### **3.1.1. A $\beta$ -Spiegel der APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen**

In dieser Arbeit wurden APP-transfizierte PC12- und HEK-Zellen verwendet. Die schwedische Doppelmutation im APP-Gen führt in PC12-Zellen (0,2 nmol/l) und in HEK-Zellen (5,42 nmol/l) zu einer erhöhten A $\beta$ -Sekretion im Vergleich zu APPwt-PC12- und APPwt-HEK-Zellen (Bonert, A. et al., 2004) (Tabelle 1). APPsw-PC12-Zellen produzieren niedrige A $\beta$ -Spiegel, die jenen bei Patienten mit sporadischer AD entsprechen. Die APP-Expression ist jedoch in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen gleich stark ausgeprägt (Eckert, A. et al., 2001b) und ist im Vergleich zur endogenen APP-Expression in Kontroll-PC12-Zellen zweifach erhöht. APPsw-HEK-Zellen weisen 20fach erhöhte A $\beta$ -Spiegel auf, was vergleichbar ist mit A $\beta$ -Spiegeln von Patienten mit familiärer AD und was gleichzeitig die stärkeren Effekte in einigen Versuchen erklärt. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass der Sekretionsweg von A $\beta$  in APPsw-HEK-Zellen stärker ausgeprägt ist als in PC12-Zellen. Die endogene humane APP-Expression ist in Kontroll-HEK-Zellen zweifach erhöht im Vergleich zu APPsw-PC12-Zellen. Darüber hinaus haben sowohl APPwt- als auch APPsw-HEK-Zellen eine 3fach erhöhte APP-Expression im Vergleich zu Kontroll-HEK-Zellen und eine 6fach erhöhte APP-Expression im Vergleich zu APPsw-PC12-Zellen (Bonert et al., 2004). Der Vergleich der beiden Zelllinien erlaubt es deshalb, dosisabhängige Effekte von A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen.



Zelltyp	A $\beta$ -Sekretion in pg/ml Medium		
	<i>co</i>	<i>APPwt</i>	<i>APPsw</i>
PC12-Zellen	3.67 $\pm$ 1.52	17.33 $\pm$ 3.18 ***	97.33 $\pm$ 9.56 *** ++
HEK-Zellen	35.47 $\pm$ 1.16	259.1 $\pm$ 7.91 ***	2598 $\pm$ 26.29 *** +++

One way ANOVA, posthoc Tukeys Multiple Comparison Test, \*\*\*p<0.001 vs. Kontrollzellen, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01 vs. APPwt Zellen. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 3 – 4 Experimenten dar.

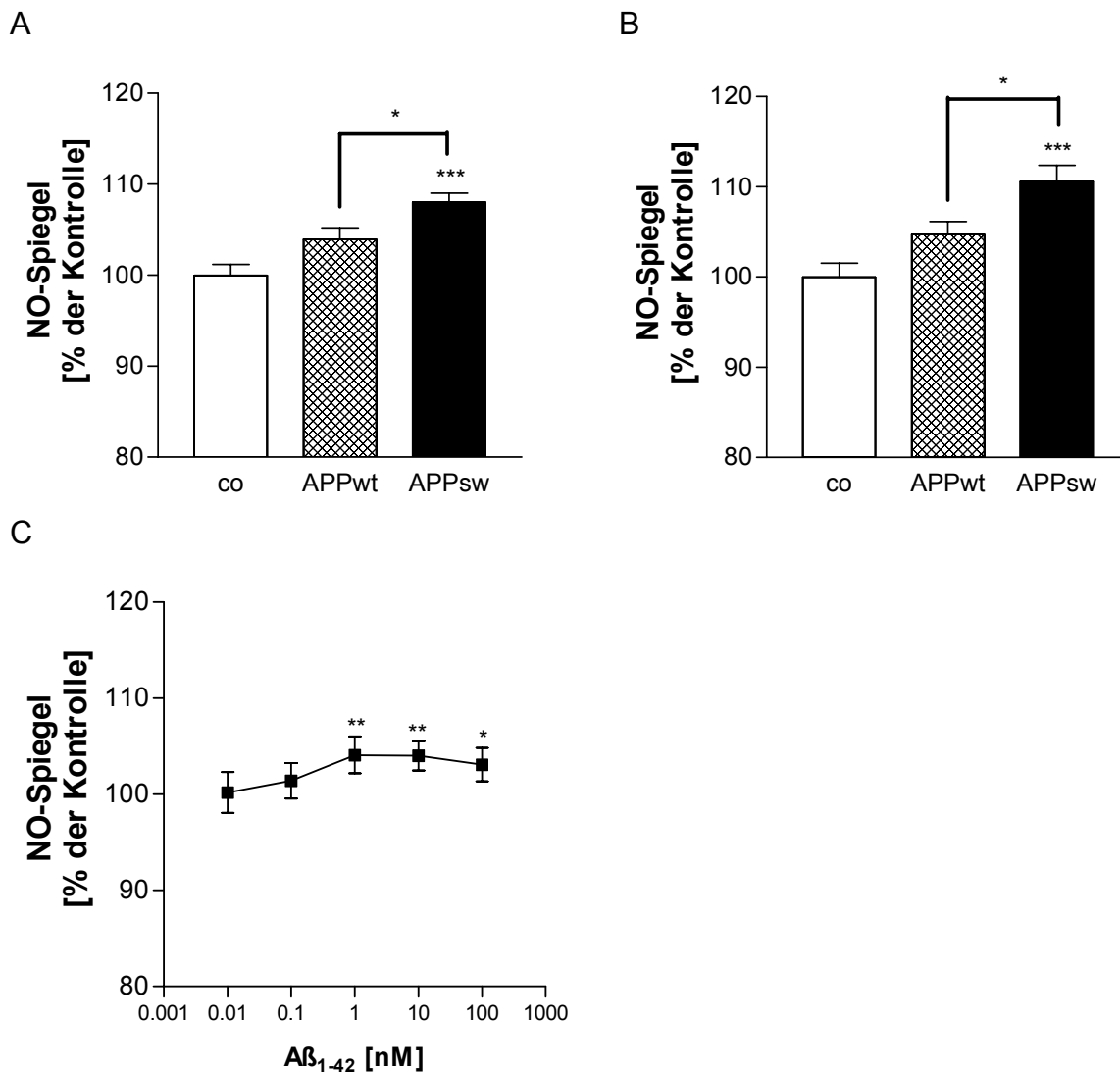
**Tabelle 1: A $\beta$ -Sekretion von PC12-Zellen und HEK-Zellen in pg/ml Medium**

### 3.2. Amyloid beta erhöht die NO-Produktion und führt zu mitochondrialer Fehlfunktion bei Alzheimer-Demenz

#### 3.2.1. Erhöhte NO-Spiegel in APPsw-PC12- und APPsw-HEK-Zellen

Die Bildung von NO scheint in der Pathogenese der AD eine entscheidende Rolle zu spielen (Law, A. et al., 2001b). Aus diesem Grund wurden die intrazellulären NO-Spiegel in APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA bestimmt. Beide Zelllinien weisen erhöhte NO-Spiegel in folgender Reihenfolge auf: *co* < *APPwt* < *APPsw* (Abb. 3.1 A, B). Die Erhöhung der NO-Spiegel ist bei beiden Zelllinien gleichermaßen ausgeprägt. Sie beträgt ca. 10 % zwischen Kontrollzellen und *APPsw*-Zellen. Betrachtet man allerdings die absoluten DAF-2DA-Werte, so fällt auf, dass *APPsw*-HEK-Zellen höhere NO-Werte aufweisen als *APPsw*-PC12-Zellen. Um den Effekt von extrazellulärem A $\beta$  auf die NO-Spiegel zu untersuchen, wurden darüber hinaus untransfizierte PC12-Zellen mit extrazellulärem A $\beta_{1-42}$  über einen Zeitraum von 24 h behandelt und anschließend die intrazellulären NO-Spiegel bestimmt. Nach A $\beta_{1-42}$ -Stimulation findet man ebenfalls einen Anstieg der NO-Spiegel um 5 % mit einem

Maximaleffekt bei 1 nM A $\beta$  (Abb. 3.1 C). Der NO-Anstieg ist jedoch weniger stark ausgeprägt als durch die APPsw-Transfektion.



**Abb. 3.1: Intrazelluläre NO-Spiegel von APP-transfizierten PC12-Zellen und HEK-Zellen sowie NO-Spiegel nach extrazellulärer A $\beta$ -Behandlung.**

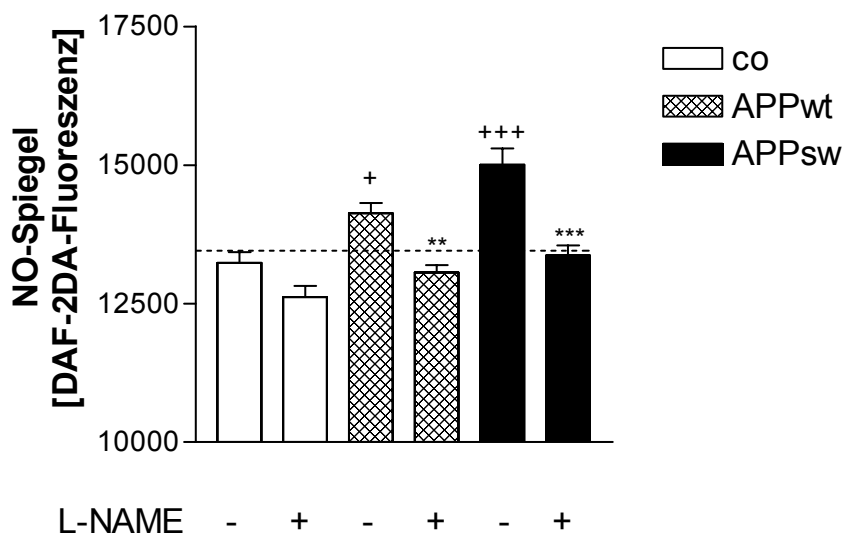
**A:** APPsw-PC12-Zellen weisen signifikant erhöhte basale NO-Spiegel auf (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$  versus Kontroll-PC12-Zellen, \* $p < 0.05$  versus APPwt-PC12-Zellen). **B:** basale NO Spiegel sind in APPsw-HEK-Zellen erhöht im Vergleich zu Kontroll-HEK-Zellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$  versus Kontroll-HEK-Zellen, \* $p < 0.05$  versus APPwt-HEK-Zellen). **C:** Anstieg der NO Spiegel nach extrazellulärer A $\beta$ -Behandlung (ANOVA, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus unbehandelte PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 12 Experimenten.

### 3.2.2. Erhöhte NO-Synthase-Aktivität in APPsw-PC12-Zellen

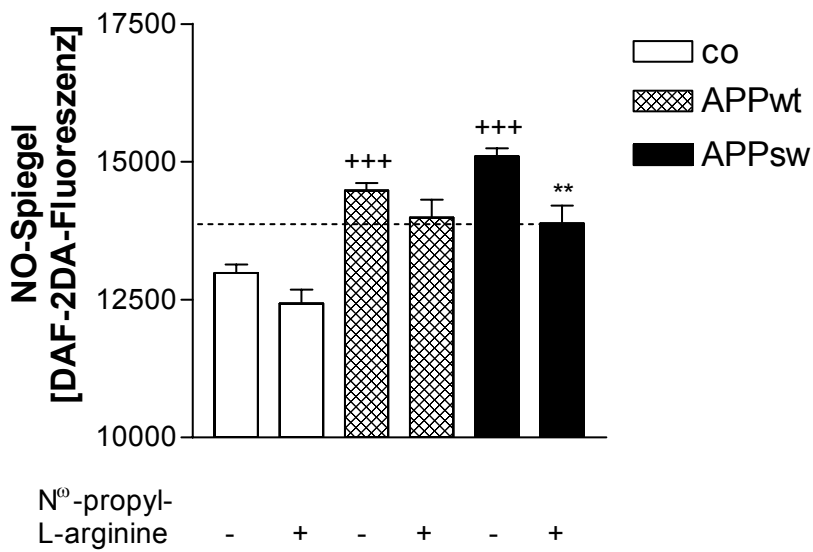
Um zu überprüfen, ob die erhöhten NO-Spiegel in den APPsw-PC12-Zellen hervorgerufen werden durch eine erhöhte NO-Synthase-Aktivität, wurden

Kontrollzellen, APPwt-PC12-Zellen und APPsw-PC12-Zellen mit dem unselektiven NO-Synthase-Hemmstoff L-NAME für 48 h inkubiert. Der unselektive NO-Synthase-Hemmstoff L-NAME ist in der Lage, die NO-Spiegel der APPsw-PC12-Zellen auf die Level der Kontrollzellen zu senken, was eine erhöhte NO-Synthase-Aktivität in diesen Zellen impliziert (Abb. 3.2 A). Um zu untersuchen welche NO-Synthase-Isoform am A $\beta$ -bedingten NO-Anstieg beteiligt ist, wurden die Zellen außerdem mit dem selektiven iNOS-Hemmstoff 1400W und dem selektiven nNOS-Hemmstoff N<sup>w</sup>-propyl-L-arginine inkubiert. Der Abfall der NO-Spiegel in APPsw-PC12-Zellen nach Stimulation mit dem nNOS-Inhibitor N<sup>w</sup>-propyl-L-arginine beträgt ca. 9,4 % verglichen mit 4,2 % in den Kontrollzellen und 3,7 % in APPwt-Zellen (Abb. 3.2 B). Nach Inkubation mit dem iNOS-Hemmstoff 1400W beträgt die Reduktion der NO-Spiegel ca. 13,7 % in APPsw-PC12-Zellen verglichen mit 3,3 % in Kontrollzellen und 4,6 % in APPwt-Zellen (Abb. 3.2 C). Es scheinen dementsprechend beide Isoformen am A $\beta$ -induzierten NO-Anstieg beteiligt zu sein. Die Beteiligung der eNOS kann nicht ausgeschlossen werden. Zur Zeit sind jedoch keine selektiven eNOS-Inhibitoren erhältlich.

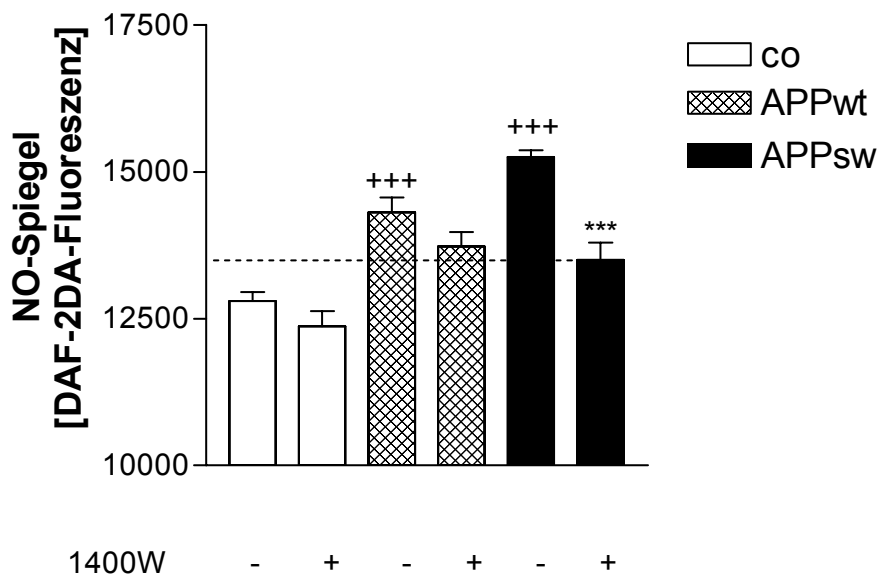
A



B



C



**Abb. 3.2: Bestimmung der NOS-Aktivität in APP-transfizierten PC12-Zellen.**

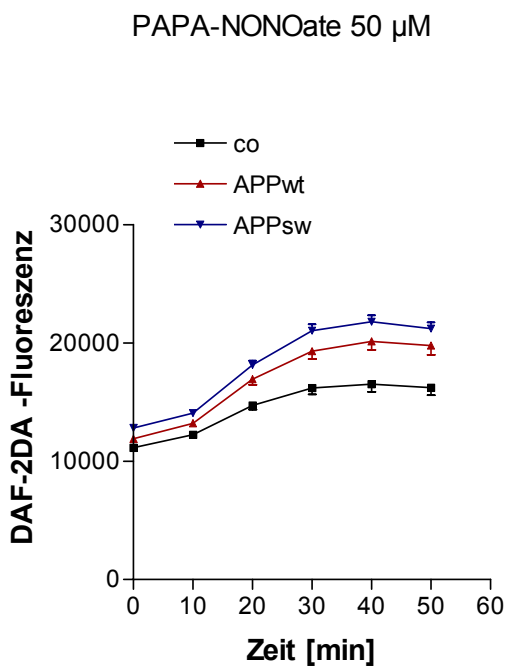
Die NOS-Aktivität ist in APPsw-PC12-Zellen erhöht. Die NO-Spiegel der APP-transfizierten Zellen wurden nach 48 h Inkubation mit und ohne NO-Synthase-Hemmstoffe (**A**: L-NAME, **B**: N<sup>o</sup>Propyl-L-arginine, **C**: 1400W) gemessen (ANOVA,  $+++p < 0.001$ ,  $+p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen,  $+++p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$  versus unbehandelte APPwt- and APPsw-PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 14 Experimenten.

### 3.2.3. Erniedrigte NO-Toleranz in APPsw-PC12-Zellen

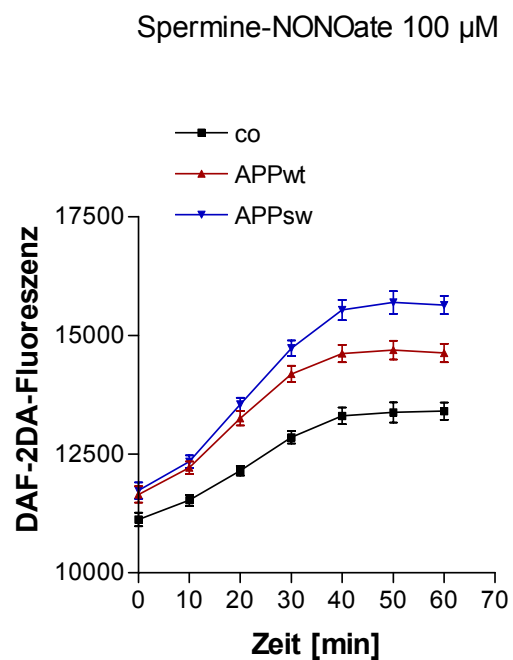
Um zu untersuchen, welchen Einfluss externes NO auf die erhöhten NO-Spiegel der APPsw-PC12-Zellen ausübt, wurden die APP-transfizierten Zellen mit 2

verschiedenen NO-Donatoren versetzt. Papa-NONOate setzt NO schnell frei (Halbwertszeit bei 37 °C: 13 min), wohingegen Spermine-NONOate einen langsam freisetzenden NO-Donator darstellt (Halbwertszeit bei 37 °C: 37 min). Es zeigte sich folgendes Bild: APPsw-PC12-Zellen reagieren bei niedrigen Konzentrationen der NO-Donatoren mit einer stärkeren Zunahme der NO-Spiegel im Vergleich zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen (Abb. 3.3). Bei höheren Konzentrationen sind jedoch keine Unterschiede mehr zwischen APPwt- und APPsw-PC12-Zellen erkennbar.

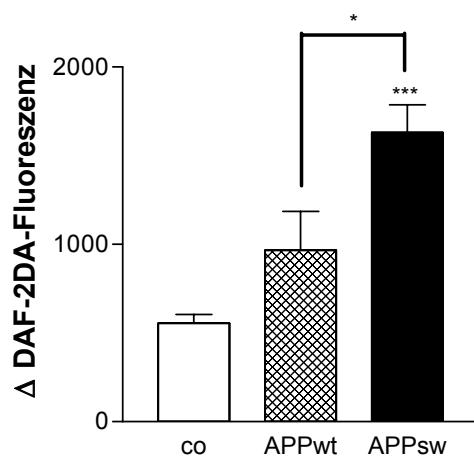
A



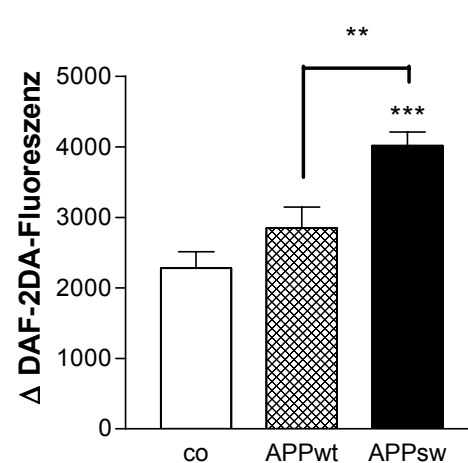
B

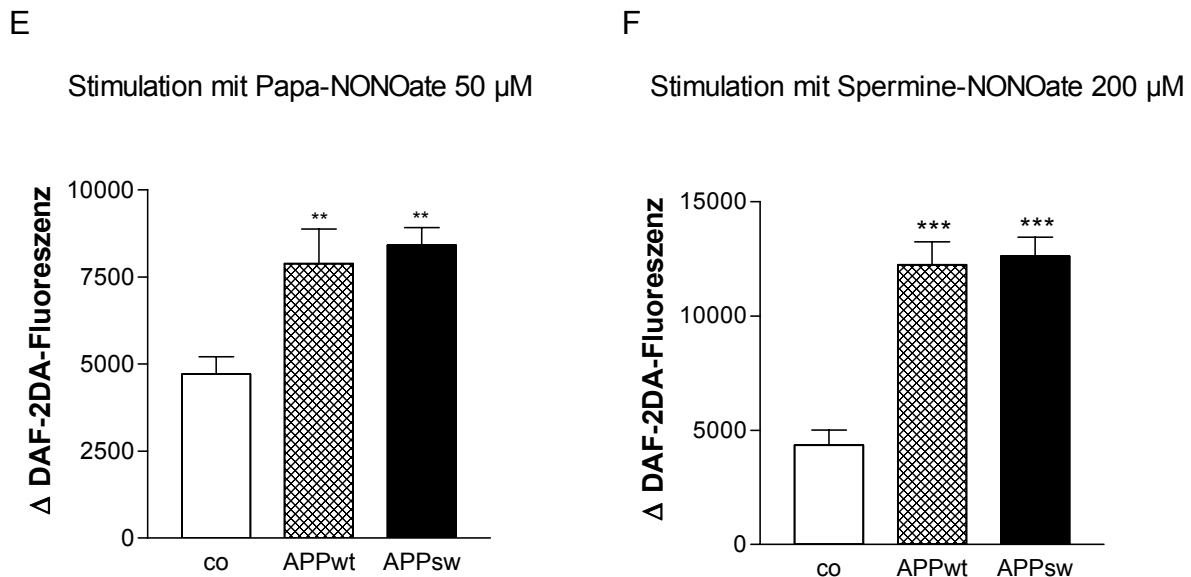


C

Stimulation mit Papa-NONOate 10  $\mu$ M

D

Stimulation mit Spermine-NONOate 100  $\mu$ M



**Abb. 3.3: NO-Spiegel der APP-transfizierten Zellen nach Stimulation mit NO-Donoren.**

**A:** beispielhafter Verlauf des NO-Anstiegs nach Stimulation mit Papa-NONOate 50  $\mu\text{M}$ . **B:** beispielhafter Verlauf des NO-Anstiegs nach Stimulation mit Spermine-NONOate 100  $\mu\text{M}$ . **C:** APPsw-PC12-Zellen zeigen einen stärkeren NO-Anstieg nach Stimulation mit Papa-NONOate 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen. **D:** das gleiche Bild zeigt sich nach Stimulation mit Spermine-NONOate 100  $\mu\text{M}$ . **E:** nach Stimulation mit Papa-NONOate 50  $\mu\text{M}$  reagieren sowohl APPwt- als auch APPsw-PC12-Zellen mit einem verstärkten NO-Anstieg. **F:** nach Stimulation mit Spermine-NONOate 200  $\mu\text{M}$  zeigt sich das gleiche Bild wie bei **E** (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus APPwt- oder Kontroll-PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 8 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der DAF-2DA-Fluoreszenz nach Stimulation.

### 3.2.4. A $\beta$ verändert das mitochondriale Membranpotential

Mitochondrien stellen einen sehr wichtigen Regulator während des Apoptoseprozesses dar (Newmeyer, D. D. and Ferguson-Miller, S., 2003). Aus diesem Grund wurde der Effekt der APPsw-Mutation und von extrazellulärem A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion in PC12-Zellen und HEK-Zellen untersucht.

Einen wichtigen Marker für die mitochondriale Funktion stellt das mitochondriale Membranpotential dar. A $\beta$  zeigt je nach Dosis und akuter bzw. chronischer Gabe unterschiedliche Effekte auf das mitochondriale Membranpotential. APPsw-PC12-Zellen weisen im Vergleich zu Kontrollzellen und APPwt-PC12-Zellen eine Hyperpolarisation auf (Abb. 3.4 A). Wohingegen APPsw-HEK-Zellen, die 20fach erhöhte A $\beta$ -Spiegel aufweisen, ein signifikant erniedrigtes Membranpotential zeigen (Abb. 3.4 B). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den Apoptosedaten (Marques, C. A. et al., 2003), bei denen APPsw-HEK-Zellen im Gegensatz zu

APPsw-PC12-Zellen basal eine erhöhte Apoptoserate zeigten. Die Behandlung von untransfizierten PC12-Zellen mit extrazellulärem A $\beta$  führt ebenfalls zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials ( $\psi_m$ ) (Abb. 3.4 C). Allerdings ist dieser Abfall schwächer ausgeprägt als in den APPsw-HEK-Zellen. Dieser Befund weist wiederum daraufhin, dass intrazelluläre A $\beta$ -Effekte und Effekte von APP-Prozessierungsprodukten am Abfall des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt sind. Man kann daher davon ausgehen, dass man auf der einen Seite zwischen akuten und chronischen A $\beta$ -Effekten unterscheiden muss und auf der anderen Seite zwischen Effekten von niedrigen und höheren A $\beta$ -Konzentrationen.

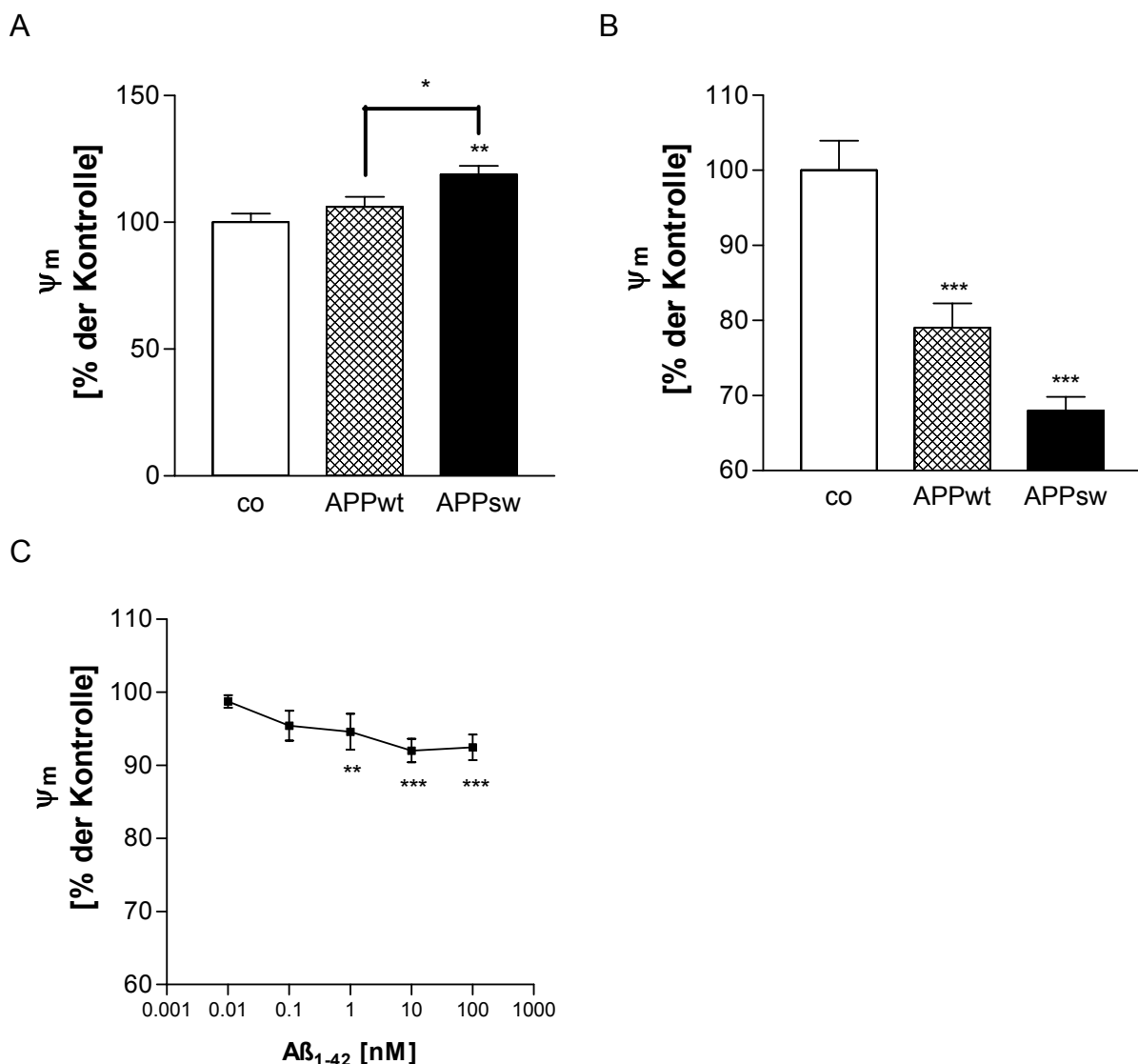
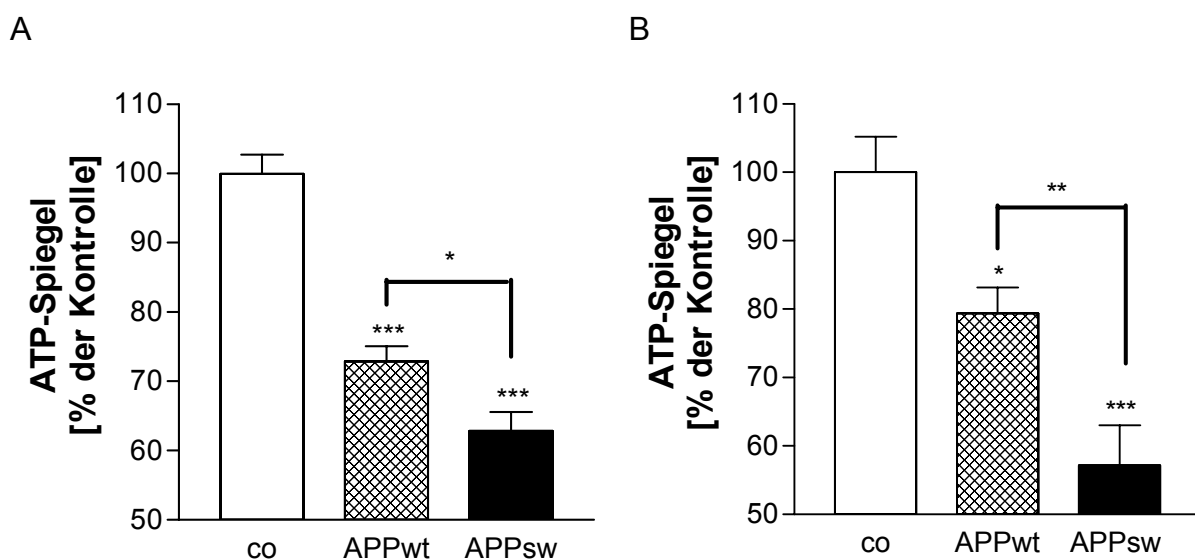


Abb. 3.4: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\psi_m$ ) in APP-transfizierten PC12-Zellen, APP-transfizierten HEK-Zellen und in untransfizierten PC12 Zellen, die mit extrazellulärem A $\beta$  behandelt wurden.

**A:** Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in APPsw-PC12-Zellen (ANOVA, \*\* $p < 0.01$  versus Kontroll-PC12-Zellen, \* $p < 0.05$  versus APPwt-PC12-Zellen). **B:** Das mitochondriale Membranpotential ist signifikant reduziert in APPwt-HEK-Zellen und APPsw-HEK-Zellen verglichen mit Kontroll-HEK-Zellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$  versus Kontroll-HEK-Zellen). **C:** Behandlung mit extrazellulärem A $\beta$  führt zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in untransfizierten PC12-Zellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  versus unbehandelte PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 15 Experimenten.

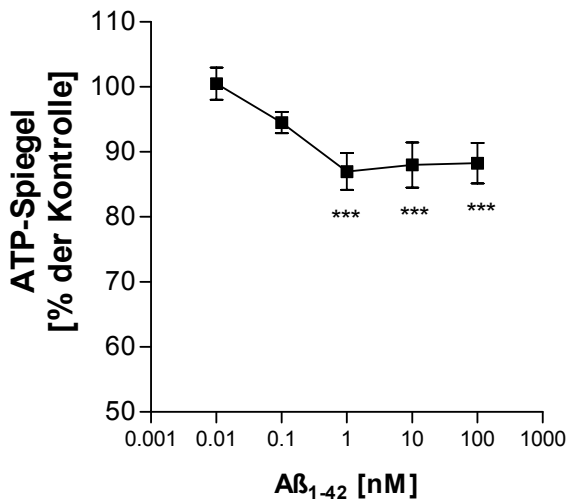
### 3.2.5. Erniedrigte ATP-Spiegel in APPsw PC12- und APPsw-HEK-Zellen

Mitochondrien sind die wichtigste Quelle für die ATP-Bildung. Sowohl die APPsw-PC12-Zellen als auch die APPwt-PC12-Zellen weisen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen erniedrigte ATP-Spiegel auf (Abb. 3.5 A). APP-transfizierte HEK-Zellen weisen ebenfalls erniedrigte ATP-Spiegel in der folgenden Reihenfolge auf: APPsw < APPwt < Kontrollzellen (Abb. 3.5 B). Der Abfall der ATP-Spiegel in den APPsw-HEK-Zellen ist stärker ausgeprägt als in den APPsw-PC12-Zellen (Marques C.A. et al., 2004). Diese Befunde weisen auf dosisabhängige Effekte von A $\beta$  auf die ATP-Spiegel hin. Zusätzlich sind die absoluten ATP-Werte in den APPsw-HEK-Zellen geringer als in den APPsw-PC12-Zellen. Die extrazelluläre Behandlung von untransfizierten PC12-Zellen mit A $\beta_{1-42}$  führte ebenfalls zu einer Abnahme der ATP-Spiegel (Abb. 3.5 C). Genauso wie bei der Bestimmung der NO-Spiegel lag der Maximaleffekt bei 1 nM und war schwächer ausgeprägt als bei den APPsw-PC12-Zellen (37 % versus 13 %).





C



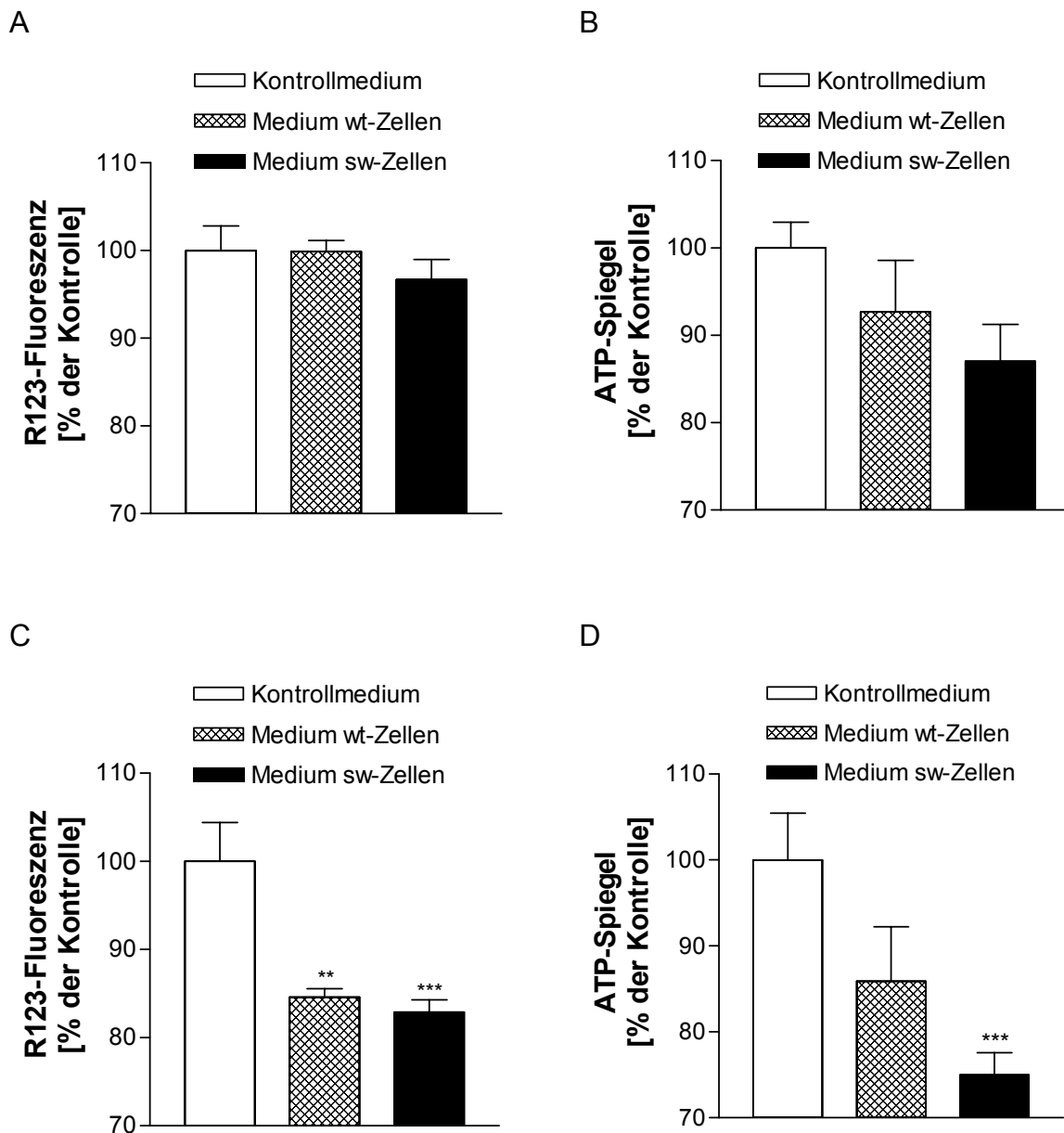
**Abb. 3.5: Bestimmung der ATP-Spiegel in APP-transfizierten PC12-, APP-transfizierten HEK-Zellen und in untransfizierten PC12-Zellen, die extrazellulär mit Aβ behandelt wurden.**

**A:** Abfall der ATP-Spiegel in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$  versus Kontroll-PC12-Zellen, \* $p < 0.05$  versus APPwt-Zellen). **B:** ATP-Spiegel von APPwt- and APPsw-HEK-Zellen sind signifikant erniedrigt (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  versus Kontroll-HEK-Zellen, \*\* $p < 0.01$  versus APPwt-HEK-Zellen). **C:** extrazelluläre Aβ-Behandlung führt zu einer Reduktion der ATP-Spiegel (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$  versus unbehandelte PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 9 –18 Experimenten.

### 3.2.6. Behandlung von Kontroll-PC12-Zellen mit konditioniertem Medium von Kontroll-PC12-Zellen, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen

Um zu überprüfen, ob sezerniertes Aβ von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen ebenfalls toxische Effekte auf Mitochondrien ausübt, wurde über 24 h hinweg Medium von Kontrollzellen, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen gesammelt und anschließend Kontrollzellen für 24 bzw. 48 h mit diesem Medium inkubiert. Im Anschluss daran wurden das mitochondriale Membranpotential bzw. die ATP-Spiegel bestimmt. Interessanterweise ist auch nach Inkubation mit konditioniertem Medium eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel erkennbar (Abb. 3.6). Nach 24 h findet man lediglich leichte Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel (Abb. 3.6 A, B). Nach 48 h sind Effekte sowohl unter APPwt- als auch bei APPsw-Medium zu beobachten, wobei die Effekte unter APPsw-Medium stärker ausgeprägt sind (Abb. 3.6 C, D), was ebenfalls auf dosisabhängige Effekte von Aβ hinweist. Auffällig ist allerdings auch hier, dass die Reduktion der ATP-Spiegel in APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt

ist als in Kontroll-PC12-Zellen, die mit konditioniertem Medium von APPsw-PC12-Zellen behandelt wurden, was auf intrazelluläre A $\beta$ -Effekte schließen lässt.



**Abb. 3.6: Effekte von konditioniertem Medium von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen auf die mitochondriale Funktion.**

**A:** Das mitochondriale Membranpotential ist nach 24-stündiger Inkubation mit APPsw-Medium leicht erniedrigt. **B:** Man findet eine leichte ATP-Reduktion nach 24 h. **C:** Nach 48 h ist eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials unter APPwt- und APPsw-Medium erkennbar. **D:** Deutliche ATP-Reduktion nach 48-stündiger Inkubation mit APPsw-Medium (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  versus Kontrollzellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

### 3.2.7. Der $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT normalisiert NO-Spiegel, ATP-Spiegel und stabilisiert das mitochondriale Membranpotential

Um zu überprüfen, ob die erhöhten NO-Spiegel, die reduzierten ATP-Spiegel und das veränderte mitochondriale Membranpotential durch eine intrazelluläre A $\beta$ -Anreicherung oder durch die APP-Überexprimierung zustande kommen, wurden die APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT behandelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DAPT zu einer Reduktion von A $\beta$ -Spiegeln in HEK-Zellen, im Gehirn, im Plasma sowie im Liquor von transgenen Mäusen führt, ohne die APP-Prozessierung zu beeinflussen (Dovey, H. F. et al., 2001; Vandermeeren, M. et al., 2001; Lanz, T. A. et al., 2003). In PC12-Zellen und HEK-Zellen weist DAPT keine neurotoxischen Effekte auf (Bonert et al., 2004). Im MTT-Assay konnte keine erniedrigte MTT-Reduktion nach 24-, 48- und 72-stündiger DAPT-Inkubation beobachtet werden. Es ist jedoch bereits nach 24-stündiger DAPT-Inkubation eine deutliche Abnahme der sezernierten A $\beta$ -Menge erkennbar (Tabelle 2).

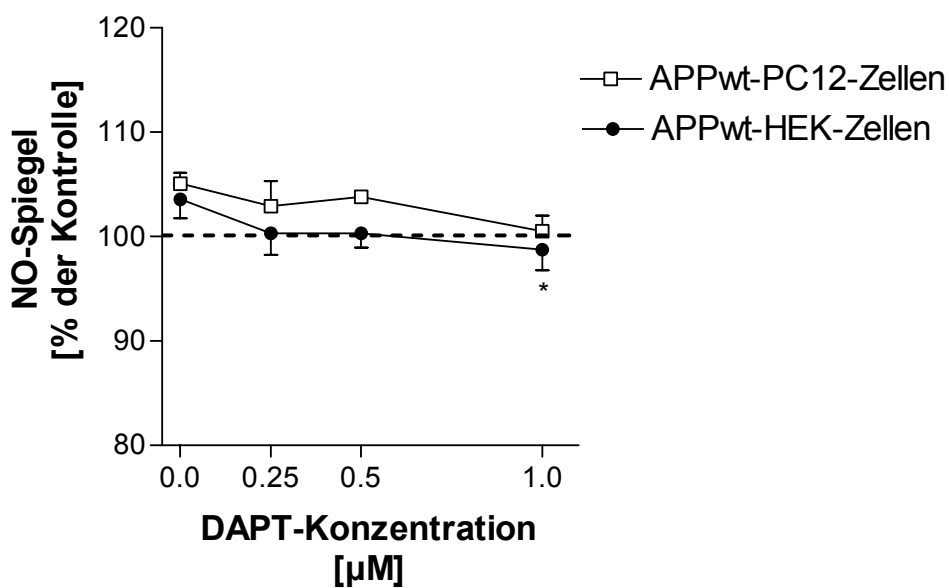
	Co	APPwt	APPsw	APPsw + DAPT (24 h, 1 $\mu$ M)	APPsw + DAPT (48 h, 1 $\mu$ M)
<b>PC12 Zellen</b>	3.67 $\pm$ 1.52	17.33 $\pm$ 3.18	97.33 $\pm$ 9.56 +++	19.81 $\pm$ 0.40 ***	19.44 $\pm$ 0.41 ***
<b>HEK Zellen</b>	35.47 $\pm$ 1.16	259.1 $\pm$ 7.91 +++	2598 $\pm$ 26.29 +++	73.69 $\pm$ 0.65 ***	15.77 $\pm$ 0.15 ***

One way ANOVA, posthoc Tukeys Multiple Comparison Test, +++p<0.001 vs. Kontroll-PC12- oder HEK-Zellen, \*\*\* p<0.001 vs. APPwt- oder APPsw-Zellen. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 3 – 4 Experimenten dar.

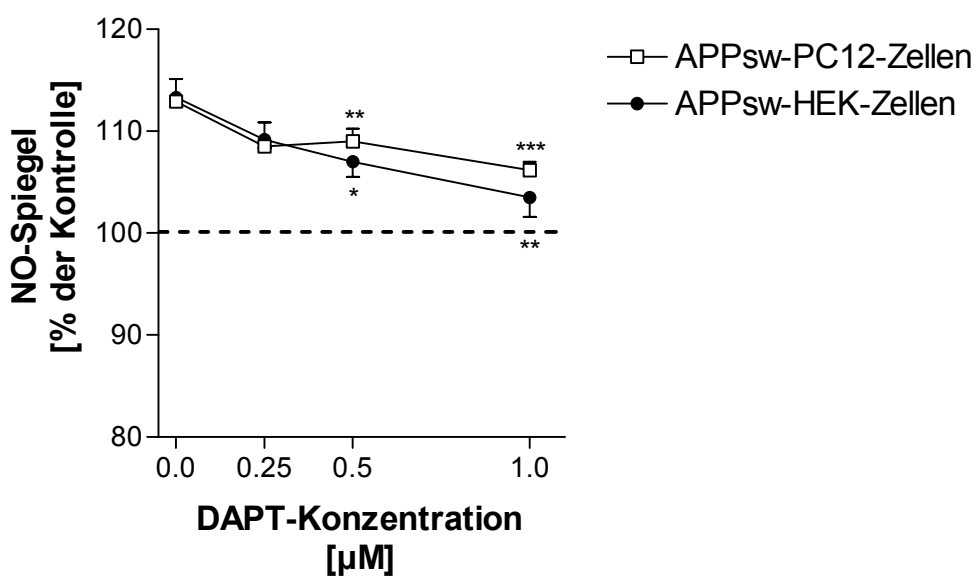
**Tabelle 2: A $\beta$ -Sekretion von PC12-Zellen und HEK-Zellen in pg/ml Medium unter basalen Verhältnissen und nach 24- bzw. 48-stündiger DAPT-Inkubation.**

Nach 48-stündiger Inkubation führt DAPT in APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen zu einer deutlichen Abnahme der sezernierten A $\beta$ -Spiegel (Tabelle 2) (Bonert et al., 2004). Gleichzeitig führt die Inkubation der APPwt- und APPsw-transfizierten PC12-Zellen und HEK-Zellen mit DAPT zu einer Abnahme der erhöhten NO-Spiegel und zu einer Zunahme der reduzierten ATP-Spiegel (Abb. 3.7). Die Effekte von DAPT auf NO- und ATP-Spiegel sind jeweils dosisabhängig, mit einem maximalen Effekt bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M.

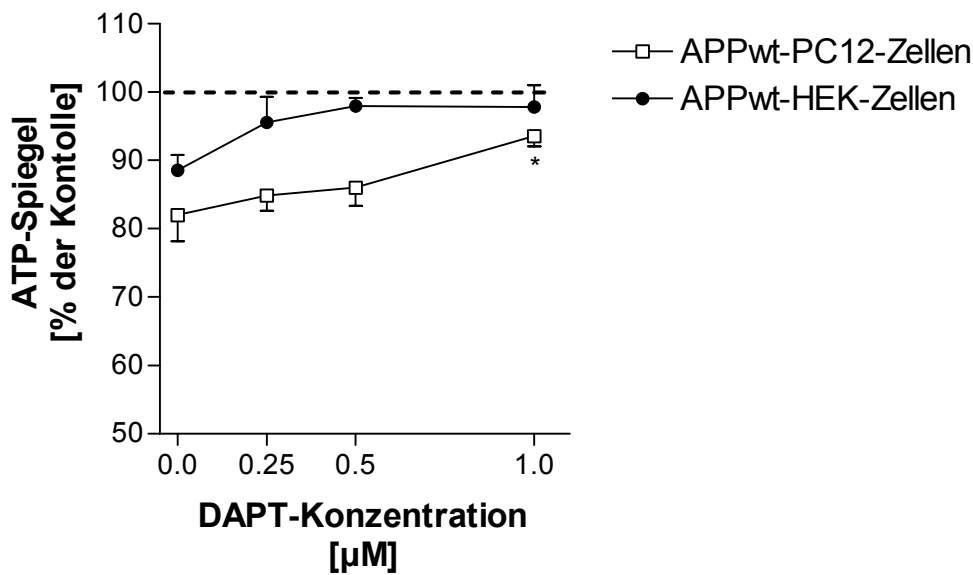
A



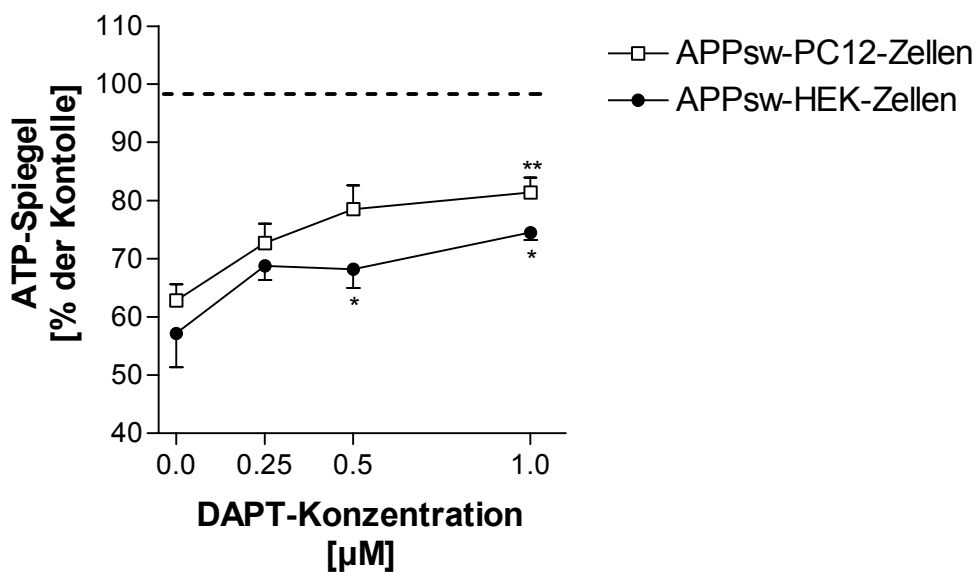
B



C



D



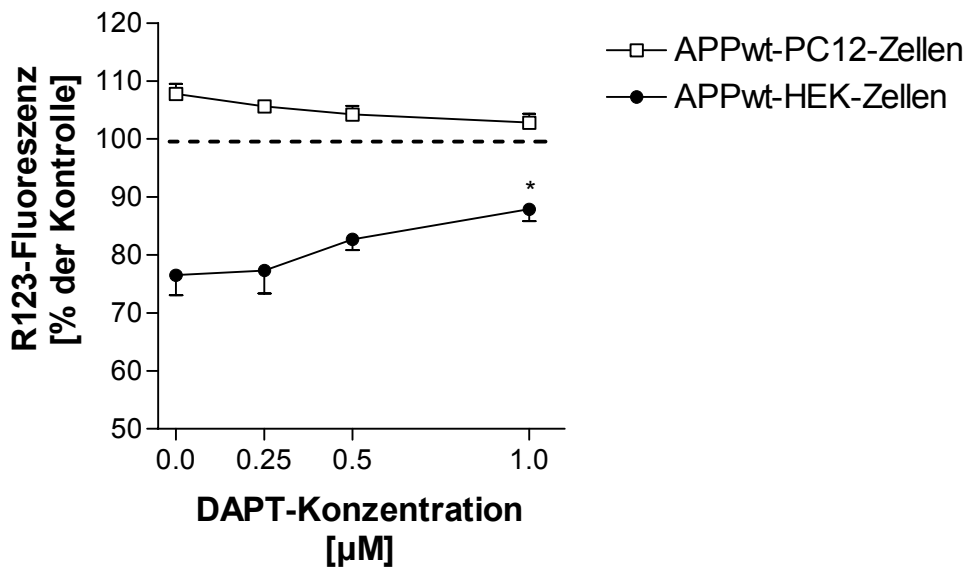
**Abb. 3.7: NO-Spiegel und ATP-Spiegel der APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT.**

**A, B:** DAPT führt zu einer Abnahme der NO-Spiegel in APP-transfizierten PC12-Zellen und APP-transfizierten HEK-Zellen. **C, D:** Zunahme der ATP-Spiegel in APP-transfizierten PC12-Zellen und APP-transfizierten HEK-Zellen nach DAPT-Inkubation (Student's t-test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus unbehandelte Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

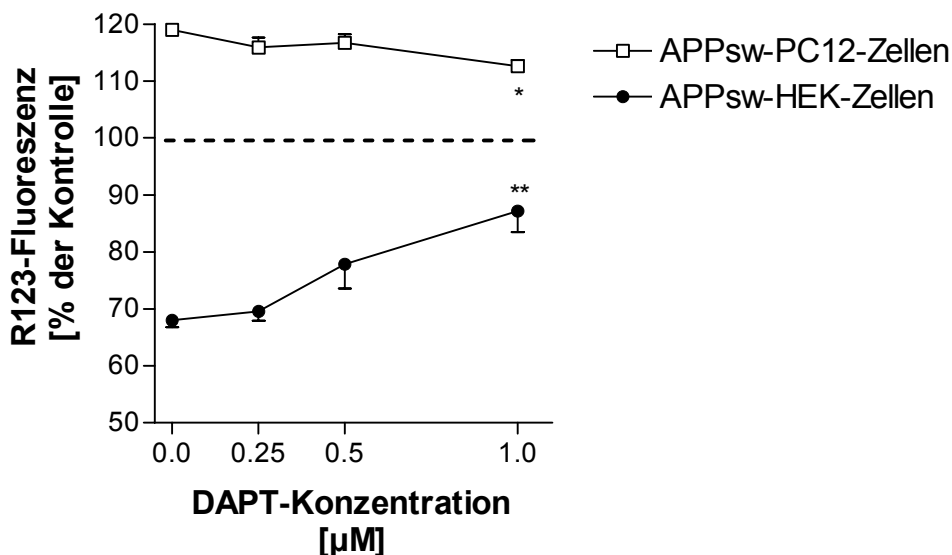
Die Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase durch 48-stündige DAPT-Inkubation führt auch zu Effekten auf das mitochondriale Membranpotential (Abb. 3.8). APPwt- und APPsw-PC12-Zellen weisen, wie in Kapitel 3.2.4 gezeigt, eine leichte Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials auf. Nach Inkubation mit DAPT erkennt man

eine Abnahme dieser Hyperpolarisation, das heißt einen Wegfall des Gegenregulationsmechanismus der APPwt- und APPsw-PC12-Zellen. APPwt- und APPsw-HEK-Zellen weisen unter basalen Bedingungen ein signifikant erniedrigtes mitochondriales Membranpotential auf. Hier führt die DAPT-Inkubation zu einer Stabilisation des mitochondrialen Membranpotentials. Auch hier werden maximale Effekte bei einer DAPT-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erreicht.

A



B



**Abb. 3.8: Die Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT stabilisiert das mitochondriale Membranpotential.**

**A, B:** DAPT führt zu einer Abnahme der Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in APP-transfizierten PC12-Zellen und zu einer Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials in

---

APP-transfizierten HEK-Zellen (Student's t-test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus unbehandelte Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

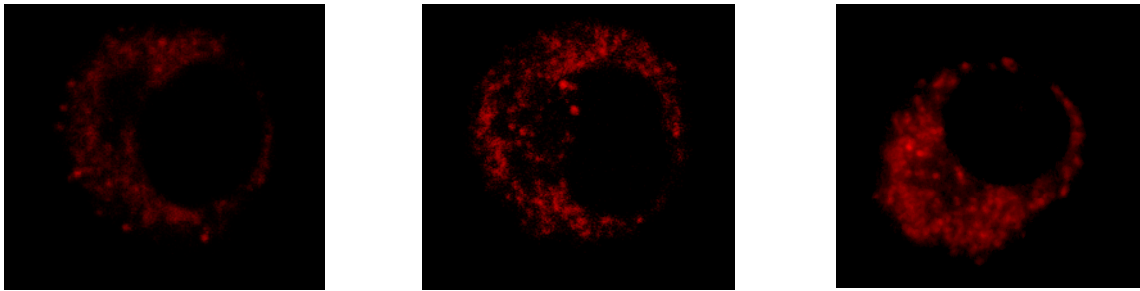
Um zu überprüfen, ob die Effekte des  $\gamma$ -Sekretasehemmstoffes DAPT auf die ATP-Spiegel und auf das mitochondriale Membranpotential lediglich durch die Normalisierung der NO-Spiegel bedingt sind, wurden die APPsw-HEK- und APPsw-PC12-Zellen in einem weiteren Versuch für 48 h mit dem NOS-Hemmstoff L-NAME behandelt und anschließend die mitochondriale Funktion untersucht. Interessanterweise waren die Effekte von L-NAME auf die ATP-Spiegel und auf das mitochondriale Membranpotential im Vergleich zur DAPT-Inkubation wesentlich schwächer ausgeprägt, weshalb davon auszugehen ist, dass die Hemmung der A $\beta$ -Produktion durch DAPT über die Normalisierung der NO-Spiegel hinaus Effekte auf die mitochondriale Funktion ausübt.

### **3.2.8. APPsw-Zellen haben eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien**

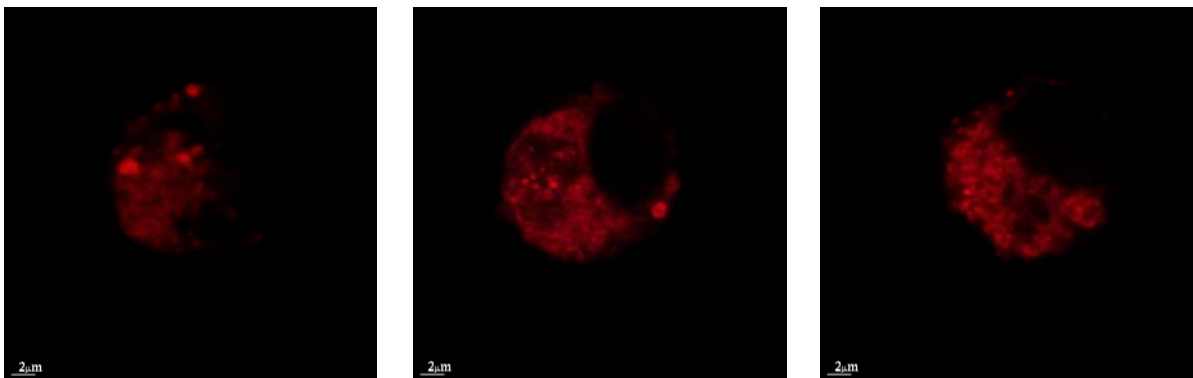
Um ausschließen zu können, dass die reduzierten ATP-Spiegel Folge eines Verlustes von Mitochondrien sind, wurde die Anzahl der Mitochondrien mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Mitotracker Red bestimmt. Mitotracker Red lagert sich selektiv und unabhängig vom mitochondrialen Membranpotential in die Mitochondrien ein. Die Anzahl der Mitochondrien wurde am CLSM und am Fluoreszenzspektrometer bestimmt. APPsw-PC12-Zellen und auch APPsw-HEK-Zellen scheinen mehr Mitochondrien aufzuweisen als APPwt- und Kontrollzellen (Abb. 3.9 A, B; Abb. 3.10). Die ATP-Reduktion scheint also nicht durch mitochondrialen Verlust hervorgerufen zu werden sondern durch mitochondriale Fehlfunktion. Eine Vermehrung der Mitochondrien scheint jedoch die mitochondriale Fehlfunktion nicht kompensieren zu können.

Im Zuge dieser Messung wurde auch gleichzeitig die Lokalisation des Farbstoffs Rhodamine 123 in der Zelle überprüft. Hierzu wurde eine Doppelfärbung mit Rhodamine 123 und Mitotracker Red durchgeführt. Man erkennt eine deutliche Kolokalisation der beiden Farbstoffe (Abb. 3.9 C). Rhodamine 123 lagert sich dementsprechend selektiv in die Mitochondrien ein.

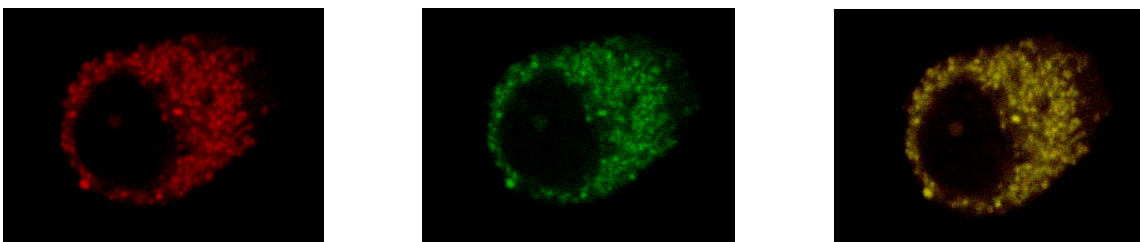
A



B



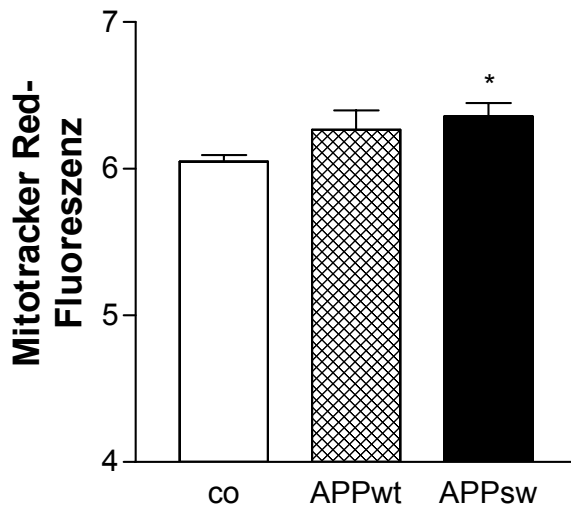
C



**Abb. 3.9: Anfärbung der Mitochondrien in APP-transfizierten PC12-Zellen.**

**A:** Kontroll-PC12-Zellen, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen wurden mit Mitotracker Red angefärbt. **B:** Kontroll-HEK-Zellen, APPwt-HEK-Zellen und APPsw-HEK-Zellen nach Anfärbung mit Mitotracker Red. **C:** APPsw-PC12-Zellen wurden angefärbt mit Mitotracker Red (links), die gleiche Zelle wurde zusätzlich mit Rhodamine 123 angefärbt (Mitte), Kolokalisation von Mitotracker Red und Rhodamine 123 (rechts).



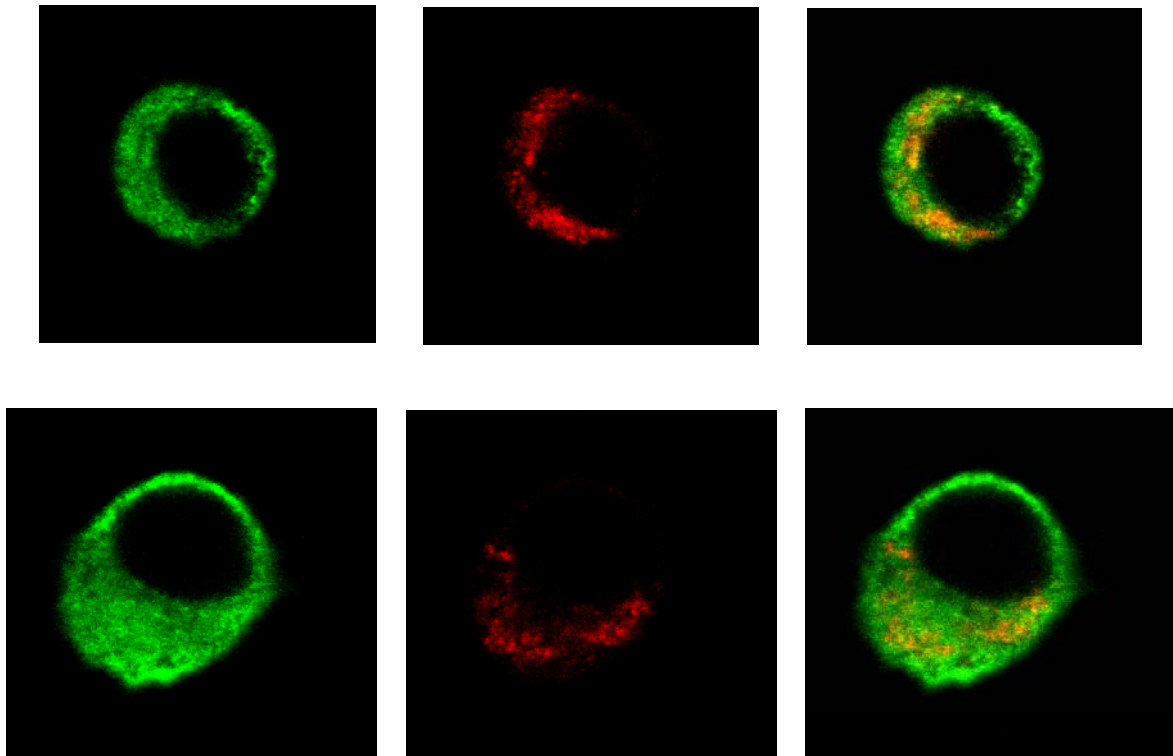


**Abb. 3.10: APPsw-PC12-Zellen haben mehr Mitochondrien als APPwt-PC12-Zellen und Kontroll-PC12-Zellen.**

(ungepaarter Student's t-test, \* $p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

### 3.2.9. APP ist im Mitochondrium lokalisiert

Des weiteren sollte überprüft werden, ob APP in Mitochondrien von stabil transfizierten APPsw-PC12-Zellen lokalisiert ist. Als Mitochondrienmarker wurde ein ATP-Synthase-Antikörper verwendet. Dieser wurde zusammen mit einem APP-Antikörper und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Es zeigte sich eine Kolo-kalisation der beiden Antikörper, was auf eine Anwesenheit von APP im Mitochondrium schließen lässt (Abb. 3.11). Die Kolo-kalisation war nicht komplett, doch ein großer Teil der Mitochondrien zeigte die Anwesenheit von APP. In Ergänzung hierzu konnte Astrid Bonert mittels Westernblot ebenfalls in der mitochondrialen Fraktion von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen APP nachweisen (Bonert, A. et al., 2004). Zusätzlich konnte auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass APP außer im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran auch im Mitochondrium lokalisiert ist (Anandatheerthavarada, H. K. et al., 2003). In dieser Studie wurden allerdings transient transfizierte Zellen verwendet.

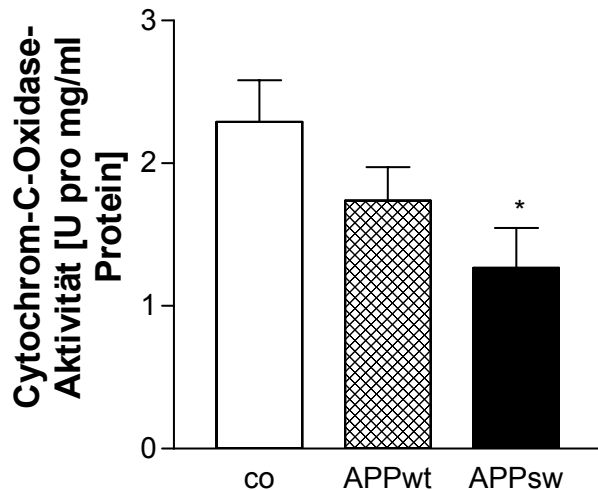


**Abb. 3.11: APP ist in Mitochondrien von APPsw-PC12-Zellen lokalisiert.**

Dargestellt sind zwei verschiedene APPsw-PC12-Zellen. **Links:** Anfärbung mit APP-Antikörper. **Mitte:** Anfärbung mit ATP-Synthase-Antikörper als Marker für die Mitochondrien. **Rechts:** Kolokalisation von APP- und ATP-Synthase-Antikörper.

### 3.2.10. Geschädigte mitochondriale Atmungskette in APPsw-PC12-Zellen

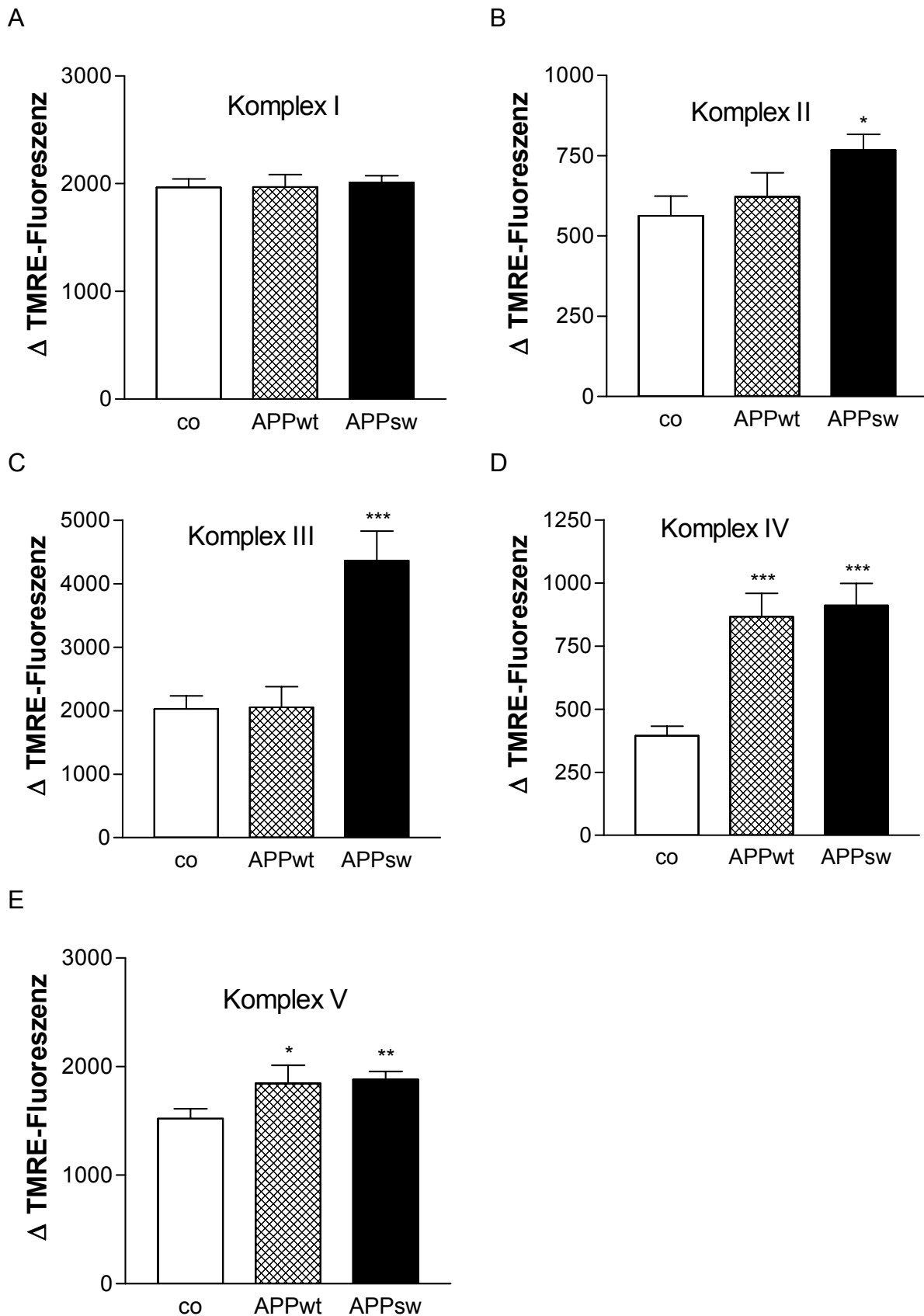
Erhöhte NO-Spiegel sind in der Lage, die mitochondriale Atmungskette, insbesondere die Cytochrom-C-Oxidase, zu hemmen. Da APPsw-PC12-Zellen basal erhöhte NO-Spiegel aufweisen, wurden Mitochondrien aus PC12-Zellen isoliert und anschließend die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität bestimmt. Übereinstimmend mit den erhöhten NO-Spiegeln weisen APPsw-PC12-Zellen eine signifikant erniedrigte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität auf (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität von APP-transfizierten Zellen.**

Die Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität ist signifikant erniedrigt in APPsw-PC12-Zellen (ANOVA, \* $p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 12 Experimenten.

Um auch eine Aussage über die anderen Atmungsketten-Komplexe zu erhalten, wurde das mitochondriale Membranpotential mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs TMRE nach Stimulation mit selektiven Komplexinhibitoren bestimmt. Für Komplex I ist kein Unterschied zwischen den drei Zelltypen erkennbar. Die Komplexe II, III, IV und V der APPsw-PC12-Zellen reagieren hierbei mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials als die Kontroll-PC12-Zellen, was auf eine Beeinträchtigung dieser mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe hinweist (Abb. 3.13). Interessanterweise reagieren die Komplexe IV und V auch in APPwt-PC12-Zellen besonders empfindlich auf die jeweiligen Komplexinhibitoren, was dafür spricht, dass eine Beeinträchtigung der Komplexe IV und V auch schon durch die sehr niedrigen A $\beta$ -Spiegel in den APPwt-PC12-Zellen ausgelöst werden kann.



**Abb. 3.13: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit Komplexinhibitoren.**

**A:** Stimulation mit Rotenon, die Membranpotentialänderung ist bei allen Zelltypen gleich ausgeprägt.

**B:** Stimulation mit TTFa, APPsw-PC12-Zellen reagieren mit der stärksten Abnahme des

mitochondrialen Membranpotentials. **C**: Stimulation mit Antimycin, die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist in APPsw-PC12-Zellen am stärksten ausgeprägt. **D**: Stimulation mit Natriumazid, APPwt- und APPsw-Zellen reagieren mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials als Kontrollzellen. **E**: Stimulation mit Oligomycin, Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen gleich stark ausgeprägt. (ANOVA,\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontrollzellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 4 – 8 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

In der folgenden Tabelle sind die oben dargestellten Ergebnisse nochmals zusammengefasst:

Hemmung der Atmungskette	APPwt	APPsw
Komplex I durch Rotenon (2 $\mu$ M)	n.s.	n.s.
Komplex II durch Thenoyltrifluoroacetone (10 $\mu$ M)	n.s.	+36.31 % *
Komplex III durch Antimycin (2 $\mu$ M)	n.s.	+128.61 % ***
Komplex IV durch Natriumazid (10 mM)	+119.8 % ***	+131.0 % ***
Komplex V durch Oligomycin (10 $\mu$ M)	+27.0 % *	+23.5 % **

One way ANOVA posthoc Tukeys Multiple Comparison Test, n.s.: nicht signifikant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Kontrollzellen. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 4 – 8 Experimenten.

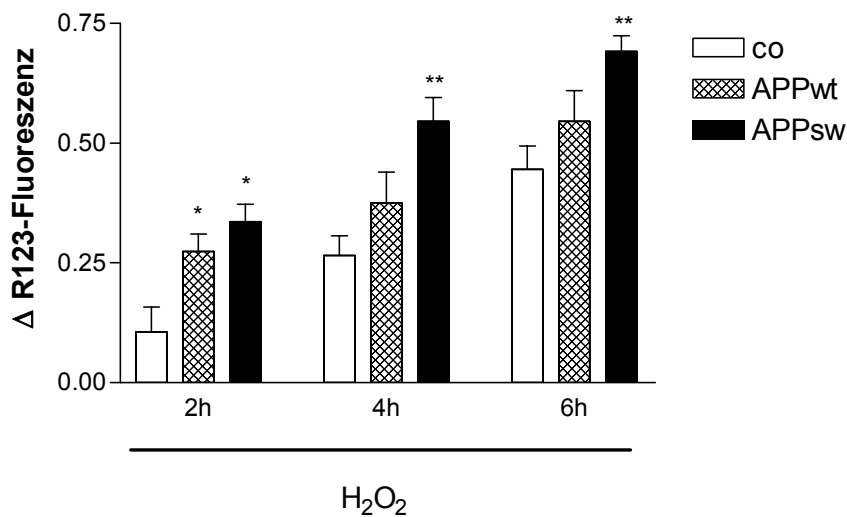
**Tabelle 3: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials der APPwt- und APPsw-PC12-Zellen nach Stimulation mit Atmungsketteninhibitoren verglichen mit Kontrollzellen (Kontrolle=100 %).**

### 3.2.11. Oxidativer Stress schädigt die Mitochondrien

Oxidativer Stress scheint an der Pathogenese der AD beteiligt zu sein. Celio Marques konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass oxidativer Stress zu erhöhtem apoptotischen Zelltod in APPsw-PC12-Zellen führt (Eckert, A. et al., 2001b; Marques, C. A. et al., 2003). Oxidativer Stress wurde hierbei hervorgerufen durch das membranpermeable Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Um zu untersuchen, ob oxidativer

Stress auch in APPsw-PC12-Zellen mitochondriale Fehlfunktion begünstigt, wurde das mitochondriale Membranpotential nach Stimulation mit  $H_2O_2$  bestimmt. APPsw-PC12-Zellen reagieren nach Inkubation mit  $H_2O_2$  im Vergleich zu APPwt-PC12-Zellen und Kontrollzellen mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.14 A), das heißt, die unter basalen Bedingungen vorliegende Hyperpolarisation in APPsw-PC12-Zellen dekompenziert und es kommt durch oxidativen Stress zur verstärkten Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials.

A



B

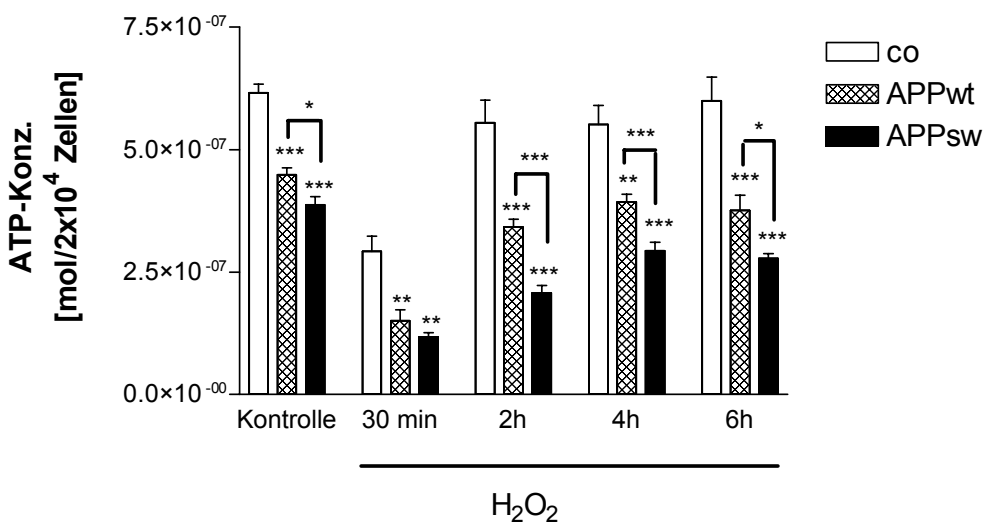


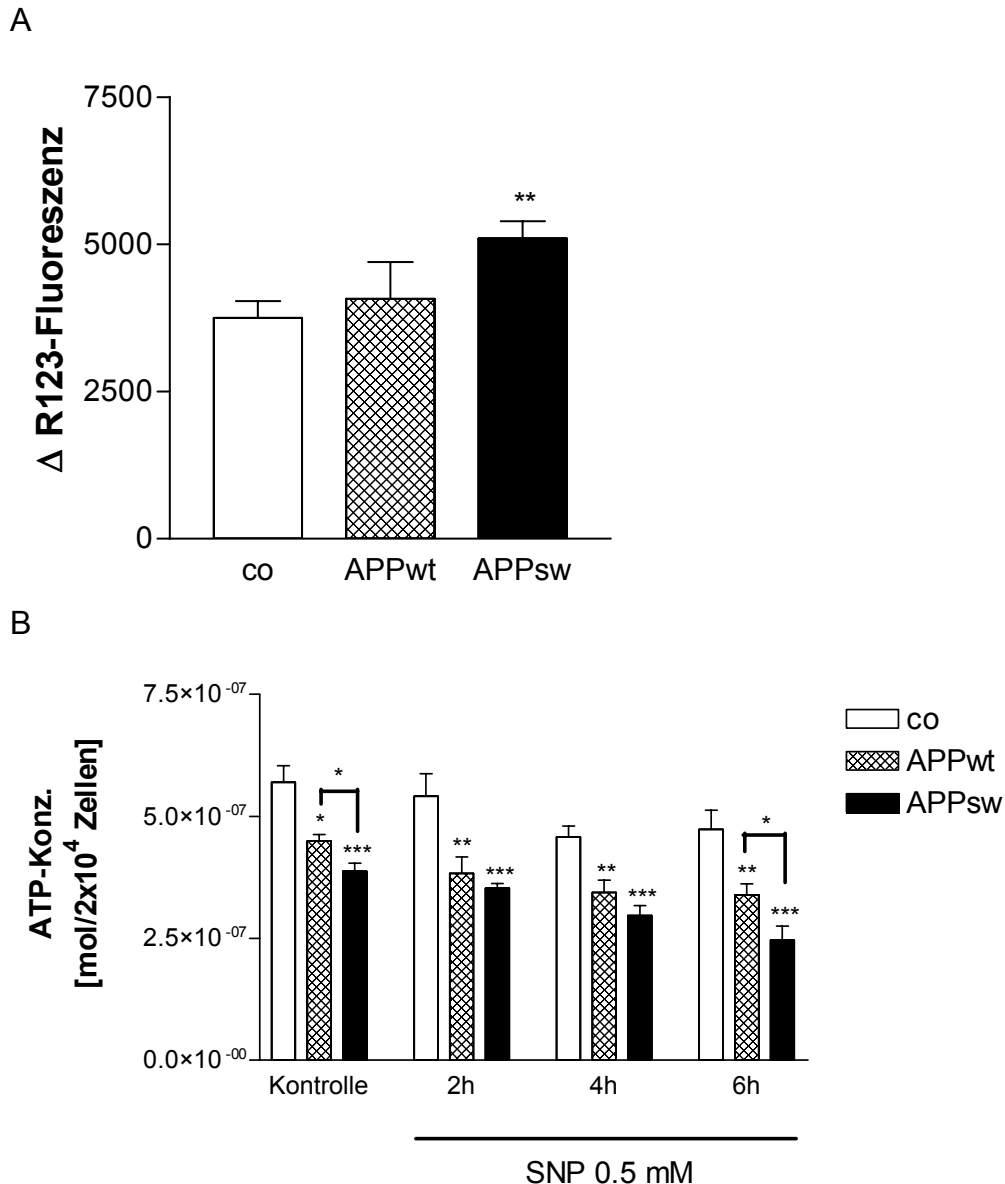
Abb. 3.14: Mitochondriales Membranpotential und ATP-Spiegel nach Wasserstoffperoxidinkubation.

**A:** APPsw-Zellen zeigen eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach 2, 4 und 6 h Wasserstoffperoxidinkubation (0.5 mM) (ANOVA, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen); dargestellt ist der Abfall der R123-Fluoreszenz nach Stimulation mit  $H_2O_2$ . **B:** Die Reduktion der ATP-Spiegel ist nach Wasserstoffperoxidinkubation (0.1 mM) in APPwt- und APPsw-Zellen stärker ausgeprägt als in Kontrollzellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontrollzellen oder APPwt-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 5 – 9 Experimenten.

Die Abnahme der ATP-Spiegel nach  $H_2O_2$ -Gabe ist ebenfalls in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt als in Kontrollzellen (Abb. 3.14 B). Interessant ist auch die Tatsache, dass die Kontrollzellen in der Lage sind, die ATP-Spiegel nach 4- und 6-stündiger  $H_2O_2$ -Inkubation wieder zu stabilisieren. Dieser Effekt ist bei APPsw-PC12-Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt. Die APPsw-PC12-Zellen weisen also eine reduzierte Kapazität auf, das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach oxidativem Stress zu stabilisieren und zeigen konstant ein ATP-Defizit.

### **3.2.12. Nitrosativer Stress schädigt die Mitochondrien**

NO spielt eine wichtige Rolle bei Zelltodprozessen (Chae, I. H. et al., 2004). Aus diesem Grund wurde der Effekt von Natriumnitroprussid (SNP), einem NO-Donor, auf die Mitochondrien untersucht. APPsw-PC12-Zellen reagieren nach 24-stündiger SNP-Inkubation im Vergleich zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.15 A). Die Reduktion der ATP-Spiegel ist ebenfalls in APPsw-PC12-Zellen am stärksten ausgeprägt (Abb. 3.15 B). Die APPsw-Mutation scheint also die Zellen empfindlicher gegenüber nitrosativem Stress zu machen.



**Abb. 3.15: Mitochondriales Membranpotential und ATP-Spiegel nach Inkubation mit Natriumnitroprussid.**

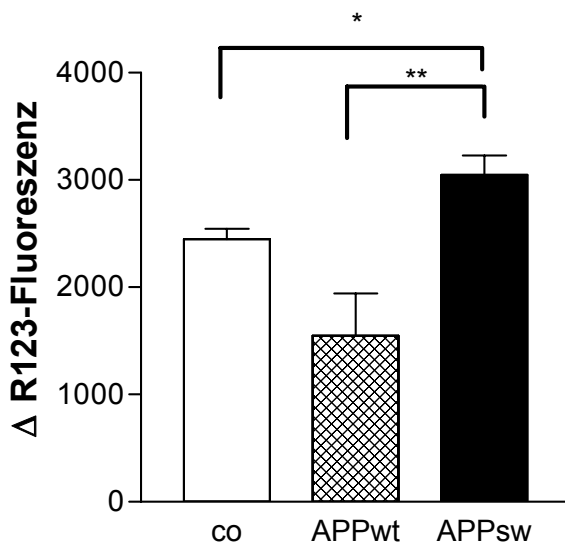
**A:** APPsw-Zellen zeigen eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach 24 h SNP-Inkubation (0.5 mM) (ANOVA, \*\* $p < 0.01$  versus Kontroll-PC12-Zellen); dargestellt ist der Abfall der R123-Fluoreszenz nach Stimulation mit SNP. **B:** die Reduktion der ATP-Spiegel ist in APPwt- und APPsw-Zellen stärker ausgeprägt als in Kontrollzellen (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontrollzellen oder APPwt-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 7 – 9 Experimenten.

### 3.2.13. Serumentzug führt zu mitochondrialer Fehlfunktion

Zellen brauchen Serum, um unter in vitro Bedingungen wachsen zu können. Serum stellt Wachstumsfaktoren zur Verfügung, die für das Wachstum der Zellen essentiell sind. Ein Entzug von Serum stellt eine milde Form von oxidativem Stress dar. Steffen Leutz konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass APPsw-PC12-Zellen im Vergleich



zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen nach Serumentzug eine höhere Apoptoserate aufweisen (Leutz, S. et al., 2002). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die APPwt-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen weniger empfindlich auf Serumentzug reagieren. Die humane APPwt-Expression scheint also einen protektiven Effekt unter Serumentzug auszuüben. Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials zeigte ein sehr ähnliches Bild: Bei den APPwt-Zellen ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Serumentzug geringer ausgeprägt als in Kontroll-PC12-Zellen (Abb. 3.16). APPsw-Zellen weisen jedoch die stärkste Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials auf. Hier wiederum scheint die APPsw-Mutation die Zellen empfindlicher gegenüber einem sekundären Insult zu machen.



**Abb. 3.16: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach 24-stündigem Serumentzug.**

APPsw-PC12-Zellen zeigen eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Serumentzug im Vergleich zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen (ungepaarter students t-test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen und APPwt-Zellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten. Dargestellt ist der Abfall der R123-Fluoreszenz nach Serumentzug.

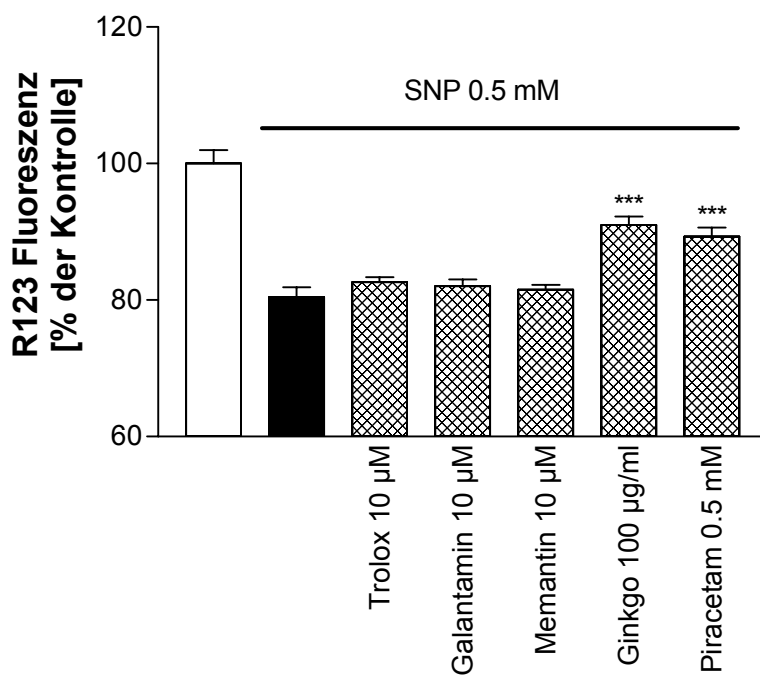
### 3.3. Überprüfung von Antidementiva, Antipsychotika und Antidepressiva auf ihre protektiven Eigenschaften auf mitochondrialer Ebene

#### 3.3.1. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress

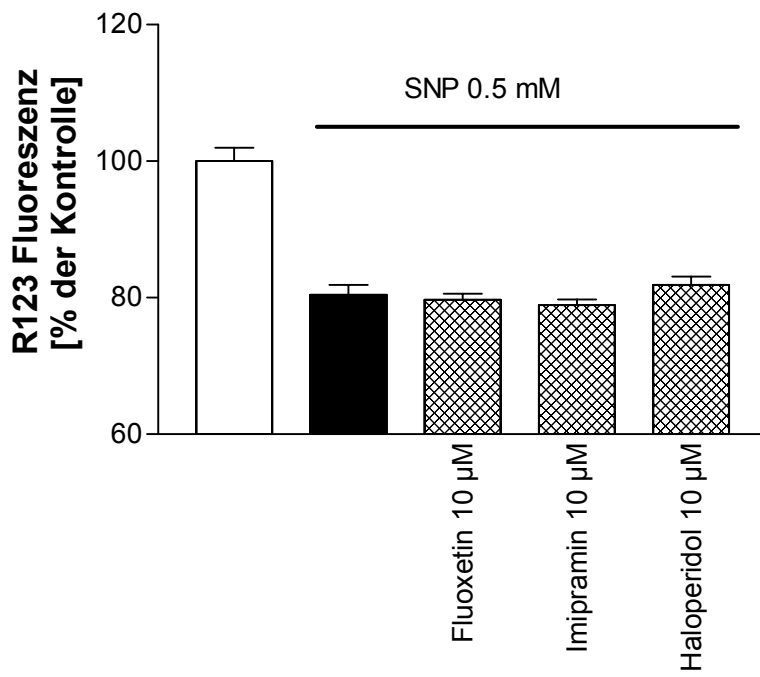
In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob in der Therapie der AD verwendete Antidementiva bzw. Psychopharmaka einen protektiven Effekt auf die Mitochondrien ausüben. Es standen zur Verfügung Memantin, Galantamin, Ginkgo biloba Extrakt EGb 761, Piracetam und Trolox als Antidementiva und Fluoxetin, Imipramin und Haloperidol als andere Psychopharmaka. Die PC12-Zellen wurden über 24 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult wurden die Arzneistoffe hinzugefügt. Interessanterweise wiesen Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt nach nitrosativem Stress protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel auf (Abb. 3.17).

Die protektiven Effekte von Piracetam und Ginkgo biloba Extrakt wurden in weiteren Versuchen genauer untersucht.

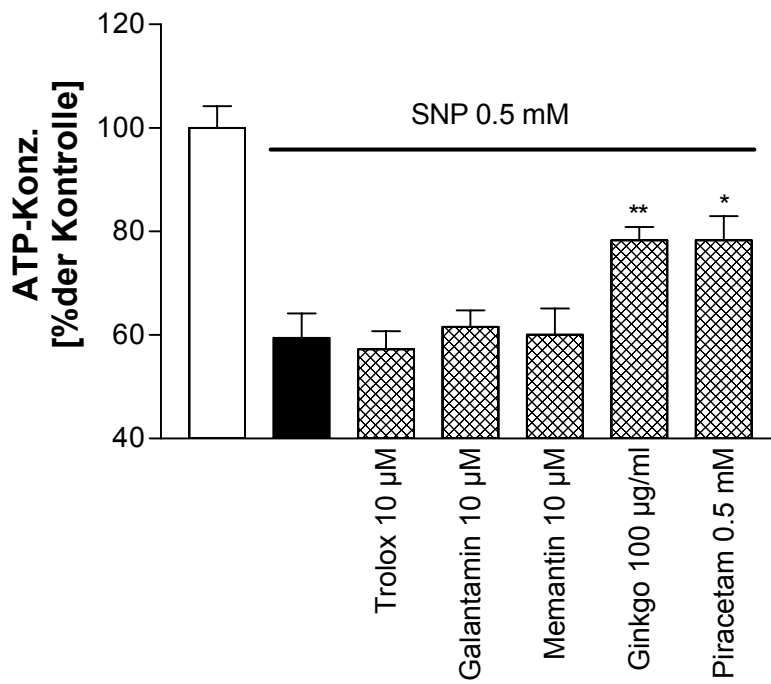
A



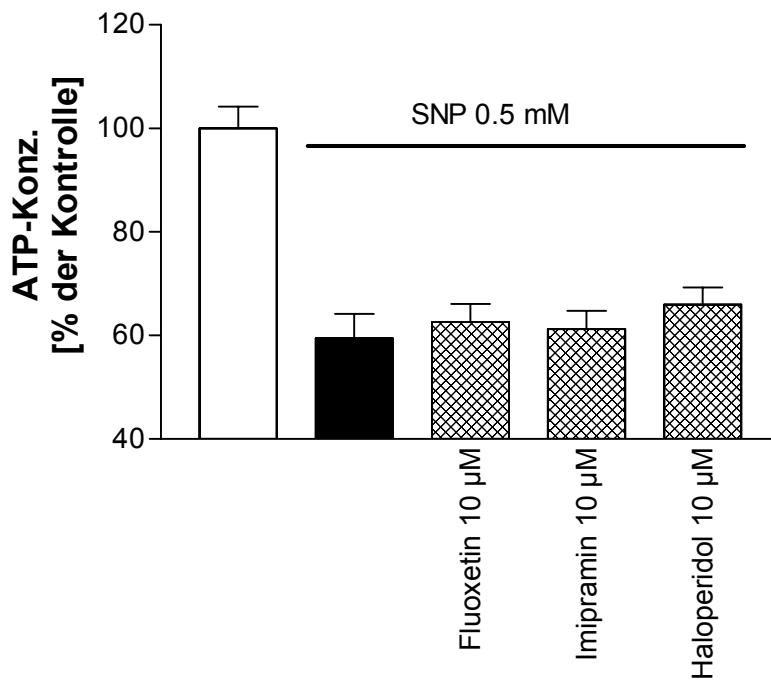
B



C



D



**Abb. 3.17: Ginkgo biloba Extrakt und Piracetam weisen protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel auf.**

**A:** PC12-Zellen wurden 24 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult erfolgte die Zugabe der Antidementiva, anschließend Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. **B:** PC12-Zellen wurden 24 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult erfolgte die Zugabe der Psychopharmaka, anschließend Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. **C:** Design wie bei A nur Bestimmung der ATP-Spiegel. **D:** Design wie bei B nur Messung der ATP-Spiegel. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 5 – 13 Experimenten.

### 3.4. Schützender Effekt von Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761) auf die Mitochondrien

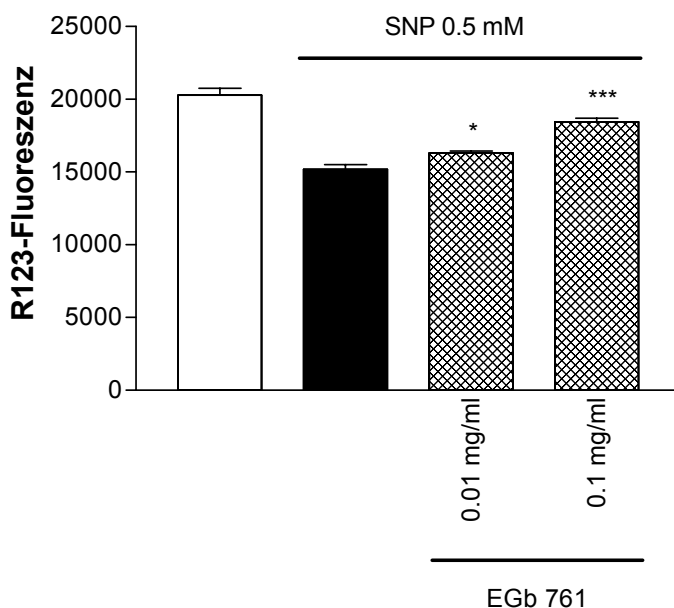
#### 3.4.1. Effekte auf untransfizierte PC12-Zellen

##### 3.4.1.1. EGb 761 schützt Mitochondrien vor dem Angriff von Natriumnitroprussid

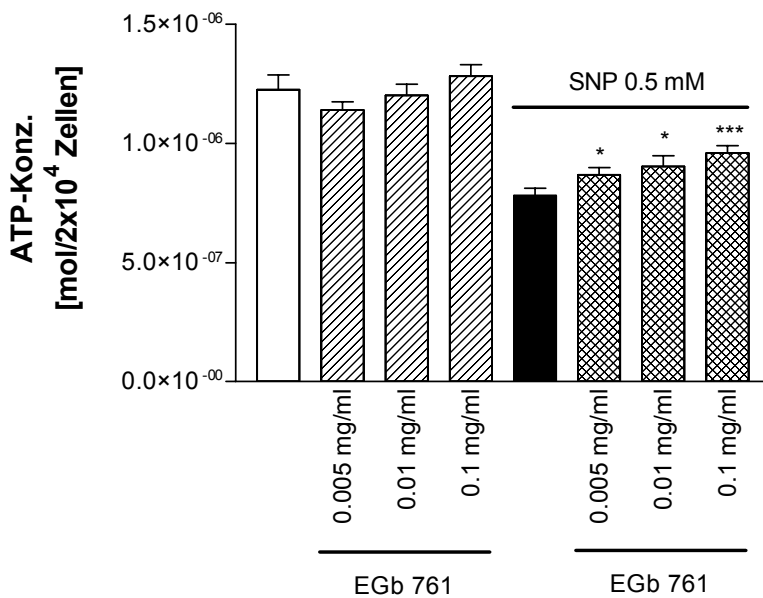
Um zu überprüfen, ab welcher Konzentration EGb 761 protektive Effekte auf die Mitochondrien bei nitrosativem Stress ausübt, wurden die Zellen mit Natriumnitroprussid über einen Zeitraum von 24 h behandelt. 30 min nach Insult wurde EGb 761 in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Hierbei zeigte sich, dass EGb 761 ab einer Konzentration von 0,01 mg/ml in der Lage ist, sowohl die mitochondriale Membranpotentialabnahme als auch die Reduktion der ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress zu verringern (Abb. 3.18). Unter basalen Bedingungen weist EGb 761 jedoch keine Effekte auf die ATP-Spiegel auf.

Um den protektiven Effekt von EGb 761 auf das mitochondriale Membranpotential nochmals zu verdeutlichen, wurden zusätzlich Aufnahmen am konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt. Hierzu wurde ebenfalls EGb 761 30 Minuten nach SNP-Inkubation hinzugefügt und die Rhodamine 123-Fluoreszenz nach 24 h am CLSM betrachtet (Abb. 3.19).

A



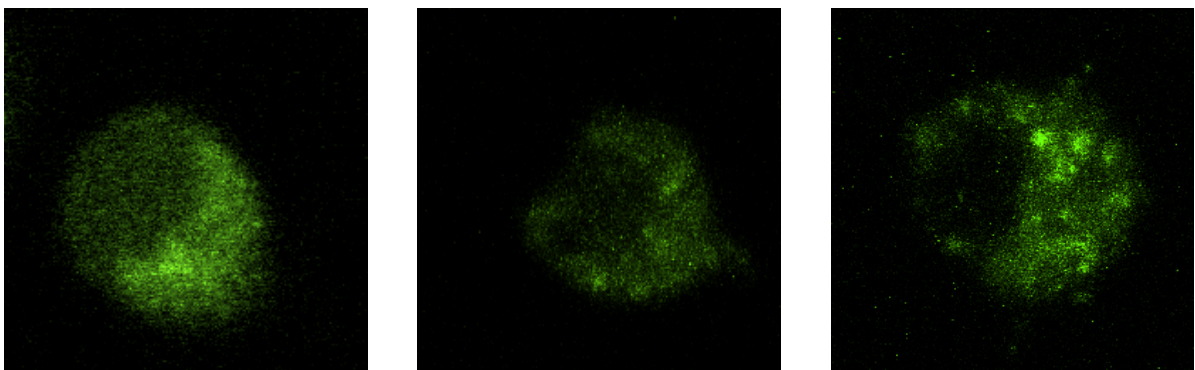
B



**Abb. 3.18: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion.**

**A:** PC12-Zellen wurden 24 h mit SNP inkubiert, EGb 761 wurde 30 min nach Insult hinzugegeben und das mitochondriale Membranpotential bestimmt, **B:** gleiche Bedingungen, Bestimmung der ATP-Spiegel (Student's t-test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

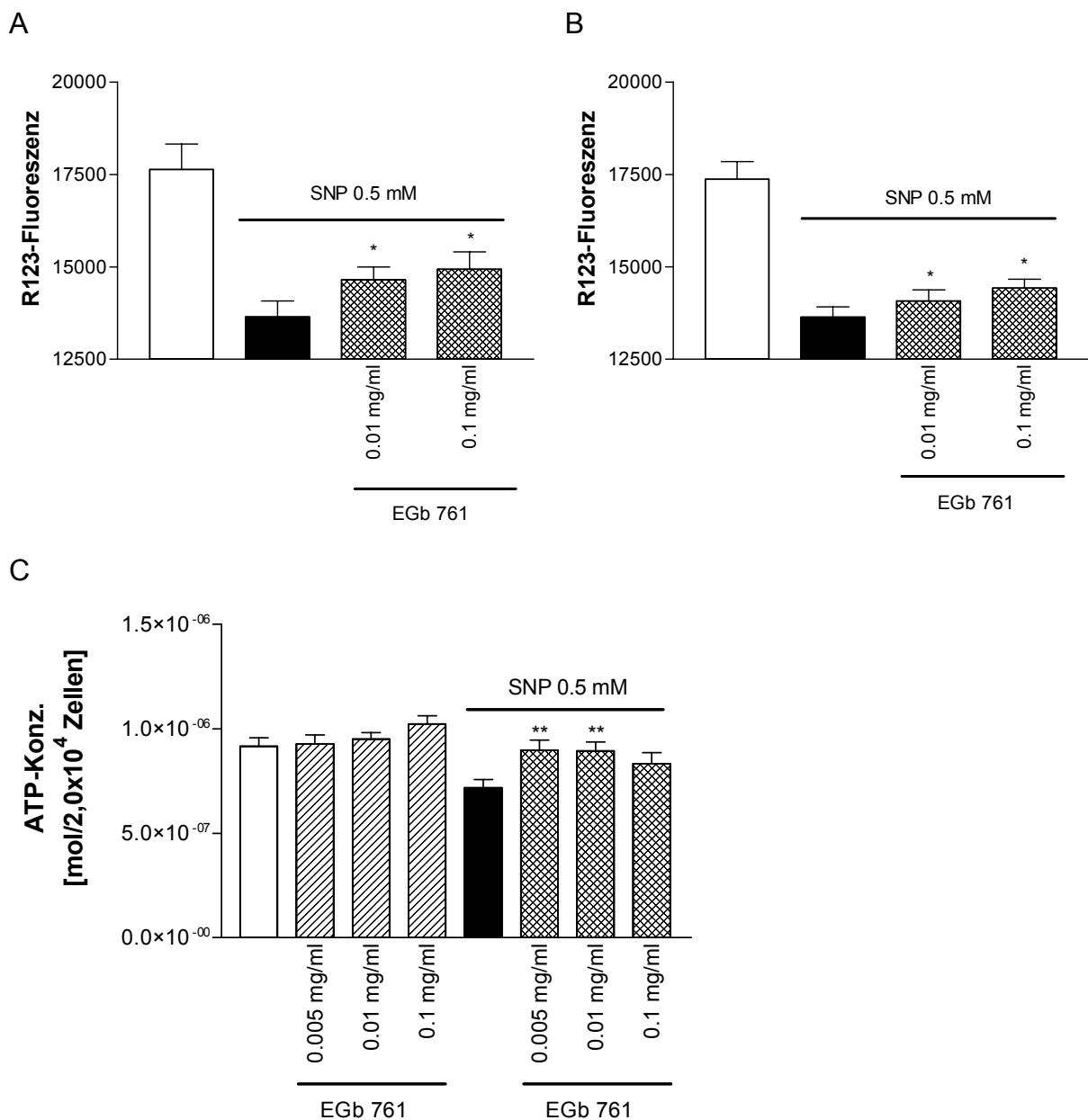
Die Rhodamine 123-Fluoreszenz wird durch Inkubation mit SNP deutlich vermindert, was auf einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials hinweist (Abb. 3.19 Mitte). Die zusätzliche Inkubation mit EGb 761 führt zu einer Erhöhung der Rhodamine 123-Fluoreszenz und somit zu einer Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.19 Rechts).



**Abb. 3.19: Rhodamine 123 Anfärbung von PC12-Zellen.**

Links: Anfärbung von Kontrollzellen. Mitte: 24 h Inkubation mit SNP 0.5 mM. Rechts, Gesamtkubationszeit: 24 h, 30 min nach SNP-Inkubation Zugabe von 0.01 mg/ml EGb 761.

EGb 761 vermindert interessanterweise auch dann die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel, wenn das Medium nach 30-minütiger Stimulation mit SNP ausgetauscht und im Anschluss daran EGb 761 für 23 h hinzugefügt wird (Abb. 3.20 A, C). EGb 761 scheint also auch die Regenerationsbereitschaft der Zellen zu verbessern, wenn der Stressor, in diesem Fall SNP, schon wieder entfernt wurde. Es kann somit zu keiner direkten Reaktion von EGb 761 mit SNP kommen.



**Abb. 3.20: Nachbehandlung mit EGb 761 verbessert die Mitochondrienfunktion nach NO-Schädigung.**

**A:** 30-minütige Behandlung der PC12-Zellen mit SNP, Medium austauschen, EGb 761 Inkubation über 23 h, Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. **B:** 2-stündige Behandlung mit SNP,

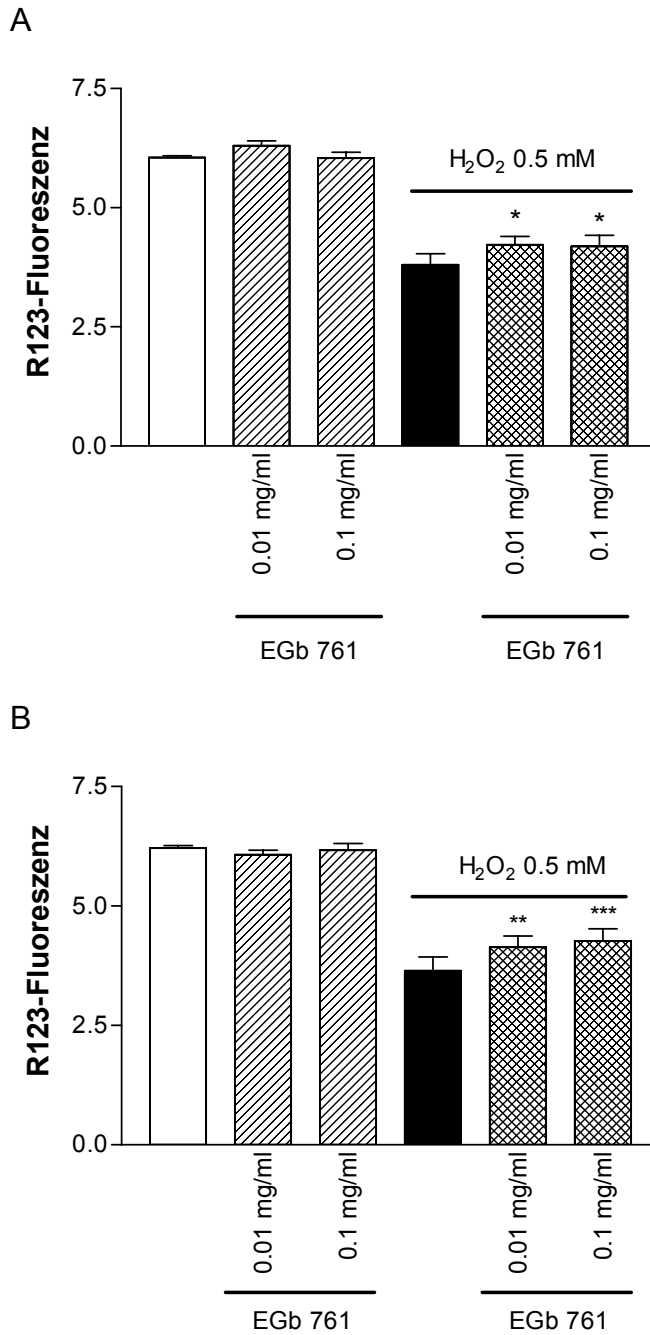
Medium austauschen, nach 23-stündiger EGb 761-Behandlung Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials, **C**: gleiche Bedingungen wie bei **A**, allerdings Bestimmung der ATP-Spiegel (gepaarter student's t-test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 8 Experimenten.

Verlängert man die Zeit bis zum Austausch des Mediums auf 2 h, so ist der protektive Effekt auf die Mitochondrien geringer ausgeprägt als nach 30-minütiger SNP-Inkubation (Abb. 3.20 B).

#### 3.4.1.2. EGb 761 schützt Mitochondrien vor dem Angriff von Wasserstoffperoxid

Um zu überprüfen, ob Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761) auch protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion nach oxidativem Stress ausübt, wurden PC12-Zellen mit  $H_2O_2$  geschädigt und die Effekte von EGb 761 beobachtet. PC12-Zellen wurden nach zwei verschiedenen Protokollen behandelt. Zuerst wurde getestet, ob EGb 761 in der Lage ist, die Zellen vor mitochondrialem Schaden zu schützen. Hierzu wurden die Zellen mit 0.01 mg/ml oder 0.1 mg/ml EGb 761 vorbehandelt. Nach 1 h wurde  $H_2O_2$  (0.5 mM) hinzugefügt und nach 6 h das mitochondriale Membranpotential bestimmt. Als zweites wurde der protektive Effekt von EGb 761 nach oxidativem Stress getestet. PC12-Zellen wurden hierbei ebenfalls für 6 h mit  $H_2O_2$  (0.5 mM) behandelt. 30 min nach Insult wurde EGb 761 hinzugefügt und anschließend das mitochondriale Membranpotential bestimmt. EGb 761 zeigt gegenüber  $H_2O_2$ -induzierter mitochondrialer Fehlfunktion protektive Effekte (Abb. 3.21 A). Eine signifikante Reduktion der Membranpotentialveränderungen zeigt sich ab einer Konzentration von 0.01 mg/ml EGb 761. Interessanterweise weist EGb 761 auch protektive Effekte auf, wenn es nach  $H_2O_2$  verabreicht wird (Abb. 3.21 B). Es scheint also neben seinen Radikalfänger-Eigenschaften auch die Regenerationsfähigkeit der Zellen zu verbessern. Unter basalen Bedingungen weist EGb 761 keine Effekte auf das mitochondriale Membranpotential auf.





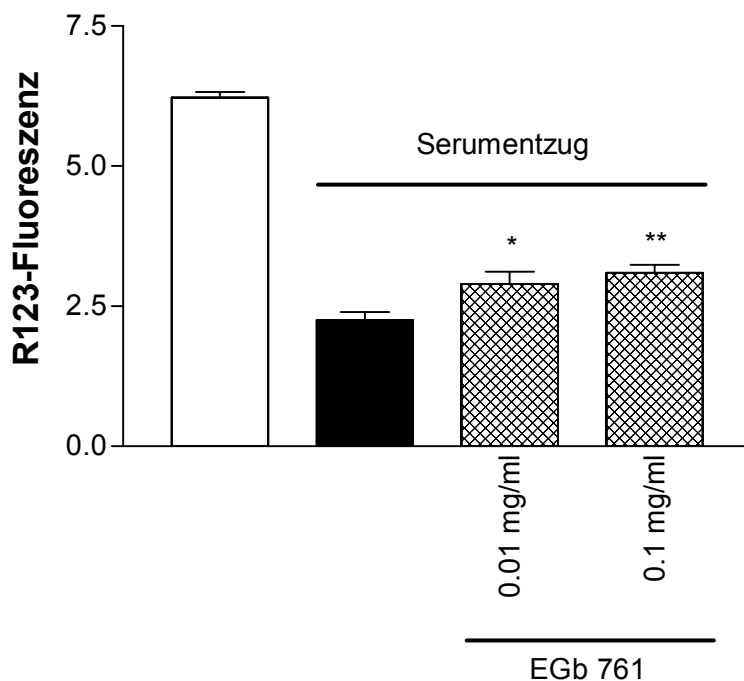
**Abb. 3.21: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials.**

**A:** PC12-Zellen wurden mit EGb 761 vorbehandelt, nach 1 h wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt und insgesamt 6 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. **B:** PC12-Zellen wurden ebenfalls 6 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, aber in diesem Experiment wurde EGb 761 30 min nach Insult hinzugegeben (gepaarter Student's t-test, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 6 Experimenten.

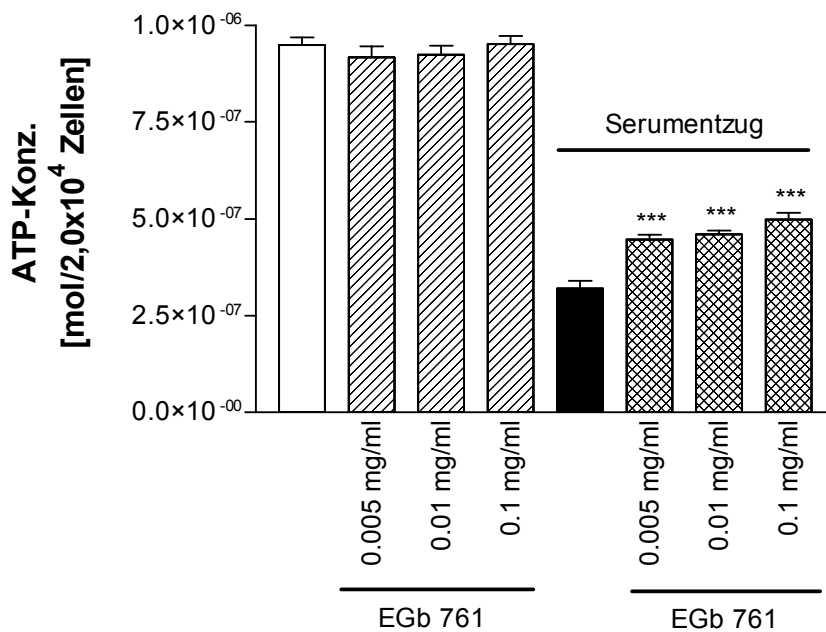
### 3.4.1.3. EGb 761 stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug

Wie in Abb. 3.16 gezeigt, führt 24-stündiger Serumentzug zu mitochondrialer Fehlfunktion. Die Behandlung der PC12-Zellen mit EGb 761, 30 min nach dem Entzug des Serums, vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach 24-stündigem Serumentzug (Abb. 3.22). EGb 761 stabilisiert also auch unter serumreduzierten Bedingungen die mitochondriale Funktion. Besonders ausgeprägt ist der Effekt auf der Ebene der ATP-Spiegel (Abb. 3.22 B). Hier erkennt man schon ab einer Konzentration von 0.005 mg/ml EGb 761 einen protektiven Effekt auf die ATP-Spiegel.

A



B



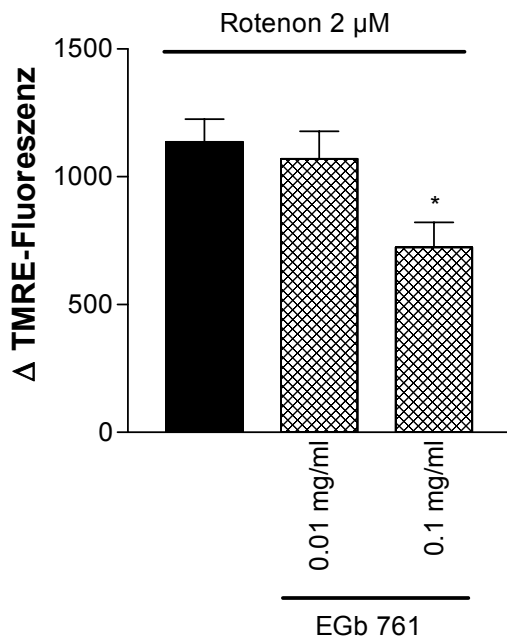
**Abb. 3.22: EGb 761 stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug.**

**A:** Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials wird durch EGb 761 vermindert. **B:** die Reduktion der ATP-Spiegel ist nach EGb 761-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen geringer ausgeprägt (student's t-test; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Serumentzugkontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

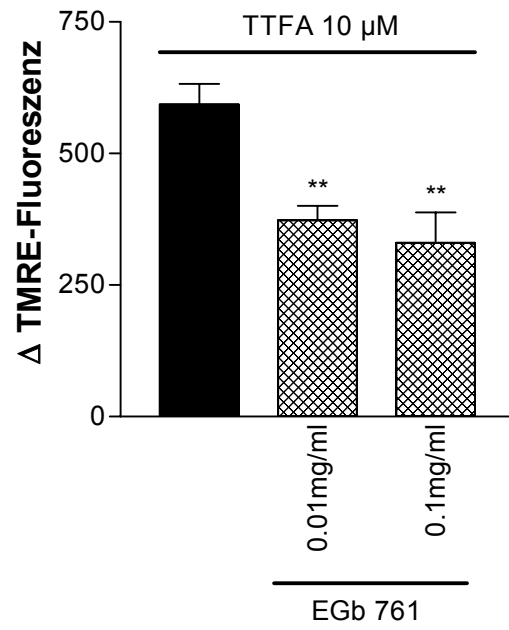
#### 3.4.1.4. Ginkgo-biloba-Extrakt stabilisiert die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

Defekte der mitochondrialen Atmungskette scheinen eine entscheidende Rolle bei der AD zu spielen. Aus diesem Grund wurden Effekte von EGb 761 auf die mitochondriale Atmungskette untersucht. EGb 761 wurde hierbei für 6 h vorinkubiert, die Zellen anschließend mit TMRE angefärbt und nach Aufnahme des Basalwertes mit verschiedenen Komplexinhibitoren stimuliert. Die Komplexe der Atmungskette werden nach der Schädigung durch die Komplexinhibitoren durch EGb 761 in unterschiedlichem Ausmaß geschützt: Die Komplexe II, IV und V werden schon durch EGb 761 Konzentrationen im Bereich von 0.01 mg/ml geschützt, wohingegen die Komplexe I und III erst ab Konzentrationen von 0.1 mg/ml geschützt werden (Abb. 3.23). Die Komplexe II, IV und V scheinen also besonders gut auf EGb 761-Gabe anzusprechen.

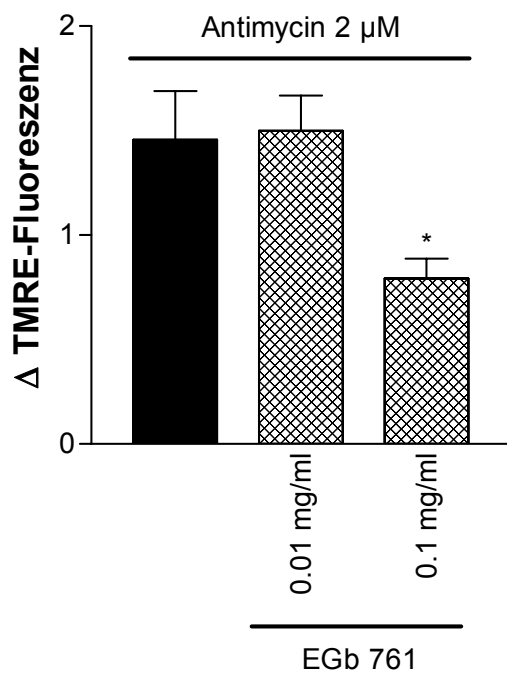
A



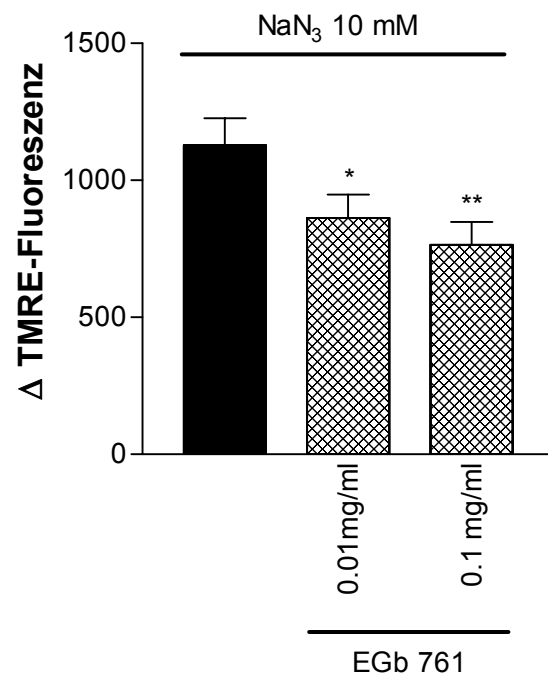
B



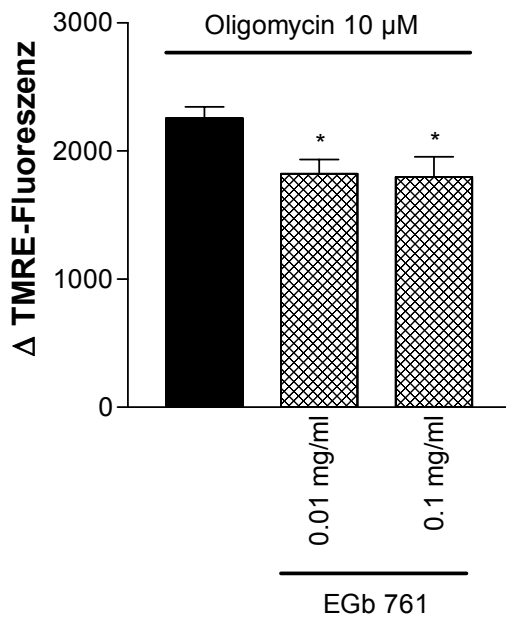
C



D



E



**Abb. 3.23: Schützende Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe.**

Vorinkubation mit EGb 761 über einen Zeitraum von 6 h, anschließend Stimulation mit Komplexinhibitoren. **A:** Rotenon 2  $\mu$ M. **B:** TTFA 10  $\mu$ M. **C:** Antimycin 2  $\mu$ M. **D:**  $\text{NaN}_3$  10 mM. **E:** Oligomycin 10  $\mu$ M (ungepaarter Student's t-test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontrollzellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 4 – 12 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

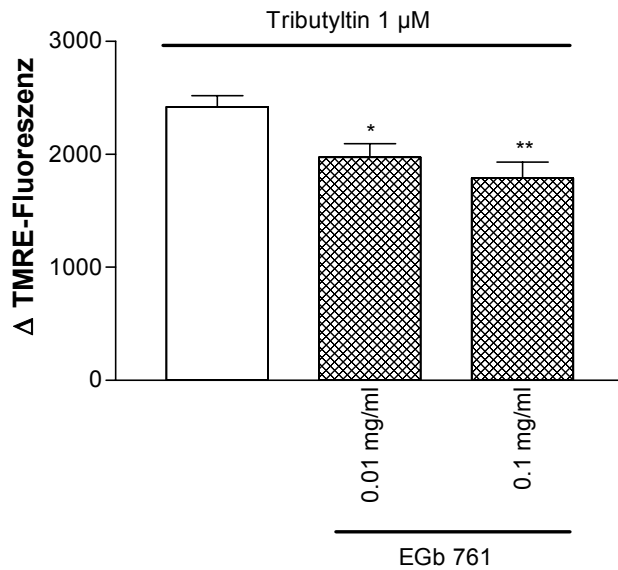
In der folgenden Tabelle sind nochmals die Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zusammengefasst:

		Schädigung	Protektion durch EGb 761		
			10	100	$\mu$ g/ml
Komplex	I	Rotenon			+
	II	Thenoyltrifluoroacetone	++	++	
	III	Antimycin			+
	IV	Natriumazid	+	++	
	V	Oligomycin	+	+	

**Tabelle 4: Protektive Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe**

#### 3.4.1.5. Protektive Effekte von EGb 761 auf die Tributyltin-induzierte mitochondriale Dysfunktion

Tributyltin gehört zur Gruppe der Triorganotin-Substanzen. Es stellt einen potenten Induktor der Caspaseaktivierung und Apoptose dar (Stridh, H. et al., 1998; Stridh, H. et al., 1999). Viele Daten weisen daraufhin, dass Tributyltin zu Cytochrom C-Freisetzung und zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials führt (Nishikimi, A. et al., 2001; Gogvadze, V. et al., 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Tributyltin zu einer Hemmung des Komplexes 5 der mitochondrialen Atmungskette führt (Gogvadze, V. et al., 2002) und den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) modifiziert (Nishikimi, A. et al., 2001). Man geht davon aus, dass Tributyltin Thiolgruppen im ANT modifiziert und somit zu einer Öffnung der mitochondrialen Pore gefolgt von Cytochrom C-Freisetzung führt (Nishikimi, A. et al., 2001). Außerdem gibt es Hinweise, dass Tributyltin den Malonat-Transport und den Nitrat/Chlorid-Transport ins Mitochondrium verhindert (Powers, M. F. and Beavis, A. D., 1991). Für Ginkgo-biloba-Extrakt konnte bereits gezeigt werden, dass es die Entwicklung des zytotoxischen Ödems durch Triethyltin in Ratten verringern kann (Otani, M. et al., 1986). EGb 761 reduzierte hierbei nicht nur den erhöhten Wassergehalt und die Elektrolytkonzentration, sondern reduzierte auch den Myelinschaden (Otani, M. et al., 1986). Um Aufschlüsse über mögliche Angriffspunkte von EGb 761 und Bestandteilen des Ginkgo-biloba-Extraktes am Mitochondrium zu erhalten, wurden die PC12-Zellen mit EGb 761 für 6 h vorbehandelt und anschließend mit Tributyltin stimuliert. Tributyltin führt auch in PC12-Zellen zu einer signifikanten Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Bei Vorinkubation mit EGb 761 ist die Abnahme jedoch signifikant geringer ausgeprägt als in den Kontrollzellen (Abb. 3.24). EGb 761 ist dementsprechend in der Lage, den Tributyltin-induzierten mitochondrialen Schaden zu reduzieren.



**Abb. 3.24: EGb 761 schützt die Mitochondrien vor der Schädigung durch Tributyltin.**

Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist nach 6-stündiger EGb 761 Vorinkubation geringer ausgeprägt als in Kontrollzellen (Student's t-test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus Kontrollzellen). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 9 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

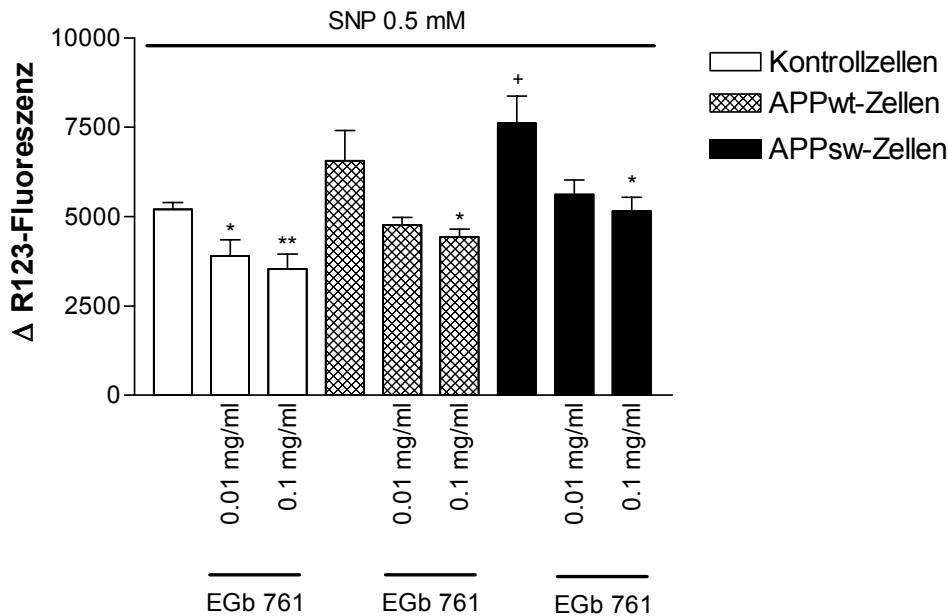
### 3.4.2. Effekte von EGb 761 auf transfizierte PC12-Zellen

#### 3.4.2.1. Protektiver Effekt von EGb 761 bei nitrosativem Stress in APP-transfizierten PC12-Zellen

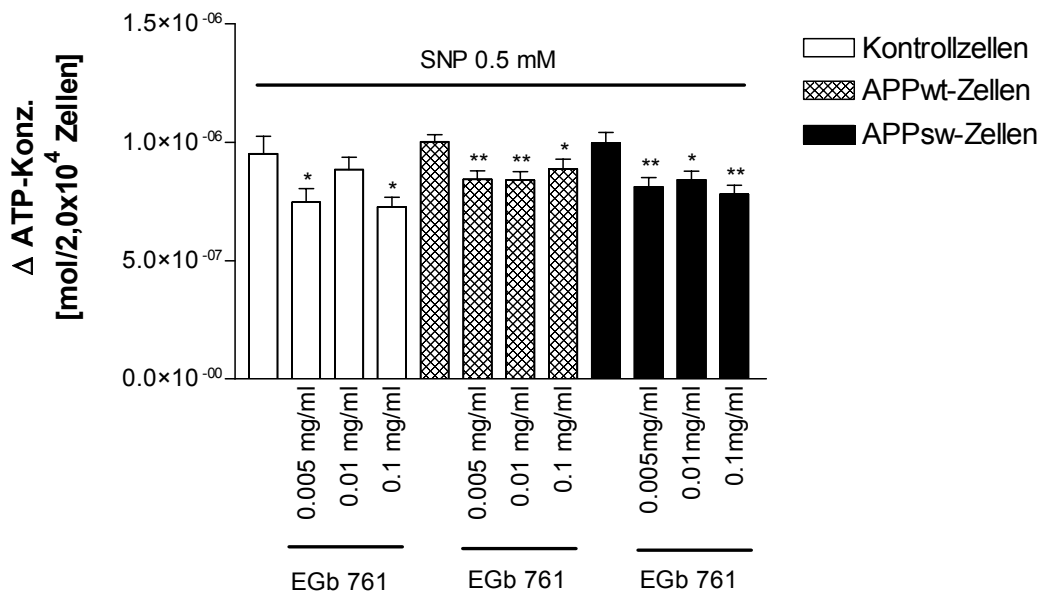
Wie in Abb. 3.15 gezeigt, reagieren APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen signifikant empfindlicher auf nitrosativen Stress. Aus diesem Grund ist es sehr interessant zu untersuchen, ob EGb 761 seine schützenden Effekte auch in APPsw-PC12-Zellen ausübt. APPsw-Zellen wurden deshalb über 24 h mit SNP behandelt und 30 min nach Insult EGb 761 hinzugefügt. Auch hier ist erkennbar, dass die APPsw-Zellen im Vergleich zu APPwt- und Kontrollzellen mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials reagieren (Abb. 3.25 A). Interessanterweise besitzt EGb 761 auch in APPsw-Zellen einen schützenden Effekt auf das mitochondriale Membranpotential. Die ATP-Reduktion nach 24-stündiger SNP-Inkubation ist in allen Zelltypen gleichermaßen ausgeprägt, wobei die APPsw-PC12-Zellen, wie in Abb. 3.5 schon gezeigt, unter basalen Bedingungen erniedrigte ATP-Spiegel aufweisen. EGb 761 ist auch in den APPsw-

Zellen in der Lage, die ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation zu stabilisieren (Abb. 3.25 B).

A



B



**Abb. 3.25: EGb 761 weist auch in APPsw-Zellen nach SNP-Inkubation einen protektiven Effekt auf die Mitochondrien auf.**

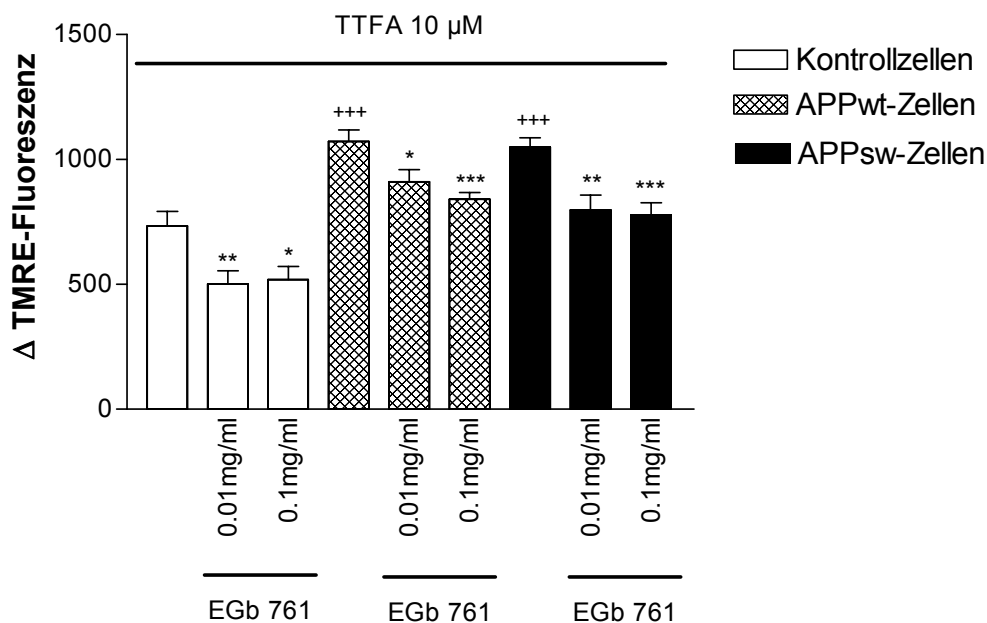
**A:** EGb 761 vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in APPsw-PC12-Zellen; dargestellt ist der Abfall der Rhodamine Fluoreszenz nach Stimulation mit SNP. **B:** EGb 761 stabilisiert die ATP-Spiegel in APPsw-PC12-Zellen (Student's t-test, <sup>+</sup>p<0.05 versus Kontrollzellen, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*</sup>p<0.05 versus SNP-Kontrolle); dargestellt ist der Abfall der ATP-Konzentration nach Stimulation mit SNP. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 7 – 12 Experimenten.



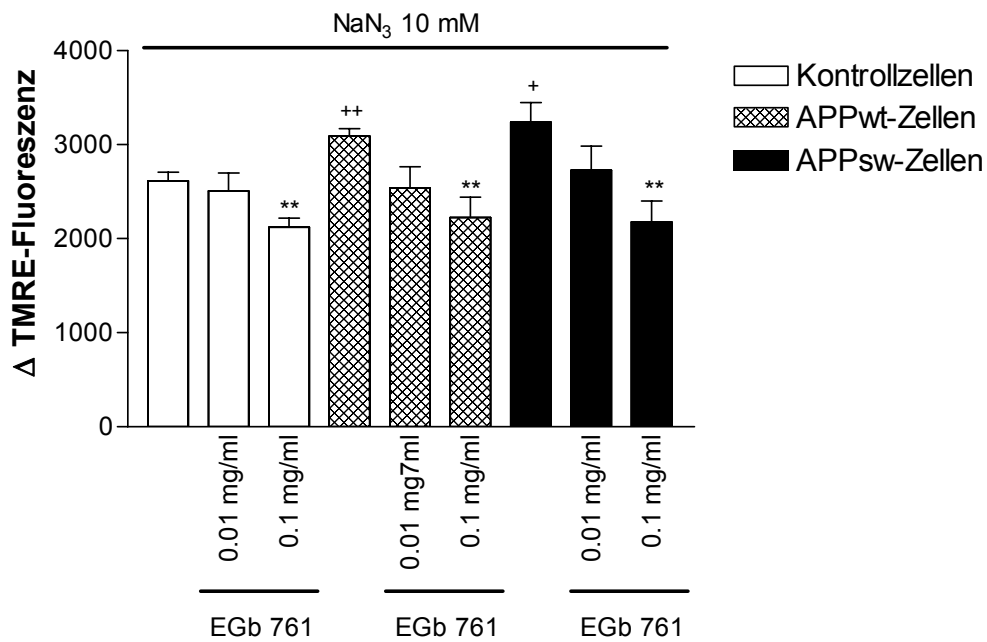
### 3.4.2.2. Protektiver Effekt von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe in APP-transfizierten PC12-Zellen

Wie in Abb. 3.23 gezeigt, schützt EGb 761 schon in einer Konzentration von 0.01 mg/ml die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe II, IV und V. Aus diesem Grund wurden in den APP-transfizierten Zellen auch genau diese Komplexe untersucht. Die Komplexe II, IV und V reagieren in APPsw-PC12-Zellen besonders empfindlich auf die Zugabe der Komplexinhibitoren. EGb 761 ist in der Lage, auch in APPsw-Zellen den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials signifikant zu vermindern (Abb. 3.26). Bei den Komplexen IV und V sind die protektiven Effekte sogar bei APPwt- und APPsw-Zellen stärker ausgeprägt als bei den Kontrollzellen (Abb. 3.26 B, C).

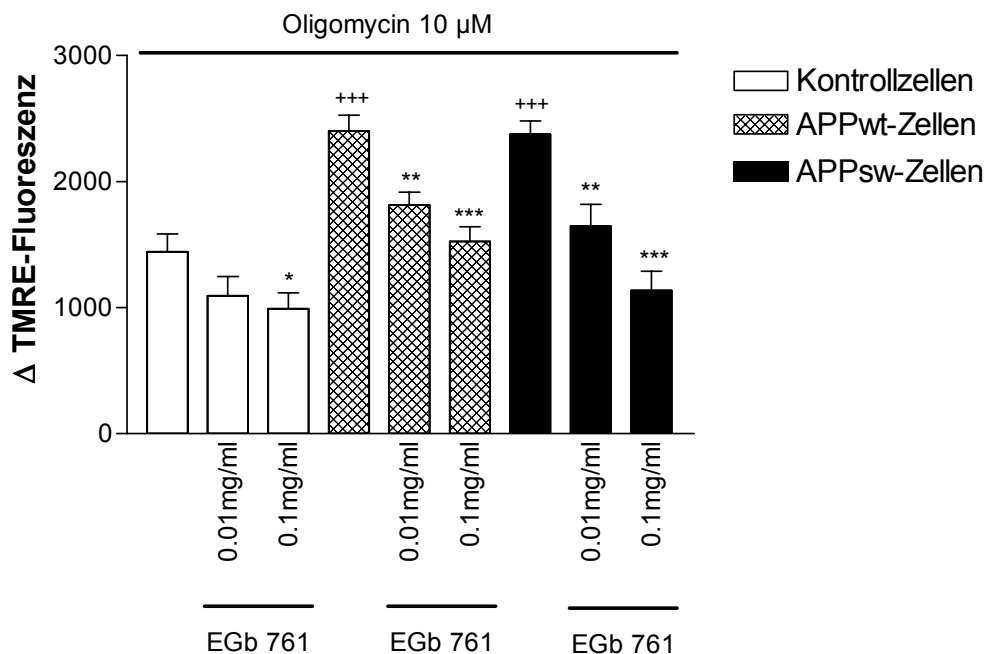
A



B



C

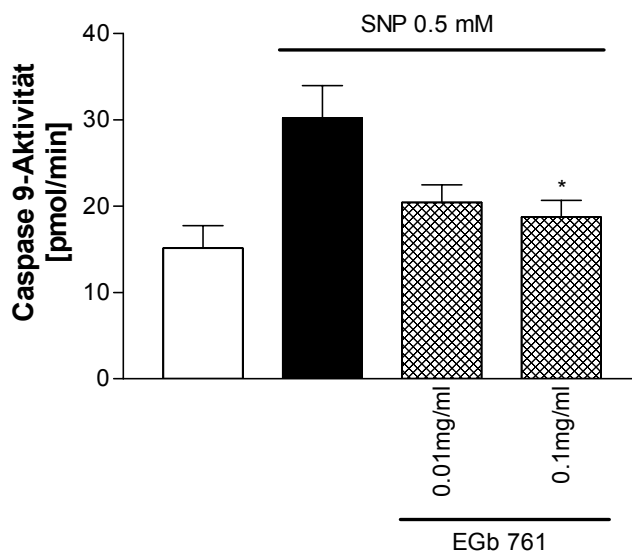


**Abb. 3.26: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe II, IV und V in APP-transfizierten Zellen.**

**A:** Stimulation mit TTFA 10 μM. **B:** Stimulation mit NaN<sub>3</sub> 10 mM. **D:** Stimulation mit Oligomycin 10 μM (Student's t-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus Kontrollzellen, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 versus jeweilige Kontrolle). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 6 – 12 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

### 3.4.3. Ginkgo-biloba-Extrakt verringert Caspase-9-Aktivität

Caspase 9 spielt eine sehr wichtige Rolle beim intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg: Die Aktivierung von Caspase 9 führt zur Aktivierung von Caspase 3 und somit letztendlich zum Zelltod. Da Caspase 9 den Mitochondrien nachgeschaltet ist und EGb 761 protektive Effekte auf die Mitochondrien ausübt, war es nun interessant zu untersuchen, ob EGb 761 auch in der Lage ist, die Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress zu reduzieren. Hierzu wurde 22 h mit EGb 761 vorinkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 2 h mit SNP stimuliert. EGb 761 ist in der Lage ab einer Konzentration von 0.1 mg/ml die Caspase-9-Aktivität nach 2-stündiger SNP-Inkubation signifikant zu senken (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: EGb 761 reduziert die Caspase-9-Aktivität nach SNP-Inkubation.**

PC12-Zellen wurden mit EGb 761 für 22 h vorbehandelt, anschließend erfolgte eine 2-stündige SNP-Inkubation (Student's t-test, \* $p < 0.05$  versus SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 5 Experimenten.

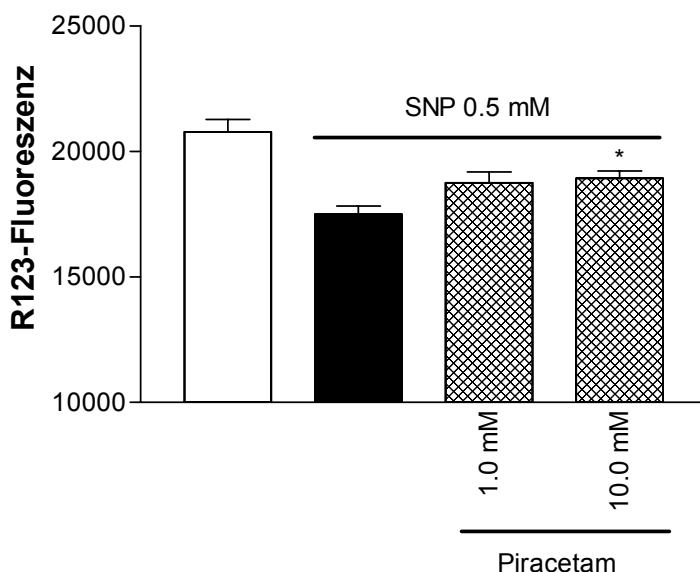
### 3.5. Schützender Effekt von Piracetam auf die Mitochondrien

#### 3.5.1. Effekte auf untransfizierte Zellen

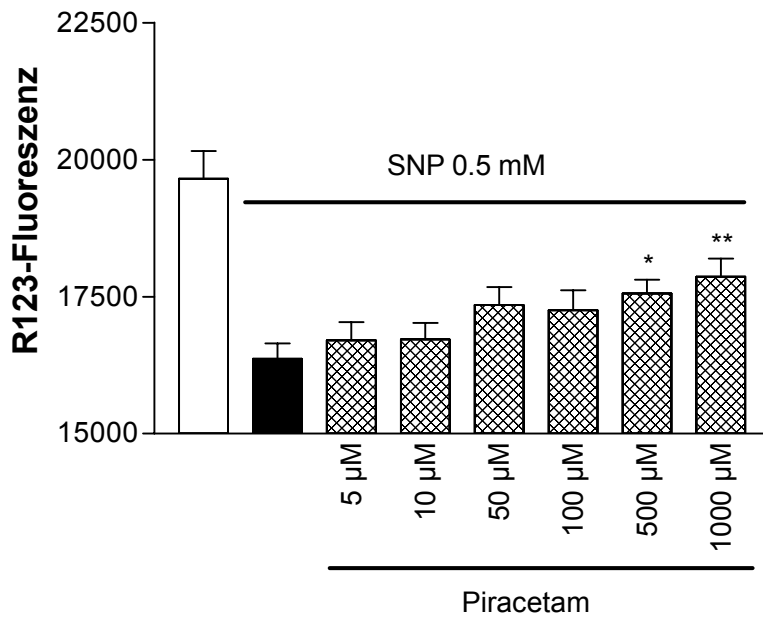
##### 3.5.1.1. Piracetam schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch nitrosativen Stress

Als zweites Antidementivum zeigte Piracetam protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress. Aus diesem Grund sollten genauere Untersuchungen über die protektiven Effekte von Piracetam am Mitochondrium durchgeführt werden. SNP wurde hierbei zum einen 6 h und zum anderen 24 h inkubiert und jeweils 30 min nach Insult Piracetam in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Interessanterweise ist Piracetam sowohl bei 6-stündiger als auch bei 24-stündiger SNP-Inkubation in der Lage, die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials zu vermindern (Abb. 3.28). Nach 24-stündiger SNP-Inkubation ist bemerkenswert, dass Piracetam schon in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials signifikant erniedrigt (Abb. 3.28 B). Zusätzlich ist Piracetam ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  in der Lage, die ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation zu stabilisieren (Abb. 3.28 C, D). Unter basalen Bedingungen zeigt Piracetam jedoch keine Effekte auf die ATP-Spiegel.

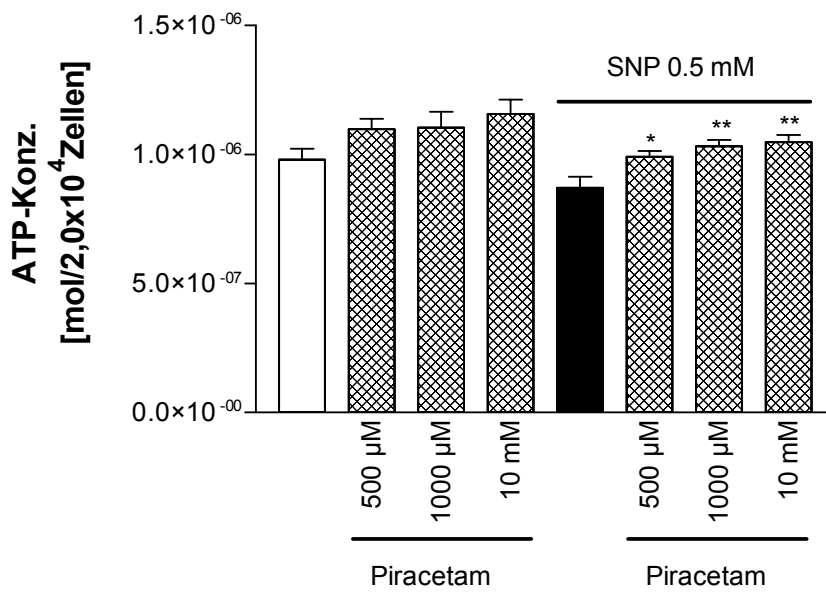
A



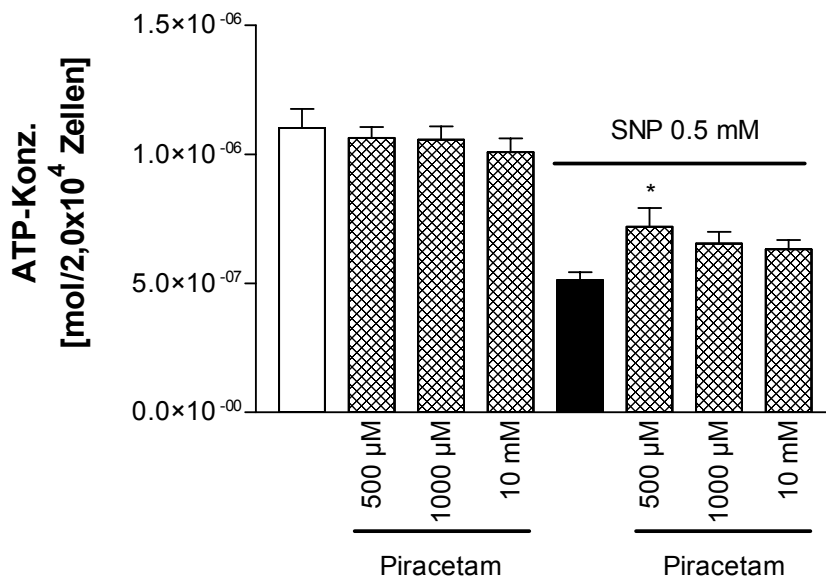
B



C



D

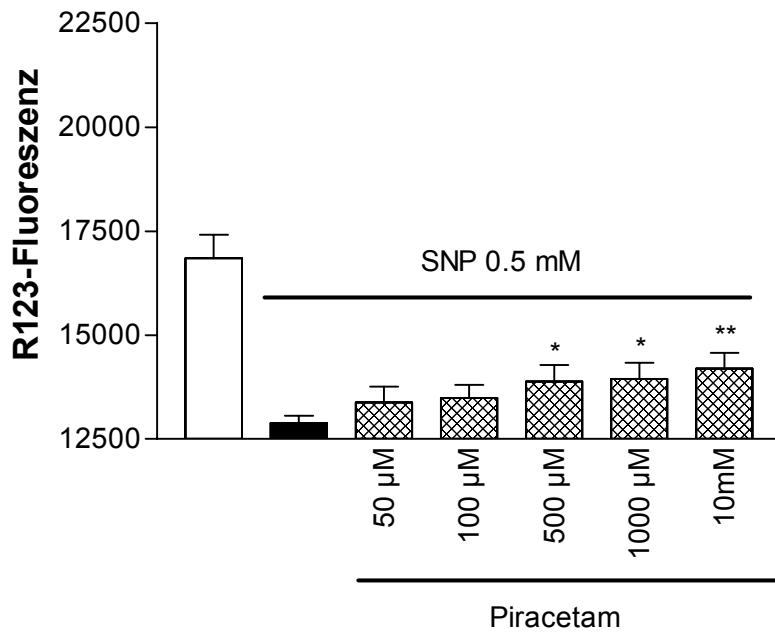


**Abb. 3.28: Die Behandlung mit Piracetam vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation.**

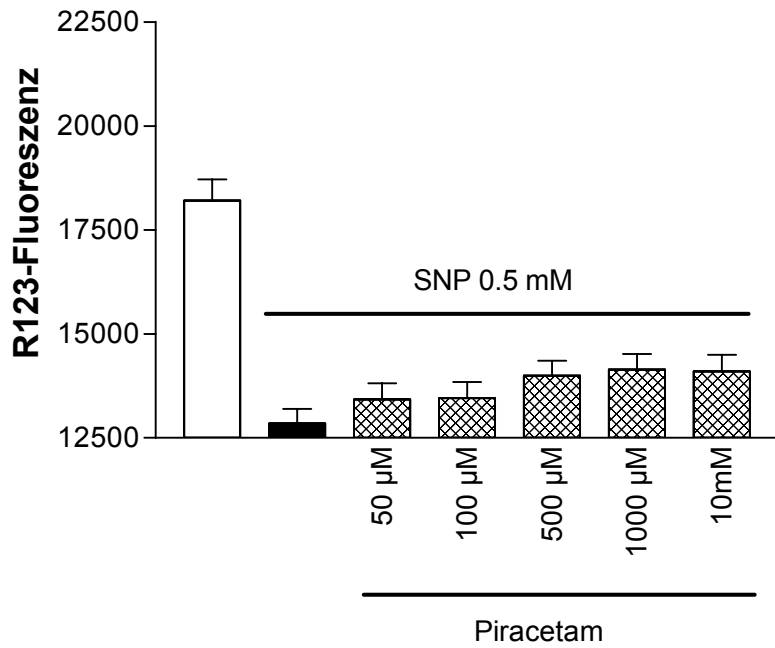
**A:** PC12-Zellen wurden 6 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult erfolgte die Piracetamzugabe, anschließend Messung des mitochondrialen Membranpotentials. **B:** PC12-Zellen wurden 24 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult erfolgte die Piracetamzugabe, anschließend Messung des mitochondrialen Membranpotentials. **C:** gleiches Design wie bei **A** nur ATP-Messung. **D:** gleiches Design wie bei **C** nur ATP-Messung (ANOVA, \*\*p<0.01, \*p<0.05 versus SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 8 – 12 Experimenten.

Interessanterweise weist Piracetam auch dann protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel auf, wenn SNP nach 30-minütiger Inkubation ausgewaschen wird und anschließend Piracetam über den Zeitraum von 23 h hinzugefügt wird (Abb. 3.29 A, D). Verlängert man die Dauer der SNP-Inkubation vor dem Auswaschen, erkennt man, dass die Schädigung durch SNP größer wird und der protektive Effekt von Piracetam in Abhängigkeit von der Zeit geringer (Abb. 3.29 B). Nach 4- bzw. 6-stündiger SNP-Inkubation und anschließendem Auswaschen, ist kein schützender Effekt von Piracetam mehr vorhanden (Abb. 3.29 C, D).

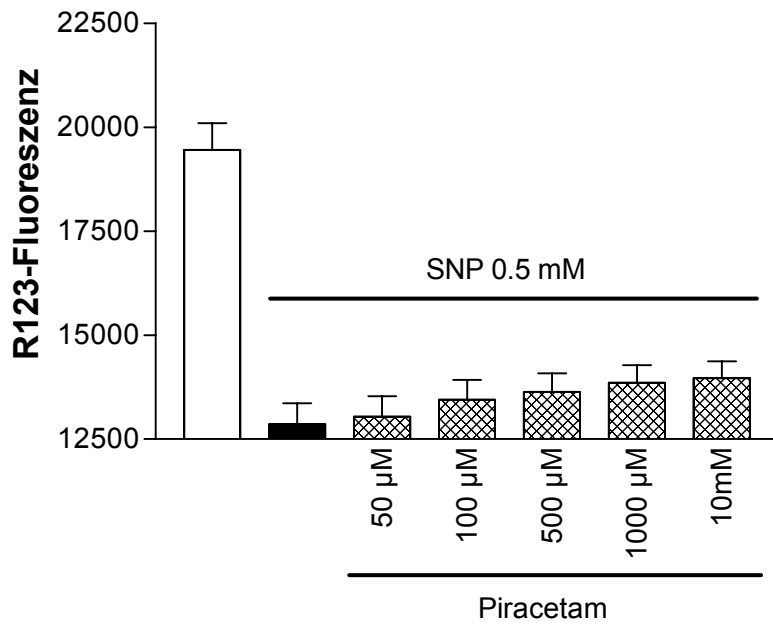
A



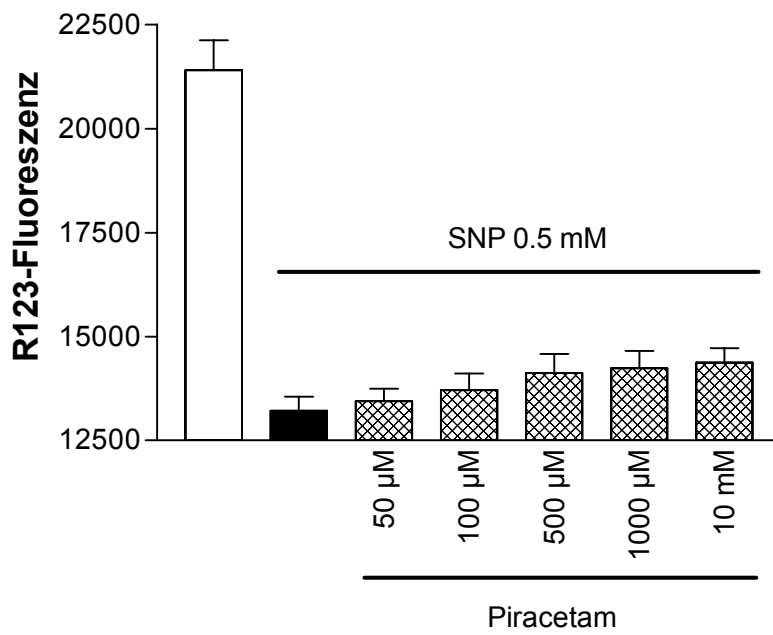
B



C

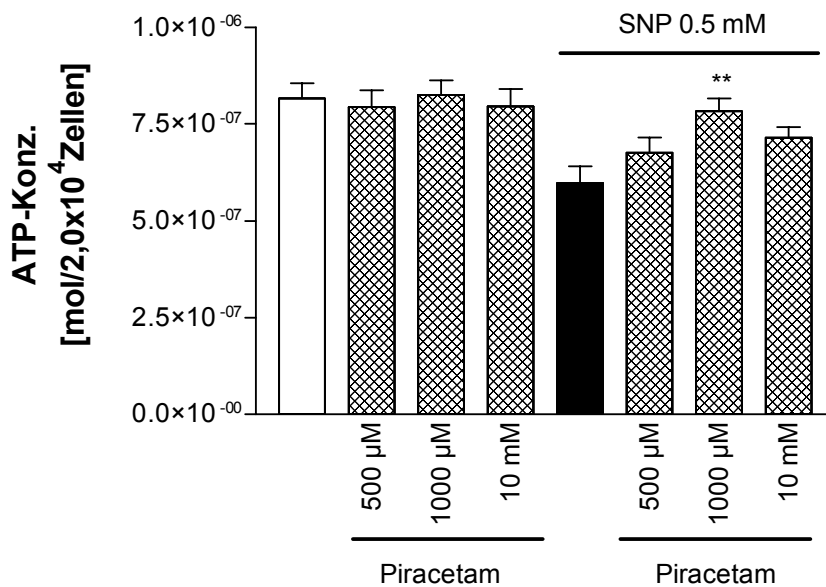


D





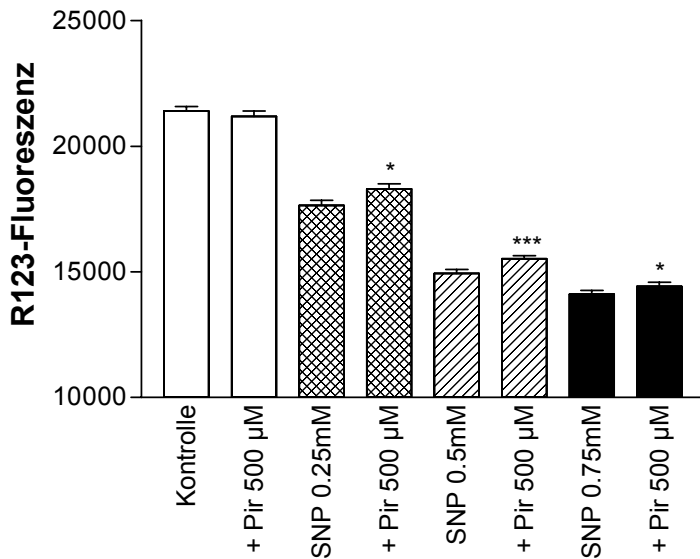
E



**Abb. 3.29: Piracetam verbessert die Regenerationsfähigkeit des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation.**

**A:** PC12-Zellen wurden 30 min mit SNP behandelt, nach einem Mediumwechsel wurde Piracetam für 23 h hinzugefügt und das mitochondriale Membranpotential bestimmt. **B:** gleiches Design nur 2 h SNP-Inkubation. **C:** gleiches Design nur 4 h SNP-Inkubation. **D:** gleiches Design nur 6 h SNP-Inkubation. **E:** gleiches Design wie bei **A** nur ATP-Messung (ANOVA, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 18 Experimenten.

Da nach 24-stündiger SNP-Inkubation ab einer Konzentration von 500  $\mu$ M Piracetam ein protektiver Effekt auf das mitochondriale Membranpotential erkennbar ist, wurde diese Konzentration verwendet, um eine SNP-Konzentrationsreihe durchzuführen. Hierzu wurde SNP in den Konzentrationen 0.25 mM, 0.5 mM und 0.75 mM für 24 h inkubiert und 30 min nach Insult Piracetam 500  $\mu$ M hinzugefügt. Es ist erkennbar, dass die Schädigung der Mitochondrien, das heißt die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials mit steigender SNP-Konzentration zunimmt (Abb. 3.30). Der protektive Effekt von Piracetam nimmt mit steigender SNP-Konzentration ab. Bei leichter Schädigung scheint Piracetam dementsprechend besonders protektiv zu sein.

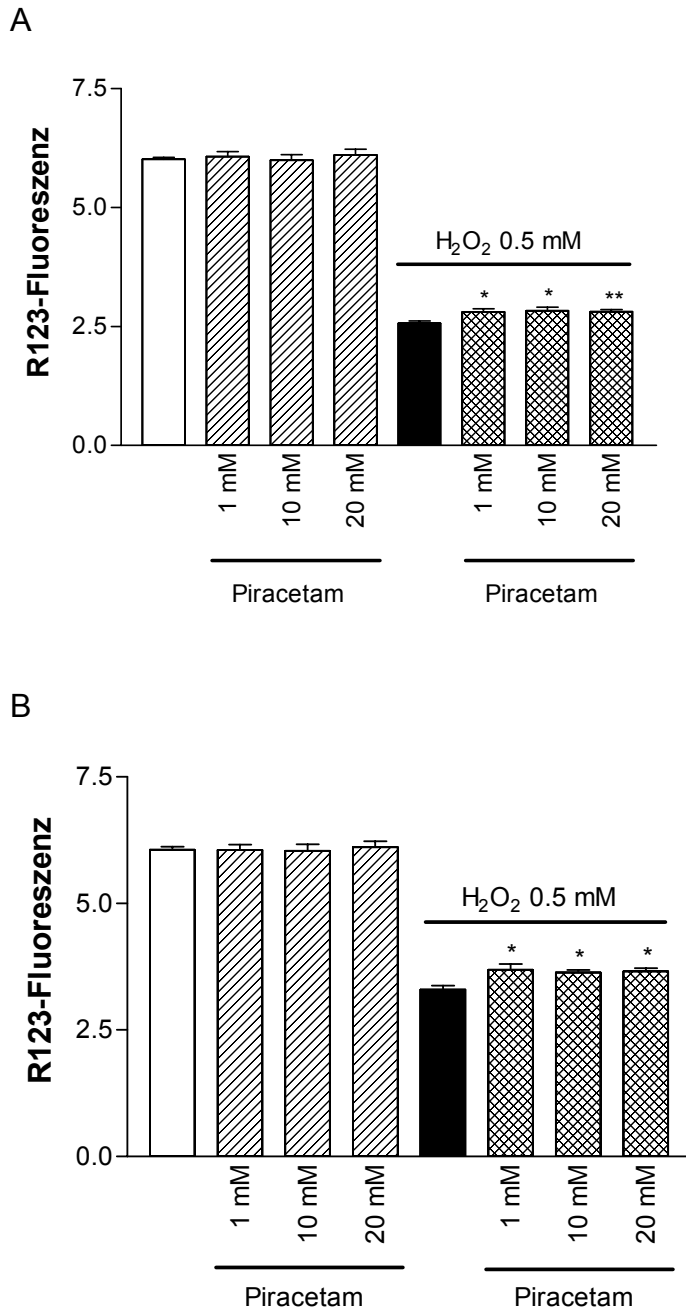


**Abb. 3.30: Protektiver Effekt von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential bei verschiedenen SNP-Konzentrationen**

PC12-Zellen wurden 24 h mit SNP behandelt, 30 min nach Insult erfolgte die Piracetamzugabe, anschließend Messung des mitochondrialen Membranpotentials (gepaarter student's t-test, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  versus jeweilige SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

### 3.5.1.2. Piracetam schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch oxidativen Stress

Des weiteren sollte der protektive Effekt von Piracetam nach oxidativem Stress untersucht werden. Hierzu wurden PC12-Zellen mit  $H_2O_2$  geschädigt und die Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Funktion überprüft. Das Versuchsdesign war identisch gewählt mit dem der Ginkgo-biloba-Extrakt-Inkubation: 1) 1 h Vorbehandlung mit Piracetam und anschließend 6 h  $H_2O_2$ -Inkubation, 2) 6 h  $H_2O_2$ -Inkubation und 30 min nach Insult Piracetamzugabe. Interessanterweise ist Piracetam in der Lage, die Mitochondrien vor dem Angriff von  $H_2O_2$  zu schützen. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist bei beiden Ansätzen geringer ausgeprägt als in Kontrollzellen (Abb. 3.31). Hierbei wird deutlich, dass Piracetam die mitochondriale Funktion direkt stabilisiert und somit protektiv wirkt. Nach 30-minütiger  $H_2O_2$ -Inkubation kann man davon ausgehen, dass das  $H_2O_2$  schon komplett in die Zelle aufgenommen wurde und schon erste Stressreaktionen in Gang gesetzt hat.



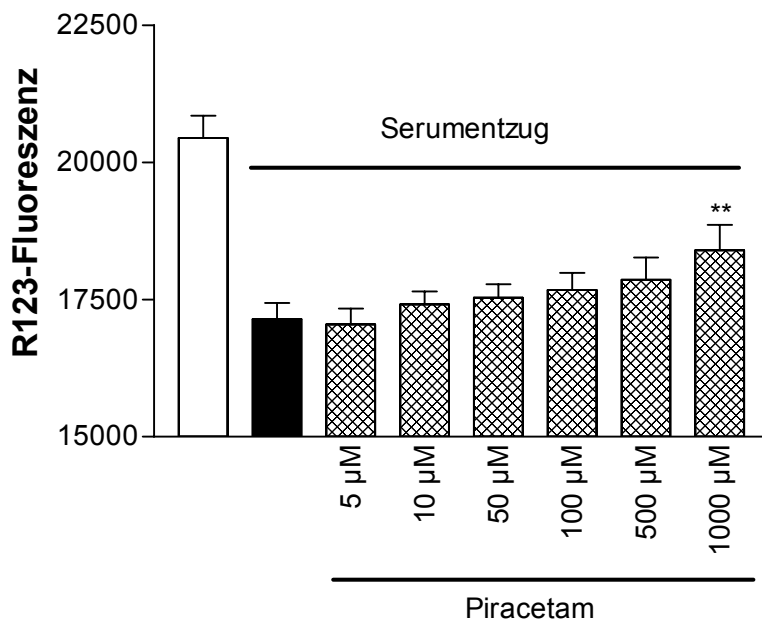
**Abb. 3.31: Piracetam reduziert die mitochondriale Membranpotentialabnahme nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation.**

**A:** PC12-Zellen wurden mit Piracetam vorbehandelt, nach 1 h wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt und insgesamt 6 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. **B:** PC12-Zellen wurden ebenfalls 6 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, aber in diesem Experiment wurde Piracetam 30 min nach Insult hinzugegeben (ANOVA, \*\*p<0.01,\*p<0.05). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 5 – 6 Experimenten.

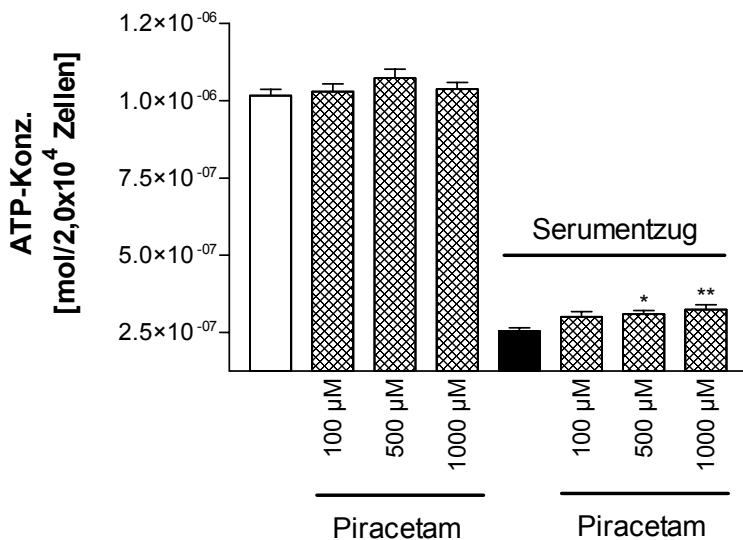
### 3.5.1.3. Piracetam stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug

Genauso wie Ginkgo-biloba-Extrakt sollte auch Piracetam auf seine Fähigkeit überprüft werden, die mitochondriale Funktion nach Serumentzug zu stabilisieren. Es wurde hierzu wiederum ein 24-stündiger Serumentzug durchgeführt und 30 min nach Eintritt des Serumentzuges Piracetam hinzugefügt. Es ist erkennbar, dass Piracetam sowohl den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials als auch die Reduktion der ATP-Spiegel deutlich vermindert (Abb. 3.32). Piracetam schützt also die Mitochondrien vor dem zellulären Stress, der durch Serumentzug hervorgerufen wird.

A



B

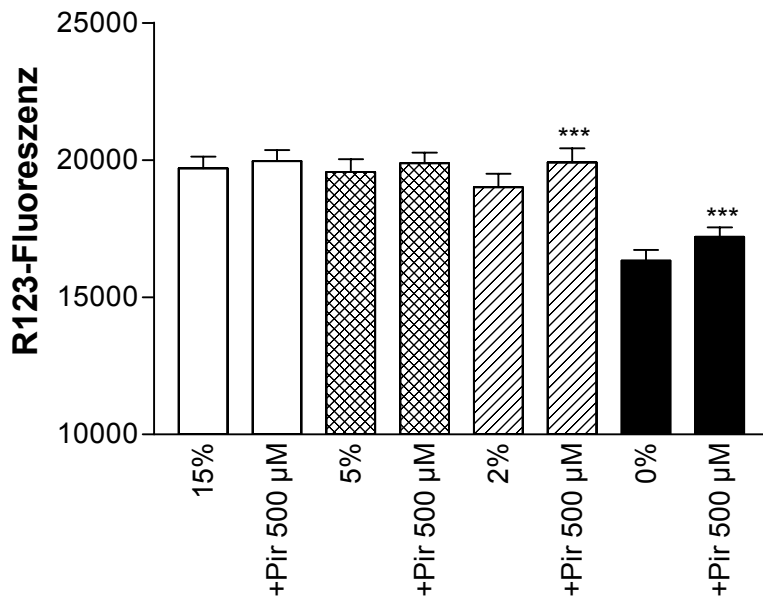


**Abb. 3.32: Die Behandlung mit Piracetam vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach Serumentzug.**

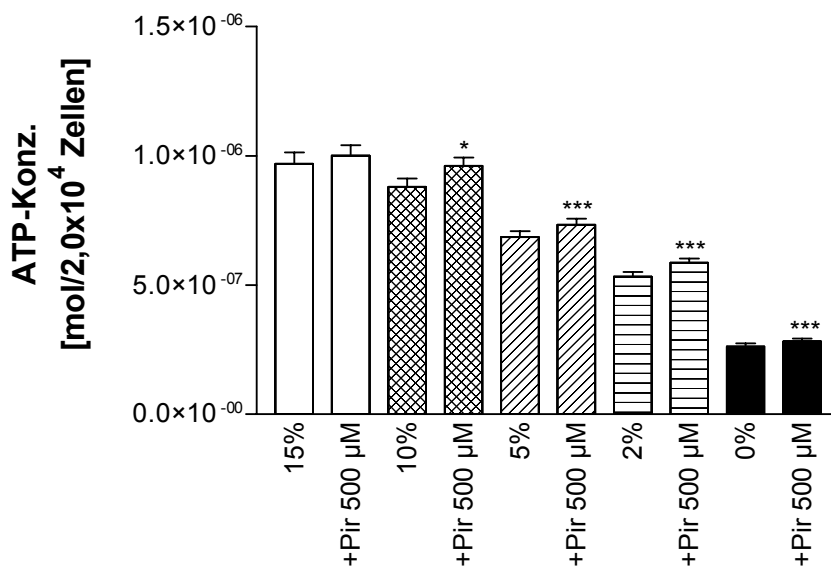
**A:** 24 h Serumentzug, 30 min nach Insult Piracetamzugabe, Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. **B:** gleiche Bedingungen, Bestimmung der ATP-Spiegel (ANOVA,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  versus Serumentzug-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

Serumentzug stellt einen sehr starken Eingriff in den Energiehaushalt der Zelle dar. Um zu untersuchen, ob Piracetam bei milderem Eingriffen einen stärker ausgeprägten Effekt auf die Mitochondrien aufweist, wurde eine stufenweise Serumreduktion durchgeführt. Die Zellen wurden mit Medium, das 15 %, 10 %, 5 %, 2 % und 0 % Medium enthält für 24 h versetzt und 30 min danach Piracetam in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Man erkennt, dass das mitochondriale Membranpotential erst nach einer Serumreduktion auf 2 % Serum leicht abfällt (Abb. 3.33 A). Piracetam ist in der Lage, diesen leichten Abfall komplett zu kompensieren. Bei der Bestimmung der ATP-Spiegel fällt auf, dass die Reduktion der ATP-Spiegel schon bei 10 % Serum im Medium leicht einsetzt und bei 5 % Serum schon stark ausgeprägt ist (Abb. 3.33 B). Bei noch niedrigeren Serumkonzentrationen sinken die ATP-Spiegel immer stärker ab. Bei 10 % Serum ist Piracetam in der Lage, die Abnahme der ATP-Spiegel komplett aufzuheben. Je stärker der Effekt durch die Serumreduktion ist, desto schwächer ist der protektive Effekt von Piracetam ausgeprägt (Abb. 3.33 B). Das heißt, bei 0 % Serum ist der schützende Effekt von Piracetam am geringsten.

A



B

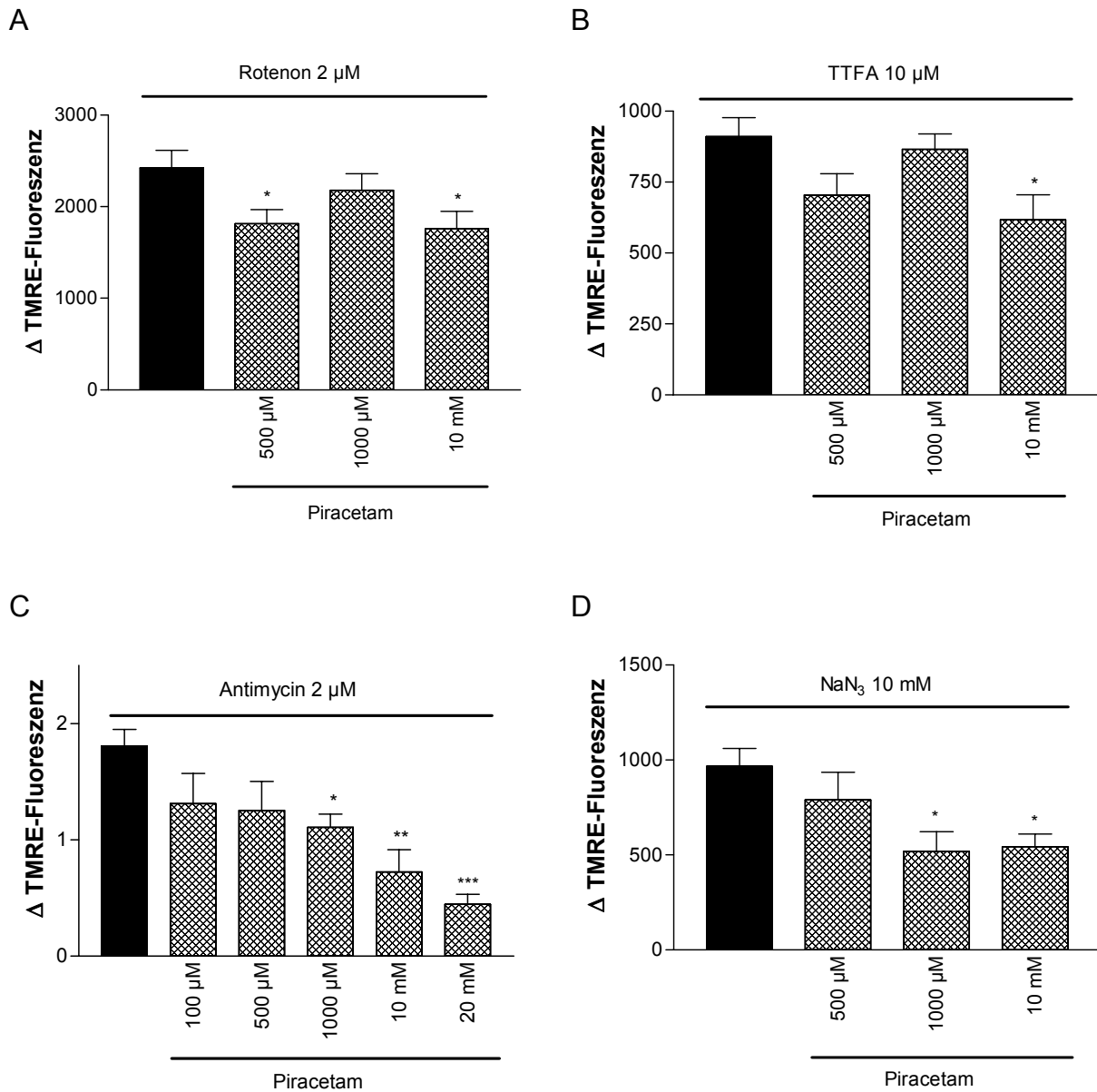


**Abb. 3.33: Piracetam verbessert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach 24 h stufenweiser Serumreduktion.**

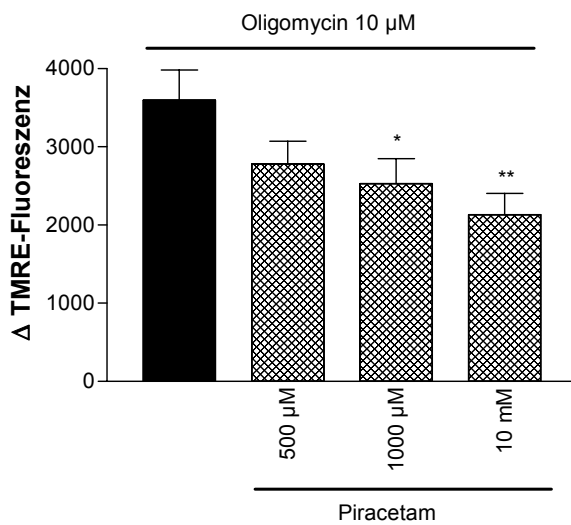
**A:** Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials. **B:** Messung der ATP-Spiegel (gepaarter t-test, \*\*\*p<0.001, \*p<0.05 versus jeweilige Kontrolle). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 10 – 15 Experimenten.

## 3.5.1.4. Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Atmungskette

Da Piracetam protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel aufweist, war es interessant zu untersuchen, ob Piracetam auch protektive Effekte auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe hat. Hierzu wurde mit Piracetam für 6 h vorinkubiert und anschließend das mitochondriale Membranpotential nach Stimulation mit Komplexinhibitoren bestimmt.



E



**Abb. 3.34: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe.**

**A:** Stimulation mit Rotenon 2 µM. **B:** Stimulation mit TTFA 10 µM. **C:** Stimulation mit Antimycin 10 µM. **D:** Stimulation mit  $\text{NaN}_3$  10 mM. **E:** Stimulation mit Oligomycin 10 µM (ANOVA, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus jeweilige Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 – 12 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

Piracetam reduziert die Effekte der verschiedenen Komplexinhibitoren auf das mitochondriale Membranpotential (Abb. 3.34). Die Komplexe I, II und III werden ab einer Piracetamkonzentration von 500 µM geschützt. Eine signifikante Protektion der Komplexe IV und V tritt bei einer Piracetamkonzentration von 1000 µM auf. Piracetam scheint also die Atmungsketten-Komplexe gegenüber dem hemmenden Effekt der Komplexinhibitoren zu schützen.

Piracetam zeigt dementsprechend in unterschiedlichem Ausmaß ausgeprägte Effekte auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe. In der nachfolgenden Tabelle sind die Effekte nochmals zusammengefasst:

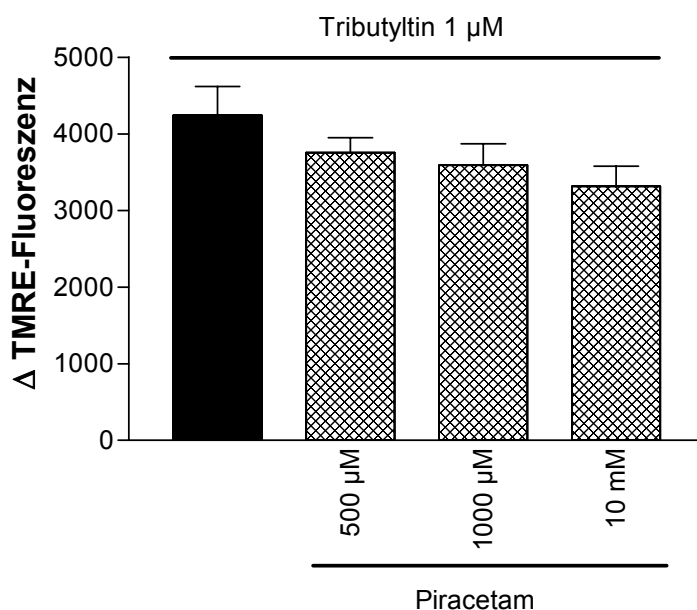


		Schädigung	Protektion durch Piracetam		
			500	1000	10000 $\mu\text{mol/l}$
Komplex I	I	Rotenon	+	+	+
	II	Thenoyltrifluoroacetone	+	+	+
	III	Antimycin	+	+	++
	IV	Natriumazid		+	+
	V	Oligomycin		+	++

**Tabelle 5: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe**

### 3.5.1.5. Keine protektiven Effekte von Piracetam auf die durch Tributyltin induzierte mitochondriale Dysfunktion

Die Effekte von Piracetam auf die durch Tributyltin induzierte mitochondriale Membranpotentialabnahme wurden zusätzlich untersucht. Im Gegensatz zu Ginkgo-biloba-Extrakt weist Piracetam nach 6-stündiger Vorinkubation keinerlei protektive Effekte nach Tributyltin-Stimulation auf (Abb. 3.35).

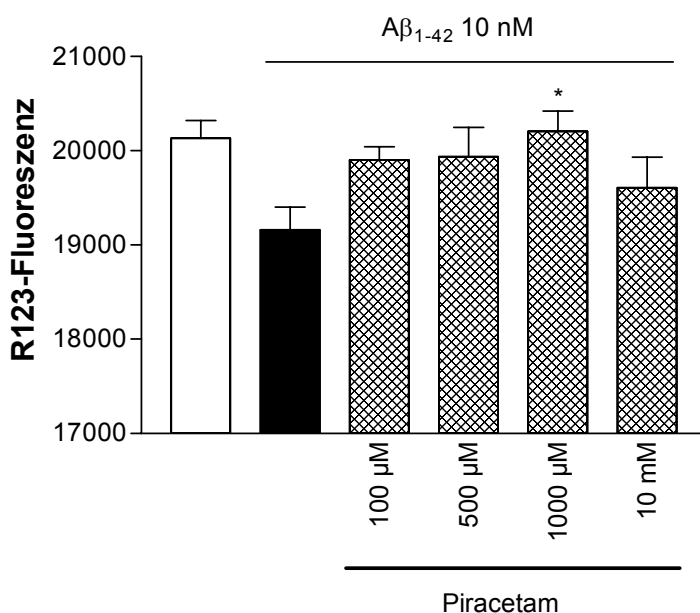


**Abb. 3.35: Piracetam weist keine protektiven Effekte nach Tributyltin-Stimulation auf.**

Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 9 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation mit Tributyltin.

### 3.5.1.6. Protektive Effekte von Piracetam nach extrazellulärer Inkubation mit A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Piracetam ist in der Lage, die Progression von kognitiven Störungen bei AD-Patienten zu reduzieren (Croisile, B. et al., 1993). In Abb. 3.4 konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ <sub>1-42</sub> schädigende Effekte auf das mitochondriale Membranpotential ausübt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Piracetam protektive Effekte auf die A $\beta$ -Neurotoxizität aufweist und somit die Wirksamkeit von Piracetam bei AD-Patienten auf eine Reduktion der A $\beta$ -Neurotoxizität zurückgeführt werden kann. Hierzu wurde über einen Zeitraum von 24 h mit A $\beta$ <sub>1-42</sub> inkubiert, 30 min nach Insult Piracetam hinzugefügt und anschließend das mitochondriale Membranpotential bestimmt. Interessanterweise ist Piracetam in der Lage, die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Inkubation signifikant zu reduzieren (Abb. 3.36). Besonders bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass ab einer Piracetam-Konzentration von 500  $\mu$ M die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch A $\beta$  nahezu vollständig verhindert werden kann.



**Abb. 3.36: Behandlung mit Piracetam reduziert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach A $\beta$ -Stimulation.**

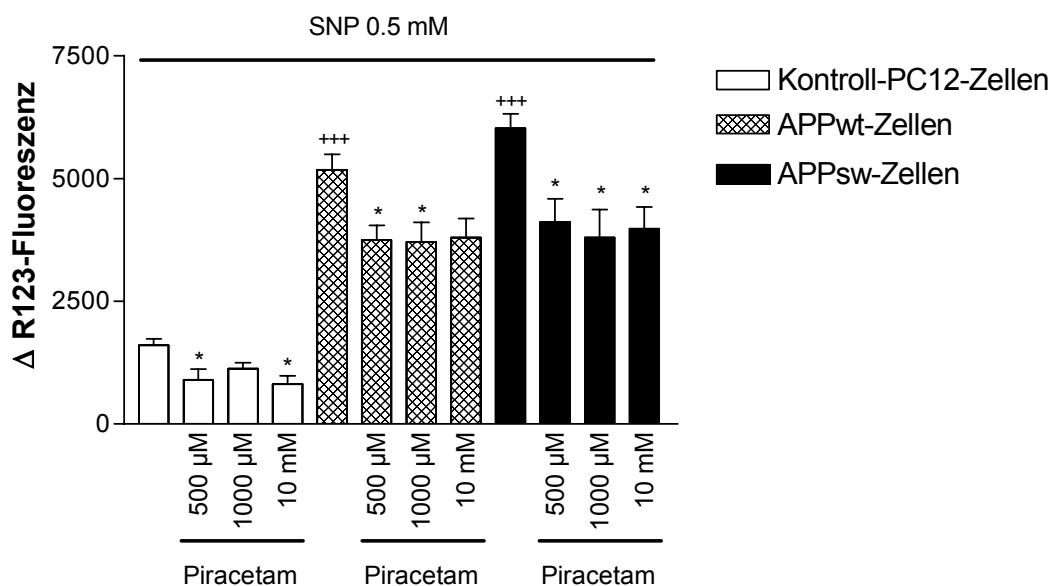
24-stündige A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Inkubation, 30 min nach Insult Piracetamzugabe, anschließend Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (Repeated Measures ANOVA, \*p<0.05 versus A $\beta$ -Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 6 Experimenten.

### 3.5.2. Effekte von Piracetam auf transfizierte Zellen

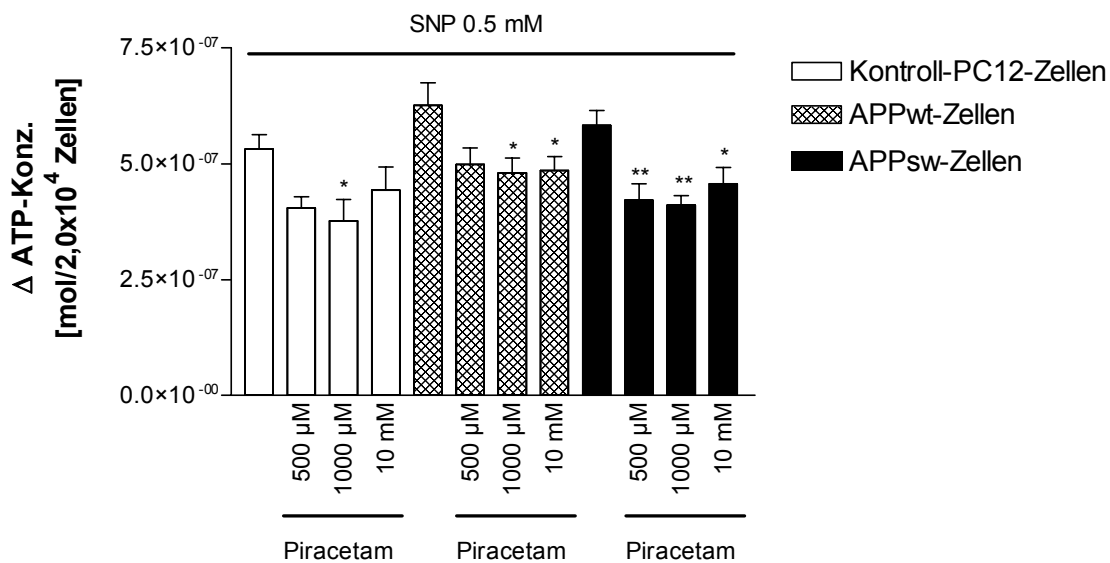
#### 3.5.2.1. Protektiver Effekt von Piracetam nach nitrosativem Stress in APP-transfizierten PC12-Zellen

Da Piracetam protektive Effekte nach extrazellulärer A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Inkubation aufweist, sollte überprüft werden, ob Piracetam auch in den APP-transfizierten PC12-Zellen, die chronisch A $\beta$ -Stress im pikomolaren Bereich ausgesetzt sind, protektive Effekte nach nitrosativem Stress aufweist. Die APP-transfizierten Zellen wurden deshalb über 24 h mit SNP behandelt und 30 min nach Insult Piracetam hinzugefügt und das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel bestimmt. Interessanterweise, ist Piracetam in der Lage, auch in den APPsw-PC12-Zellen die mitochondriale Membranpotentialabnahme und die Reduktion der ATP-Spiegel zu verringern (Abb. 3.37).

A



B



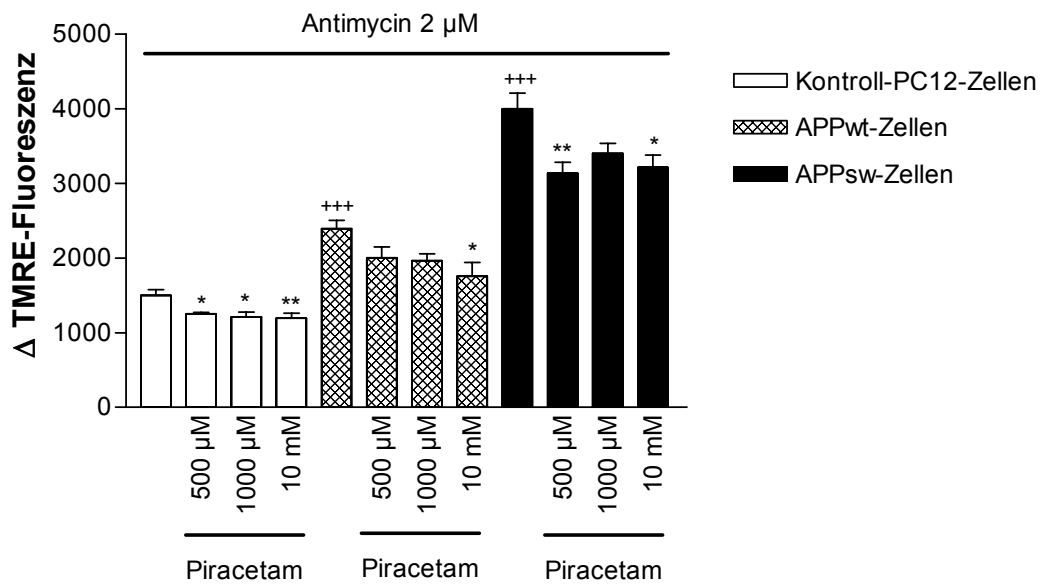
**Abb. 3.37: Piracetam schützt die Mitochondrien von APPsw-PC12-Zellen vor nitrosativem Stress**

**A:** Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials; dargestellt ist der Abfall der R123-Fluoreszenz nach Stimulation mit SNP. **B:** Messung der ATP-Spiegel (ANOVA,  $^{***}p < 0.001$  versus Kontroll-PC12-Zellen,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{*}p < 0.05$  versus jeweilige Kontrolle); dargestellt ist der Abfall der ATP-Konzentration nach Stimulation mit SNP. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 7 – 15 Experimenten.

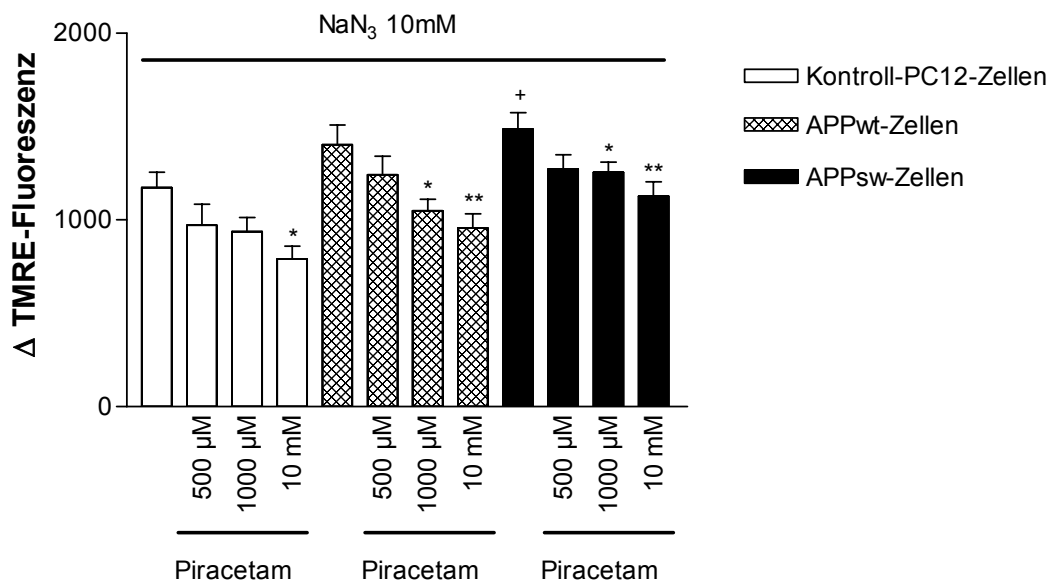
### 3.5.2.2. Piracetam schützt die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe in APP-transfizierten PC12-Zellen

Bei den Komplexen III und IV findet man nach Zugabe von Komplexinhibitoren, wie in Abb. 3.13 gezeigt, in den drei Zelltypen sehr stark unterschiedliche Membranpotentialveränderungen. Beim Komplex III reagieren die APPsw-PC12-Zellen besonders empfindlich, beim Komplex IV reagieren APPwt- und APPsw-PC12-Zellen beide mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen. Aus diesem Grund wurden diese beiden Komplexe ausgewählt und der Effekt von Piracetam untersucht. Piracetam in einer Konzentration von 1000  $\mu$ M ist sogar in den APPsw-PC12-Zellen in der Lage, die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit den Komplexinhibitoren der Komplexe III und IV zu vermindern (Abb. 3.38). Dies ist besonders bemerkenswert, denn die mitochondriale Membranpotentialabnahme ist in den APPsw-Zellen jeweils am stärksten ausgeprägt.

A



B

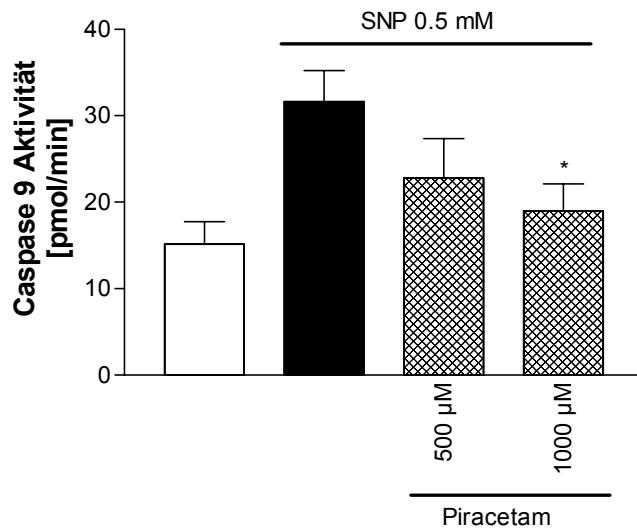


**Abb. 3.38: Behandlung der APPsw-PC12-Zellen mit Piracetam führt zu einem Schutz der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe III und IV.**

**A:** Stimulation mit Antimycin 2  $\mu\text{M}$ . **B:** Stimulation mit  $\text{NaN}_3$  10 mM (ANOVA,  $+++p < 0.001$ ,  $+p < 0.05$  versus Kontroll-PC12-Zellen,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  versus jeweilige Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 9 – 12 Experimenten. Dargestellt ist der Anstieg der TMRE-Fluoreszenz nach Stimulation.

### 3.5.3. Piracetam verringert Caspase-9-Aktivität

Da Caspase 9 einen wichtigen Regulator des intrinsischen Apoptoseweges darstellt, sollten die Effekte von Piracetam auf die Caspase-9-Aktivität untersucht werden. Nach 22-stündiger Piracetamvorinkubation und anschließend 2 h SNP-Inkubation reduzierte Piracetam ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant die Caspase-9-Aktivität (Abb. 3.39).



**Abb. 3.39: Piracetam reduziert die Caspase-9-Aktivität nach SNP-Inkubation.**

22 h Piracetamvorinkubation, anschließend 2 h SNP-Inkubation, Bestimmung der Caspase-9-Aktivität (ANOVA, \* $p < 0.05$  versus SNP-Kontrolle). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 5 Experimenten.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Effekte der schwedischen Doppelmutation auf die NO-Produktion und die mitochondriale Funktion**

#### **4.1.1. Vorteile der APP<sup>sw</sup>-Transfektion im Vergleich zu extrazellulärer A $\beta$ -Inkubation**

Die Alzheimer-Demenz ist gekennzeichnet durch Störungen des Energiehaushaltes (Blass, J. P. et al., 2002) sowie durch Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und Funktion im Gehirn (Hirai, K. et al., 2001). Störungen des Glukosestoffwechsels (Hoyer, S., 2004) und erhöhter oxidativer Stress (Christen, Y., 2000) sind ebenfalls charakteristische Veränderungen im AD-Gehirn und tragen zu mitochondrialer Fehlfunktion bei. Der genaue Entstehungsmechanismus der mitochondrialen Fehlfunktion bei AD ist allerdings noch nicht geklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass das Amyloid-beta-Peptid zu dosisabhängigen mitochondrialen Veränderungen und mitochondrialer Fehlfunktion führt. In den bisherigen Veröffentlichungen zu dieser Thematik wurde A $\beta$  immer extrazellulär hinzugefügt und die mitochondriale Funktion anschließend entweder an isolierten Mitochondrien oder an intakten Zellen untersucht (Pereira, C. et al., 1998; Canevari, L. et al., 1999; Casley, C. S. et al., 2002b; Abramov, A. Y. et al., 2004). Diese Studien sind dahingehend problematisch, als dass A $\beta$  immer in unphysiologisch mikromolarer Konzentration verwendet wurde. Außerdem entspricht die Untersuchung von A $\beta$ -Effekten an isolierten Mitochondrien nicht den tatsächlichen Verhältnissen in der Zelle, da die Mitochondrien aus dem zellulären Kontext entfernt wurden und somit keine Interaktionen mit anderen Zellbestandteilen stattfinden können.

Die Transfektion von PC12-Zellen mit humanem Wildtyp-APP bzw. mit der schwedischen Doppelmutation bietet zum einen die Möglichkeit, chronische Effekte von A $\beta$  im pikomolaren Bereich auf die mitochondriale Funktion (Citron, M. et al., 1992) und zum anderen dosisabhängige Effekte von A $\beta$  zu untersuchen. Die A $\beta$ -Spiegel in den APP<sup>sw</sup>-PC12-Zellen entsprechen den physiologischen A $\beta$ -Spiegeln in Patienten mit sporadischer AD (Scheuner, D. et al., 1996; Selkoe, D. J., 2002). Der Vergleich dieses Zellsystems mit den APP<sup>sw</sup>-transfizierten HEK-Zellen, die A $\beta$ -Spiegel im niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen, bietet die Möglichkeit

dosisabhängige Effekte von A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen. APPsw-HEK-Zellen, die hohe pathologische A $\beta$ -Spiegel aufweisen, spiegeln hierbei die Verhältnisse in Patienten mit familiärer AD wieder (Scheuner, D. et al., 1996). Viele Daten weisen heute daraufhin, dass A $\beta$  intrazellulär gebildet wird (Hartmann, T., 1999). A $\beta$  kann intrazellulär im ER und Golgi-Apparat aggregieren. Früher ging man davon aus, dass aggregiertes A $\beta$  toxische Effekte auslöst, heute wird die Plaque-Bildung nicht mehr als initiales toxisches Ereignis der AD angesehen. Aus diesem Grund haben beide Zellmodelle den Vorteil, dass nicht nur extrazelluläre Effekte von A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion untersucht werden können, sondern dass auch intrazelluläre A $\beta$ -Effekte und Effekte von anderen APP-Prozessierungsprodukten wie z.B. AICD auf die mitochondriale Funktion erfasst werden können. Diese Tatsache ist besonders wichtig, denn zum einen wird heute diskutiert, dass intrazelluläres A $\beta$  toxische Effekte aufweist und zum anderen ist bekannt, dass AICD in ausdifferenzierten PC12-Zellen neurotoxische Effekte aufweist (Kim, H. S. et al., 2003). Die Effekte von intrazellulärem A $\beta$  und AICD könnten ebenfalls zu den toxischen Effekten auf mitochondrialer Ebene beitragen.

Da bei einem Großteil der Patienten die AD sporadischer Natur ist und APPsw-PC12-Zellen diesen Verlauf der Erkrankung widerspiegeln, wurden die meisten Versuche auch mit diesem Zellmodell durchgeführt.

#### **4.1.2. Effekte von A $\beta$ auf den NO-Stoffwechsel**

Die Daten in dieser Arbeit weisen daraufhin, dass NO eine sehr wichtige Rolle bei der A $\beta$ -induzierten mitochondrialen Dysfunktion und bei Zelltodprozessen spielt. Die Expression der schwedischen Doppelmutation führt sowohl in PC12- als auch in HEK-Zellen zu einem Anstieg der NO-Spiegel (Abb. 3.1, S. 71). Dieser Anstieg ist wesentlich stärker ausgeprägt als nach 24-stündiger extrazellulärer A $\beta$ -Inkubation von untransfizierten PC12-Zellen, nach der nur ein leichter Anstieg erkennbar ist (Abb. 3.1, S. 71). Die extrazelluläre A $\beta$ -Gabe kann also den langfristigen kumulierenden Effekt der APPsw-Transfektion nicht komplett nachahmen, was dafür spricht, dass intrazelluläre Effekte in APPwt- und APPsw-Zellen maßgeblich am A $\beta$ -induzierten NO-Anstieg beteiligt sind (Kienlen-Campard, P. et al., 2002).

Außerdem weisen die Daten daraufhin, dass der NO-Anstieg durch eine erhöhte NO-Synthaseaktivität hervorgerufen wird, denn die NO-Spiegel der APPsw-PC12-Zellen können durch den unselektiven NO-Synthase-Hemmstoff, L-NAME, auf die Level der



Kontroll-PC12-Zellen gesenkt werden (Abb. 3.2, S. 73). Beteiligt am A $\beta$ -induzierten NO-Anstieg sind, wie in Abb. 3.2 gezeigt, die neuronale und die induzierbare NO-Synthase. Eine Beteiligung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, denn es sind bisher keine selektiven eNOS-Inhibitoren erhältlich. Daten von Parks et al. weisen ebenfalls daraufhin, dass A $\beta$  seine neurotoxischen Effekte über einen NO-Synthase-Mechanismus vermittelt (Parks, J. K. et al., 2001). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die durch A $\beta$ -induzierte ROS-Bildung durch einen unselektiven NOS-Hemmstoff signifikant gesenkt werden kann. Es wurde jedoch in dieser Studie keine Aussage darüber getroffen, welche Isoform daran beteiligt ist. Der Befund aus der hier vorliegenden Arbeit, dass die iNOS und die nNOS am A $\beta$ -induzierten NO-Anstieg beteiligt sind, deckt sich mit Daten von Law et al., die zeigen konnten, dass primäre Rattenneuronenkulturen nach A $\beta_{1-42}$ -Inkubation mit einer verstärkten NO-Freisetzung reagieren (Law, A. et al., 2001a) und dass diese NO-Freisetzung unter Beteiligung der nNOS und der iNOS erfolgt. Es gibt zusätzlich Hinweise, dass A $\beta$  in PC12-Zellen zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) wie z.B. ERK 1 und ERK 2 führt und dass diese zur Phosphorylierung von CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) führen können (Sato, N. et al., 1997). Der Promotor des nNOS-Gens enthält CREs (*cAMP/ Ca<sup>2+</sup> response elements*). An diese CREs bindet CREB und reguliert somit die nNOS-Expression (Sasaki, M. et al., 2000). A $\beta$  scheint also über eine Aktivierung von MAP-Kinasen, die Phosphorylierung von CREB zu fördern und somit die nNOS-Expression zu verstärken. Zusätzlich gibt es Daten über eine gesteigerte iNOS-Expression und erhöhte NO-Produktion nach A $\beta$ -Stimulation in Astrozyten (Ayasolla, K. et al., 2004). Die Autoren konnten zeigen, dass die gesteigerte iNOS-Expression über die Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  vermittelt wird. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Effekt von A $\beta$  auf die NMDA-Rezeptor-induzierte LTP (*long-term potentiation*) untersucht. A $\beta$  führte zu einer Hemmung der durch NMDA-Rezeptoren induzierten LTP. Interessanterweise war dieser Effekt in iNOS-knock-out-Mäusen und nach Stimulation mit dem iNOS-Hemmstoff 1400W verschwunden, was darauf hinweist, dass A $\beta$  den hemmenden Effekt auf die LTP über eine Stimulation der iNOS-Aktivität bewirkt. A $\beta$  scheint demnach die NO-Produktion über eine Aktivierung von NO-Synthasen zu steigern. Darüber hinaus konnten Hanson et al. zeigen, dass der NO-Donor SIN-1 in Neuroblastom-Zellen, die humanes Wildtyp-APP überexprimieren, die Sekretion von

A $\beta$ <sub>1-40</sub>, jedoch nicht von A $\beta$ <sub>1-42</sub> signifikant erhöht (Hanson, A. J. et al., 2003). Es könnte sich also um einen positiven Rückkopplungsmechanismus handeln, das heißt A $\beta$  erhöht die NO-Spiegel und erhöhte NO-Spiegel führen zu verstärkter A $\beta$ <sub>1-40</sub>-Sekretion. Es wäre dementsprechend in weiterführenden Untersuchungen interessant, die APPsw-PC12-Zellen mit einem NO-Donor zu stimulieren und anschließend die A $\beta$ -Produktion zu bestimmen.

APPsw-PC12-Zellen haben jedoch nicht nur erhöhte NO-Spiegel, sondern weisen auch nach Stimulation mit NO-Donoren höhere NO-Spiegel auf als APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen (Abb. 3.3, S. 75). Dies könnte auf eine erniedrigte Bindungskapazität von NO in APPsw-PC12-Zellen hinweisen. NO wird in Mitochondrien hauptsächlich an Proteinthiole gebunden (Costa, N. J. et al., 2003). Wichtige Thiole in Mitochondrien sind beispielsweise Glutathion, Glutathionperoxidase, Glutaredoxin, Thioredoxin und Peroxiredoxin. Der Glutathionpool ist der wichtigste Thiol-Redox-Puffer der Mitochondrien (Costa, N. J. et al., 2003). Die einzige Möglichkeit, wie NO direkt mit Thiolen reagieren kann, ist über Thiyl-Radikale, und diese Reaktion führt zur Bildung von S-Nitrosothiolen. Eine weitere Möglichkeit zur Reaktion von Thiolen mit NO erfolgt über die Bildung von Peroxynitrit und anschließender Reaktion mit Thiolen. Es ist durchaus vorstellbar, dass in APPsw-PC12-Zellen, die basal schon erhöhte NO-Spiegel aufweisen, mehr Thiolbindungsstellen besetzt sind und somit extern zugeführtes NO in APPsw-PC12-Zellen schlechter abgepuffert werden kann, woraus dann höhere NO-Spiegel nach Stimulation mit NO-Donoren resultieren.

#### **4.1.3. Effekte von A $\beta$ auf die mitochondriale Atmungskette**

Die mitochondriale Atmungskette ist sehr empfindlich gegenüber dem Angriff von NO und Peroxynitrit (Brown, G. C. and Borutaite, V., 2002; Radi, R. et al., 2002; Sarti, P. et al., 2003). In Übereinstimmung mit diesem Befund weisen sowohl APPwt- als auch APPsw-PC12-Zellen eine reduzierte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität auf. Die Reduktion der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität ist allerdings in APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt als in APPwt-PC12-Zellen (Abb. 3.12, S. 88), was auf A $\beta$ -dosisabhängige Effekte hinweist. Ursache für die reduzierte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität könnte hierbei ein direkter hemmender Effekt von NO sein (Sarti, P. et al., 2000; Cooper, C. E., 2002). Passend zu diesen Daten weisen auch viele Studien an AD-Patienten auf eine Beeinträchtigung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität hin

(Maurer, I. et al., 2000; Cottrell, D. A. et al., 2002; Cardoso, S. M. et al., 2004). In Ergänzung dazu konnte auch eine Reduktion der Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheiten in AD-Gehirnen gefunden werden (Kish, S. J. et al., 1999; Ojaimi, J. et al., 1999). Zusätzlich ergab die Messung des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit selektiven Komplexinhibitoren für die Komplexe II, III, und V eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in APPsw-PC12-Zellen, was auf eine Beeinträchtigung der Atmungsketten-Komplexe II, III und V in diesen Zellen hinweist (Abb. 3.13, S. 89). Da Peroxynitrit in der Lage ist, alle Atmungsketten-Komplexe gleichermaßen zu hemmen, könnte diese Beeinträchtigung durch Peroxynitrit hervorgerufen werden. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist der Befund, dass in APPwt-PC12-Zellen die Komplexe IV und V ebenfalls beeinträchtigt sind. Die niedrigen A $\beta$ -Spiegel in APPwt-PC12-Zellen scheinen die Funktion der Komplexe IV und V zu beeinträchtigen. Sie reagieren dementsprechend besonders empfindlich auf A $\beta$ . Interessanterweise findet man auch bei Behandlung von primären Rattenneuronen mit A $\beta$  einen Abfall der Aktivitäten aller mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe (Casley, C. S. et al., 2002b). Zusätzlich konnte in Gehirnen von AD-Patienten eine Reduktion von Komplex-I-Untereinheiten gefunden werden (Kim, S. H. et al., 2000).

Zusätzlich zu der Hemmung der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe durch die erhöhten NO-Spiegel in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen könnte auch das Vorhandensein von APP bzw. A $\beta$  im Mitochondrium eine Funktionsstörung der Atmungsketten-Komplexe hervorrufen. In Versuchen am konfokalen Laserscanmikroskop konnte APP im Mitochondrium von APPsw-PC12-Zellen durch eine Kolokalisation des APP-Antikörpers mit dem mitochondrienselektiven ATP-Synthase-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.9, S. 85). Ergänzend hierzu konnte Astrid Bonert mittels Westernblot ebenfalls APP in der mitochondrialen Fraktion von APPsw-PC12-Zellen nachweisen (Bonert, A. et al., 2004). Passend zu diesem Befund konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass APP in neuronalen Mitochondrien APP-transgener Mäuse lokalisiert ist und somit mitochondriale Dysfunktion und eine Hemmung der ATP-Synthese bewirkt (Anandatheerthavarada, H. K. et al., 2003). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus nachweisen, dass der N-Terminus von APP hierbei im Mitochondrium und der C-Terminus außerhalb des Mitochondriums lokalisiert ist. Sequenzanalysen von APP zeigten, dass drei positive Ladungen an den Aminosäurepositionen +40, +44 und

+51 verantwortlich sind für die Anreicherung von APP im Mitochondrium. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass mitochondriales APP in direktem Kontakt mit dem mitochondrialen Translokase-Protein TOM 40 steht. Die Arbeitsgruppe geht deshalb davon aus, dass die mitochondriale Dysfunktion durch eine Hemmung der mitochondrialen Transportproteine durch mitochondriales APP hervorgerufen wird. Lustbader et al. konnten zusätzlich A $\beta$  im Mitochondrium von AD-Gehirnen und von APP-transgenen Mäusen nachweisen (Lustbader, J. W. et al., 2004). Sie zeigten, dass A $\beta$  im Mitochondrium an ABAD (*A $\beta$ -binding alcohol dehydrogenase*) gebunden ist und somit in APP-transgenen Mäusen zu Cytochrom-C-Freisetzung, ROS-Bildung und erhöhter Apoptoserate führt. Die Blockade von ABAD mit Hilfe eines ABAD-Decoy-Peptids führte zu einer Hemmung der Cytochrom-C-Freisetzung, einer verminderten ROS-Bildung und zu einer reduzierten Apoptoserate, was die Wichtigkeit von ABAD bei der A $\beta$ -induzierten mitochondrialen Dysfunktion bestätigt. Die Hemmung von ABAD könnte dementsprechend die mitochondriale Dysfunktion reduzieren und stellt somit einen möglichen Therapieansatz bei AD dar. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls A $\beta$ -Anreicherungen in Mitochondrien kortikaler Neurone von AD-Patienten finden (Fernandez-Vizarra, P. et al., 2004). Interessanterweise waren A $\beta$ -Anreicherungen im Mitochondrium in einem früheren Stadium der AD-Erkrankung erkennbar als gepaarte helikale Tau-Filamente, was darauf hinweist, dass mitochondriale Fehlfunktion ein sehr frühes Ereignis in der Pathogenese der AD darstellt. Zusätzlich stützt dieser Befund die These, dass die Anreicherung von A $\beta$  vor der Bildung von helikalen Tau-Filamenten erfolgt. Diese Studien bestätigen die Vermutung, dass APP bzw. A $\beta$  in Mitochondrien lokalisiert ist und zu einer Störung der mitochondrialen Atmungskettenfunktion führen können. Man kann deshalb davon ausgehen, dass mitochondriale Fehlfunktion auf der einen Seite über erhöhte NO-Spiegel und auf der anderen Seite durch direkte Effekte von APP bzw. A $\beta$  auf die Mitochondrien hervorgerufen werden kann. Die Arbeitsgruppe um Casley geht davon aus, dass intrazellulär gebildetes A $\beta$  in der Lage ist, direkt an die Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheiten zu binden und somit die Anlagerung von Cytochrom C zu verhindern (Casley, C. S. et al., 2002a). Diese Daten stimmen überein mit Untersuchungen von Parker et al., die zeigen, dass isolierte Cytochrom-C-Oxidase aus AD-Gehirnen einen Verlust zweier Cytochrom-C-Bindungsstellen aufweist (Parker, W. D., Jr. and Parks, J. K., 1995). Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere APP-Prozessierungsprodukte wie AICD

schädigende Effekte auf die Mitochondrien ausüben. Um genauere Erkenntnisse zu erlangen, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

#### **4.1.4. Effekte von A $\beta$ auf die ATP-Spiegel**

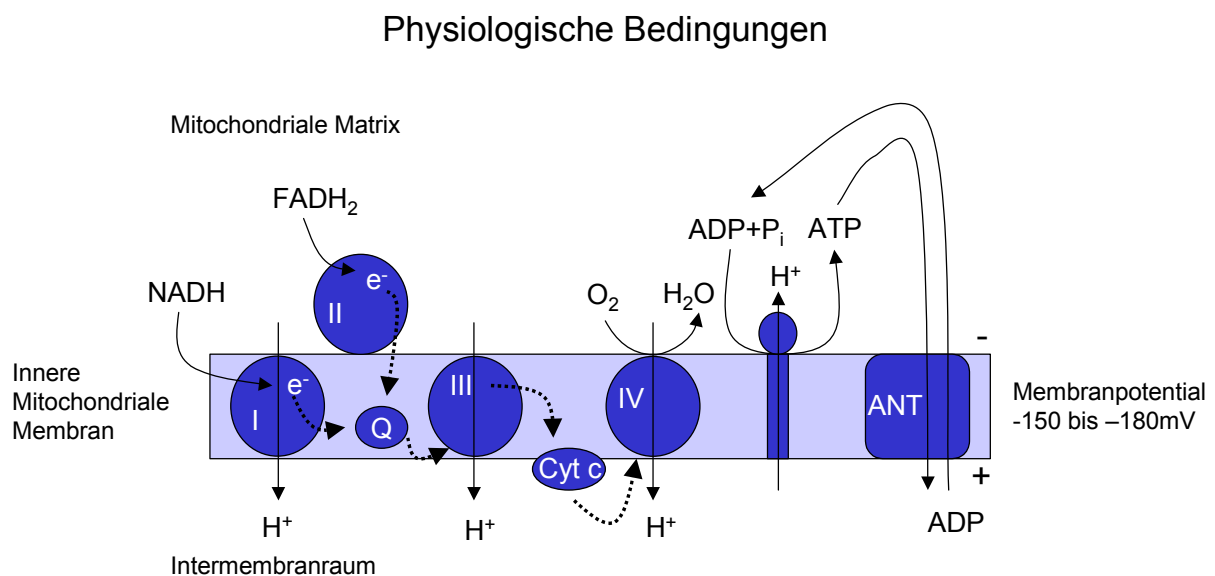
Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette in APPsw-PC12-Zellen stimmt überein mit den basal erniedrigten ATP-Spiegeln in APPsw-PC12-Zellen verglichen mit APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen (Abb. 3.5, S. 78). Interessant in diesem Zusammenhang ist der Befund, dass APPwt-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen auch schon erniedrigte ATP-Spiegel aufweisen, dass der Effekt aber nicht so stark ausgeprägt ist wie in APPsw-PC12-Zellen. Die reduzierten ATP-Spiegel in APPwt-Zellen lassen sich durch die Beeinträchtigung der Komplexe IV und V erklären. Die sehr niedrigen A $\beta$ -Spiegel der APPwt-PC12-Zellen üben dementsprechend auch schon einen hemmenden Effekt auf die ATP-Synthese aus. Interessanterweise schlägt sich die ATP-Reduktion in APPwt- und APPsw-PC12-Zellen noch nicht auf die Überlebensrate der Zellen nieder, denn APPwt- und APPsw-PC12-Zellen weisen basal keine erhöhten Apoptoselevel auf (Marques, C. A. et al., 2003). Die APPsw-PC12-Zellen scheinen also in der Lage zu sein, den beeinträchtigten Energiehaushalt zu kompensieren. Anders ist die Situation in APPsw-HEK-Zellen: APPsw-HEK-Zellen weisen basal ebenfalls signifikant erniedrigte ATP-Spiegel auf (Abb. 3.5, S. 78). Die ATP-Reduktion ist noch stärker ausgeprägt als in APPsw-PC12-Zellen, was wiederum auf A $\beta$ -dosisabhängige Effekte schließen lässt. APPsw-HEK-Zellen können das ATP-Defizit nicht ausgleichen und weisen deshalb basal eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Kontroll-HEK-Zellen auf (Marques C.A. et al., 2004).

Nach extrazellulärer A $\beta$ -Behandlung von untransfizierten PC12-Zellen findet nur eine leichte Reduktion der ATP-Spiegel statt (Abb. 3.5, S. 78), was wiederum darauf hinweist, dass A $\beta$  seine schädigenden Effekte auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel in erster Linie durch intrazelluläre Effekte hervorruft. Um ausschließen zu können, dass ein Verlust an Mitochondrien die Reduktion der ATP-Spiegel bedingt, wurde die Anzahl der Mitochondrien bestimmt. Aufgrund der ermittelten Daten kann ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der ATP-Spiegel durch einen Verlust an Mitochondrien hervorgerufen wird, denn die APPsw-Transfektion erhöht sowohl in PC12-Zellen als auch in HEK-Zellen die Anzahl der Mitochondrien (Abb. 3.9, S. 85). Die ATP-Reduktion scheint dementsprechend durch

mitochondriale Fehlfunktion hervorgerufen zu werden und nicht Folge eines Verlustes an Mitochondrien zu sein. Die erhöhte Anzahl der Mitochondrien in APPsw-Zellen könnte zum einen durch die erhöhten NO-Spiegel und zum anderen durch das chronische ATP-Defizit hervorgerufen werden. Die Zellen könnten versuchen, das ATP-Defizit durch eine gesteigerte Mitochondriensynthese auszugleichen. Nisoli et al. konnten ebenfalls eine gesteigerte Mitochondriensynthese nach Inkubation mit NO-Donoren in einer humanen Zelllinie zeigen (Nisoli, E. et al., 2003). Die erhöhte Mitochondriensynthese wurde in diesem Fall durch eine erhöhte mRNA-Expression des Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden-Rezeptor-Gamma-Koaktivator-1-Alpha (PGC-1 $\alpha$ ) hervorgerufen. PGC-1 $\alpha$  stellt einen Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese dar (Lehman, J. J. et al., 2000). Er erhöht die Expression des nukleären Atmungsfaktors (*nuclear respiratory factor-1*, *NRF-1*) und des Mitochondrientranskriptionsfaktors (mtTFA). Diese verstärken die Expression von nukleären und mitochondrialen Genen, die bei der Mitochondriensynthese eine wichtige Rolle spielen. Man kann also davon ausgehen, dass die chronisch erhöhten NO-Spiegel in APPsw-PC12- und APPsw-HEK-Zellen die Mitochondriensynthese erhöhen. Zusätzlich weisen viele Daten daraufhin, dass oxidativer Stress die Mitochondrienmasse und den mitochondrialen DNA-Gehalt signifikant erhöht (Lee, H. C. et al., 2000; Wei, Y. H. et al., 2001; Lee, H. C. et al., 2002). Es wurden beispielsweise humane Lungenfibroblasten über 48 h mit Wasserstoffperoxid behandelt und anschließend die mitochondriale Masse und der mtDNA-Gehalt bestimmt. Beide Parameter waren nach oxidativem Stress signifikant erhöht. Die erhöhte mitochondriale Biogenese nach mildem oxidativem Stress wird hierbei wiederum über eine Erhöhung der mRNA-Spiegel des nukleären Atmungsfaktors (NRF-1) und des Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden-Rezeptor-Gamma-Koaktivators-1-Alpha hervorgerufen (Lee, H. C. et al., 2002). Die Hochregulierung der Anzahl Mitochondrien stellt eine Art Kompensationsmechanismus der Zelle dar, um das Energiedefizit zu verringern. Dieser Kompensationsmechanismus ist aber trotzdem nicht ausreichend, um die reduzierten ATP-Spiegel in APPsw-PC12- und APPsw-HEK-Zellen auszugleichen.

#### 4.1.5. Einfluss von A $\beta$ auf das mitochondriale Membranpotential

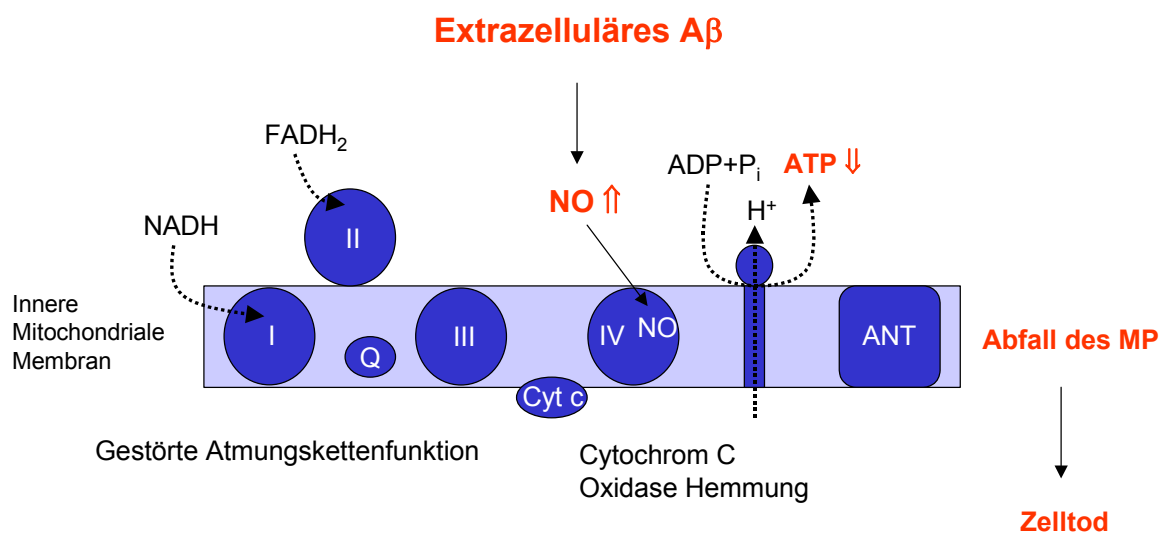
Das mitochondriale Membranpotential stellt ebenfalls einen sehr wichtigen Marker für die Funktion der Mitochondrien dar. Ausgehend von NADH werden die Elektronen über die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe auf Sauerstoff übertragen. Gleichzeitig werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt, wodurch ein Spannungsgradient (Membranpotential) aufgebaut wird. Unter physiologischen Bedingungen wird ein mitochondriales Membranpotential von ca.  $-150$  bis  $-180$  mV aufrechterhalten (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Membranpotential unter physiologischen Bedingungen**

Nach akuter extrazellulärer A $\beta_{1-42}$ -Inkubation kommt es zu einem leichten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials bei A $\beta$ -Konzentrationen im nanomolaren Bereich (Abb. 3.4, S. 76), die nicht physiologischen Verhältnissen entsprechen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Studien, die ebenfalls nach extrazellulärer A $\beta$ -Inkubation eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in PC12-Zellen beobachten konnten (Pereira, C. et al., 1998; Jang, J. H. and Surh, Y. J., 2003). Extrazelluläre A $\beta_{1-42}$ -Inkubation führt zu einem Anstieg der NO-Spiegel, gefolgt von einer Hemmung des Komplexes IV der Atmungskette und einer Reduktion der ATP-

Spiegel (Abb. 4.2). Diese Hemmung der mitochondrialen Atmungskette führt zu einem Abfall der entlang der Atmungskette transportierten Elektronen und somit zu einem verminderten Austransport von Protonen, was zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials führt. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist ein wichtiger Induktor des mitochondrialen apoptotischen Zelltodweges.

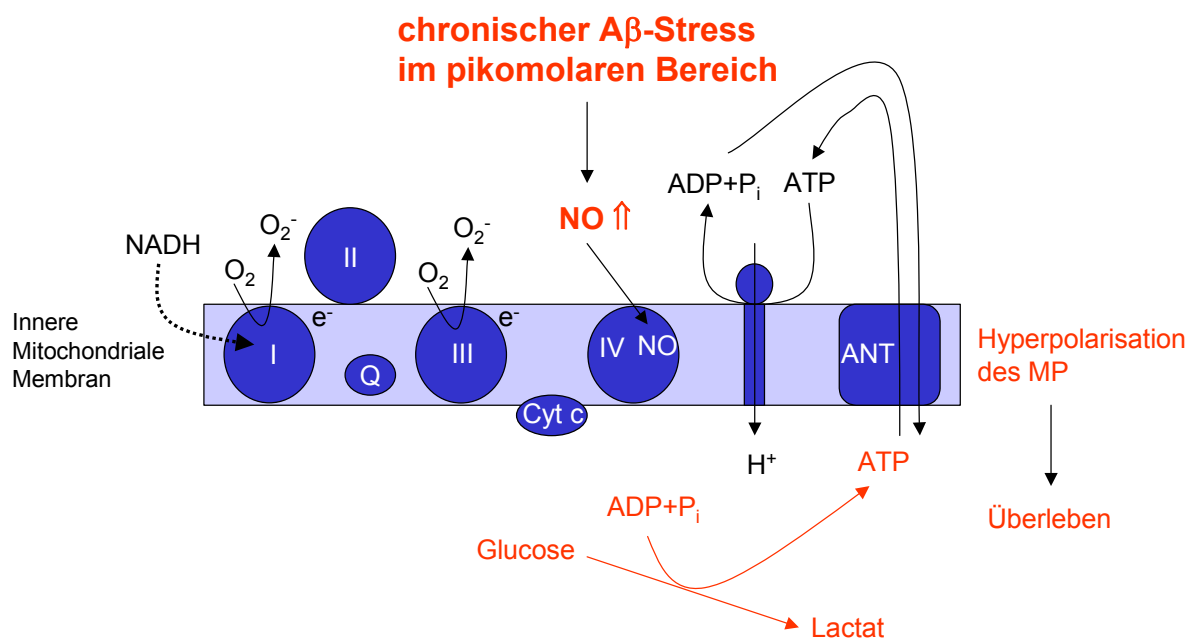


**Abb. 4.2: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (MP) nach 24-stündiger extrazellulärer Aβ-Inkubation.**

Im Gegensatz hierzu weisen APPsw-PC12-Zellen eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials auf (Abb. 3.4, S. 76). Sie sind chronisch Aβ-Spiegeln im pikomolaren Bereich ausgesetzt. Man kann davon ausgehen, dass sie, um zelluläre Funktionen und Zellviabilität aufrechtzuerhalten, eine Art Abwehrmechanismus aufweisen. Folgender Mechanismus ist vorstellbar: APPsw-PC12-Zellen weisen aufgrund der erhöhten NO-Spiegel eine chronische Hemmung der mitochondrialen Atmungskette auf (Abb. 4.3). Diese Hemmung führt zu einer vorübergehenden Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Die chronische Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch die erhöhten NO-Spiegel führt im Sinne einer Adaption dazu, dass die ATP-Synthase ihre Funktion umdreht (Moncada,



S. and Erusalimsky, J. D., 2002). Sie hydrolysiert nun zytosolisches ATP zu ADP und Phosphat und pumpt gleichzeitig Protonen in den Intermembranraum. Dies wiederum trägt zur Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials bei. Gleichzeitig hat die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch NO eine Steigerung der anaeroben Glykolyserate zur Folge (Almeida, A. et al., 2001). Das mittels Glykolyse gebildete ATP kann mit Hilfe des Adenin-Nukleotid-Translokators (ANT) ins Mitochondrium aufgenommen werden und steht somit der ATP-Synthase zur Verfügung. Die ATP-Synthase hydrolysiert das über den ANT aufgenommene ATP und pumpt vermehrt Protonen in den Intermembranraum. Dies führt zur Hyperpolarisation der inneren mitochondrialen Membran und zum Überleben der Zellen.



**Abb. 4.3: Bei chronischem  $\beta$ -Stress zeigen APPsw-PC12-Zellen einen Abwehrmechanismus.**

Die Glykolyserate wird gesteigert und es kommt zu einer Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (MP).

APPsw-PC12-Zellen weisen, wie in Abb. 3.12 (S. 88) und Abb. 3.13 (S. 89) gezeigt, eine fehlerhafte mitochondriale Atmungskette auf. Es wäre deshalb durchaus

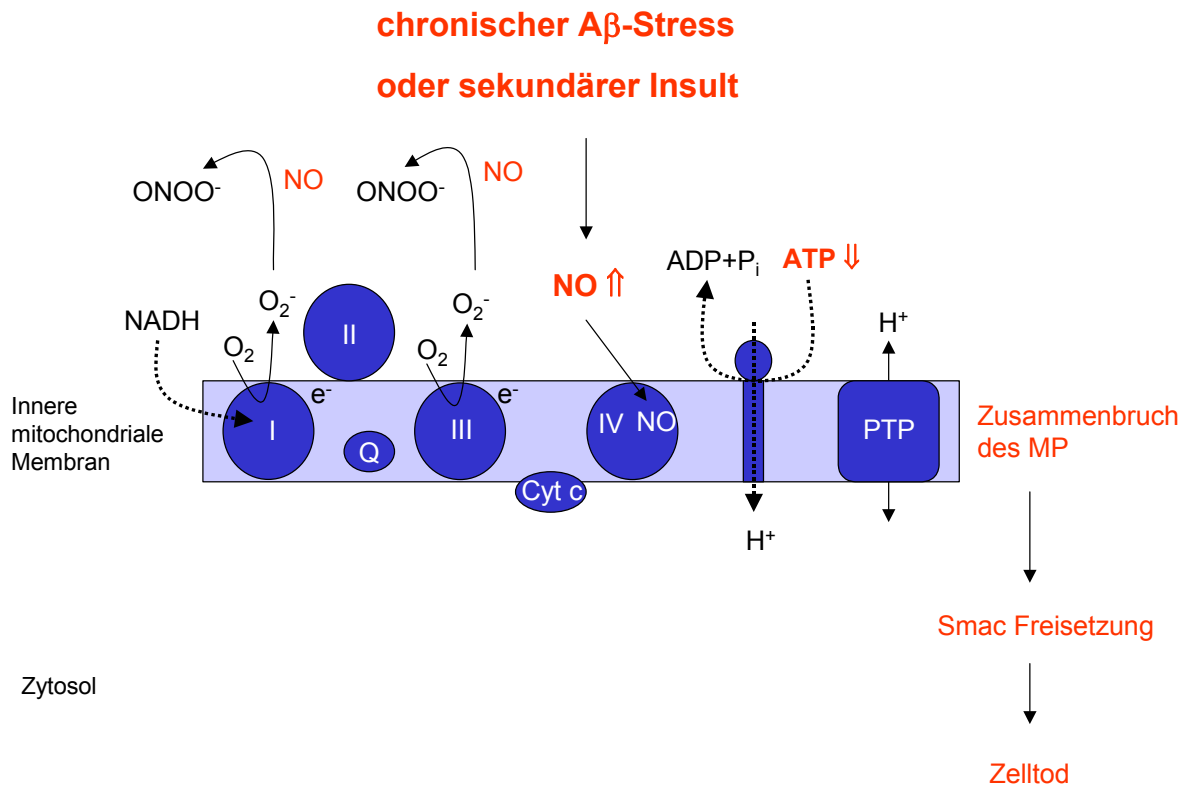
denkbar, dass sie auf glykolytisch gewonnenes ATP angewiesen sind, um überleben zu können. In Zellen, deren mitochondriale DNA komplett entfernt wurde und die auf glykolytisch gewonnenes ATP angewiesen sind, erfolgt der ATP-Transport ins Mitochondrium über den ANT-Isoform 2 (Loiseau, D. et al., 2002). Der Adenin-Nukleotid-Translokator wird in diesen Zellen überexprimiert, um vermehrt ATP aufnehmen zu können. Zellen, die mutierte mitochondriale DNA enthalten, weisen ebenfalls eine gesteigerte Glykolyserate auf (Gajewski, C. D. et al., 2003). Interessanterweise wurden im Liquor von AD-Patienten erhöhte Laktatspiegel gefunden, was ebenfalls auf eine gesteigerte Glykolyserate hinweist (Redjems-Bennani, N. et al., 1998; Parnetti, L. et al., 2000). Mancuso et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass auch die Blut-Laktatkonzentrationen in Patienten mit AD signifikant erhöht sind (Mancuso, M. et al., 2003). Die Laktatspiegel waren hierbei invers korreliert mit der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität in Thrombozyten dieser Patienten. Eine Steigerung der Glykolyserate zum Ausgleich von Energiedefiziten scheint also auch bei Patienten mit sporadischer AD einen wichtigen Abwehrmechanismus darzustellen. Es wäre deshalb sehr interessant in einem weiteren Projekt die Laktatspiegel im Medium und im Lysat von APPsw-PC12-Zellen zu messen, um zu überprüfen, ob die Glykolyserate in diesen Zellen erhöht ist.

Wie kommt es nun zur gesteigerten Glykolyse durch erhöhte NO-Spiegel? Man geht heute davon aus, dass NO zu einer Phosphorylierung der AMP-aktivierten Protein-Kinase und somit zu einer Aktivierung der Phosphofruktokinase 2 führt (Almeida, A. et al., 2004). Die Phosphofruktokinase 2 induziert die Bildung von Fruktose-2,6-Bisphosphat, dem Hauptaktivator der Phosphofruktokinase 1 (Van Schaftingen, E. et al., 1982). Phosphofruktokinase 1 stellt den wichtigsten Regulator der Glykolyse dar (Uyeda, K., 1979). Es wäre dementsprechend interessant zu untersuchen, ob die APPsw-PC12-Zellen aufgrund der erhöhten NO-Spiegel auch eine erhöhte Aktivität der AMP-aktivierten Kinase und der nachgeschalteten Enzyme aufweisen. Sehr interessant in diesem Zusammenhang ist der Befund, dass die AMP-aktivierte Kinase in der Lage ist, die c-Jun-Kinase zu aktivieren (Kefas, B. A. et al., 2003). Celio Marques konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass die c-Jun-Kinase-Aktivität nach oxidativem Stress in APPsw-PC12-Zellen besonders stark erhöht ist (Marques, C. A. et al., 2003). Die durch die erhöhten NO-Spiegel unter Umständen gesteigerte AMP-aktivierte Kinase-Aktivität könnte also die erhöhte c-Jun-Kinase-Aktivität in den APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem Stress erklären. Es ist zusätzlich bekannt, dass

eine Aktivierung der AMP-aktivierten Kinase zu Apoptose führen kann (Kefas, B. A. et al., 2004). Dieser Befund könnte erklären, warum APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen nach oxidativem Stress mit einer höheren Apoptoserate reagieren (Marques, C. A. et al., 2003).

APPsw-HEK-Zellen, die hohe A $\beta$ -Spiegel im nanomolaren Bereich aufweisen, zeigen im Gegensatz zu APPsw-PC12-Zellen eine signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.4, S. 76). APPsw-HEK-Zellen haben demnach keine Möglichkeit, die mitochondrialen Defekte, die durch die hohen A $\beta$ -Spiegel hervorgerufen werden, zu kompensieren. Es ist bekannt, dass A $\beta$  in der Lage ist, die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen zu erhöhen (Butterfield, D. A., 2003). Hierbei gibt es viele Hinweise, dass die Aminosäure Methionin an Position 35 im A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptid eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress spielt (Butterfield, D. A. and Bush, A. I., 2004). Der Ersatz von Methionin an Position 35 durch Methioninsulfoxid ergibt ein A $\beta$ -Peptid, das keinen oxidativen Stress mehr hervorruft und nicht mehr neurotoxisch ist (Varadarajan, S. et al., 2001).

Es wäre also durchaus möglich, dass die hohen A $\beta$ -Spiegel in APPsw-HEK-Zellen die Bildung von Superoxidanionradikalen hervorrufen, die mit NO zur Bildung von Peroxynitrit führen können (Abb. 4.4). Die erhöhten Peroxynitrit-Spiegel in APPsw-HEK-Zellen könnten dann zu einer Öffnung der mitochondrialen Pore führen (Halestrap, A. P. et al., 1997; Vieira, H. L. et al., 2001b). Man geht hierbei davon aus, dass Peroxynitrit Thiolgruppen im Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) modifiziert und somit zur Öffnung der mitochondrialen Pore führt (Vieira, H. L. et al., 2001a). Die Öffnung der mitochondrialen Pore macht die innere mitochondriale Membran permeabel für Protonen und führt zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials. Zusätzlich führt die Öffnung der mitochondrialen Pore zu Cytochrom-C- und Smac-Freisetzung und letztendlich zum Zelltod. Übereinstimmend mit diesen Überlegungen weisen APPsw-HEK-Zellen auch basal eine signifikant erhöhte Apoptoserate auf. Zusätzlich ist die Cytochrom-C- und Smac-Freisetzung in APPsw-HEK-Zellen unter basalen Bedingungen schon deutlich sichtbar (Bonert, A. et al., 2004). APPsw-HEK-Zellen weisen demnach bereits basal sehr stark ausgeprägte mitochondriale Defizite auf.



**Abb. 4.4:** Chronischer A $\beta$ -Stress in APPsw-HEK-Zellen oder ein sekundärer Insult in APPsw-PC12-Zellen führt zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (MP).

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass man auf der einen Seite zu unterscheiden hat zwischen akutem und chronischem A $\beta$ -Stress und auf der anderen Seite zwischen niedrigen und hohen A $\beta$ -Spiegeln. Man könnte sich vorstellen, dass die mitochondriale Funktion in APPsw-PC12-Zellen die Verhältnisse in sporadischen AD-Patienten widerspiegelt und die APPsw-HEK-Zellen die Situation in familiären AD-Patienten aufzeigen.

#### 4.1.6. Einfluss eines sekundären Insults auf die mitochondriale Funktion

Werden jedoch die APPsw-PC12-Zellen mit einem sekundären Insult versetzt, wie z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder SNP, so reagieren APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.14, S. 91; Abb. 3.15, S. 92). Die Zellen sind dementsprechend bei zusätzlichem oxidativen oder nitrosativen Stress nicht mehr in der Lage, die

mitochondriale Fehlfunktion zu kompensieren. Passend hierzu nimmt die Apoptoserate nach oxidativem Stress in den APPsw-PC12-Zellen stärker zu als in APPwt- und Kontroll-PC12-Zellen (Marques, C. A. et al., 2003). Zusätzlich findet man in APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem Stress eine erhöhte c-Jun-Kinase-, Caspase-9- und Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen (Marques, C. A. et al., 2003). Die c-Jun-Kinase ist den Mitochondrien vorgeschaltet, denn das mitochondriale Membranpotential kann durch die Vorinkubation mit einem JNK-Hemmstoff vor oxidativem Stress geschützt werden (Marques, C. A. et al., 2003). Die Caspasen 9 und 3 sind den Mitochondrien nachgeschaltet. Der mitochondriale Apoptoseweg ist demnach nach oxidativem Stress aktiviert. Passend zu diesen Daten findet man in APPsw-PC12-Zellen eine stärkere Reduktion der ATP-Spiegel nach oxidativem und auch nach nitrosativem Stress. Die erhöhten A $\beta$ -Spiegel in APPsw-PC12-Zellen scheinen also die Zellen empfindlicher gegenüber oxidativem und nitrosativem Stress zu machen. Genau diese Konstellation könnte auch bei Patienten mit sporadischer AD eine sehr wichtige Rolle spielen, denn auch bei diesen Patienten findet man zusätzlich erhöhte oxidative Stress-Marker. Auch hier könnte die Kombination aus erhöhten A $\beta$ -Spiegeln und oxidativem Stress zu mitochondrialer Fehlfunktion führen. Eine weitere Ursache für die verstärkte mitochondriale Fehlfunktion der APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem Stress könnten die erniedrigten Bcl<sub>XL</sub>-Spiegel sein (Bonert, A. et al., 2004). Bcl<sub>XL</sub> stellt ein antiapoptotisches Protein dar, das heißt erniedrigte Spiegel machen die Zellen empfindlicher gegenüber oxidativem Stress. Die Folge ist ein Shift in der Bcl<sub>XL</sub>/Bax-Ratio in Richtung Bax, einem proapoptotischen Protein. Aber auch unter basalen Bedingungen findet man einen Shift in der Bcl<sub>XL</sub>/Bax-Ratio in Richtung Bax, welcher unter Umständen durch die erhöhten NO-Spiegel in den APPsw-PC12-Zellen hervorgerufen werden kann. Chae et al. konnten zeigen, dass Muskelzellen, die mit SNP stimuliert wurden, eine verstärkte Bax-Expression aufwiesen (Chae, I. H. et al., 2004). Ein Shift der Bcl<sub>XL</sub>/Bax-Ratio in Richtung Bax begünstigt die Freisetzung von Cytochrom C und Smac (Scorrano, L. and Korsmeyer, S. J., 2003). Die Cytochrom-C-Freisetzung ist nach oxidativem Stress jedoch in allen PC12-Zelltypen gleichermaßen ausgeprägt, wohingegen die Smac-Freisetzung in APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt ist als in Kontroll-PC12-Zellen (Bonert, A. et al., 2004). Die erhöhte Smac-Freisetzung in APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem Stress könnte dementsprechend die erhöhte Caspase-9- und Caspase-3-Aktivität in APPsw-PC12-

Zellen erklären (Marques, C. A. et al., 2003), denn Smac hemmt einen Inhibitor der Caspase 9. Fällt nun der hemmende Effekt auf die Caspase 9 weg, so findet eine verstärkte Caspase-9-Aktivierung, gefolgt von einer Caspase-3-Aktivierung statt.

Serumentzug stellt ebenfalls einen sekundären Insult dar. Steffen Leutz konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass 24-stündiger Serumentzug zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt (Leutz, S. et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob unter Serumentzugsbedingungen auch mitochondriale Fehlfunktion auftritt. Interessanterweise konnte in PC12-Zellen unter Serumentzug eine signifikante Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel beobachtet werden (Abb. 3.16, S. 94). Über welche Mechanismen wird nun die mitochondriale Fehlfunktion vermittelt? Atabay et al. konnten zeigen, dass Serumentzug zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Spiegel in Neuronen führt (Atabay, C. et al., 1996). Ein ähnlicher Befund wurde von Goncharova aufgestellt, nämlich dass Serumentzug die Menge an intrazellulären Oxidantien erhöht (Goncharova, E. I. et al., 1996). In einer neueren Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Serumentzug in Leberzellen zu oxidativem Stress und zu reduzierten Glutathionspiegeln führt (Pandey, S. et al., 2003). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Serumentzug zur Peroxidation von Membranlipiden und einer erniedrigten Superoxiddismutase-Aktivität in PC12-Zellen führt (Ochiai, T. et al., 2004). Huang konnte außerdem in PC12-Zellen zeigen, dass der durch Serumentzug hervorgerufene oxidative Stress über Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird (Huang, N. K., 2003). Betrachtet man nun all diese Untersuchungen, so spricht alles dafür, dass Serumentzug in erster Linie zur Entstehung von oxidativem Stress führt und somit zu mitochondrialer Fehlfunktion und Apoptose. Interessanterweise zeigen APP<sup>sw</sup>-PC12-Zellen im Vergleich zu APP<sup>wt</sup>- und Kontroll-PC12-Zellen unter serumreduzierten Bedingungen eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.16, S. 94). Auffällig ist der Befund, dass APP<sup>wt</sup>-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen weniger empfindlich auf Serumentzug reagieren. Das Wildtyp-APP scheint also vor zellulärem Stress durch Serumentzug zu schützen. Der Befund, dass Wildtyp-APP die Mitochondrien vor Serumentzug schützt, stimmt mit den Apoptosedaten überein, denn auch hier findet man in APP<sup>wt</sup>-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen eine niedrigere Apoptoserate (Leutz, S. et al., 2002).

#### 4.1.7. Führt intra- und/oder extrazelluläres A $\beta$ zu mitochondrialer Fehlfunktion?

Um genauere Erkenntnisse über extra- bzw. intrazelluläre Effekte von A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion zu erhalten, wurde die Rolle von sezerniertem A $\beta$  auf die mitochondriale Funktion überprüft. Hierzu wurde das Kulturmedium von Kontrollzellen, APPwt- und APPsw-PC12-Zellen über den Zeitraum von 24 h gesammelt und als Quelle für extrazelluläres A $\beta$  verwendet. Die APPsw-PC12-Zellen sezernieren ca. 100 pg/ml Medium A $\beta_{1-40}$  (Bonert, A. et al., 2004). Nach 24-stündiger Inkubation mit dem konditionierten Medium von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen ist im Gegensatz zur Stimulation mit extrazellulärem A $\beta$  noch kein Effekt auf das mitochondriale Membranpotential oder die ATP-Spiegel erkennbar (Abb. 3.6, S. 79). Erst nach 48-stündiger Inkubation mit konditionierten Medium von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen kommt es zu einer leichten Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Medium von APPsw-PC12-Zellen um 18 %) und zu einer leichten Reduktion der ATP-Spiegel (Medium von APPsw-PC12-Zellen um 25 %). Interessanterweise ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach Inkubation mit Medium von APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt als nach Inkubation mit Medium von APPwt-PC12-Zellen. Dieser Befund ist erklärbar durch die Tatsache, dass APPsw-PC12-Zellen im Zeitraum von 48 h mehr A $\beta$  sezernieren als APPwt-PC12-Zellen. A $\beta$  weist hier wiederum dosisabhängige Effekte auf die mitochondriale Funktion auf. Auffällig ist allerdings, dass die Effekte auf die ATP-Spiegel nach 48-stündiger Inkubation mit konditioniertem Medium wesentlich schwächer ausgeprägt als durch die APPsw-Transfektion. Die ATP-Abnahme durch Inkubation mit konditioniertem Medium von APPsw-PC12-Zellen beträgt ca. 25 %, wohingegen die ATP-Abnahme in APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen ca. 38 % beträgt. Da APPwt- und APPsw-PC12-Zellen gleich hohe APP- Expressionslevel aufweisen (Eckert, A. et al., 2001b), kann daher davon ausgegangen werden, dass die Effekte durch die APPsw-Mutation auf die mitochondriale Funktion in erster Linie durch intrazelluläre A $\beta$ -Effekte oder andere APP-Prozessierungsprodukte hervorgerufen werden und weniger durch sezerniertes A $\beta$ . Dies bestätigt wiederum die Hypothese, dass intrazelluläres A $\beta$  toxische Effekte auf die Zellen ausübt (Kienlen-Campard, P. et al., 2002).

Um ausschließen zu können, dass die mitochondriale Fehlfunktion und die erhöhte NO-Produktion durch eine APP-Überexprimierung hervorgerufen werden, wurde die intrazelluläre A $\beta$ -Produktion mit Hilfe des  $\gamma$ -Sekretasehemmstoffes DAPT gehemmt. DAPT wurde hierzu ausgewählt, weil es keine toxischen Effekte auf PC12- und HEK-Zellen aufweist und weil es keinen Einfluss auf die APP-Expression hat (Dovey, H. F. et al., 2001; Vandermeeren, M. et al., 2001; Lanz, T. A. et al., 2003). DAPT führt nach 48-stündiger Inkubation zu einer Reduktion der sezernierten A $\beta$ -Spiegel (Tabelle 2, S. 80) und der Gesamt-A $\beta$ -Spiegel (Kienlen-Campard, P. et al., 2002). Gleichzeitig führt die Inkubation mit DAPT zu einem Abfall der NO-Spiegel, sowie zu einer Stabilisation der ATP-Spiegel und des mitochondrialen Membranpotentials in APPwt- und APPsw-PC12- sowie APPwt- und APPsw-HEK-Zellen (Abb. 3.7, S. 82; Abb. 3.8, S. 83). Bemerkenswert ist hierbei der Befund, dass sowohl die Hyperpolarisation der APPsw-PC12-Zellen als auch die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials der APPsw-HEK-Zellen nach DAPT-Inkubation normalisiert werden kann. Da extrazelluläres A $\beta$  in PC12-Zellen nur geringe Effekte auf die NO-Spiegel, die ATP-Spiegel und auf das mitochondriale Membranpotential ausübt, weisen diese Daten deutlich darauf hin, dass intrazelluläre A $\beta$ -Anreicherungen mitochondriale Fehlfunktion und einen gestörten NO-Stoffwechsel hervorrufen. Die Regeneration der NO-Spiegel, ATP-Spiegel und des mitochondrialen Membranpotentials nach Inkubation mit DAPT findet jedoch nicht vollständig statt, weshalb davon auszugehen ist, dass die mitochondriale Fehlfunktion und der gestörte NO-Stoffwechsel auch noch durch andere Faktoren hervorgerufen werden können. Beispielsweise kann das Vorhandensein von APP im Mitochondrium zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und somit zu mitochondrialer Fehlfunktion führen. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in primären kortikalen Rattenneuronen, die humanes APP exprimieren, nach 5-tägiger DAPT-Inkubation eine Steigerung der Überlebensrate festgestellt werden (Kienlen-Campard, P. et al., 2002). Es fand jedoch auch hier keine komplette Regeneration statt.



#### **4.1.8. Zusammenfassung der Ergebnisse an den APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen**

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass mitochondriale Fehlfunktion eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AD spielt. Folgendes Pathogenesemodell kann für die AD aufgestellt werden: Die APPsw-Mutation führt in APPsw-PC12-Zellen zu A $\beta$ -Spiegeln im pikomolaren Bereich. Die erhöhten A $\beta$ -Spiegel rufen entweder eine erhöhte nNOS- oder iNOS-Expression oder eine Aktivitätssteigerung der beiden Isoformen hervor (Abb. 4.5). Es kommt zur erhöhten NO-Produktion in APPsw-PC12-Zellen. NO ruft bekanntermaßen eine Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität hervor. Die APPsw-PC12-Zellen weisen dementsprechend eine erniedrigte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität auf. NO kann aber auch mit dem Superoxidanionradikal, welches durch fehlerhaftes Austreten aus der mitochondrialen Atmungskette gebildet wird, zu Peroxynitrit reagieren. Peroxynitrit führt zu einer Beeinträchtigung der Atmungsketten-Komplexe II, III und V, wie sie in APPsw-PC12-Zellen vorliegt. Die Hemmung der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe führt zu einer verminderten ATP-Produktion, weshalb APPsw-PC12-Zellen signifikant reduzierte ATP-Spiegel aufweisen. Zusätzlich kann im Mitochondrium befindliches APP bzw. A $\beta$  zu einer direkten Schädigung der Mitochondrien führen.



Schäden im Alter akkumulieren (Harman, D., 1972; Harman, D., 1992), durchaus vorstellbar.

In HEK-Zellen führt die APPsw-Mutation zu 20fach erhöhten A $\beta$ -Spiegeln im Vergleich zu APPsw-PC12-Zellen. Die APPsw-HEK-Zellen zeigen ebenfalls erhöhte NO-Spiegel und reduzierte ATP-Spiegel. Die Reduktion der ATP-Spiegel ist allerdings stärker ausgeprägt als in den APPsw-PC12-Zellen. Zusätzlich zeigen APPsw-HEK-Zellen ein signifikant erniedrigtes mitochondriales Membranpotential. Die mitochondriale Dysfunktion ist dementsprechend durch die höheren A $\beta$ -Spiegel wesentlich stärker ausgeprägt. Passend zu diesem Befund weisen APPsw-HEK-Zellen auch basal eine erhöhte Apoptoserate auf. APPsw-HEK-Zellen stellen deshalb eine sehr gutes Modell dar, um die Situation bei Patienten mit familiärer AD zu untersuchen. Die familiäre AD ist gekennzeichnet durch ein sehr frühes Erkrankungsalter. Es kommt also bei diesen Patienten schon sehr frühzeitig zu synaptischer Dysfunktion und massivem Neuronenverlust. Patienten mit familiärer AD weisen genau wie die APPsw-HEK-Zellen pathophysiologisch erhöhte A $\beta$ -Spiegel im Gehirn auf. Die hohen A $\beta$ -Spiegel rufen mitochondriale und zelluläre Fehlfunktion hervor, die zu synaptischer Dysfunktion und massivem Neuronenverlust führen können. Auch hier scheinen erhöhte NO-Spiegel die mitochondriale Funktion zu beeinträchtigen. Synapsen sind besonders reich an Mitochondrien und spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Regulierung der synaptischen Funktion. Es wäre also durchaus denkbar, dass die A $\beta$ -induzierte mitochondriale Fehlfunktion bei Patienten mit familiärer AD schon in einem sehr frühen Stadium zu synaptischer Dysfunktion und zu massivem Neuronenverlust führt. Die Daten mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff zeigen deutlich, dass der gestörte NO-Stoffwechsel und die mitochondriale Fehlfunktion in beiden Zelllinien durch intrazellulär gebildetes A $\beta$  und nicht durch die APP-Überexpression hervorgerufen werden.

Die familiäre und die sporadische Form der Alzheimer-Demenz münden also in eine gemeinsame Endstrecke, die Anreicherung von intra- und extrazellulären A $\beta$ -Oligomeren (Abb. 4.6). Intra- und extrazelluläre A $\beta$ -Oligomere führen zu oxidativem Stress und mitochondrialer Fehlfunktion, was zur Aktivierung der Zelltodkaskade und letztendlich zur Degeneration von Synapsen und Neuronen führt.

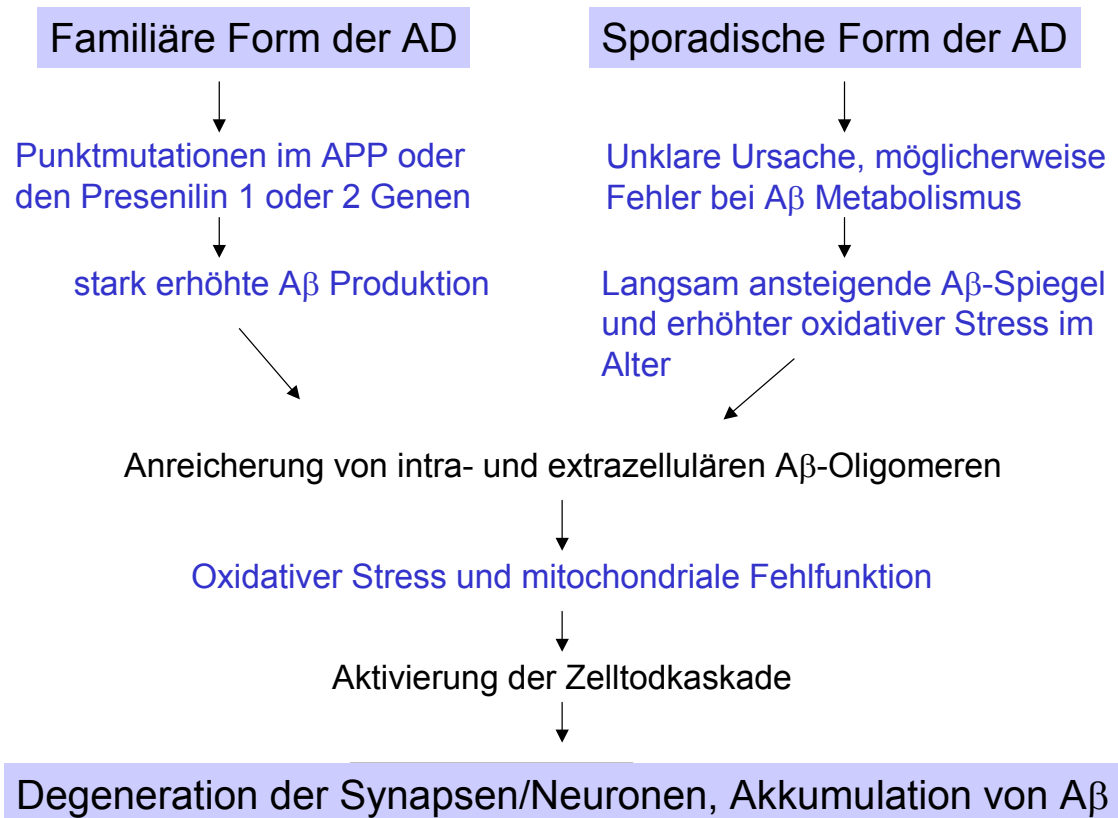


Abb. 4.6: Hypothetische Pathogenese der Alzheimer-Demenz.

## **4.2. Effekte von Ginkgo-biloba-Extrakt auf die mitochondriale Funktion**

### **4.2.1. EGb 761 schützt die Mitochondrien vor Schädigung durch oxidativen und nitrosativen Stress**

Wie unter 4.1. bereits gezeigt, stellt mitochondriale Fehlfunktion ein sehr frühes und wichtiges Ereignis in der Pathogenese der AD dar. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, Arzneistoffe zu finden, die den Energiehaushalt der Mitochondrien stabilisieren und somit die Neuronen vor apoptotischem Zelltod schützen können. EGb 761 ist in der Lage, das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach oxidativem und nitrosativem Stress zu stabilisieren (Abb. 3.18, S. 99; Abb. 3.21, S. 102). Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Fragestellung, ob EGb 761 seine protektiven Effekte über Radikalfänger-Eigenschaften oder durch eine direkte Beeinflussung der mitochondrialen Funktion hervorruft. Die in dieser Arbeit untersuchten Inkubationsschemata können hierbei wichtige Aufklärungsarbeit leisten. Bei Erstinkubation mit EGb 761 und anschließender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation kommen in erster Linie die Radikalfänger-Eigenschaften von EGb 761 zum Tragen, denn das zugegebene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann direkt durch die Bestandteile von EGb 761 abgefangen werden. Es besteht hierbei die Möglichkeit, dass ein Teil des protektiven Effektes von EGb 761 auf die Mitochondrien über seine Radikalfänger-Eigenschaften bedingt ist. Die Radikalfänger-Eigenschaften von EGb 761 wurden schon in vielen Studien untersucht (Schindowski, K. et al., 2001; Smith, J. V. and Luo, Y., 2003). Ob nun die Flavonoidfraktion oder die Terpenoidfraktion für die antioxidativen Effekte verantwortlich ist, müssen noch weitere Untersuchungen zeigen. In zellfreien Systemen konnte gezeigt werden, dass Flavonoide Sauerstoffradikale abfangen können (Robak, J. and Gryglewski, R. J., 1988). Man geht hierbei davon aus, dass die Polyphenolstruktur für die Radikalfänger-Eigenschaften der Flavonoide verantwortlich ist (Saija, A. et al., 1995). Zudem konnten für Bilobalid und die Ginkgolide B, C und J auch in zellfreien Systemen Radikalfänger-Eigenschaften gezeigt werden (Scholtyssek, H. et al., 1997). Die Datenlage bei diesen Komponenten ist allerdings kontrovers, denn eine andere Studie konnte keine antioxidativen Eigenschaften bei diesen Komponenten zeigen (Pietri, S. et al., 1997). In zellulären Systemen konnten die antioxidativen Eigenschaften von EGb 761 auf

die Flavonoidfraktion (Oyama, Y. et al., 1994; Smith, J. V. and Luo, Y., 2003) und auf die Bilobalide (Zhou, L. J. and Zhu, X. Z., 2000) bezogen werden. Besonders die Flavonoide Kämpferol und Quercetin wiesen hierbei antioxidative Effekte auf (Smith, J. V. and Luo, Y., 2003). Darüber hinaus gibt es Daten, dass EGb 761 die Proteinspiegel und die Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie z.B. der Superoxiddismutase und der Katalase, im Hippocampus von Ratten (Bridi, R. et al., 2001) und der Glutathionreduktase in der Leber von Mäusen erhöht (Sasaki, K. et al., 2002). Die Erhöhung der antioxidativen Enzyme durch EGb 761 trägt zusätzlich zur Reduktion des oxidativen Stresses durch EGb 761 bei. Zusätzlich ist bekannt, dass  $H_2O_2$  zur Oxidation von Proteinen und Lipiden führt (Brennan, J. P. et al., 2004). Für EGb 761 konnte gezeigt werden, dass es die Proteinoxidation und Lipidperoxidation in PC12-Zellen nach  $H_2O_2$ -Inkubation vermindert (Horakova, L. et al., 2003). EGb 761 scheint also zusätzlich über eine Verminderung der Proteinoxidation und Lipidperoxidation die Mitochondrien vor oxidativem Stress zu schützen.

Antioxidative Eigenschaften scheinen dementsprechend entscheidend zu der Wirkweise von EGb 761 beizutragen.

Das zweite Inkubationsschema von EGb 761 zielt eher darauf ab, die mitochondriale Funktion nach oxidativem Stress zu verbessern. Hierbei wurde  $H_2O_2$  für 6 h inkubiert und 30 min nach Insult EGb 761 hinzugefügt. EGb 761 wirkt auch in diesem Setting stabilisierend auf die mitochondriale Funktion. Da  $H_2O_2$  schnell in die Zellen aufgenommen wird, kann man davon ausgehen, dass nach 30 min schon die schädigenden Effekte von  $H_2O_2$  in Gang gesetzt wurden, dass also die protektiven Effekte von EGb 761 nicht auf Radikalfänger-Eigenschaften zurückzuführen sind, sondern auf eine Stabilisation der mitochondrialen Funktion. EGb 761 scheint also die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe direkt vor dem Angriff von  $H_2O_2$  zu schützen.  $H_2O_2$  führt über eine Hemmung der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase zu einer Reduktion der NADH-Spiegel und somit zu einer Hemmung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität (Chinopoulos, C. et al., 1999). Es wäre also möglich, dass EGb 761 die NADH-Spiegel stabilisiert und somit die Aktivität der NADH-Dehydrogenase aufrecht erhält.

EGb 761 ist darüber hinaus in der Lage, die Mitochondrien von PC12-Zellen vor der Schädigung durch nitrosativen Stress zu schützen (Abb. 3.18, S. 99). Hierbei weist EGb 761 zum einen protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel auf, wenn es 30 min nach Insult zum Medium hinzugefügt wird

(Abb. 3.18, S. 99). Zum anderen zeigen sich protektive Effekte, wenn das Medium nach Stimulation mit SNP ausgetauscht und anschließend EGb 761 zugesetzt wird (Abb. 3.20, S. 100). EGb 761 scheint also die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe vor nitrosativem Stress zu schützen und zum anderen die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach nitrosativem Stress zu verbessern. Da NO zu einer Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase führt, wäre es durchaus vorstellbar, dass EGb 761 die Funktion dieses Komplexes stabilisiert. Eine Reduktion der NO-Toxizität durch EGb 761 konnte auch in hippocampalen Rattenneuronen gefunden werden (Bastianetto, S. et al., 2000b). Auch in dieser Studie konnte EGb 761 die Regenerationsfähigkeit nach NO-Stress verbessern. Die selbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass NO zu einer erhöhten Proteinkinase-C-Aktivität führt. Somit könnte eine Verminderung dieser Proteinkinase-C-Aktivität am protektiven Effekt von EGb 761 beteiligt sein. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Flavonoidfraktion am meisten zu dem protektiven Effekt von EGb 761 beiträgt (Bastianetto, S. et al., 2000b). Zusätzlich führte jedoch auch Bilobalid zu einer Reduktion der Neurotoxizität von NO in PC12-Zellen (Song, W. et al., 2000). In der gleichen Studie erhöhte Bilobalid die Aktivitäten der Superoxiddismutase und der Katalase, weshalb die Autoren davon ausgehen, dass die Erhöhung der antioxidativen Enzyme ebenfalls zum protektiven Effekt von Bilobalid bei nitrosativem Stress beiträgt. Die Ginkgolide A und B scheinen ebenfalls einen Einfluss auf den NO-Stoffwechsel zu haben. Sie hemmen die NO-Produktion in Lipopolysaccharid-stimulierter Mikroglia (Du, Z. Y. and Li, X. Y., 1998). Dementsprechend scheinen Bilobalid und die Ginkgolide A und B an der Reduktion der Neurotoxizität von NO beteiligt zu sein. In Übereinstimmung mit diesen Angaben aus der Literatur wiesen Bilobalid und die Ginkgolide A, B, C und J auch in PC12-Zellen, die über 24 h nitrosativem Stress ausgesetzt waren, protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential auf (Daten von Susanne Hauptmann). Die einzelnen Komponenten von EGb 761 scheinen also additiv am protektiven Gesamteffekt von EGb 761 auf die Mitochondrien beteiligt zu sein. Im Hinblick auf die Wichtigkeit der NO-Neurotoxizität bei AD, scheint die Stabilisation der mitochondrialen Funktion von EGb 761 nach nitrosativem Stress einen entscheidenden Beitrag zur Wirksamkeit von EGb 761 bei AD zu leisten.

#### **4.2.2. EGb 761 schützt vor Serumentzug**

Viele Studien weisen daraufhin, dass EGb 761 und seine Bestandteile antiapoptotische Effekte nach Serumentzug aufweisen (Ahlemeyer, B. et al., 1999; Ahlemeyer, B. and Krieglstein, J., 2003b). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EGb 761 nach 24-stündigem Serumentzug ebenfalls protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel aufweist (Abb. 3.22, S. 104). Besonders ausgeprägt sind hierbei die Effekte auf die ATP-Spiegel. Passend zu diesem Befund waren EGb 761 und Bilobalid auch in der Lage, den Hypoxie-bedingten ATP-Abfall in endothelialen Zellen signifikant zu reduzieren (Janssens, D. et al., 1995). Bilobalid führte hierbei zu einer Protektion von 36 % und trug somit maßgeblich zum protektiven Effekt von EGb 761 (44 %) bei. Ginkgo-biloba-Extrakt scheint dementsprechend in der Lage zu sein, die Mitochondrien nach Serumentzug zu schützen und somit das Energiedefizit nach Serumentzug auszugleichen. Zheng et al. konnten zusätzlich zeigen, dass Bilobalid die mRNA- und die Protein-Level von *glial-derived neurotrophic factor* und *vascular endothelial growth factor* in kortikalen Astrozyten der Ratte erhöht (Zheng, S. X. et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass EGb 761 in der Lage ist, den Verlust an Wachstumsfaktoren nach Serumentzug auszugleichen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Serumentzug zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen führt. Zum protektiven Effekt von EGb 761 bei Serumentzug könnten also zusätzlich auch die Radikalfänger-Eigenschaften von EGb 761 beitragen. Die protektiven Effekte von EGb 761 bei Serumentzug scheinen also durch drei Faktoren hervorgerufen zu werden: 1) Stabilisierung der mitochondrialen Funktion, 2) Erhöhung der Proteinexpression von Wachstumsfaktoren, 3) Radikalfänger-Eigenschaften.

#### **4.2.3. Protektive Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe**

EGb 761 ist in der Lage, die mitochondriale Funktion nach oxidativem Stress, nach nitrosativem Stress und nach Serumentzug zu stabilisieren. Über welche Mechanismen werden nun diese protektiven Effekte an Mitochondrien hervorgerufen? An isolierten Mitochondrien konnte bereits gezeigt werden, dass Ratten, die mit Bilobalid gefüttert wurden, eine erhöhte *Respiratory Control Ratio*



(RCR) und eine erniedrigte Stadium-4-Atmung aufwiesen (Janssens, D. et al., 1999). Stadium 4 der Atmung beschreibt den Protonenverlust über der inneren mitochondrialen Membran und ist gleichzeitig ein Marker für die Bildung von ROS. Eine Reduktion der Stadium-4-Atmung geht deshalb einher mit einer verminderten Bildung von ROS. Darüber hinaus war Bilobalid in der Lage, die Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette vor dem Angriff von Komplexinhibitoren zu schützen und gleichzeitig die Komplex-I-Aktivität zu erhöhen (Janssens, D. et al., 1999). Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe in PC12-Zellen untersucht. EGb 761 ist in der Lage, alle Atmungsketten-Komplexe vor dem Angriff von Komplexinhibitoren zu schützen (Abb. 3.23, S. 106). Die Komplexe II, IV und V konnten von EGb 761 in einer Konzentration von 10 µg/ml und die Komplexe I und III ab einer Konzentration von 100 µg/ml geschützt werden. Es gibt Hinweise, dass EGb 761 und Bilobalid zu einem Anstieg der mRNA-Spiegel der Untereinheit 1 der NADH-Dehydrogenase und zusätzlich zu einem Anstieg der mRNA-Spiegel der Untereinheit III der Cytochrom-C-Oxidase führt. Der Schutz der Atmungsketten-Komplexe I und IV könnte deshalb über diesen Mechanismus erklärt werden (Chandrasekaran, K. et al., 1998; Tendi, E. A. et al., 2002). Ginkgo-biloba kann dementsprechend die Expression von Genen, die für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe kodieren, erhöhen und somit die Funktion der mitochondrialen Atmungskette verbessern. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Frage, ob EGb 761 die Anzahl an mtDNA-Kopien, die Transkriptionsrate oder die Stabilität der mRNA erhöht. Für den NADH-Dehydrogenase-Komplex liegen schon Daten vor. EGb 761 und Bilobalid erhöhen in PC12-Zellen die mRNA-Transkription, indem sie die Expression und die Bindung der Transkriptionsfaktoren am Promotor der Gene erhöhen, die für die mitochondriale Transkription verantwortlich sind (Tendi, E. A. et al., 2002).

Welche Eigenschaften von EGb 761 können nun noch zusätzlich zur Stabilisation der mitochondrialen Funktion beitragen? Es gibt Hinweise, dass EGb 761 die Glutathionspiegel in Mitochondrien von alten Ratten stabilisiert (Sastre, J. et al., 1998a). In retinalen Gliazellen führte EGb 761 in vitro zu einer Steigerung der Glutathionsynthese (Rimbach, G. et al., 2001). Zusätzlich steigert EGb 761 die Transkription von  $\gamma$ -Glutamyl-cysteinyl-Synthetase, dem bei der Glutathionsynthese entscheidenden Enzym (Gohil, K. et al., 2001). Diese Befunde sind besonders wichtig, denn mitochondriales Glutathion trägt entscheidend zum Schutz der mtDNA

vor oxidativem Stress bei. Die Stabilisation des mitochondrialen Glutathiongehaltes unterstützt ebenfalls den protektiven Effekt von EGb 761 auf die mitochondriale Funktion. Besonders im Alter kommt es zu mitochondrialen Schäden durch erhöhten oxidativen Stress (Miquel, J. et al., 1980). Glutathionoxidation gilt häufig als Marker für oxidative Schäden an mitochondrialen Lipiden und Proteinen. Interessanterweise ist EGb 761 in der Lage, die Glutathionoxidation in Leber-Mitochondrien von alten Mäusen signifikant zu erniedrigen und gleichzeitig oxidative Schäden von mitochondrialer DNA im Gehirn und in der Leber zu vermindern (Sastre, J. et al., 2002b). EGb 761 scheint also nicht nur den Glutathiongehalt zu stabilisieren, sondern gleichzeitig auch die Oxidation von Glutathion zu vermeiden. Zusätzlich verhindert EGb 761 die altersabhängigen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und der Größe der Gehirn- und Leber-Mitochondrien (Sastre, J. et al., 1998b). Die Stabilisation der mitochondrialen Morphologie hat auch Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion, denn EGb 761 reduziert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in Leber- und Gehirn-Mitochondrien von alten Ratten (Sastre, J. et al., 1998b). Diese Stabilisation des mitochondrialen Membranpotentials an isolierten Mitochondrien stimmt mit den Mitochondrien-stabilisierenden Effekten von EGb 761 an PC12-Zellen überein. Zusätzlich moduliert EGb 761 bei chronischer Gabe in Vitamin-E-defizienten Ratten die synaptische und mitochondriale Plastizität (Bertoni-Freddari, C. et al., 2002), was besonders interessant in dem Zusammenhang ist, dass synaptische Dysfunktion ein sehr frühes Ereignis bei AD darstellt. EGb 761 weist, wie eben gezeigt, zahlreiche Effekte auf die Mitochondrien auf. Die Stabilisation der mitochondrialen Funktion durch EGb 761 scheint dementsprechend durch die Addition von mehreren Einzeleffekten hervorgerufen zu werden.

#### **4.2.4. Effekte von EGb 761 auf die Tributyltintoxizität**

EGb 761 weist auch protektive Effekte aufs mitochondriale Membranpotential nach Stimulation mit Tributyltin auf (Abb. 3.24, S. 108). Tributyltin hemmt den Komplex V der Atmungskette (Powers, M. F. and Beavis, A. D., 1991) und führt zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Gogvadze, V. et al., 2002). Zusätzlich führt Triethyltin, eine dem Tributyltin verwandte Substanz, zu einer Hemmung der ATPasen Aktivität (Wassenaar, J. S. and Kroon, A. M., 1973), zu einem verminderten

Blutfluss (Legrain, Y. and MacKenzie, E. T., 1981), zu einer Reduktion der ATP-Bildung (Cremer, J. E., 1970) und zu einer Permeabilisationsstörung von Membranen (Torack, R. et al., 1970). EGb 761 ist in der Lage, die durch Triethyltin hervorgerufene Toxizität zu vermindern, aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass EGb 761 genau diese toxischen Effekte von Triethyltin antagonisiert (Otani, M. et al., 1986). Für den protektiven Effekt von EGb 761 auf die Mitochondrien scheint in erster Linie die Stabilisierung der ATP-Spiegel und somit eine Reduktion des Energiedefizits, u.U. durch eine gesteigerte ATP-Synthase-Aktivität, verantwortlich zu sein (Otani, M. et al., 1986). Passend zu diesen Vermutungen konnte Hoyer zeigen, dass EGb 761 den Glukose- und Energiehaushalt im zerebralen Kortex von Ratten verbessert (Hoyer, S., 2003). Außerdem weisen Daten daraufhin, dass Tributyltin einen Chlorid/Hydroxid-Antiporter-Transport an der inneren Mitochondrienmembran vermittelt (Selwyn, M. J. et al., 1970). Die Stabilisation der mitochondrialen Funktion durch EGb 761 könnte auch darin begründet liegen, dass EGb 761 diesen Chloridtransport von Tributyltin verhindert. Passend zu diesen Vermutungen über eine Beeinflussung des Chloridtransports durch EGb 761, konnten Klein et al. zeigen, dass Bilobalid den NMDA-induzierten Einstrom von Chloridionen über ligandgesteuerte Chloridkanäle in synaptosomalen hippocampalen Ratten-membranen hemmt (Klein, J. et al., 2003). Zusätzlich führen die Ginkgolide A, B, C und J zu einer Blockade von Glycin-aktivierten Chloridkanälen in hippocampalen Neuronen der Ratte (Chatterjee, S. S. et al., 2003). EGb 761 und seine Bestandteile scheinen also sowohl den Chlorideinstrom an der Plasmamembran, als auch an der inneren mitochondrialen Membran zu hemmen und über diesen Mechanismus protektive Effekte auszuüben. Des Weiteren führt Tributyltin zur Modifikation von Thiolgruppen im Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) (Nishikimi, A. et al., 2001). Dadurch kommt es zur Vernetzung von zwei ANT-Monomeren am Cystein-56. Es wäre also möglich, dass EGb 761 und seine Bestandteile ANT-Thiolgruppen vor dem Angriff von Tributyltin schützen und somit die Öffnung der mitochondrialen Pore und die Freisetzung von Cytochrom-C verhindern. Dieser Effekt könnte ebenfalls zum Schutz der Mitochondrien beitragen. Zusammenfassend scheinen für die Stabilisation der mitochondrialen Funktion nach Tributyltingabe mehrere Effekte von EGb 761 verantwortlich zu sein: 1) eine Erhöhung der ATP-Synthase-Aktivität, 2) eine Hemmung des Chloridtransports und 3) ein Schutz der Thiolgruppen im ANT.

#### **4.2.5. EGb 761 reduziert die Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress**

Darüberhinaus weist EGb 761 protektive Effekte auf die Caspase-9-Aktivität auf. Ab einer Konzentration von 0.01 mg/ml reduziert EGb 761 die Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress (Abb. 3.27, S. 112). Ergänzend hierzu weisen viele Daten daraufhin, dass EGb 761 in den Apoptoseprozess eingreift. So konnten Zhou et al. zeigen, dass Bilobalid in der Lage ist, die ROS-induzierte Erhöhung der Bax-Expression, die Caspase-3-Aktivierung und die Anzahl an apoptotischen Zellen nach oxidativem Stress in PC12-Zellen zu verringern (Zhou, L. J. and Zhu, X. Z., 2000). In kultivierten Kückenneuronen reduzierten Ginkgolid B und Bilobalid die Anzahl an apoptotischen Neuronen nach Staurosporin-Inkubation. In kortikalen Neuronenkulturen fanden Massieu et al. ebenfalls nach Vorinkubation mit EGb 761 weniger kondensierte Zellkerne und eine verringerte Caspase-3-Aktivität nach Staurosporin-Inkubation (Massieu, L. et al., 2004). Die Autoren gehen jedoch davon aus, dass EGb 761 keinen direkten Effekt auf Caspase 3 ausübt, sondern dass EGb 761 entweder über antioxidative Effekte oder über eine Stabilisierung der mitochondrialen Funktion die Caspase-3-Aktivität verringert (Zhou, L. J. and Zhu, X. Z., 2000). Es ist deshalb davon auszugehen, dass EGb 761 die Caspase-9-Aktivität auch nicht auf direktem Weg verringert, sondern über eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und eine reduzierte Cytochrom-C- oder Smac-Freisetzung. Smith et al. konnten in ausdifferenzierten PC12-Zellen zeigen, dass EGb 761 die Cytochrom-C-Freisetzung nach Staurosporinbehandlung und nach Serumentzug signifikant vermindert (Smith, J. V. et al., 2002). Zusätzlich fanden sie eine erhöhte Bcl-2-Expression und eine verminderte Caspase-12-Expression. Die vermehrte Expression von Bcl-2 könnte ebenfalls zum Mitochondrien-stabilisierenden Effekt von EGb 761 beitragen, da Bcl-2 die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom-C oder Smac vermindert. Eine Reduktion der Caspase-12-Expression trägt ebenfalls zum antiapoptotischen Effekt von EGb 761 bei, da der über das endoplasmatische Retikulum vermittelte Apoptoseweg reduziert wird. EGb 761 wirkt dementsprechend über seine antioxidativen Effekte hinaus regulierend auf die zelluläre Apoptosekaskade.

#### 4.2.6. Protektive Effekte von EGb 761 auf die A $\beta$ -Toxizität

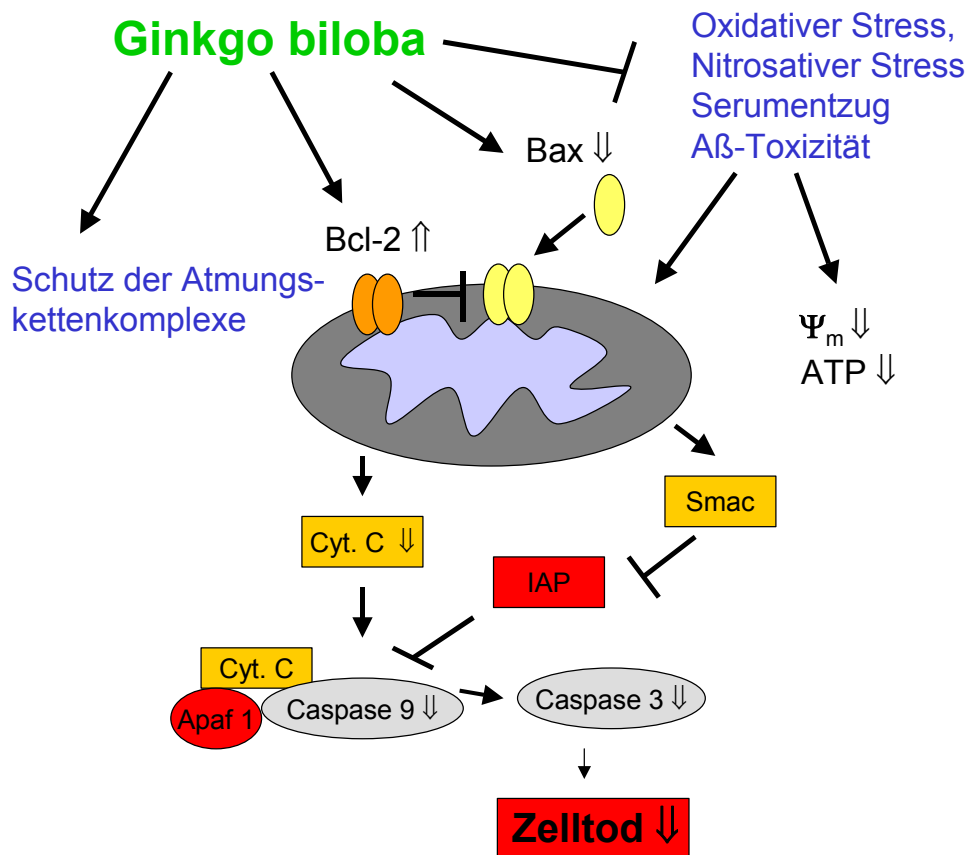
Interessanterweise zeigt EGb 761 auch protektive Effekte in APP-transfizierten PC12-Zellen, die chronisch A $\beta$ -Spiegeln im pikomolaren Bereich ausgesetzt sind. EGb 761 stabilisiert hierbei das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress (Abb. 3.25, S. 109) und schützt zusätzlich die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe II, IV und V (Abb. 3.26, S. 110). APPsw-PC12-Zellen sind durch die erhöhten A $\beta$ -Spiegel schon sensibilisiert, das heißt, sie reagieren im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen auf nitrosativen Stress mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Besonders wichtig ist deshalb der Befund, dass EGb 761 auch hier in der Lage ist, die mitochondriale Funktion zu stabilisieren. Viele Daten nach extrazellulärer A $\beta$ -Inkubation weisen daraufhin, dass EGb 761 hippocampale Neurone vor A $\beta$ -Neurotoxizität schützt (Bastianetto, S. et al., 2000a; Bastianetto, S. and Quirion, R., 2002). Dabei wurde der Zelltod durch EGb 761 vermindert, die MTT-Reduktion verbessert und die Bildung von ROS vermindert. EGb 761 scheint also zum einen durch antioxidative Effekte und zum anderen durch direkte Effekte auf das A $\beta$ -Peptid die Toxizität von A $\beta$  zu reduzieren. Yao et al. konnten zeigen, dass EGb 761 die Bildung von A $\beta$ -Oligomeren, in erster Linie von Dimeren und Tetrameren, in PC12-Zellen dosisabhängig vermindert (Yao, Z. et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass man heute davon ausgeht, dass A $\beta$ -Oligomere neurotoxische Eigenschaften aufweisen (Lambert, M. P. et al., 1998), wäre dieser Befund ein Erklärungsansatz für die protektiven Eigenschaften von EGb 761 auf die A $\beta$ -Neurotoxizität. Zusätzlich führte die Behandlung von Neuroblastoma-Zellen mit A $\beta$  und EGb 761 zu einer reduzierten A $\beta$ -Fibrillenbildung (Luo, Y. et al., 2002). In stabil transfizierten Neuroblastoma-Zellen, die die schwedische Doppelmutation und eine Präsenilin-Mutation (Deletion von Exon 9) tragen, führte EGb 761 ebenfalls zu einer verminderten A $\beta$ -Fibrillenbildung und zur verminderten Caspase-3-Aktivität in diesen Zellen (Luo, Y. et al., 2002). Dies spricht dafür, dass auch die Reduktion der Fibrillenbildung zu den neuroprotektiven Eigenschaften von EGb 761 beiträgt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass EGb 761 in hippocampalen Schnitten die Freisetzung des neuroprotektiven sAPP $\alpha$  erhöht (Colciaghi, F. et al., 2004). Die  $\alpha$ -Sekretase-Expression wurde in dieser Studie von EGb 761 nicht beeinflusst. Die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität war jedoch in Ratten, die über

5 Tage mit EGb 761 gefüttert wurden, im Vergleich zu Kontrollratten um 85 % erhöht (Colciaghi, F. et al., 2004). EGb 761 scheint also die Spaltung von APP über den nicht-amyloidogenen Weg zu forcieren und somit die A $\beta$ -Neurotoxizität zu reduzieren. Eine andere Studie konnte zeigen, dass EGb 761 in der Lage ist, den Gedächtnisverlust von Ratten, die intrazerebroventrikulär mit A $\beta$ <sub>1-40</sub> behandelt wurden, signifikant zu vermindern (Tang, F. et al., 2002). EGb 761 kann also den A $\beta$ -bedingten Gedächtnisverlust reduzieren. Interessanterweise konnte EGb 761 auch in APP-transgenen Mäusen das altersbedingte Gedächtnisdefizit reduzieren, ohne jedoch die löslichen A $\beta$ -Spiegel oder die A $\beta$ -Plaques-Dichte zu beeinflussen (Stackman, R. W. et al., 2003).

#### **4.2.7. Zusammenfassung EGb 761**

Ginkgo-biloba-Extrakt EGb 761 wird heute eingesetzt bei demenziellen Syndromen (im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzeptes), bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Stadium II nach Fontaine), bei Vertigo und bei Tinnitus vaskulärer und involutiver Genese. Klinische Studien konnten den Nutzen von EGb 761 für ZNS-Störungen belegen und zusätzlich vasoregulatorische, antioxidative, antiischämische, antiödematöse, antiapoptotische und neuroprotektive Effekte als mögliche Wirkmechanismen zeigen. Die einzelnen Bestandteile von EGb 761, wie Flavonoide, Bilobalid und Ginkgolide, scheinen hierbei additive Effekte auszuüben. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen stark daraufhin, dass die neuroprotektiven und die antiapoptotischen Effekte von EGb 761 durch antioxidative und Mitochondrien-stabilisierende Effekte hervorgerufen werden. Man kann drei verschiedene Komponenten der mitochondrialen Protektion unterscheiden: 1) Radikalfänger-Eigenschaften (vor allem durch Flavonoide), 2) Stabilisation der mitochondrialen Funktion (vor allem durch Bilobalid, aber auch durch Ginkgolide) und 3) Modulation von Chloridkanälen (durch Bilobalid und Ginkgolide) (Abb. 4.7). Betrachtet man nun die Wirkweise von EGb 761, so fällt auf, dass die meisten Effekte von EGb 761 in Situationen, die mit einem Energiedefizit und somit mit mitochondrialer Dysfunktion einhergehen, hervorgerufen werden. Synaptische Dysfunktion stellt ein sehr frühes Ereignis in der Pathogenese der AD dar und wird häufig in Verbindung gebracht mit mitochondrialer Fehlfunktion. Aufgrund der Mitochondrien-stabilisierenden Eigenschaften von EGb 761 scheint dieses dazu

geeignet zu sein synaptischer Dysfunktion vorzubeugen. EGb 761 ist somit ein geeignetes Medikament sowohl zur Prävention, als auch zur Therapie der AD, weil es in der Lage ist, in den Krankheitsprozess der AD einzugreifen. Die einfache Handhabbarkeit, der geringe Kostenaufwand und die wenigen Nebenwirkungen machen EGb 761 zu einer wichtigen Therapieoption bei AD.



**Abb. 4.7: Wichtige Angriffspunkte von Ginkgo-biloba-Extrakt am Mitochondrium und in der apoptotischen Zelltodkaskade.**

Basierend auf den Daten dieser Arbeit und auf Literaturdaten lässt sich folgender Wirkmechanismus entwickeln: Ginkgo-biloba-Extrakt ist in der Lage, das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach oxidativem und nitrosativem Stress sowie nach Serumentzug zu stabilisieren und die Mitochondrien vor A $\beta$ -Toxizität zu schützen. Es führt zu einer Protektion der Atmungsketten-Komplexe, zu einer Hochregulation des antiapoptotischen Bcl-2 und zusätzlich zu einer Herabregulation des proapoptotischen Bax. Die den Mitochondrien nachgeschalteten Apoptosemarker wie Cytochrom-C-Freisetzung, Caspase-9- und Caspase-3-Aktivität und letztendlich apoptotischer Zelltod werden durch Ginkgo-biloba-Extrakt ebenfalls reduziert.

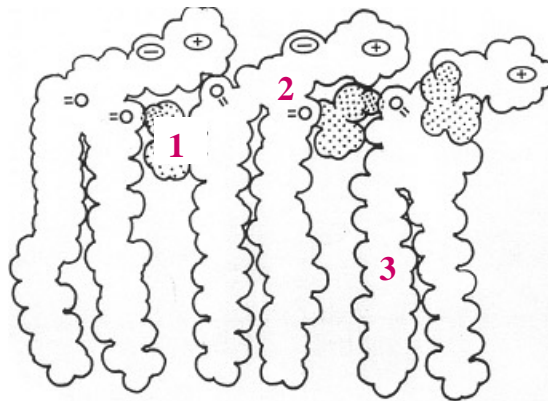
### **4.3 Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Funktion**

#### **4.3.1. Piracetam schützt die Mitochondrien vor oxidativem und nitrosativem Stress**

Piracetam zeigt ebenso wie EGb 761 protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion. Es ist in der Lage, nach Stimulation mit oxidativem oder nitrosativem Stress das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel zu stabilisieren (Abb. 3.28, S. 115; Abb. 3.31, S. 120). Über welche Mechanismen werden diese Effekte von Piracetam hervorgerufen? Piracetam weist *in vitro* in therapeutischen Konzentrationen keine antioxidativen Effekte auf (Horvath, B. et al., 2002). Passend zu dieser Studie konnte Sebastian Schaffer im Guajacol-Assay und im Oxyhämoglobin-Assay zeigen, dass Piracetam in Konzentrationen bis zu 5 mM keine antioxidativen Effekte aufweist. Eine Studie von Bentue-Ferrer et al., bei der Ratten mit Piracetam in einer Konzentration von 200 und 400 mg/kg Körpergewicht gefüttert wurden, zeigte ebenfalls keine Radikalfänger-Eigenschaften von Piracetam (Bentue-Ferrer, D. et al., 1989). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass bei Piracetamvorinkubation und anschließender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation der Mitochondrien-stabilisierende Effekt nicht durch ein Abfangen von ROS hervorgerufen wird. Piracetam scheint dementsprechend die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe direkt zu schützen und somit die mitochondriale Funktion zu stabilisieren. Interessanterweise konnte Susanne Hauptmann zeigen, dass Piracetam in der Lage, die Folgen des oxidativen Stresses, die Hochregulation der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase bei alten Mäusen zu normalisieren. Piracetam scheint demnach über eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion den oxidativen Stress in der Zelle zu vermindern.

Welche Eigenschaften von Piracetam könnten nun dazu führen, dass Piracetam die Mitochondrien vor der Schädigung durch oxidativen und nitrosativen Stress schützt? Viele Daten weisen darauf hin, dass Piracetam direkt mit Membranen interagiert (Fassoulaki, A. et al., 1985). In einer Studie konnte mit Hilfe einer <sup>31</sup>P-NMR-Methode gezeigt werden, dass Piracetam mit synthetischen Phospholipid-Doppelschichten spezifisch interagiert. Es bindet insbesondere an Phosphatkopfguppen und verursacht eine Neuorganisation der Lipidmoleküle und die Bildung von Piracetam-Phospholipidkomplexen (Peuvot, J. et al., 1995).





**Abb. 4.8: Piracetam (1) bindet an polare Kopfgruppen (2) von Phospholipid-Doppelschichten (3).**

Während diese Interaktion in jungen Mäusen die Membranfluidität nur geringfügig beeinflusst, führt sie jedoch in alten Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der erniedrigten Membranfluidität (Muller, W. E. et al., 1997b; Muller, W. E. et al., 1999a), was auch Auswirkungen auf Rezeptorebene hat. Piracetam erhöht zusätzlich in alten Tieren die Dichte der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Cohen, S. A. and Muller, W. E., 1993) und der NMDA-Rezeptoren (Pilch, H. and Muller, W. E., 1988; Scheuer, K. et al., 1999b) und führt gleichzeitig zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten (Scheuer, K. et al., 1999a).

Besonders interessant ist auch der Befund, dass Piracetam die Membranfluidität von mitochondrialen Membranen verbessert (Muller, W. E. et al., 1999a). Piracetam scheint somit auch über eine Stabilisierung der mitochondrialen Membran die Mitochondrien vor oxidativem und nitrosativem Stress zu schützen. Gabryel et al. konnten ebenfalls einen stabilisierenden Effekt von Piracetam auf die mitochondriale Funktion zeigen (Gabryel, B. et al., 2002). In dieser Studie wurden Rattenastrozyten Hypoxie ausgesetzt. Hypoxie ruft in Astrozyten einen Abfall der MTT-Reduktion, einen Abfall der ATP-Spiegel und eine erhöhte Apoptoserate hervor. Piracetam war in dieser Studie in der Lage, die MTT-Reduktion nach Hypoxie zu verbessern, den Abfall der ATP-Spiegel zu reduzieren (Gabryel, B. et al., 1999) und die Apoptoserate zu verringern (Gabryel, B. et al., 2002). Interessanterweise erhöhte Piracetam auch im Kortex von Ratten nach Hypoglykämie die ATP-Spiegel (Benzi, G. et al., 1985).

Passend zu diesen Daten konnte Piracetam auch in PC12-Zellen die ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress stabilisieren (Abb. 3.28, S. 115). Darüberhinaus ist Piracetam aber auch in der Lage, die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach nitrosativem Stress zu verbessern (Abb. 3.29, S.116). Nach 30-minütiger SNP-Inkubation sind die schützenden Effekte von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential noch sehr deutlich ausgeprägt. Mit zunehmender Zeitdauer der SNP-Inkubation vor dem Mediumwechsel werden jedoch die schützenden Effekte von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential geringer. Piracetam scheint also über eine Stabilisation des Energiehaushaltes die Regenerationsfähigkeit der Zellen zu verbessern. Es muss allerdings in einem gewissen Zeitrahmen nach Zugabe des Stressors hinzugefügt werden. Passend zu diesen Daten ist auch der Befund, dass Piracetam beim Schlaganfall nur dann schützende Effekte aufweist, wenn es im Zeitintervall von 7 Stunden nach Auftreten des Schlaganfalls gegeben wurde (De Deyn, P. P. et al., 1997), also dann, wenn der Schaden noch nicht maximal ausgeprägt ist. Daraus kann man schließen, dass Piracetam die größten protektiven Effekte aufweist, wenn zuvor eine leichte Schädigung der mitochondrialen Funktion vorliegt. In Übereinstimmung mit diesem Befund nimmt der protektive Effekt von Piracetam auf die Mitochondrien auch mit steigenden SNP-Konzentrationen ab (Abb. 3.30, S. 119). Piracetam sollte demzufolge sehr frühzeitig bei leichten kognitiven Störungen eingesetzt werden, weil es in diesem Stadium den stärksten Effekt auf die mitochondriale Funktion aufweist, und deshalb dann auch der größte klinische Nutzen zu erwarten ist.

#### **4.3.2. Piracetam schützt vor Serumentzug**

Serumentzug führt zu mitochondrialer Fehlfunktion. Interessanterweise zeigt Piracetam bei Serumentzug protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel (Abb. 3.32, S. 121). Auffällig ist jedoch der Befund, dass bei teilweiser Serumreduktion die protektiven Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Funktion noch stärker ausgeprägt sind als bei komplettem Serumentzug (Abb. 3.33, S. 123). Bei 2 % Serum kann das mitochondriale Membranpotential durch Piracetam in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  beispielsweise komplett wieder auf den Ausgangswert zurückgebracht werden, das heißt, es findet eine komplette Regeneration statt. Piracetamkonzentrationen

zwischen 500 und 1000  $\mu\text{M}$  sind klinisch bedeutsam, da in vivo Piracetam-Plasmakonzentrationen von 200 – 2000  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Die gleiche Situation findet man bei der Bestimmung der ATP-Spiegel bei 10 % Serum, bei der durch Piracetam ebenfalls eine komplette Normalisierung der ATP-Spiegel stattfindet. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass Piracetam, genau wie im vorhergehenden Abschnitt schon gezeigt, bei leichten Funktionsstörungen die stärksten Effekte auf die Mitochondrien ausübt. Zum protektiven Effekt von Piracetam bei serumreduzierten Bedingungen könnten wiederum die schon beschriebenen membranstabilisierenden Effekte von Piracetam beitragen. Serumentzug führt zur Öffnung der mitochondrialen Pore (Furuno, T. et al., 2001). Aufgrund der membranstabilisierenden Effekte von Piracetam ist es auch möglich, dass Piracetam die Öffnung dieser mitochondrialen Pore unter Serumentzugsbedingungen verhindert und somit die mitochondriale Funktion stabilisiert. Zusätzlich ist bekannt, dass Serumentzug zu einer Störung des Energiehaushaltes führt (Gottlieb, E. et al., 2002). Der schützende Effekt von Piracetam auf die mitochondriale Funktion könnte also auch über eine Stabilisation des Energiehaushaltes zustande kommen. Zur Stabilisierung des Energiehaushaltes könnte ein gesteigerter Glukosetransport beitragen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Piracetam die Glukoseaufnahme ins Gehirn von AD-Patienten und in Rattengehirne, die mit Scopolamin behandelt wurden, verbessert (Heiss, W. D. et al., 1988; Heiss, W. D. et al., 1989). Dies ist besonders interessant, denn die Glukoseaufnahme ins Gehirn ist bei AD-Patienten erniedrigt (Hoyer, S., 2000; Santens, P. et al., 2001; Hoyer, S., 2004). Die gesteigerte Glukoseaufnahme unter Piracetam könnte auch eine Folge der verbesserten mitochondrialen Funktion sein, was zu einem schnelleren Verbrauch der Glukose führt. Hypnotika wie z.B. Barbiturate hemmen den Glukosetransport ins Gehirn in vitro und in vivo (Stephenson, K. N. et al., 2000). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass Piracetam die Hemmung des Glukosetransports durch Barbiturate, Diazepam, Melatonin und Galanin in humanen Erythrozyten antagonisiert (Naftalin, R. J. et al., 2004). Eine gesteigerte Glukoseaufnahme in die Zellen könnte die Stabilisation der mitochondrialen Funktion unter Serumentzug erklären. Die Beeinflussung des Glukosetransports durch Piracetam scheint ein möglicher Wirkmechanismus zu sein, wie Piracetam in den Krankheitsprozess der AD eingreifen kann.

### 4.3.3. Schutz der mitochondrialen Atmungskette durch Piracetam

Interessanterweise ist Piracetam auch in der Lage, die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zu schützen (Abb. 3.34, S. 125). Besonders gut geschützt werden die Komplexe I, II und III ab einer Piracetamkonzentration von 500  $\mu\text{M}$ . Bei den Komplexen IV und V weist Piracetam einen protektiven Effekt ab einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  auf. Passend zu diesen Daten zeigt Piracetam in Rattengehirn-Mitochondrien nach traumatischem Ödem einen stabilisierenden Effekt auf die oxidative Phosphorylierung (Novikov, V. E. and Sharov, A., 1991). Zusätzlich erhöht es in Ratten-Gehirnschnitten sowohl die Atmung als auch die glykolytische Aktivität um 30 % (Domanska-Janik, K. and Zaleska, M., 1977). Durch welche Effekte wird der protektive Effekt von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe hervorgerufen? Piracetam erhöht die Membranfluidität der inneren mitochondrialen Membran (Muller, W. E. et al., 1999a). Die Atmungsketten-Komplexe befinden sich in der inneren mitochondrialen Membran, es wäre deshalb möglich, dass Piracetam über eine Veränderung der Membranzusammensetzung die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe schützt und somit die Funktion der Atmungsketten-Komplexe verbessert. Zusätzlich kann unter Umständen eine Stabilisation der Membraneigenschaften ein ungewolltes Eindringen von Protonen aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix verhindern und somit das mitochondriale Membranpotential stabilisieren. Im Vergleich zu EGb 761 zeigt Piracetam jedoch keine protektiven Effekte nach Tributyltinstimulation (Abb. 3.35, S. 126), weshalb davon auszugehen ist, dass Piracetam keinen Effekt auf den mitochondrialen Chlorid/Hydroxid-Antiporter-Transport hat und seine schützenden Effekte nicht über eine modifizierte Chloridpermeabilität vermittelt werden. Darüber hinaus scheint es auch keinen Effekt auf den Adenin-Nukleotid-Translokator auszuüben. Um genauere Erkenntnisse über den Mechanismus der mitochondrialen Protektion durch Piracetam zu gewinnen, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Es wäre beispielsweise interessant zu schauen, ob Piracetam direkte Effekte auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe ausübt.

#### **4.3.4. Piracetam schützt die Mitochondrien vor toxischen A $\beta$ -Effekten**

##### 4.3.4.1. Extrazelluläre A $\beta$ -Inkubation

Piracetam führt zu einer deutlichen Reduktion der A $\beta$ -Toxizität auf mitochondrialer Ebene (Abb. 3.36, S. 127). Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch 10 nM A $\beta$  ist bei einer Piracetamkonzentration von 1000  $\mu$ M fast komplett aufgehoben. Interessanterweise ist auch in dissoziierten Neuronen von Mäusen eine deutliche Reduktion der A $\beta$ -Toxizität erkennbar (Daten von Isabel Scherping). Viele Daten weisen daraufhin, dass A $\beta$  die Membranpermeabilität stört (Muller, W. E. et al., 2001; Eckert, G. P. et al., 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass Piracetam die Membran-destabilisierenden Effekte von A $\beta_{29-42}$  signifikant reduziert (Mingeot-Leclercq, M. P. et al., 2003). Piracetam wurde hierzu mit Lipiden vorinkubiert und anschließend A $\beta$  hinzugefügt. Bei Vorinkubation von A $\beta_{29-42}$  mit Lipiden und anschließender Piracetamzugabe war kein Effekt erkennbar, was darauf hinweist, dass A $\beta$  irreversible Effekte an Lipiden hervorruft, die nachträglich durch Piracetam nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Piracetam scheint die Membranen zu stabilisieren, indem es sie polarer und hydratisierter macht. Die protektiven Effekte von Piracetam auf die A $\beta$ -Toxizität an Mitochondrien scheinen dementsprechend auf einer Stabilisation der mitochondrialen Membran bzw. der Plasmamembran begründet zu sein, wodurch A $\beta$  seine toxischen Effekte auf die Mitochondrien nicht mehr ausüben kann. Zusätzlich können natürlich auch direkte Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Atmungskette an der Reduktion der A $\beta$ -Toxizität auf die Mitochondrien beteiligt sein.

##### 4.3.4.2. APP-transfizierte PC12-Zellen

Interessanterweise ist Piracetam auch in der Lage, APPsw-PC12-Zellen vor nitrosativem Stress zu schützen (Abb. 3.37, S. 129). APPsw-PC12-Zellen reagieren sehr empfindlich auf nitrosativen Stress, weil sie bereits durch die chronisch vorhandenen A $\beta$ -Spiegel im pikomolaren Bereich sensibilisiert sind. Demzufolge ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in APPsw-PC12-Zellen stärker ausgeprägt als in Kontroll-PC12-Zellen. Interessanterweise ist der protektive Effekt von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel in den

APP-transfizierten PC12-Zellen mindestens genauso stark ausgeprägt wie in den Kontroll-PC12-Zellen. Diese Daten stimmen mit Befunden überein, die zeigen, dass Piracetam die Membranfluidität in hippocampalen Membranen von AD-Patienten stärker erhöht als in älteren Kontrollpatienten (Eckert, G. P. et al., 1999). Diese Befunde weisen darauf hin, dass Piracetam seine schützenden Effekte wiederum über eine Reduktion der A $\beta$ -Neurotoxizität hervorruft. Piracetam scheint dementsprechend in der Lage zu sein, in APPsw-PC12-Zellen, die ein Modell für die sporadische AD darstellen, die Mitochondrien vor nitrosativem Stress zu schützen. Darüber hinaus vermindert Piracetam die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch die Komplexinhibitoren der Komplexe III und IV (Abb. 3.38, S. 130). Gerade bei diesen Komplexen reagieren die APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen mit einer wesentlich stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Auch hier ist Piracetam in der Lage, die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe, wahrscheinlich über eine Stabilisierung der mitochondrialen Membranen, zu schützen. Die Befunde, dass Piracetam auch die Funktion der Mitochondrien in APP-transfizierten PC12-Zellen stabilisiert, könnten eine Erklärung für die Wirksamkeit von Piracetam bei Patienten mit AD darstellen.

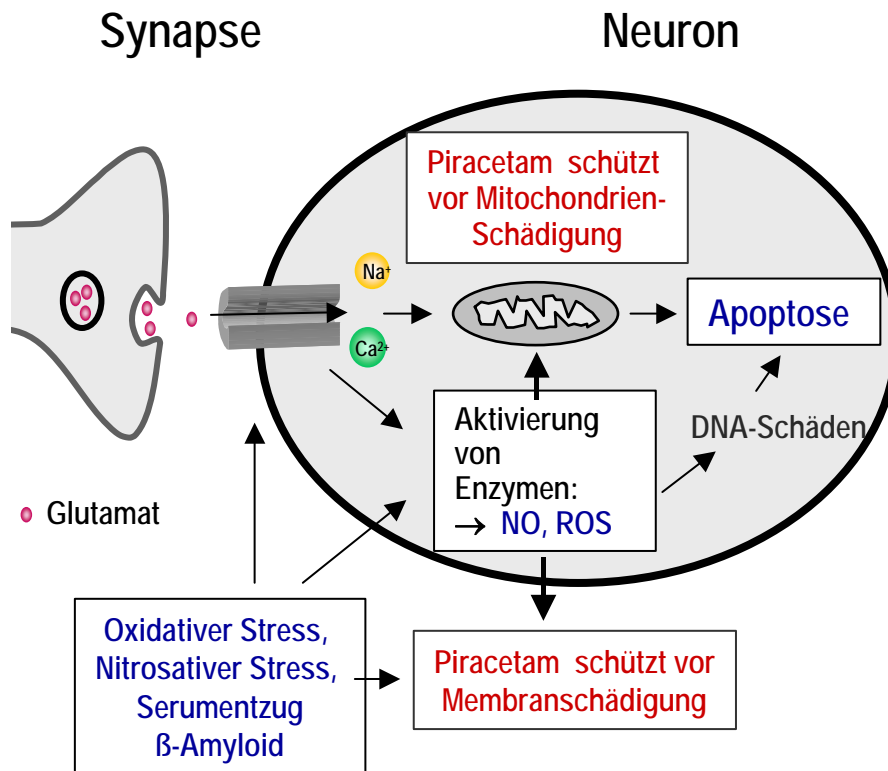
#### **4.3.5. Effekte von Piracetam auf die Caspase-9-Aktivität**

Vorinkubation mit Piracetam reduziert die Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress (Abb. 3.39, S. 131). Piracetam scheint also in den intrinsischen Apoptoseprozess einzugreifen. Ob Piracetam einen direkten Effekt auf Caspase-9 ausübt, oder ob die Reduktion der Caspase-9-Aktivität über einen stabilisierenden Effekt der mitochondrialen Funktion hervorgerufen wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Ein möglicher Mechanismus für die Reduktion der Caspase-9-Aktivität nach nitrosativem Stress könnte in einer Stabilisation der mitochondrialen Funktion, gefolgt von einer verminderten Cytochrom-C- oder Smac-Freisetzung, begründet sein. Die reduzierte Cytochrom-C- und Smac-Freisetzung könnte dann die verminderte Caspase-9-Aktivität erklären. Darüber hinaus vermindert Piracetam in Astrozyten nach Hypoxie die Caspase-3-Aktivität und die Apoptoserate (Gabryel, B. et al., 2002). Piracetam weist dementsprechend antiapoptotische Effekte sowohl in PC12-Zellen als auch in Astrozyten auf.

#### **4.3.6. Zusammenfassung Piracetam**

Piracetam ist das erste Nootropikum (Giurgea, C. E., 1982), das klinisch eingesetzt wurde. Es wird verwendet bei Myoklonus, bei ischämischem Schlaganfall und bei kognitiven Störungen. Der genaue Wirkmechanismus von Piracetam ist noch nicht geklärt. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Piracetam über eine Stabilisierung der mitochondrialen Funktion neuroprotektive Effekte ausübt (Abb. 4.9). Diese Stabilisierung der mitochondrialen Funktion bei oxidativem und nitrosativem Stress, sowie bei Serumentzug und A $\beta$ -Neurotoxizität wird möglicherweise durch die membranstabilisierenden Effekte von Piracetam hervorgerufen. Neuroprotektive Effekte von Piracetam konnten auch in anderen Studien, vor allem in Schlaganfallstudien, gezeigt werden (Enderby, P. et al., 1994; Orgogozo, J. M., 1999). Kombiniert mit der Verbesserung der Membranfluidität erhöht Piracetam in alten Tieren die Dichte der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Cohen, S. A. and Muller, W. E., 1993) und der NMDA-Rezeptoren (Pilch, H. and Muller, W. E., 1988; Scheuer, K. et al., 1999b). Die Kombination aus Verbesserung der Membranfluidität, der Neurotransmission sowie der neuroprotektiven Eigenschaften scheinen entscheidend zur Wirksamkeit von Piracetam bei kognitiven Störungen beizutragen.

Piracetam ist zu 100 % bioverfügbar und wird unverändert über die Nieren ausgeschieden. Es wird sehr gut vertragen und weist nur selten Nebenwirkungen auf. Piracetam wirkt bei leichten mitochondrialen Funktionsstörungen besonders gut und ist hier in der Lage, die mitochondriale Fehlfunktion fast komplett zu kompensieren. Aus diesem Grund scheint Piracetam insbesondere dazu geeignet zu sein, bei Patienten mit leichter Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten ein Fortschreiten der Beschwerden zu verhindern. Es läuft zur Zeit eine klinische Studie, bei der der Nutzen von Piracetam bei leichten kognitiven Störungen überprüft wird. Das geringe Nebenwirkungspotential und die ausgeprägten Mitochondrienstabilisierenden Effekte machen Piracetam somit zu einem wertvollen Arzneistoff bei leichten kognitiven Störungen.



**Abb. 4.9: Neuroprotektive Effekte von Piracetam**

Piracetam führt zu einer Stabilisation des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach oxidativem und nitrosativem Stress, sowie nach Serumentzug und nach A $\beta$ -Stress. Bei der Stabilisation der mitochondrialen Funktion scheinen die membranstabilisierenden Effekte von Piracetam eine entscheidende Rolle zu spielen.



## 5. Zusammenfassung

Die Alzheimer-Demenz ist gekennzeichnet durch extrazelluläre Ablagerungen bestehend aus dem Amyloid-beta-Peptid (A $\beta$ ), durch neurofibrilläre Bündel bestehend aus dem Tau-Protein, massiven Neuronenverlust und synaptische Dysfunktion. Weiterhin ist bekannt, dass mitochondriale Dysfunktion und ein gestörter NO-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle bei der AD spielen. Um genauere Informationen über die Ursache der mitochondrialen Dysfunktion zu erhalten, wurden zum einen akute und chronische Effekte und zum anderen dosisabhängige Effekte von A $\beta$  auf die NO-Produktion und die mitochondriale Funktion untersucht. Als Zellkulturmodelle standen PC12- und HEK-Zellen zur Verfügung, die entweder mit Leervektor (Kontrollzellen), mit humanem Wildtyp-APP (APPwt) bzw. mit der schwedischen Doppelmutation im APP-Gen (APPsw) stabil transfiziert waren. APPsw-PC12-Zellen weisen A $\beta$ -Spiegel im pikomolaren Bereich auf, wobei die A $\beta$ -Spiegel in APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu APPwt-PC12-Zellen 3- bis 4fach erhöht sind. Im Vergleich zu APPsw-PC12-Zellen haben APPsw-HEK-Zellen ca. 20fach erhöhte A $\beta$ -Spiegel im niedrigen nanomolaren Bereich. Interessanterweise weisen sowohl APPsw-PC12-Zellen als auch APPsw-HEK-Zellen signifikant erhöhte NO-Spiegel im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen auf. APPsw-PC12-Zellen zeigen zusätzlich eine erhöhte Aktivität der neuronalen und der induzierbaren NO-Synthase, was den Anstieg der NO-Spiegel erklären kann. Die erhöhten NO-Spiegel in beiden Zellsystemen gehen einher mit signifikant erniedrigten ATP-Spiegeln, wobei die ATP-Reduktion bei den APPsw-HEK-Zellen stärker ausgeprägt ist als in den APPsw-PC12-Zellen. Die A $\beta$ -Effekte auf die ATP-Spiegel sind demzufolge dosisabhängig. Die Inkubation von untransfizierten Zellen mit extrazellulärem A $\beta$ <sub>1-42</sub> führt nur zu einem schwachen Anstieg der NO-Spiegel und zu einem leichten Abfall der ATP-Spiegel, was darauf hinweist, dass in erster Linie intrazelluläre A $\beta$ -Effekte den NO-Anstieg und die ATP-Reduktion bewirken. Die 48-stündige Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT führt zur beinahe vollständigen Normalisierung der NO- und ATP-Spiegel in APPwt- und APPsw-PC12- und in APPwt- und APPsw-HEK-Zellen, was darauf hinweist, dass der gestörte NO-Stoffwechsel und die mitochondriale Dysfunktion durch A $\beta$ -Anreicherungen hervorgerufen werden und nicht durch eine Überexpression von APP. Zusätzlich kann ausgeschlossen werden, dass die ATP-Reduktion in APP-

transfizierten Zellen durch einen Verlust an Mitochondrien hervorgerufen wird, denn sowohl APPsw-PC12-Zellen als auch APPsw-HEK-Zellen weisen mehr Mitochondrien auf als die jeweiligen Kontrollzellen, was auf eine Art Kompensationsmechanismus schließen lässt. Diese Kompensation ist allerdings nicht ausreichend, um die erniedrigten ATP-Spiegel auszugleichen.

Passend zu den reduzierten ATP-Spiegeln zeigen APPsw-PC12-Zellen eine signifikant erniedrigte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität und eine Beeinträchtigung der Atmungsketten-Komplexe II, III und V. Des Weiteren konnte APP im Mitochondrium von APPsw-PC12-Zellen nachgewiesen werden. Die Reduktion der ATP-Spiegel und die verminderte Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität können also zum einen durch die A $\beta$ -bedingten erhöhten NO-Spiegel und zum anderen durch die Anwesenheit von APP bzw. A $\beta$  im Mitochondrium hervorgerufen werden.

Auf der Ebene des mitochondrialen Membranpotentials weisen die beiden Zelllinien stark unterschiedliche Ergebnisse auf. APPsw-PC12-Zellen haben unter basalen Verhältnissen ein leicht hyperpolarisiertes mitochondriales Membranpotential, was auf eine Art Gegenregulationsmechanismus hinweist. Passend zu diesen Daten ist die Apoptoserate in diesen Zellen unter basalen Bedingungen nicht erhöht. Nach zusätzlichem oxidativem Stress findet man in APPsw-PC12-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen jedoch eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, das heißt die Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, den Kompensationsmechanismus aufrechtzuerhalten. Die Folge ist eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigen APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem Stress eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Kontroll-PC12-Zellen. APPsw-HEK-Zellen weisen basal schon ein signifikant erniedrigtes mitochondriales Membranpotential und eine erhöhte Apoptoserate auf, was durch die wesentlich höheren A $\beta$ -Spiegel erklärbar ist. Nach Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT findet man sowohl eine Normalisierung der Hyperpolarisation in APPsw-PC12-Zellen als auch eine Normalisierung der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in APPsw-HEK-Zellen.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte sowohl ein Modell für die sporadische AD als auch für die familiäre AD entwickelt werden. APPsw-PC12-Zellen spiegeln hierbei die pathogenen Mechanismen in Patienten mit sporadischer AD wider, wohingegen die APPsw-HEK-Zellen die initialen Pathomechanismen bei

Patienten mit familiärer AD aufzeigen. Der Ansatz dieser Arbeit, die Untersuchung von mitochondrialer Dysfunktion unter Verwendung der verschiedenen Zellsysteme mit intra- und extrazellulärer A $\beta$ -Exposition ist neuartig auf dem Gebiet der AD.

Mitochondriale Fehlfunktion und ein gestörter NO-Stoffwechsel stellen entscheidende initiale Pathomechanismen bei AD dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Gruppe der Antidementiva Ginkgo-biloba-Extrakt und Piracetam schützende Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel in untransfizierten PC12-Zellen nach nitrosativem und oxidativem Stress, nach Serumentzug und nach A $\beta$ -Stress ausüben. Zusätzlich konnten auch in APPsw-PC12-Zellen protektive Effekte von Piracetam und Ginkgo-biloba-Extrakt auf die mitochondriale Funktion beobachtet werden. Die protektiven Effekte von Ginkgo-biloba-Extrakt werden in erster Linie durch seine Radikalfänger-Eigenschaften, durch eine Stabilisation der Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und durch eine Veränderung der Chloridpermeabilität hervorgerufen. Piracetam scheint die Mitochondrien über eine Erhöhung der Membranfluidität der inneren mitochondrialen Membran zu schützen und somit die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zu verbessern. In Ergänzung zu den Mitochondrien-stabilisierenden Effekten sind beide Substanzen auch in der Lage, die Caspase-9-Aktivität nach Stimulation mit Natriumnitroprussid zu reduzieren, was auf antiapoptotische Effekte beider Substanzen hinweist. Ginkgo-biloba-Extrakt und Piracetam stellen somit zwei sehr interessante Präventions- und Therapieoptionen bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen bzw. bei Patienten mit AD dar.

---

## 6. Literatur

- Aberg, F., Appelkvist, E. L., Dallner, G., and Ernster, L., 1992, **Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues**, *Arch.Biochem.Biophys.*, (295) : 230-234.
- Abramov, A. Y., Canevari, L., and Duchen, M. R., 2004, **Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase**, *J.Neurosci.*, (24) : 565-575.
- Adams, J. M., 2003, **Ways of dying: multiple pathways to apoptosis**, *Genes Dev.*, (17) : 2481-2495.
- Ahlemeyer, B. and Krieglstein, J., 2003a, **Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract**, *Cell Mol.Life Sci.*, (60) : 1779-1792.
- Ahlemeyer, B. and Krieglstein, J., 2003b, **Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease**, *Pharmacopsychiatry*, (36 Suppl 1) : S8-14.
- Ahlemeyer, B., Mowes, A., and Krieglstein, J., 1999, **Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by Ginkgo biloba extract and some of its constituents**, *Eur.J.Pharmacol.*, (367) : 423-430.
- Aisen, P. S., Schafer, K. A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K. L., Farlow, M. R., Jin, S., Thomas, R. G. and Thal, L. J., 2003, **Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial**, *JAMA* (289) : 2819-2826.
- Akama, K. T., Albanese, C., Pestell, R. G., and Van Eldik, L. J., 1998, **Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (95) : 5795-5800.
- Allain, H., Bentue-Ferrer, D., Tribut, O., Gauthier, S., Michel, B. F., and Drieu-La Rochelle, C., 2003, **Alzheimer's disease: the pharmacological pathway**, *Fundam.Clin.Pharmacol.*, (17) : 419-428.
- Almeida, A., Almeida, J., Bolanos, J. P., and Moncada, S., 2001, **Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (98) : 15294-15299.
- Almeida, A., Moncada, S., and Bolanos, J. P., 2004, **Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway**, *Nat.Cell Biol.*, (6) : 45-51.

- 
- Alzheimer, A., 1907, **Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde**, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, (64) : 146-148.
- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M. A., and Avadhani, N. G., 2003, **Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells**, *J.Cell Biol.*, (161) : 41-54.
- Andrieu, S., Gillette, S., Amouyal, K., Nourhashemi, F., Reynish, E., Ousset, P. J., Albaredo, J. L., Vellas, B., and Grandjean, H., 2003, **Association of Alzheimer's disease onset with ginkgo biloba and other symptomatic cognitive treatments in a population of women aged 75 years and older from the EPIDOS study**, *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.*, (58) : 372-377.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., and Martinou, J. C., 2001, **Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells**, *J.Biol.Chem.*, (276) : 11615-11623.
- Atabay, C., Cagnoli, C. M., Kharlamov, E., Ikonovic, M. D., and Manev, H., 1996, **Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists**, *J.Neurosci.Res.*, (43) : 465-475.
- Autor, A. P., 1982, **Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in saccharomyces cerevisiae. Precursor form of mitochondrial superoxide dismutase made in the cytoplasm**, *J.Biol.Chem.*, (257) : 2713-2718.
- Ayasolla, K., Khan, M., Singh, A. K., and Singh, I., 2004, **Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E**, *Free Radic.Biol.Med.*, (37) : 325-338.
- Babbs, C. F. and Steiner, M. G., 1990, **Simulation of free radical reactions in biology and medicine: a new two-compartment kinetic model of intracellular lipid peroxidation**, *Free Radic.Biol.Med.*, (8) : 471-485.
- Babu, B. R. and Griffith, O. W., 1998, **N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase**, *J.Biol.Chem.*, (273) : 8882-8889.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G., 2003, **Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1606) : 137-146.
- Bastianetto, S. and Quirion, R., 2002, **EGb 761 is a neuroprotective agent against beta-amyloid toxicity**, *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, (48) : 693-697.

- Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R., 2000a, **The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid**, *Eur.J.Neurosci.*, (12) : 1882-1890.
- Bastianetto, S., Zheng, W. H., and Quirion, R., 2000b, **The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C**, *J.Neurochem.*, (74) : 2268-2277.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B., Henshaw, R., Rosen, B., and Hyman, B. T., 1993, **Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate**, *J.Neurochem.*, (61) : 1147-1150.
- Behl, C., 2000, **Apoptosis and Alzheimer's disease**, *J.Neural Transm.*, (107) : 1325-1344.
- Bentue-Ferrer, D., Philouze, V., Pape, D., Reymann, J. M., Allain, H., and Van den, D. J., 1989, **Comparative evaluation of scavenger properties of exifone, piracetam and vinburnine**, *Fundam.Clin.Pharmacol.*, (3) : 323-328.
- Benzi, G., Pastoris, O., Villa, R. F., and Giuffrida, A. M., 1985, **Influence of aging and exogenous substances on cerebral energy metabolism in posthypoglycemic recovery**, *Biochem.Pharmacol.*, (34) : 1477-1483.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Caselli, U., Paoloni, R., and Solazzi, M., 2002, **Chronic administration of EGb 761 modulates synaptic and mitochondrial plasticity in adult vitamin E-deficient rats**, *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, (48) : 709-715.
- Biernat, J. and Mandelkow, E. M., 1999, **The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains**, *Mol.Biol.Cell*, (10) : 727-740.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., and Pradier, L., 2003, **Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice**, *Exp.Neurol.*, (184) : 247-263.
- Blass, J. P., Gibson, G. E., and Hoyer, S., 2002, **The role of the metabolic lesion in Alzheimer's disease**, *J.Alzheimers.Dis.*, (4) : 225-232.
- Bogdanovic, N., 2000, **Alzheimer's disease: plaques and tangles**, *J.Cell Mol.Med.*, (4) : 304-305.
- Bolanos, J. P., Heales, S. J., Land, J. M., and Clark, J. B., 1995, **Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture**, *J.Neurochem.*, (64) : 1965-1972.

- 
- Bolanos, J. P., Peuchen, S., Heales, S. J., Land, J. M., and Clark, J. B., 1994, **Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes**, *J.Neurochem.*, (63) : 910-916.
- Bonert, A., Marques C.A., Keil, U., Muller, W. E., and Eckert, A., 2004, **The impact of mutant APP on members of the Bcl-2 family and on the release of mitochondrial factors in oxidative stress-induced cell death**, *Archives of Pharmacology*, (369 ) : 61, Supplement 1.
- Borthwick, G. M., Johnson, M. A., Ince, P. G., Shaw, P. J., and Turnbull, D. M., 1999, **Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death**, *Ann.Neurol.*, (46) : 787-790.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E. A., Murri, L., Rapoport, S. I., and Solaini, G., 2002, **Cytochrome c oxidase and mitochondrial F(1)F(0)-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease**, *Neurobiol.Aging*, (23) : 371-376.
- Brennan, J. P., Wait, R., Begum, S., Bell, J. R., Dunn, M. J., and Eaton, P., 2004, **Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis**, *J.Biol.Chem.*,
- Brennan, W. A., Jr., Bird, E. D., and Aprille, J. R., 1985, **Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain**, *J.Neurochem.*, (44) : 1948-1950.
- Bridi, R., Crossetti, F. P., Steffen, V. M., and Henriques, A. T., 2001, **The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats**, *Phytother.Res.*, (15) : 449-451.
- Brookmeyer, R., Gray, S., and Kawas, C., 1998, **Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset**, *Am.J.Public Health*, (88) : 1337-1342.
- Brown, G. C., 1999, **Nitric oxide and mitochondrial respiration**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1411) : 351-369.
- Brown, G. C., 2001, **Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1504) : 46-57.
- Brown, G. C. and Borutaite, V., 2002, **Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death**, *Free Radic.Biol.Med.*, (33) : 1440-1450.
- Brown, G. C. and Cooper, C. E., 1994, **Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase**, *FEBS Lett.*, (356) : 295-298.

- Butterfield, D. A., 2003, **Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences**, *Curr.Med.Chem.*, (10) : 2651-2659.
- Butterfield, D. A. and Bush, A. I., 2004, **Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide**, *Neurobiol.Aging*, (25) : 563-568.
- Butterfield, D. A., Howard, B., Yatin, S., Koppal, T., Drake, J., Hensley, K., Aksenov, M., Aksenova, M., Subramaniam, R., Varadarajan, S., Harris-White, M. E., Pedigo, N. W., Jr., and Carney, J. M., 1999, **Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease**, *Life Sci.*, (65) : 1883-1892.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O., 1977, **Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria**, *Arch.Biochem.Biophys.*, (180) : 248-257.
- Cai, X. D., Golde, T. E., and Younkin, S. G., 1993, **Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor**, *Science*, (259) : 514-516.
- Canevari, L., Clark, J. B., and Bates, T. E., 1999, **beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria**, *FEBS Lett.*, (457) : 131-134.
- Cao, X. and Sudhof, T. C., 2001, **A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60**, *Science*, (293) : 115-120.
- Capaldi, R. A., 1982, **Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane**, *Biochim.Biophys.Acta*, (694) : 291-306.
- Capaldi, R. A., Malatesta, F., and Darley-USmar, V. M., 1983, **Structure of cytochrome c oxidase**, *Biochim.Biophys.Acta*, (726) : 135-148.
- Cardoso, S. M., Proenca, M. T., Santos, S., Santana, I., and Oliveira, C. R., 2004, **Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets**, *Neurobiol.Aging*, (25) : 105-110.
- Cardoso, S. M., Santos, S., Swerdlow, R. H., and Oliveira, C. R., 2001, **Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity**, *FASEB J.*, (15) : 1439-1441.
- Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B., and Sharpe, M. A., 2002a, **Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities**, *J.Neurochem.*, (80) : 91-100.
- Casley, C. S., Land, J. M., Sharpe, M. A., Clark, J. B., Duchon, M. R., and Canevari, L., 2002b, **Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons**, *Neurobiol.Dis.*, (10) : 258-267.



- 
- Cassina, A. and Radi, R., 1996, **Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport**, *Arch.Biochem.Biophys.*, (328) : 309-316.
- Chae, I. H., Park, K. W., Kim, H. S., and Oh, B. H., 2004, **Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells**, *Clin.Chim.Acta*, (341) : 83-91.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A., 1979, **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs**, *Physiol Rev.* , (59) : 527-605.
- Chandrasekaran, K., Liu, L. I., Hatanpaa, K., Hatanpaa, K., and Rapoport, S. I., 1998, **Stimulation of mitochondrial gene expression by bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761)**., *Advances in Ginkgo biloba Extract Research*, (7) : 121-128.
- Chandrasekaran, K., Mehrabian, Z., Spinnewyn, B., Chinopoulos, C., Drieu, K., and Fiskum, G., 2002, **Bilobalide, a component of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity**, *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, (48) : 663-669.
- Chang, S. W., Zhang, D., Chung, H. D., and Zassenhaus, H. P., 2000, **The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer's brain**, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (273) : 203-208.
- Chatterjee, S. S., Kondratskaya, E. L., and Krishtal, O. A., 2003, **Structure-activity studies with *Ginkgo biloba* extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators**, *Pharmacopsychiatry*, (36 Suppl 1) : S68-S77.
- Check, E., 2003, **Battle of the mind**, *Nature*, (422) : 370-372.
- Chinopoulos, C., Tretter, L., and Adam-Vizi, V., 1999, **Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase**, *J.Neurochem.*, (73) : 220-228.
- Christen, Y., 2000, **Oxidative stress and Alzheimer disease**, *Am.J.Clin.Nutr.*, (71) : 621S-629S.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J., 1992, **Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production**, *Nature*, (360) : 672-674.
- Clementi, E., Brown, G. C., Feelisch, M., and Moncada, S., 1998, **Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (95) : 7631-7636.

- Cohen, S. A. and Muller, W. E., 1993, **Effects of piracetam on N-methyl-D-aspartate receptor properties in the aged mouse brain**, *Pharmacology*, (47) : 217-222.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Zimmermann, M., Bellone, C., Longhi, A., Padovani, A., Cattabeni, F., Christen, Y., and Di Luca, M., 2004, **Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by Ginkgo biloba extracts**, *Neurobiol.Dis.*, (16) : 454-460.
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D., 2002, **Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells**, *EMBO J.*, (21) : 1616-1627.
- Cooper, C. E., 2002, **Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector?**, *Trends Biochem.Sci.*, (27) : 33-39.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Jr., Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E., and ., 1994, **Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease**, *Nat.Genet.*, (7) : 180-184.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A., 1993, **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families**, *Science*, (261) : 921-923.
- Costa, N. J., Dahm, C. C., Hurrell, F., Taylor, E. R., and Murphy, M. P., 2003, **Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide**, *Antioxid.Redox.Signal.*, (5) : 291-305.
- Cottrell, D. A., Borthwick, G. M., Johnson, M. A., Ince, P. G., and Turnbull, D. M., 2002, **The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease**, *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, (28) : 390-396.
- Cremer, J. E., 1970, **Selective inhibition of glucose oxidation by triethyltin in rat brain in vivo**, *Biochem.J.*, (119) : 95-102.
- Croft, S., Gilbert, B. C., Smith, J. R., and Whitwood, A. C., 1992, **An E.S.R. investigation of the reactive intermediate generated in the reaction between FeII and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solution. Direct evidence for the formation of the hydroxyl radical**, *Free Radic.Res.Comm.*, (17) : 21-39.
- Croisile, B., Trillet, M., Fondarai, J., Laurent, B., Mauguier, F., and Billardon, M., 1993, **Long-term and high-dose piracetam treatment of Alzheimer's disease**, *Neurology*, (43) : 301-305.
- Cross, A. R. and Jones, O. T., 1991, **Enzymic mechanisms of superoxide production**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1057) : 281-298.
- Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J., and Fletcher, J., 1993, **The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity**, *J.Immunol.Methods*, (160) : 81-88.

- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., and Kroemer, G., 2000, **Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis**, *FASEB J.*, (14) : 729-739.
- Davies, P. and Maloney, A. J., 1976, **Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease**, *Lancet*, (2) : 1403-
- Davis, R. E., Miller, S., Herrstadt, C., Ghosh, S. S., Fahy, E., Shinobu, L. A., Galasko, D., Thal, L. J., Beal, M. F., Howell, N., and Parker, W. D., Jr., 1997, **Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (94) : 4526-4531.
- De Deyn, P. P., Reuck, J. D., Deberdt, W., Vlietinck, R., and Orgogozo, J. M., 1997, **Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the Piracetam in Acute Stroke Study (PASS) Group**, *Stroke*, (28) : 2347-2352.
- de la Monte, S. M., Chiche, J., von dem, B. A., Sanyal, S., Lahousse, S. A., Janssens, S. P., and Bloch, K. D., 2003, **Nitric oxide synthase-3 overexpression causes apoptosis and impairs neuronal mitochondrial function: relevance to Alzheimer's-type neurodegeneration**, *Lab Invest*, (83) : 287-298.
- de la Monte, S. M., Luong, T., Neely, T. R., Robinson, D., and Wands, J. R., 2000, **Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease**, *Lab Invest*, (80) : 1323-1335.
- De Strooper, B., 2003, **Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex**, *Neuron*, (38) : 9-12.
- DeFeudis, F. V. and Drieu, K., 2000, **Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications**, *Curr.Drug Targets.*, (1) : 25-58.
- DiMauro, S., 1996, **Mitochondrial encephalomyopathies: what next?**, *J.Inherit.Metab Dis.*, (19) : 489-503.
- DiMauro, S. and Schon, E. A., 2003, **Mitochondrial respiratory-chain diseases**, *N.Engl.J.Med.*, (348) : 2656-2668.
- Domanska-Janik, K. and Zaleska, M., 1977, **The action of piracetam on 14C-glucose metabolism in normal and posthypoxic rat cerebral cortex slices**, *Pol.J.Pharmacol.Pharm.*, (29) : 111-116.
- Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S., and Bernstein, A., 1999, **Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects**, *Genes Dev.*, (13) : 2801-2810.
- Dorheim, M. A., Tracey, W. R., Pollock, J. S., and Grammas, P., 1994, **Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease**, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (205) : 659-665.

- Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint, A. P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., and Audia, J. E., 2001, **Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain**, *J.Neurochem.*, (76) : 173-181.
- Drubin, D. G. and Kirschner, M. W., 1986, **Tau protein function in living cells**, *J.Cell Biol.*, (103) : 2739-2746.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X., 2000, **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition**, *Cell*, (102) : 33-42.
- Du, G., Willet, K., Mouithys-Mickalad, A., Sluse-Goffart, C. M., Droy-Lefaix, M. T., and Sluse, F. E., 1999, **EGb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation**, *Free Radic.Biol.Med.*, (27) : 596-604.
- Du, Z. Y. and Li, X. Y., 1998, **Effects of ginkgolides on interleukin-1, tumor necrosis factor- and nitric oxide production by rat microglia stimulated with lipopolysaccharides in vitro**, *Arzneimittelforschung/Drug Res.*, (48) : 1126-1130.
- Eckert, A., Schindowski, K., Leutner, S., Luckhaus, C., Touchet, N., Czech, C., and Muller, W. E., 2001a, **Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice**, *Neurobiol.Dis.*, (8) : 331-342.
- Eckert, A., Steiner, B., Marques, C., Leutz, S., Romig, H., Haass, C., and Muller, W. E., 2001b, **Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation**, *J.Neurosci.Res.*, (64) : 183-192.
- Eckert, G. P., Cairns, N. J., and Muller, W. E., 1999, **Piracetam reverses hippocampal membrane alterations in Alzheimer's disease**, *J.Neural Transm.*, (106) : 757-761.
- Eckert, G. P., Kirsch, C., Leutz, S., Wood, W. G., and Muller, W. E., 2003, **Cholesterol modulates amyloid beta-peptide's membrane interactions**, *Pharmacopsychiatry*, (36 Suppl 2) : S136-S143.
- Enderby, P., Broeckx, J., Hospers, W., Schildermans, F., and Deberdt, W., 1994, **Effect of piracetam on recovery and rehabilitation after stroke: a double-blind, placebo-controlled study**, *Clin.Neuropharmacol.*, (17) : 320-331.

- 
- Engidawork, E., Gulesserian, T., Seidl, R., Cairns, N., and Lubec, G., 2001, **Expression of apoptosis related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease**, *Neurosci.Lett.*, (303) : 79-82.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J., 1990, **Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor**, *Science*, (248) : 1122-1124.
- Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M., and Rydel, R. E., 1997, **Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction**, *J.Neurosci.*, (17) : 7736-7745.
- Etminan, M., Gill, S., and Samii, A., 2003, **Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies**, *BMJ*, (327) : 128-
- Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M. A., Eckman, E. A., Bertram, L., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., and Selkoe, D. J., 2004, **Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein**, *Am.J.Pathol.*, (164) : 1425-1434.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T., 2001, **Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (98) : 5856-5861.
- Fassoulaki, A., Kostopanagiotou, G., Kaniaris, P., and Varonos, D. D., 1985, **Piracetam attenuates the changes in the surface potential of the phosphatidylcholine monolayer produced by alcohols**, *Acta Anaesthesiol.Belg.*, (36) : 47-51.
- Fernandez-Vizarra, P., Fernandez, A. P., Castro-Blanco, S., Serrano, J., Bentura, M. L., Martinez-Murillo, R., Martinez, A., and Rodrigo, J., 2004, **Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease**, *Histol.Histopathol.*, (19) : 823-844.
- Finsterer, J., 2004, **Mitochondriopathies**, *Eur.J.Neurol.*, (11) : 163-186.
- Forsmark-Andree, P., Dallner, G., and Ernster, L., 1995, **Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles**, *Free Radic.Biol.Med.*, (19) : 749-757.
- Forsmark-Andree, P., Lee, C. P., Dallner, G., and Ernster, L., 1997, **Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles**, *Free Radic.Biol.Med.*, (22) : 391-400.

- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., and Mattson, M. P., 1996, **Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain**, *J.Neurochem.*, (67) : 1882-1896.
- Furuno, T., Kanno, T., Arita, K., Asami, M., Utsumi, T., Doi, Y., Inoue, M., and Utsumi, K., 2001, **Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition**, *Biochem.Pharmacol.*, (62) : 1037-1046.
- Gabryel, B., Adamek, M., Pudelko, A., Malecki, A., and Trzeciak, H. I., 2002, **Piracetam and vinpocetine exert cytoprotective activity and prevent apoptosis of astrocytes in vitro in hypoxia and reoxygenation**, *Neurotoxicology*, (23) : 19-31.
- Gabryel, B., Trzeciak, H. I., Pudelko, A., and Cieslik, P., 1999, **Influence of piracetam and oxiracetam on the content of high-energy phosphates and morphometry of astrocytes in vitro**, *Pol.J.Pharmacol.*, (51) : 485-495.
- Gajewski, C. D., Yang, L., Schon, E. A., and Manfredi, G., 2003, **New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters**, *Mol.Biol.Cell*, (14) : 3628-3635.
- Garcia, M. L. and Cleveland, D. W., 2001, **Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease**, *Curr.Opin.Cell Biol.*, (13) : 41-48.
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., and Knowles, R. G., 1997, **1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo**, *J.Biol.Chem.*, (272) : 4959-4963.
- Gibson, G. E., Sheu, K. F., and Blass, J. P., 1998, **Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease**, *J.Neural Transm.*, (105) : 855-870.
- Giuffre, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T., and Brunori, M., 1996, **On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide**, *J.Biol.Chem.*, (271) : 33404-33408.
- Giurgea, C. E., 1982, **The Nootropic Concept and Its Prospective Implications**, *Drug Development Research*, (2) : 441-446.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W., 1984a, **Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein**, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, (122) : 1131-1135.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W., 1984b, **Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein**, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, (120) : 885-890.

- 
- Gogvadze, V., Stridh, H., Orrenius, S., and Cotgreave, I., 2002, **Tributyltin causes cytochrome C release from isolated mitochondria by two discrete mechanisms**, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (292) : 904-908.
- Gohil, K., Moy, R. K., Farzin, S., Maguire, J. J., and Packer, L., 2001, **mRNA Expression Profile of a Human Cancer Cell Line in Response to Ginkgo Biloba Extract: Induction of Antioxidant Response and the Golgi System**, *Free Radic.Res.*, (33) : 831-849.
- Goncharova, E. I., Nadas, A., and Rossman, T. G., 1996, **Serum deprivation, but not inhibition of growth per se, induces a hypermutable state in Chinese hamster G12 cells**, *Cancer Res.*, (56) : 752-756.
- Gottlieb, E., Armour, S. M., and Thompson, C. B., 2002, **Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (99) : 12801-12806.
- Gottlieb, R. A. and Granville, D. J., 2002, **Analyzing mitochondrial changes during apoptosis**, *Methods*, (26) : 341-347.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R., 1977, **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5**, *J.Gen.Virol.*, (36) : 59-74.
- Green, D. R. and Evan, G. I., 2002, **A matter of life and death**, *Cancer Cell*, (1) : 19-30.
- Green, D. R. and Kroemer, G., 2004, **The pathophysiology of mitochondrial cell death**, *Science*, (305) : 626-629.
- Green, D. R. and Reed, J. C., 1998, **Mitochondria and apoptosis**, *Science*, (281) : 1309-1312.
- Greenamyre, J. T., Sherer, T. B., Betarbet, R., and Panov, A. V., 2001, **Complex I and Parkinson's disease**, *IUBMB.Life*, (52) : 135-141.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S., 1976, **Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (73) : 2424-2428.
- Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P., 1995, **Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion**, *Biochem.J.*, (307 ( Pt 1)) : 93-98.
- Haass, C., 2004, **Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation**, *EMBO J.*, (23) : 483-488.
- Haass, C., Hung, A. Y., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B., 1994, **Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor**, *J.Biol.Chem.*, (269) : 17741-17748.

- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J., 1995, **The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway**, *Nat.Med.*, (1) : 1291-1296.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., and Connern, C. P., 1997, **Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase**, *J.Biol.Chem.*, (272) : 3346-3354.
- Hanson, A. J., Prasad, J. E., Nahreini, P., Andreatta, C., Kumar, B., Yan, X. D., and Prasad, K. N., 2003, **Overexpression of amyloid precursor protein is associated with degeneration, decreased viability, and increased damage caused by neurotoxins (prostaglandins A1 and E2, hydrogen peroxide, and nitric oxide) in differentiated neuroblastoma cells**, *J.Neurosci.Res.*, (74) : 148-159.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A., 1992, **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis**, *Science*, (256) : 184-185.
- Harman, D., 1972, **Free radical theory of aging: dietary implications**, *Am.J.Clin.Nutr.*, (25) : 839-843.
- Harman, D., 1992, **Free radical theory of aging**, *Mutat.Res.*, (275) : 257-266.
- Harrison, S. M., Harper, A. J., Hawkins, J., Duddy, G., Grau, E., Pugh, P. L., Winter, P. H., Shilliam, C. S., Hughes, Z. A., Dawson, L. A., Gonzalez, M. I., Upton, N., Pangalos, M. N., and Dingwall, C., 2003, **BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes**, *Mol.Cell Neurosci.*, (24) : 646-655.
- Hartmann, T., 1999, **Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide**, *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, (249) : 291-298.
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., and Beyreuther, K., 1997, **Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides**, *Nat.Med.*, (3) : 1016-1020.
- Heiss, W. D., Hebold, I., Klinkhammer, P., Ziffling, P., Szelies, B., Pawlik, G., and Herholz, K., 1988, **Effect of piracetam on cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease as measured by positron emission tomography**, *J.Cereb.Blood Flow Metab.*, (8) : 613-617.
- Heiss, W. D., Herholz, K., Pawlik, G., Hebold, I., Klinkhammer, P., and Szelies, B., 1989, **Positron emission tomography findings in dementia disorders: contributions to differential diagnosis and objectivizing of therapeutic effects**, *Keio J.Med.*, (38) : 111-135.



- Hensley, K., Maitd, M. L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W. R., and Floyd, R. A., 1998, **Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation**, *J.Neurosci.*, (18) : 8126-8132.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G., and Smith, M. A., 2001, **Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease**, *J.Neurosci.*, (21) : 3017-3023.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., and Nitsch, R. M., 2003, **Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease**, *Neuron*, (38) : 547-554.
- Hom, R. K., Gailunas, A. F., Mamo, S., Fang, L. Y., Tung, J. S., Walker, D. E., Davis, D., Thorsett, E. D., Jewett, N. E., Moon, J. B., and John, V., 2004, **Design and synthesis of hydroxyethylene-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase**, *J.Med.Chem.*, (47) : 158-164.
- Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C., and Tang, J., 2000, **Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor**, *Science*, (290) : 150-153.
- Horakova, L., Licht, A., Sandig, G., Jakstadt, M., Durackova, Z., and Grune, T., 2003, **Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury**, *Arch.Toxicol.*, (77) : 22-29.
- Horvath, B., Marton, Z., Halmosi, R., Alexy, T., Szapary, L., Vekasi, J., Biro, Z., Habon, T., Kesmarky, G., and Toth, K., 2002, **In vitro antioxidant properties of pentoxifylline, piracetam, and vinpocetine**, *Clin.Neuropharmacol.*, (25) : 37-42.
- Hoyer, S., 2000, **Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update**, *Exp.Gerontol.*, (35) : 1363-1372.
- Hoyer, S., 2003, **Memory function and brain glucose metabolism**, *Pharmacopsychiatry*, (36 Suppl 1) : S62-S67.
- Hoyer, S., 2004, **Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease**, *Eur.J.Pharmacol.*, (490) : 115-125.
- Huang, N. K., 2003, **Adenosine A2A receptors regulate oxidative stress formation in rat pheochromocytoma PC12 cells during serum deprivation**, *Neurosci.Lett.*, (350) : 127-131.

- in, t., V, Ruitenbergh, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., Breteler, M. M., and Stricker, B. H., 2001, **Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease**, *N.Engl.J.Med.*, (345) : 1515-1521.
- Jang, J. H. and Surh, Y. J., 2003, **Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death**, *Free Radic.Biol.Med.*, (34) : 1100-1110.
- Janssens, D., Delaive, E., Remacle, J., and Michiels, C., 2000, **Protection by bilobalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity**, *Fundam.Clin.Pharmacol.*, (14) : 193-201.
- Janssens, D., Michiels, C., Delaive, E., Eliaers, F., Drieu, K., and Remacle, J., 1995, **Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide**, *Biochem.Pharmacol.*, (50) : 991-999.
- Janssens, D., Remacle, J., Drieu, K., and Michiels, C., 1999, **Protection of mitochondrial respiration activity by bilobalide**, *Biochem.Pharmacol.*, (58) : 109-119.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H. T., Nixon, R. A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P. E., George-Hyslop, P., and Westaway, D., 2000, **A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease**, *Nature*, (408) : 979-982.
- Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F., and Rosen, B. R., 1993, **Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy**, *Neurology*, (43) : 2689-2695.
- Jenkins, S. M. and Johnson, G. V., 1998, **Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ**, *Neuroreport*, (9) : 67-71.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S., and Drachman, D. A., 2000, **Statins and the risk of dementia**, *Lancet*, (356) : 1627-1631.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., and Goldstein, L. S., 2000, **Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I**, *Neuron*, (28) : 449-459.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R., 2003, **APP processing and synaptic function**, *Neuron*, (37) : 925-937.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B., 1987, **The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor**, *Nature*, (325) : 733-736.

- Kanowski, S., Herrmann, W. M., Stephan, K., Wierich, W., and Horr, R., 1996, **Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia**, *Pharmacopsychiatry*, (29) : 47-56.
- Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M., and Wink, D. A., 1996, **"NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms**, *Methods Enzymol.*, (268) : 281-293.
- Kefas, B. A., Cai, Y., Kerckhofs, K., Ling, Z., Martens, G., Heimberg, H., Pipeleers, D., and Castele, M. V., 2004, **Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis**, *Biochem.Pharmacol.*, (68) : 409-416.
- Kefas, B. A., Cai, Y., Ling, Z., Heimberg, H., Hue, L., Pipeleers, D., and Van de, C. M., 2003, **AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase**, *J.Mol.Endocrinol.*, (30) : 151-161.
- Khan, S. M., Cassarino, D. S., Abramova, N. N., Keeney, P. M., Borland, M. K., Trimmer, P. A., Krebs, C. T., Bennett, J. C., Parks, J. K., Swerdlow, R. H., Parker, W. D., Jr., and Bennett, J. P., Jr., 2000, **Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways**, *Ann.Neurol.*, (48) : 148-155.
- Kienlen-Campard, P., Miolet, S., Tasiaux, B., and Octave, J. N., 2002, **Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid- beta peptides, induces neuronal apoptosis**, *J.Biol.Chem.*, (277) : 15666-15670.
- Kim, H. S., Kim, E. M., Lee, J. P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J. H., Chang, K. A., Yu, E., Jeong, S. J., Chong, Y. H., and Suh, Y. H., 2003, **C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression**, *FASEB J.*, (17) : 1951-1953.
- Kim, S. H., Vlkolinsky, R., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G., 2001, **The reduction of NADH ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease**, *Life Sci.*, (68) : 2741-2750.
- Kim, S. H., Vlkolinsky, R., Cairns, N., and Lubec, G., 2000, **Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome**, *Cell Mol.Life Sci.*, (57) : 1810-1816.
- Kish, S. J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiacomo, F., Chang, L. J., Wilson, J. M., DiStefano, L. M., and Nobrega, J. N., 1992, **Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease**, *J.Neurochem.*, (59) : 776-779.

- Kish, S. J., Mastrogiacomo, F., Guttman, M., Furukawa, Y., Taanman, J. W., Dozic, S., Pandolfo, M., Lamarche, J., DiStefano, L., and Chang, L. J., 1999, **Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change?**, *J.Neurochem.*, (72) : 700-707.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., Ota, T., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Smith, M. A., Perry, G., Whitehouse, P. J., and Taniguchi, T., 1998, **Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease**, *Brain Res.*, (780) : 260-269.
- Kleijnen, J. and Knipschild, P., 1992a, **Ginkgo biloba**, *Lancet*, (340) : 1136-1139.
- Kleijnen, J. and Knipschild, P., 1992b, **Ginkgo biloba for cerebral insufficiency**, *Br.J.Clin.Pharmacol.*, (34) : 352-358.
- Klein, J., Weichel, O., Hilgert, M., Rupp, J., Chatterjee, S. S., and Nawrath, H., 2003, **Excitotoxic hippocampal membrane breakdown and its inhibition by bilobalide: role of chloride fluxes**, *Pharmacopsychiatry*, (36 Suppl 1) : S78-S83.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E., 2001, **Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?**, *Trends Neurosci.*, (24) : 219-224.
- Kojima, H., Hirata, M., Kudo, Y., Kikuchi, K., and Nagano, T., 2001, **Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia**, *J Neurochem.*, (76) : 1404-1410.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F., 2001, **Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (98) : 5815-5820.
- Koppenol, W. H., 1990, **What is in a name? Rules for radicals**, *Free Radic.Biol.Med.*, (9) : 225-227.
- Krohn, A. J., Wahlbrink, T., and Prehn, J. H., 1999, **Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis**, *J.Neurosci.*, (19) : 7394-7404.
- Kruman, I. I., Pedersen, W. A., Springer, J. E., and Mattson, M. P., 1999, **ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis**, *Exp.Neurol.*, (160) : 28-39.
- Kuwana, T. and Newmeyer, D. D., 2003, **Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis**, *Curr.Opin.Cell Biol.*, (15) : 691-699.
- Lacza, Z., Snipes, J. A., Zhang, J., Horvath, E. M., Figueroa, J. P., Szabo, C., and Busija, D. W., 2003, **Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS**, *Free Radic.Biol.Med.*, (35) : 1217-1228.

- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L., 1998, **Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (95) : 6448-6453.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F., 1999, **Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (96) : 3922-3927.
- Lanctot, K. L., Herrmann, N., Yau, K. K., Khan, L. R., Liu, B. A., LouLou, M. M., and Einarson, T. R., 2003, **Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis**, *CMAJ*, (169) : 557-564.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., and Irwin, I., 1983, **Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis**, *Science*, (219) : 979-980.
- Lanz, T. A., Himes, C. S., Pallante, G., Adams, L., Yamazaki, S., Amore, B., and Merchant, K. M., 2003, **The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A beta levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice**, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, (305) : 864-871.
- Law, A., Gauthier, S., and Quirion, R., 2001a, **Neuroprotective and neurorescuing effects of isoform-specific nitric oxide synthase inhibitors, nitric oxide scavenger, and antioxidant against beta-amyloid toxicity**, *Br.J.Pharmacol.*, (133) : 1114-1124.
- Law, A., Gauthier, S., and Quirion, R., 2001b, **Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type**, *Brain Res.Brain Res.Rev.*, (35) : 73-96.
- Le Bars, P. L., Katz, M. M., Berman, N., Itil, T. M., Freedman, A. M., and Schatzberg, A. F., 1997, **A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group**, *JAMA*, (278) : 1327-1332.
- Le Bars, P. L., Kieser, M., and Itil, K. Z., 2000, **A 26-week analysis of a double-blind, placebo-controlled trial of the ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia**, *Dement.Geriatr.Cogn Disord.*, (11) : 230-237.
- Le Bars, P. L., Velasco, F. M., Ferguson, J. M., Dessain, E. C., Kieser, M., and Hoerr, R., 2002, **Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the Gnkgo biloba extract EGb 761 in Alzheimer's disease**, *Neuropsychobiology*, (45) : 19-26.
- Lee, H. C., Yin, P. H., Chi, C. W., and Wei, Y. H., 2002, **Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence**, *J.Biomed.Sci.*, (9) : 517-526.

- 
- Lee, H. C., Yin, P. H., Lu, C. Y., Chi, C. W., and Wei, Y. H., 2000, **Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells**, *Biochem.J.*, (348 Pt 2) : 425-432.
- Legrain, Y. and MacKenzie, E. T., 1981, **Various indices of brain metabolism and activity in a model of chronic neurological dysfunction: triethyl tin intoxication in the rat**, *Eur.Neurol.*, (20) : 183-187.
- Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M., and Kelly, D. P., 2000, **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis**, *J.Clin.Invest.*, (106) : 847-856.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J., 2002, **Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics**, *Cancer Cell*, (2) : 183-192.
- Leutz, S., Steiner, B., Marques, C. A., Haass, C., Muller, W. E., and Eckert, A., 2002, **Reduction of trophic support enhances apoptosis in PC12 cells expressing Alzheimer's APP mutation and sensitizes cells to staurosporine-induced cell death**, *J.Mol.Neurosci.*, (18) : 189-201.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J., 1998, **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis**, *Cell*, (94) : 491-501.
- Lin, M. T., Simon, D. K., Ahn, C. H., Kim, L. M., and Beal, M. F., 2002, **High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain**, *Hum.Mol.Genet.*, (11) : 133-145.
- Lipton, S. A. and Rosenberg, P. A., 1994, **Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders**, *N.Engl.J.Med.*, (330) : 613-622.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C. X., 2002, **Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta**, *FEBS Lett.*, (530) : 209-214.
- Lloreta-Trull, J. and Serrano, S., 1998, **Biology and pathology of the mitochondrion**, *Ultrastruct.Pathol.*, (22) : 357-367.
- Loesch, A., Belai, A., and Burnstock, G., 1994, **An ultrastructural study of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery**, *J.Neurocytol.*, (23) : 49-59.
- Loiseau, D., Chevrollier, A., Douay, O., Vavasseur, F., Renier, G., Reynier, P., Malthiery, Y., and Stepien, G., 2002, **Oxygen consumption and expression of the adenine nucleotide translocator in cells lacking mitochondrial DNA**, *Exp.Cell Res.*, (278) : 12-18.

- Lorenzo, A. and Yankner, B. A., 1994, **Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (91) : 12243-12247.
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., and Markesbery, W. R., 1995, **Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease**, *Neurology*, (45) : 1594-1601.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., and Rogers, J., 1999, **Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease**, *Am.J.Pathol.*, (155) : 853-862.
- Luo, Y., Smith, J. V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K. J., Buford, J. P., Khan, I., Netzer, W. J., Xu, H., and Butko, P., 2002, **Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (99) : 12197-12202.
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L. F., Walker, D. G., Kuppusamy, P., Zewier, Z. L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S. S., and Wu, H., 2004, **ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease**, *Science*, (304) : 448-452.
- Luth, H. J., Holzer, M., Gartner, U., Staufenbiel, M., and Arendt, T., 2001, **Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology**, *Brain Res.*, (913) : 57-67.
- Luth, H. J., Munch, G., and Arendt, T., 2002, **Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation**, *Brain Res.*, (953) : 135-143.
- Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., and Halliwell, B., 1997, **An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease**, *J.Neurochem.*, (68) : 2061-2069.
- Mancuso, M., Filosto, M., Bosetti, F., Ceravolo, R., Rocchi, A., Tognoni, G., Manca, M. L., Solaini, G., Siciliano, G., and Murri, L., 2003, **Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease**, *Exp.Neurol.*, (182) : 421-426.
- Markesbery, W. R., 1997, **Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease**, *Free Radic.Biol.Med.*, (23) : 134-147.
- Marques C.A., Bonert, A., Keil, U., Muller, W. E., and Eckert, A., 2004, **Intracellular signal cascade triggered by  $\beta$ -amyloid**, *5th Int Conference on Cell and Molecular Biology of Alzheimer's disease, Hamburg, Germany, Nov 2003*.

- Marques, C. A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W. E., and Eckert, A., 2003, **Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway**, *J.Biol.Chem.*, (278) : 28294-28302.
- Martinou, J. C. and Green, D. R., 2001, **Breaking the mitochondrial barrier**, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, (2) : 63-67.
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., and Hansen, L. A., 1998, **Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease**, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, (57) : 1041-1052.
- Massieu, L., Moran, J., and Christen, Y., 2004, **Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons**, *Brain Res.*, (1002) : 76-85.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K., 1985, **Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (82) : 4245-4249.
- Maurer, I., Zierz, S., and Moller, H. J., 2000, **A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients**, *Neurobiol.Aging*, (21) : 455-462.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., and Masters, C. L., 1999, **Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease**, *Ann.Neurol.*, (46) : 860-866.
- Menzies, F. M., Ince, P. G., and Shaw, P. J., 2002, **Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis**, *Neurochem.Int.*, (40) : 543-551.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Lins, L., Bensliman, M., Thomas, A., Van Bambeke, F., Peuvot, J., Schanck, A., and Brasseur, R., 2003, **Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide Abeta C-terminal fragment**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1609) : 28-38.
- Miquel, J., Economos, A. C., Fleming, J., and Johnson, J. E., Jr., 1980, **Mitochondrial role in cell aging**, *Exp.Gerontol.*, (15) : 575-591.
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y., 2000, **Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells**, *Biochemistry*, (39) : 6951-6959.
- Moncada, S. and Erusalimsky, J. D., 2002, **Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?**, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, (3) : 214-220.



- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G. W., 2000, **A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease**, *Nature*, (408) : 982-985.
- Muller, W. E., Eckert, G. P., and Eckert, A., 1999a, **Piracetam: novelty in a unique mode of action**, *Pharmacopsychiatry*, (32 Suppl 1) : 2-9.
- Muller, W. E., Kirsch, C., and Eckert, G. P., 2001, **Membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides**, *Biochem.Soc.Trans.*, (29) : 617-623.
- Muller, W. E., Koch, S., Scheuer, K., Rostock, A., and Bartsch, R., 1997a, **Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain**, *Biochem.Pharmacol.*, (53) : 135-140.
- Naftalin, R. J., Cunningham, P., and Afzal-Ahmed, I., 2004, **Piracetam and TRH analogues antagonise inhibition by barbiturates, diazepam, melatonin and galanin of human erythrocyte D-glucose transport**, *Br.J.Pharmacol.*, (142) : 594-608.
- Neve, R. L., Finch, E. A., and Dawes, L. R., 1988, **Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain**, *Neuron*, (1) : 669-677.
- Newmeyer, D. D. and Ferguson-Miller, S., 2003, **Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death**, *Cell*, (112) : 481-490.
- Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V., and Heikkila, R. E., 1987, **MPTP, MPP+ and mitochondrial function**, *Life Sci.*, (40) : 721-729.
- Nishikimi, A., Kira, Y., Kasahara, E., Sato, E. F., Kanno, T., Utsumi, K., and Inoue, M., 2001, **Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release**, *Biochem.J.*, (356) : 621-626.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., and Ogata, E., 1993, **Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)**, *Nature*, (362) : 75-79.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., and Carruba, M. O., 2003, **Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide**, *Science*, (299) : 896-899.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L. F., and Duff, K., 2003, **Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo**, *Neuron*, (38) : 555-565.

- Norris, P. J., Faull, R. L., and Emson, P. C., 1996, **Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains**, *Brain Res.Mol.Brain Res.*, (41) : 36-49.
- Novikov, V. E. and Sharov, A., 1991, **[The effect of GABA-ergic agents on oxidative phosphorylation in the brain mitochondria in traumatic edema]**, *Farmakol.Toksikol.*, (54) : 44-46.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., and Smith, M. A., 2001, **Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease**, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, (60) : 759-767.
- Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., and Shimeno, H., 2004, **Crocini prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol**, *Neurosci.Lett.*, (362) : 61-64.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., and LaFerla, F. M., 2003, **Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction**, *Neuron*, (39) : 409-421.
- Ojaimi, J., Masters, C. L., McLean, C., Opeskin, K., McKelvie, P., and Byrne, E., 1999, **Irregular distribution of cytochrome c oxidase protein subunits in aging and Alzheimer's disease**, *Ann.Neurol.*, (46) : 656-660.
- Oken, B. S., Storzbach, D. M., and Kaye, J. A., 1998, **The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease**, *Arch.Neurol.*, (55) : 1409-1415.
- Olivieri, G., Baysang, G., Meier, F., Muller-Spahn, F., Stahelin, H. B., Brockhaus, M., and Brack, C., 2001, **N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation**, *J.Neurochem.*, (76) : 224-233.
- Olney, J. W., Wozniak, D. F., and Farber, N. B., 1998, **Glutamate receptor dysfunction and Alzheimer's disease**, *Restor.Neurol.Neurosci.*, (13) : 75-83.
- Orgogozo, J. M., 1999, **Piracetam in the treatment of acute stroke**, *Pharmacopsychiatry*, (32 Suppl 1) : 25-32.
- Oshino, N. and Chance, B., 1977, **Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase**, *Biochem.J.*, (162) : 509-525.
- Otani, M., Chatterjee, S. S., Gabard, B., and Kreutzberg, G. W., 1986, **Effect of an extract of Ginkgo biloba on triethyltin-induced cerebral edema**, *Acta Neuropathol.(Berl)*, (69) : 54-65.

- Oyama, Y., Fuchs, P. A., Katayama, N., and Noda, K., 1994, **Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca(2+)-loaded brain neurons**, *Brain Res.*, (635) : 125-129.
- Pandey, S., Lopez, C., and Jammu, A., 2003, **Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin**, *Apoptosis.*, (8) : 497-508.
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., and Greenamyre, J. T., 2002, **Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines**, *Nat.Neurosci.*, (5) : 731-736.
- Parker, W. D., Jr., 1991, **Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease**, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, (640) : 59-64.
- Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J., and Parks, J. K., 1989, **Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease**, *Ann.Neurol.*, (26) : 719-723.
- Parker, W. D., Jr., Filley, C. M., and Parks, J. K., 1990, **Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease**, *Neurology*, (40) : 1302-1303.
- Parker, W. D., Jr., Mahr, N. J., Filley, C. M., Parks, J. K., Hughes, D., Young, D. A., and Cullum, C. M., 1994a, **Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease**, *Neurology*, (44) : 1086-1090.
- Parker, W. D., Jr., Parks, J., Filley, C. M., and Kleinschmidt-DeMasters, B. K., 1994b, **Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain**, *Neurology*, (44) : 1090-1096.
- Parker, W. D., Jr. and Parks, J. K., 1995, **Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization**, *Neurology*, (45) : 482-486.
- Parks, J. K., Smith, T. S., Trimmer, P. A., Bennett, J. P., Jr., and Parker, W. D., Jr., 2001, **Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro**, *J.Neurochem.*, (76) : 1050-1056.
- Parnetti, L., Reboldi, G. P., and Gallai, V., 2000, **Cerebrospinal fluid pyruvate levels in Alzheimer's disease and vascular dementia**, *Neurology*, (54) : 735-737.
- Pearce, L. L., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., Pitt, B. R., and Peterson, J., 2001, **Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide**, *Nitric.Oxide.*, (5) : 128-136.

- Pelsman, A., Hoyo-Vadillo, C., Gudasheva, T. A., Seredenin, S. B., Ostrovskaya, R. U., and Busciglio, J., 2003, **GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons**, *Int.J.Dev.Neurosci.*, (21) : 117-124.
- Penninger, J. M. and Kroemer, G., 2003, **Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution**, *Nat.Cell Biol.*, (5) : 97-99.
- Pereira, C., Santos, M. S., and Oliveira, C., 1998, **Mitochondrial function impairment induced by amyloid beta-peptide on PC12 cells**, *Neuroreport*, (9) : 1749-1755.
- Peuvot, J., Schanck, A., Deleers, M., and Brasseur, R., 1995, **Piracetam-induced changes to membrane physical properties. A combined approach by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and conformational analysis**, *Biochem.Pharmacol.*, (50) : 1129-1134.
- Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., and Culcasi, M., 1997, **Cardioprotective and antioxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761)**, *J.Mol.Cell Cardiol.*, (29) : 733-742.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W., 1993, **Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state**, *J.Neurosci.*, (13) : 1676-1687.
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W., 1991, **In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity**, *Brain Res.*, (563) : 311-314.
- Pilch, H. and Muller, W. E., 1988, **Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice**, *Psychopharmacology (Berl)*, (94) : 74-78.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F., 2004, **A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model**, *J.Clin.Invest*, (113) : 1456-1464.
- Powers, M. F. and Beavis, A. D., 1991, **Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel**, *J.Biol.Chem.*, (266) : 17250-17256.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., and Castro, L., 2002, **Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria**, *Free Radic.Biol.Med.*, (33) : 1451-1464.
- Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., and Telleri, R., 1994, **Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite**, *Arch.Biochem.Biophys.*, (308) : 89-95.

- Rasmussen, U. F. and Rasmussen, H. N., 2000, **Human quadriceps muscle mitochondria: a functional characterization**, *Mol.Cell Biochem.*, (208) : 37-44.
- Redjems-Bennani, N., Jeandel, C., Lefebvre, E., Blain, H., Vidailhet, M., and Gueant, J. L., 1998, **Abnormal substrate levels that depend upon mitochondrial function in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients**, *Gerontology*, (44) : 300-304.
- Reed, J. C., 2000, **Mechanisms of apoptosis**, *Am.J.Pathol.*, (157) : 1415-1430.
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., and Matsuyama, S., 1998, **Bcl-2 family proteins and mitochondria**, *Biochim.Biophys.Acta*, (1366) : 127-137.
- Reines, S. A., Block, G. A., Morris, J. C., Liu, G., Nessly, M. L., Lines, C. R., Norman, B. A. and Baranak, C. C., 2004, **Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study**, *Neurology*, (62) : 66-71.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H. J., 2003, **Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease**, *N.Engl.J.Med.*, (348) : 1333-1341.
- Richter, C., Park, J. W., and Ames, B. N., 1988, **Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (85) : 6465-6467.
- Rimbach, G., Gohil, K., Matsugo, S., Moini, H., Saliou, C., Virgili, F., Weber, S. U., and Packer, L., 2001, **Induction of glutathione synthesis in human keratinocytes by Ginkgo biloba extract (EGb761)**, *Biofactors*, (15) : 39-52.
- Robak, J. and Gryglewski, R. J., 1988, **Flavonoids are scavengers of superoxide anions**, *Biochem.Pharmacol.*, (37) : 837-841.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S., and McConlogue, L., 2001, **BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics**, *Hum.Mol.Genet.*, (10) : 1317-1324.
- Robinson, N. C., 1993, **Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase**, *J.Bioenerg.Biomembr.*, (25) : 153-163.
- Rong, Y., Geng, Z., and Lau, B. H., 1996, **Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells**, *Free Radic.Biol.Med.*, (20) : 121-127.

- Roth, K. A., 2001, **Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion**, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, (60) : 829-838.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., and Castelli, F., 1995, **Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes**, *Free Radic.Biol.Med.*, (19) : 481-486.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., and Cossarizza, A., 1997, **JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis**, *FEBS Lett.*, (411) : 77-82.
- Santens, P., De Bleecker, J., Goethals, P., Strijckmans, K., Lemahieu, I., Slegers, G., Dierckx, R., and De Reuck, J., 2001, **Differential regional cerebral uptake of (18)F-fluoro-2-deoxy-D-glucose in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia at initial diagnosis**, *Eur.Neurol.*, (45) : 19-27.
- Sarti, P., Arese, M., and Giuffre, A., 2003, **The molecular mechanisms by which nitric oxide controls mitochondrial complex IV**, *Ital.J.Biochem.*, (52) : 37-42.
- Sarti, P., Giuffre, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M. C., and Brunori, M., 2000, **Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation**, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (274) : 183-187.
- Sasaki, K., Hatta, S., Wada, K., Ueda, N., Yoshimura, T., Endo, T., Sakata, M., Tanaka, T., and Haga, M., 2002, **Effects of extract of Ginkgo biloba leaves and its constituents on carcinogen-metabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver**, *Life Sci.*, (70) : 1657-1667.
- Sasaki, M., Gonzalez-Zulueta, M., Huang, H., Herring, W. J., Ahn, S., Ginty, D. D., Dawson, V. L., and Dawson, T. M., 2000, **Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (97) : 8617-8622.
- Sasaki, S. and Iwata, M., 1996, **Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis**, *Neurology*, (47) : 535-540.
- Sastre, J., Borrás, C., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F. V., and Vina, J., 2002a, **Mitochondrial damage in aging and apoptosis**, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, (959) : 448-451.
- Sastre, J., Lloret, A., Borrás, C., Pereda, J., Garcia-Sala, D., Droy-Lefaix, M. T., Pallardo, F. V., and Vina, J., 2002b, **Ginkgo biloba extract EGb 761 protects against mitochondrial aging in the brain and in the liver**, *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, (48) : 685-692.

- Sastre, J., Millan, A., de la Ascuncion, J. G., Pallardo, F. V., Droy-Lefaix, M. T., and Vinal, J., 1998a, **Prevention of age-associated mitochondrial DNA damage by Ginkgo biloba extract EGb 761**, *Proceedings of the VIII Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research*, Prous J.R.(ed), Barcelona.,
- Sastre, J., Millan, A., Garcia, d. I. A., Pla, R., Juan, G., Pallardo, O'Connor, E., Martin, J. A., Droy-Lefaix, M. T., and Vina, J., 1998b, **A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress**, *Free Radic.Biol.Med.*, (24) : 298-304.
- Sastre, J., Pallardo, F. V., Garcia, d. I. A., and Vina, J., 2000, **Mitochondria, oxidative stress and aging**, *Free Radic.Res.*, (32) : 189-198.
- Sato, N., Kamino, K., Tateishi, K., Satoh, T., Nishiwaki, Y., Yoshiiwa, A., Miki, T., and Ogihara, T., 1997, **Elevated amyloid beta protein(1-40) level induces CREB phosphorylation at serine-133 via p44/42 MAP kinase (Erk1/2)-dependent pathway in rat pheochromocytoma PC12 cells**, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, (232) : 637-642.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J., and ., 1993, **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease**, *Neurology*, (43) : 1467-1472.
- Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J., III, Kandel, E. R., Duff, K., Kirkwood, A., and Shen, J., 2004, **Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration**, *Neuron*, (42) : 23-36.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P., 1999, **Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse**, *Nature*, (400) : 173-177.
- Scheuer, K., Rostock, A., Bartsch, R., and Muller, W. E., 1999a, **Piracetam improves cognitive performance by restoring neurochemical deficits of the aged rat brain**, *Pharmacopsychiatry* , (32 Suppl 1) : 10-16.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., 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., and Younkin, S., 1996, **Secreted amyloid beta-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**, *Nat.Med.*, (2) : 864-870.

- Schindowski, K., Kratzsch, T., Peters, J., Steiner, B., Leutner, S., Touchet, N., Maurer, K., Czech, C., Pradier, L., Frolich, L., Muller, W. E., and Eckert, A., 2003, **Impact of aging: sporadic, and genetic risk factors on vulnerability to apoptosis in Alzheimer's disease**, *Neuromolecular.Med.*, (4) : 161-178.
- Schindowski, K., Leutner, S., Kressmann, S., Eckert, A., and Muller, W. E., 2001, **Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761)**, *J.Neural Transm.*, (108) : 969-978.
- Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D., and Roses, A. D., 1993, **Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (90) : 9649-9653.
- Scholtyssek, H., Damerau, W., Wessel, R., and Schimke, I., 1997, **Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment**, *Chem.Biol.Interact.*, (106) : 183-190.
- Schon, E. A. and Manfredi, G., 2003, **Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction**, *J.Clin.Invest* , (111) : 303-312.
- Schuessel, K., Leutner, S., Cairns, N. J., Muller, W. E., and Eckert, A., 2004, **Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain**, *J.Neural Transm.*, (111) : 1167-1182.
- Scorrano, L. and Korsmeyer, S. J., 2003, **Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members**, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, (304) : 437-444.
- Selkoe, D. J., 2001, **Clearing the brain's amyloid cobwebs**, *Neuron*, (32) : 177-180.
- Selkoe, D. J., 2002, **Alzheimer's disease is a synaptic failure**, *Science*, (298) : 789-791.
- Selkoe, D. J., 2004, **Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies**, *Ann.Intern.Med.*, (140) : 627-638.
- Selkoe, D. J. and Schenk, D., 2003, **Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics**, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, (43) : 545-584.
- Selwyn, M. J., Dawson, A. P., Stockdale, M., and Gains, N., 1970, **Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds**, *Eur.J.Biochem.*, (14) : 120-126.



- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., and ., 1992, **Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids**, *Nature*, (359) : 325-327.
- Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Ford, I., Gaw, A., Hyland, M., Jukema, J. W., Kamper, A. M., Macfarlane, P. W., Meinders, A. E., Norrie, J., Packard, C. J., Perry, I. J., Stott, D. J., Sweeney, B. J., Twomey, C., and Westendorp, R. G., 2002, **Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial**, *Lancet*, (360) : 1623-1630.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., and Tsien, J. Z., 2000, **NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation**, *Science*, (290) : 1170-1174.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. L., 1994, **A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth**, *J.Neurosci.*, (14) : 2117-2127.
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., and Markesbery, W. R., 1991, **Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease**, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (88) : 10540-10543.
- Smith, J. V., Burdick, A. J., Golik, P., Khan, I., Wallace, D., and Luo, Y., 2002, **Anti-apoptotic properties of Ginkgo biloba extract EGb 761 in differentiated PC12 cells**, *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, (48) : 699-707.
- Smith, J. V. and Luo, Y., 2003, **Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761**, *J.Alzheimers.Dis.*, (5) : 287-300.
- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S., and Perry, G., 1997, **Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease**, *J.Neurosci.*, (17) : 2653-2657.
- Sobrado, M., Roda, J. M., Lopez, M. G., Egea, J., and Garcia, A. G., 2004, **Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation**, *Neurosci.Lett.*, (365) : 132-136.
- Song, W., Guan, H. J., Zhu, X. Z., Chen, Z. L., Yin, M. L., and Cheng, X. F., 2000, **Protective effect of bilobalide against nitric oxide-induced neurotoxicity in PC12 cells**, *Acta Pharmacol.Sin.*, (21) : 415-420.
- Stackman, R. W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., and Quinn, J. F., 2003, **Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment**, *Exp.Neurol.*, (184) : 510-520.

- Stadtman, E. R., 1992, **Protein oxidation and aging**, *Science*, (257) : 1220-1224.
- Stephenson, K. N., Croxen, R. L., El Barbary, A., Fenstermacher, J. D., and Haspel, H. C., 2000, **Inhibition of glucose transport and direct interactions with type 1 facilitative glucose transporter (GLUT-1) by etomidate, ketamine, and propofol: a comparison with barbiturates**, *Biochem.Pharmacol.*, (60) : 651-659.
- Stridh, H., Kimland, M., Jones, D. P., Orrenius, S., and Hampton, M. B., 1998, **Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis**, *FEBS Lett.*, (429) : 351-355.
- Stridh, H., Orrenius, S., and Hampton, M. B., 1999, **Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin**, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, (156) : 141-146.
- Su, J. H., Anderson, A. J., Cummings, B. J., and Cotman, C. W., 1994, **Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease**, *Neuroreport*, (5) : 2529-2533.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G., 1994, **An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants**, *Science*, (264) : 1336-1340.
- Swerdlow, R. H. and Kish, S. J., 2002, **Mitochondria in Alzheimer's disease**, *Int.Rev.Neurobiol.*, (53) : 341-385.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Cassarino, D. S., Maguire, D. J., Maguire, R. S., Bennett, J. P., Jr., Davis, R. E., and Parker, W. D., Jr., 1997, **Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease?**, *Neurology*, (49) : 918-925.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., Bennett, J. P., Jr., Davis, R. E., and Parker, W. D., Jr., 1996, **Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease**, *Ann.Neurol.*, (40) : 663-671.
- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P., and Gouras, G. K., 2002, **Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology**, *Am.J.Pathol.*, (161) : 1869-1879.
- Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M., and Danni, O., 2003, **Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis**, *Free Radic.Biol.Med.*, (35) : 45-58.
- Tang, F., Nag, S., Shiu, S. Y., and Pang, S. F., 2002, **The effects of melatonin and Ginkgo biloba extract on memory loss and choline acetyltransferase activities in the brain of rats infused intracerebroventricularly with beta-amyloid 1-40**, *Life Sci.*, (71) : 2625-2631.

- 
- Tanzi, R. E., 1999, **A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders**, *J.Clin.Invest.*, (104) : 1175-1179.
- Tappel, A. L., 1973, **Lipid peroxidation damage to cell components**, *Fed.Proc.*, (32) : 1870-1874.
- Tendi, E. A., Bosetti, F., Dasgupta, S. F., Stella, A. M., Drieu, K., and Rapoport, S. I., 2002, **Ginkgo biloba extracts EGb 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells**, *Neurochem.Res.*, (27) : 319-323.
- Torack, R., Gordon, J., and Prokop, J., 1970, **Pathobiology of acute triethyltin intoxication**, *Int.Rev.Neurobiol.*, (12) : 45-86.
- Torres, J., Darley-Usmar, V., and Wilson, M. T., 1995, **Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration**, *Biochem.J.*, (312 ( Pt 1)) : 169-173.
- Trimmer, P. A., Keeney, P. M., Borland, M. K., Simon, F. A., Almeida, J., Swerdlow, R. H., Parks, J. P., Parker, W. D., Jr., and Bennett, J. P., Jr., 2004, **Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture**, *Neurobiol.Dis.*, (15) : 29-39.
- Trimmer, P. A., Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Keeney, P., Bennett, J. P., Jr., Miller, S. W., Davis, R. E., and Parker, W. D., Jr., 2000, **Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines**, *Exp.Neurol.*, (162) : 37-50.
- Tsolaki, M., Pantazi, T., and Kazis, A., 2001, **Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors versus nootropics in Alzheimer's disease: a retrospective, longitudinal study**, *J.Int.Med.Res.*, (29) : 28-36.
- Turrens, J. F. and Boveris, A., 1980, **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria**, *Biochem.J.*, (191) : 421-427.
- Uyeda, K., 1979, **Phosphofructokinase**, *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.*, (48) : 193-244.
- Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R., and Hers, H. G., 1982, **A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate**, *Eur.J.Biochem.*, (129) : 191-195.
- Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., and Mercken, M., 2001, **The functional gamma-secretase inhibitor prevents production of amyloid beta 1-34 in human and murine cell lines**, *Neurosci.Lett.*, (315) : 145-148.

- 
- Varadarajan, S., Kanski, J., Aksenova, M., Lauderback, C., and Butterfield, D. A., 2001, **Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35)**, *J.Am.Chem.Soc.*, (123) : 5625-5631.
- Vassar, R., 2001, **The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease**, *J.Mol.Neurosci.*, (17) : 157-170.
- Vatassery, G. T., Angerhofer, C. K., Knox, C. A., and Deshmukh, D. S., 1984, **Concentrations of vitamin E in various neuroanatomical regions and subcellular fractions, and the uptake of vitamin E by specific areas, of rat brain**, *Biochim.Biophys.Acta*, (792) : 118-122.
- Vieira, H. L., Belzacq, A. S., Haouzi, D., Bernassola, F., Cohen, I., Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Bartle, L. M., Melino, G., Brenner, C., Goldmacher, V., and Kroemer, G., 2001a, **The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal**, *Oncogene*, (20) : 4305-4316.
- Vieira, H. L., Belzacq, A. S., Haouzi, D., Bernassola, F., Cohen, I., Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Bartle, L. M., Melino, G., Brenner, C., Goldmacher, V., and Kroemer, G., 2001b, **The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal**, *Oncogene*, (20) : 4305-4316.
- Waegemans, T., Wilsher, C. R., Danniau, A., Ferris, S. H., Kurz, A., and Winblad, B., 2002, **Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis**, *Dement.Geriatr.Cogn Disord.*, (13) : 217-224.
- Wald, N. and Law, M., 2002, **MRC/BHF Heart Protection Study**, *Lancet*, (360) : 1781-1784.
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B., 1999, **Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates**, *J.Biol.Chem.*, (274) : 25945-25952.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J., 2002, **Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition**, *Biochem.Soc.Trans.*, (30) : 552-557.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., and Selkoe, D. J., 2000, **The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain**, *Biochemistry*, (39) : 10831-10839.
- Wang, X., 2001, **The expanding role of mitochondria in apoptosis**, *Genes Dev.*, (15) : 2922-2933.
- Wassenaar, J. S. and Kroon, A. M., 1973, **Effects of triethyltin on different ATPases, 5'-nucleotidase and phosphodiesterases in grey and white matter of rabbit brain and their relation with brain edema**, *Eur.Neurol.*, (10) : 349-370.

- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H., 2001, **A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity**, *Nature*, (414) : 212-216.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J., 2000, **tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c**, *Genes Dev.*, (14) : 2060-2071.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J., 2001, **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death**, *Science*, (292) : 727-730.
- Wei, T., Ni, Y., Hou, J., Chen, C., Zhao, B., and Xin, W., 2000, **Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by Ginkgo biloba extract**, *Pharmacol.Res.*, (41) : 427-433.
- Wei, Y. H., Lee, C. F., Lee, H. C., Ma, Y. S., Wang, C. W., Lu, C. Y., and Pang, C. Y., 2001, **Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA**, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, (928) : 97-112.
- Wiedemann, F. R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M. F., and Schon, E. A., 2002, **Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients**, *J.Neurochem.*, (80) : 616-625.
- Williamson, K. S., Gabbita, S. P., Mou, S., West, M., Pye, Q. N., Markesbery, W. R., Cooney, R. V., Grammas, P., Reimann-Philipp, U., Floyd, R. A., and Hensley, K., 2002, **The nitration product 5-nitro-gamma-tocopherol is increased in the Alzheimer brain**, *Nitric.Oxide.*, (6) : 221-227.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G., and Siegel, G., 2000, **Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors**, *Arch.Neurol.*, (57) : 1439-1443.
- Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H. V., Frautschy, S. A., and Cole, G. M., 1998, **Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease**, *Am.J.Pathol.*, (152) : 379-389.
- Yankner, B. A., Dawes, L. R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M. L., and Neve, R. L., 1989, **Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease**, *Science*, (245) : 417-420.
- Yao, Z., Drieu, K., and Papadopoulos, V., 2001, **The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta- amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands**, *Brain Res.*, (889) : 181-190.

- Zamzami, N. and Kroemer, G., 2001, **The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens**, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, (2) : 67-71.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., and ., 1995, **beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity**, *Cell*, (81) : 525-531.
- Zheng, S. X., Zhou, L. J., Chen, Z. L., Yin, M. L., and Zhu, X. Z., 2000, **Bilobalide promotes expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor in rat astrocytes**, *Acta Pharmacol.Sin.*, (21) : 151-155.
- Zhou, L. J. and Zhu, X. Z., 2000, **Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide**, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, (293) : 982-988.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen:

Abb. 1.1: Aufbau und Funktion der Mitochondrien.....	2
Abb. 1.2.: Mitochondriale Atmungskette: Komplexe I-IV.....	4
Abb. 1.3: ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) .....	4
Abb. 1.4: Humanes mitochondriales Genom .....	6
Abb. 1.5: Effekte von NO und Peroxynitrit auf die mitochondriale Atmungskette. ....	10
Abb. 1.6: Struktur der Cytochrom-C-Oxidase (Bild vom Michigan Center for Structural Biology).....	11
Abb. 1.7: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg .....	15
Abb. 1.8: Mutationen im humanen mitochondrialen Genom, die Erkrankungen hervorrufen können. ....	16
Abb. 1.9: links: extrazellulärer Plaque, zum Großteil bestehend aus A $\beta$ (Methamin Färbung) rechts: intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau .....	21
Abb. 1.10: Spaltung von APP durch $\alpha$ -Sekretase oder $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase.....	22
Abb. 1.11: Zusammensetzung und Funktion des $\gamma$ -Sekretase-Komplexes.....	24
Abb. 1.12: Schnittstellen der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase im APP-Gen. Bekannte APP-Mutationen .....	27
Abb. 1. 13: Strukturformeln der Inhaltsstoffe von Ginkgo-biloba-Extrakt .....	35
Abb. 1. 14: Strukturformel von Piracetam.....	37
Abb. 2.1: Strukturformel von DAF-2DA, Spaltung durch Esterasen, Anlagerung von NO .....	53
Abb. 2.2: Strukturformeln von Papa-NONOate (links) und Spermine-NONOate (rechts). ....	54
Abb. 2.3: Strukturformeln von R123 und TMRE .....	55
Abb. 2.4: Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und FCCP auf das mitochondriale Membranpotential.....	57
Abb. 2.5: Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach SNP- Inkubation.....	58
Abb. 2.6: Biolumineszenzreaktion .....	59
Abb. 2.7: Abnahme der Lumineszenzintensität nach Stimulation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	60
Abb. 2.8: Formel zur Berechnung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität.....	63
Abb. 2.9: Abnahme der Absorption bei 550 nm in Abhängigkeit von der zugefügten Enzymmenge.....	63
Abb. 2. 10: Strukturformel von Mitotracker Red und Bindung in der Zelle .....	64
Abb. 2.11: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie .....	65
Abb. 2.12: Zunahme der Absorption bei 405 nm nach SNP-Inkubation. ....	67
Abb. 3.1: Intrazelluläre NO-Spiegel von APP-transfizierten PC12-Zellen und HEK-Zellen sowie NO-Spiegel nach extrazellulärer A $\beta$ -Behandlung. ....	71
Abb. 3.2: Bestimmung der NOS-Aktivität in APP-transfizierten PC12-Zellen. ....	73
Abb. 3.3: NO-Spiegel der APP-transfizierten Zellen nach Stimulation mit NO- Donoren.....	75
Abb. 3.4: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\psi_m$ ) in APP- transfizierten PC12-Zellen, APP-transfizierten HEK-Zellen und in untransfizierten PC12 Zellen, die mit extrazellulärem A $\beta$ behandelt wurden.....	76

---

Abb. 3.5: Bestimmung der ATP-Spiegel in APP-transfizierten PC12-, APP-transfizierten HEK-Zellen und in untransfizierten PC12-Zellen, die extrazellulär mit A $\beta$ behandelt wurden. ....	78
Abb. 3.6: Effekte von konditioniertem Medium von APPwt- und APPsw-PC12-Zellen auf die mitochondriale Funktion. ....	79
Abb. 3.7: NO-Spiegel und ATP-Spiegel der APP-transfizierten PC12- und HEK-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit dem $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT. ....	82
Abb. 3.8: Die Inkubation mit dem $\gamma$ -Sekretasehemmstoff DAPT stabilisiert das mitochondriale Membranpotential. ....	83
Abb. 3.9: Anfärbung der Mitochondrien in APP-transfizierten PC12-Zellen. ....	85
Abb. 3.10: APPsw-PC12-Zellen haben mehr Mitochondrien als APPwt-PC12-Zellen und Kontroll-PC12-Zellen. ....	86
Abb. 3.11: APP ist in Mitochondrien von APPsw-PC12-Zellen lokalisiert. ....	87
Abb. 3.12: Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität von APP-transfizierten Zellen. ....	88
Abb. 3.13: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit Komplexinhibitoren. ....	89
Abb. 3.14: Mitochondriales Membranpotential und ATP-Spiegel nach Wasserstoff-peroxidinkubation. ....	91
Abb. 3.15: Mitochondriales Membranpotential und ATP-Spiegel nach Inkubation mit Natriumnitroprussid. ....	93
Abb. 3.16: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach 24-stündigem Serumentzug. ....	94
Abb. 3.17: Ginkgo biloba Extrakt und Piracetam weisen protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel auf. ....	97
Abb. 3.18: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion. ....	99
Abb. 3.19: Rhodamine 123 Anfärbung von PC12-Zellen. ....	99
Abb. 3.20: Nachbehandlung mit EGb 761 verbessert die Mitochondrienfunktion nach NO-Schädigung. ....	100
Abb. 3.21: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. ....	102
Abb. 3.22: EGb 761 stabilisiert die mitochondriale Funktion nach Serumentzug. ....	104
Abb. 3.23: Schützende Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe. ....	106
Abb. 3.24: EGb 761 schützt die Mitochondrien vor der Schädigung durch Tributyltin. ....	108
Abb. 3.25: EGb 761 weist auch in APPsw-Zellen nach SNP-Inkubation einen protektiven Effekt auf die Mitochondrien auf. ....	109
Abb. 3.26: Protektiver Effekt von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe II, IV und V in APP-transfizierten Zellen. ....	111
Abb. 3.27: EGb 761 reduziert die Caspase-9-Aktivität nach SNP-Inkubation. ....	112
Abb. 3.28: Die Behandlung mit Piracetam vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation. ....	115
Abb. 3.29: Piracetam verbessert die Regenerationsfähigkeit des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation. ....	118
Abb. 3.30: Protektiver Effekt von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential bei verschiedenen SNP-Konzentrationen. ....	119
Abb. 3.31: Piracetam reduziert die mitochondriale Membranpotentialabnahme nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inkubation. ....	120



Abb. 3.32: Die Behandlung mit Piracetam vermindert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach Serumentzug. ....	122
Abb. 3.33: Piracetam verbessert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und die Reduktion der ATP-Spiegel nach 24 h stufenweiser Serumreduktion. ....	123
Abb. 3.34: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe. ....	125
Abb. 3.35: Piracetam weist keine protektiven Effekte nach Tributyltin-Stimulation auf. ....	126
Abb. 3.36: Behandlung mit Piracetam reduziert die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach A $\beta$ -Stimulation. ....	127
Abb. 3.37: Piracetam schützt die Mitochondrien von APPsw-PC12-Zellen vor nitrosativem Stress. ....	129
Abb. 3.38: Behandlung der APPsw-PC12-Zellen mit Piracetam führt zu einem Schutz der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe III und IV. ....	130
Abb. 3.39: Piracetam reduziert die Caspase-9-Aktivität nach SNP-Inkubation. ....	131
Abb. 4.1: Membranpotential unter physiologischen Bedingungen. ....	140
Abb. 4.2: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (MP) nach 24-stündiger extrazellulärer A $\beta$ -Inkubation. ....	141
Abb. 4.3: Bei chronischem A $\beta$ -Stress zeigen APPsw-PC12-Zellen einen Abwehrmechanismus. ....	142
Abb. 4.4: Chronischer A $\beta$ -Stress in APPsw-HEK-Zellen oder ein sekundärer Insult in APPsw-PC12-Zellen führt zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (MP). ....	145
Abb. 4.5: Hypothetische Sequenz von pathogenen Schritten, die durch die APPsw-Mutation hervorgerufen wird. ....	151
Abb. 4.6: Hypothetische Pathogenese der Alzheimer-Demenz. ....	153
Abb. 4.7: Wichtige Angriffspunkte von Ginkgo-biloba-Extrakt am Mitochondrium und in der apoptotischen Zelltodkaskade. ....	164
Abb. 4.8: Piracetam (1) bindet an polare Kopfgruppen (2) von Phospholipid-Doppelschichten (3). ....	166
Abb. 4.9: Neuroprotektive Effekte von Piracetam. ....	173

### Tabellen:

Tabelle 1: A $\beta$ -Sekretion von PC12-Zellen und HEK-Zellen in pg/ml Medium. ....	70
Tabelle 2: A $\beta$ -Sekretion von PC12-Zellen und HEK-Zellen in pg/ml Medium unter basalen Verhältnissen und nach 24- bzw. 48-stündiger DAPT-Inkubation. ....	80
Tabelle 3: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials der APPwt- und APPsw-PC12-Zellen nach Stimulation mit Atmungsketteninhibitoren verglichen mit Kontrollzellen (Kontrolle=100 %). ....	90
Tabelle 4: Protektive Effekte von EGb 761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe. ....	106
Tabelle 5: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe. ....	126

## 8. Publikationen

### Originalarbeiten und Reviews:

Eckert A, **Keil U**, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, Müller WE  
**Effects of EGb 761 Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress**

*Pharmacopsychiatry*. 2003 Jun;36 Suppl 1:S15-23.

Marques CA, **Keil U**, Bonert A, Steiner B, Haass C, Müller WE, Eckert A  
**Neurotoxic Mechanisms Caused by the Alzheimer's Disease-linked Swedish APP Mutation: Oxidative stress, Caspases and JNK Pathway**

*J Biol Chem*. 2003, Jul 25; 278(30): 28294-302.

Eckert A, **Keil U**, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schüssel K, Müller WE  
**Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease**

*Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15; 66(8): 1627-34. Review

Eckert A, Marques CA, **Keil U**, Schussel K, Müller WE  
**Increased Apoptotic Cell Death in Sporadic and Genetic Alzheimer's Disease**

*Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2003 Dec; 1010:604-9.

**Keil U**, Bonert A, Marques CA, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Müller WE, Eckert A

**Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure**

*Pol J Pharmacol*. 2004 Sep-Oct;56(5):631-4.

**Keil U**, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Müller WE, Eckert A

**Amyloid-beta induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis**

*J Biol Chem*. 2004 Nov 26;279(48):50310-20.

**U. Keil**, I. Scherping, S. Hauptmann, A. Eckert, and W. E. Müller  
**Piracetam improves mitochondrial function following oxidative stress in vitro and in vivo**

submitted, 2005

A. Eckert, **U. Keil**, I. Scherping, S. Hauptmann, and W. E. Müller  
**Stabilization of mitochondrial membrane potential and improvement of neuronal energy metabolism by ginkgo biloba extract EGb 761**

submitted, 2005

### **Buchkapitel:**

K. Schüssel, U. Keil, A. Eckert

#### **Oxidative stress and neurodegenerative disease**

submitted, 2004

### **Vorträge:**

Uta Keil

#### **Mitochondriale Veränderungen im Alter und bei Alzheimer Demenz – Entwicklung von therapeutischen Interventionsstrategien**

Vortrag im Rahmen des Graduiertenkollegs für Arzneimittelentwicklung und Analytik

Januar 2002

Uta Keil

#### **Neurotoxische Mechanismen der Schwedischen APP-Mutation: Die Rolle der Mitochondrien**

Vortrag im Rahmen des Graduiertenkollegs für Arzneimittelentwicklung und Analytik

Januar 2003

Uta Keil

#### **Einfluss von $\beta$ -Amyloid auf die mitochondriale Funktion und den NO- Stoffwechsel**

Abschluss-symposium des Graduiertenkollegs für Arzneimittelentwicklung und  
Analytik

Januar 2004

U. Keil, C.A. Marques, C. Haass, W.E. Müller and A. Eckert

#### **Nitric oxide-induced mitochondrial failure in Alzheimer's disease**

45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2004

*Archives of Pharmacology*, 2004; Volume 369, 332, Supplement 1

### **Posterpräsentationen:**

U. Keil, B. Steiner, C. Haass, W.E. Müller, A. Eckert;

#### **Oxidative stress induces mitochondrial damage in cells bearing APP mutations**

Int. Conference on Cell and Molecular Biology of Alzheimer's disease, Hamburg,  
Germany, Sept 2002, Poster 12

U. Keil, B. Steiner, C. Haass, W.E. Müller, A. Eckert

#### **Mitochondrial dysfunction in oxidative stress-induced cell death of PC12 cells bearing APP mutations**

32<sup>nd</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, Orlando, USA, 2002.

*Soc. Neurosci.*, Abstracts 28, 193, 2002

C.A. Marques, U. Keil, B. Steiner, C. Haass, W.E. Müller, A. Eckert  
**The Swedish APP-Mutation leads to enhanced activation of different cell death mechanisms in response to oxidative stress**  
32<sup>nd</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, Orlando, USA, 2002.  
*Soc. Neurosci.*, Abstracts 28,193, 2002

Uta Keil, Barbara Steiner, Christian Haass, Walter E. Müller, Anne Eckert  
**The Swedish Alzheimer APP mutation causes mitochondrial impairment**  
Apoptosis 2003 Meeting: From signaling pathways to therapeutic tools, Luxemburg  
2003 POSTER XVII, 20.

A. Eckert, C.A. Marques, U. Keil, B. Steiner and W.E. Müller  
**Neurotoxic mechanisms by the Alzheimer's disease-linked Swedish APP-Mutation: Mitochondrial dysfunction, caspases and JNK pathway**  
44. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2003  
*Archives of Pharmacology*, 2003; Volume 367, 324, Supplement 1

Uta Keil, Celio A. Marques, Astrid Bonert, Christian Haass, Joanna B. Strosznajder, Walter E. Müller, Anne Eckert  
**Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease**  
*Pol. J. Pharmacol.*, 2003, 55 (5), 828

Keil, U., Steiner, B., Haass C., Müller W.E., Eckert A.  
**Amyloid beta induces mitochondrial dysfunction in a dose-dependent manner**  
Symposium der AGNP, München, 2003  
*Pharmacopsychiatry* 2003, Volume 36, 147

Marques CA, Keil U, Bonert A, Steiner B, Haass C, Müller W.E., Eckert A  
**Neurotoxic mechanisms triggered by  $\beta$ -amyloid: role of oxidative stress, caspases and JNK pathway**  
Symposium der AGNP, München, 2003  
*Pharmacopsychiatry* 2003, Volume 36, 183

U. Keil, B. Steiner, C. Haass, W.E. Müller, A. Eckert  
**Impact of amyloid beta on mitochondrial failure in APP transfected PC12 cells**  
33<sup>rd</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, New Orleans, USA, 2003.  
*Soc. Neurosci.*, Abstracts 29, 944, 2003

A. Eckert, C.A. Marques, A. Bonert, U. Keil, B. Steiner, C. Haass, W.E. Müller  
**Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish APP mutation: oxidative stress, caspases and JNK pathway**  
33<sup>rd</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, New Orleans, USA, 2003.  
*Soc. Neurosci.*, Abstracts 29, 877, 2003

W.E. Müller, U. Keil, I. Scherping, S. Schmitt-Schillig, A. Eckert  
**Stabilization of mitochondrial membrane potential by ginkgo biloba extract EGb 761®**

33<sup>rd</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, New Orleans, USA, 2003.  
*Soc. Neurosci.*, Abstracts 29, 240, 2003

C.A. Marques, A. Bonert, U. Keil, W.E. Müller, A. Eckert

**Intracellular signal cascade triggered by  $\beta$ -amyloid**

5<sup>th</sup> Int Conference on Cell and Molecular Biology of Alzheimer's disease, Hamburg, Germany, Nov 2003

A. Bonert, C. Marques, U. Keil, W.E. Müller and A. Eckert

**The impact of mutant APP on members of the Bcl-2 family and on the release of mitochondrial factors in oxidative stress-induced cell death**

45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2004

*Archives of Pharmacology*, 2004; Volume 369, 61, Supplement 1

Anne Eckert, Uta Keil, Astrid Bonert, Isabel Scherping, Celio A. Marques, Christian Haass, Christian Czech, Laurent Pradier, Walter E. Müller

**Impact of  $\beta$ -amyloid on mitochondrial failure in Alzheimer's disease**

The 9<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and related Disorders, Philadelphia, 2004, P4-252

U. Keil, A. Bonert, C.A. Marques, C. Haass, W.E. Müller, A. Eckert

**Nitric oxide and mitochondrial failure in amyloid beta-induced cell death**

34<sup>th</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, San Diego, USA, 2004.

*Soc. Neurosci.*, Abstracts 30, 217, 2004

A. Eckert, A. Bonert, C.A. Marques, U. Keil, W.E. Müller

**Effect of APP on members of the Bcl-2 family and on the release of mitochondrial factors in oxidative stress-induced cell death**

34<sup>th</sup> Annual Meeting Soc. Neuroscience, San Diego, USA, 2004.

*Soc. Neurosci.*, Abstracts 30, 217, 2004

Müller WE, Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Eckert A

**Stabilisation of mitochondrial membrane potential by Ginkgo biloba EGb 761**

*Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 2004; Volume 9, Supplement 1

Walter E. Müller, Uta Keil, Isabel Scherping, Anne Eckert

**Piracetam stabilizes mitochondrial function in vitro and in vivo**

ACNP 43<sup>rd</sup> Annual Meeting, San Juan, Puerto Rico, 2004

*Neuropsychopharmacology*, 2004, Volume 29, Supplement 1

U. Keil, A. Eckert, W. E. Müller

**Stabilization of mitochondrial function by standardized Ginkgo biloba extract**

ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe

*European Neuropsychopharmacology*, 2005, Volume 15, Number 1, S10

## 9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Walter E. Müller, für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit und für die Ermöglichung der Kongressreisen.

Frau Priv. Doz. Dr. Anne Eckert für die tolle Betreuung und stetige Unterstützung bei dieser Arbeit und beim Verfassen der Paper, für die wertvollen Tipps, für die freundschaftliche Atmosphäre, für die Ermöglichung der vielen sehr interessanten Kongressreisen, sowie für ihr immer offenes Ohr.

Herrn Professor Dr. Schubert-Zsilavec für die Begutachtung der Arbeit und Herrn Professor Dr. Pantel für seine Teilnahme an der Disputation.

Den aktuellen und ehemaligen Kollegen des Arbeitskreises für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, für die Hilfsbereitschaft und für den guten Zusammenhalt. Ich habe die Zeit hier sehr genossen.

Katrin Schüssel, Kristina Treiber, Susanne Horner, Cornelia Franke für das lustige und entspannte Klima im Labor, für die nette Zusammenarbeit, für ihr immer offenes Ohr, wenn es mal nicht so gut lief, für die vielen schönen Seminare im Rahmen der Weiterbildung und für die lustigen Kongressreisen, für unsere gemeinsamen sportlichen Aktivitäten, für die vielen lustigen Abende, für unsere gemeinsamen Skiurlaube und für die entstandene Freundschaft, die hoffentlich noch lange Zeit anhält.

Claudia Carolin Weber und Steffi Schmitt-Schillig für die nette Atmosphäre im Labor, für die gemeinsamen Joggingrunden, für die netten Abende (während denen Steffi mich vom Sushiessen überzeugt hat) und für die gemeinsamen Skiurlaube.

Sebastian Schaffer und Matthias Linder für ihren Humor im Laboralltag und für die lustigen Doppelkopfrunden.

Astrid Bonert für die tolle Zusammenarbeit bei den Papern, für ihren unermüdlichen Einsatz, wenn es um Daten für das Paper ging und für die nette Zusammenarbeit im Zelllabor, Celio Marques für die gute Einarbeitung in die Handhabung der Zellkulturen und für die gute Zusammenarbeit bei den Papern, Isabel Scherping für die gute Kooperation beim Piracetamprojekt, Kathrin Schulz für die sehr nette gemeinsame Zeit beim Zusammenschreiben und Susanne Hauptmann für die lustigen Komplex-1- und Sauerstoffelektrodenmessungen.

Ina Henke, Claudia Jourdan und Ulrike Hermani (Hebbes) für ihr immer offenes Ohr, für ihre aufrichtenden Worte und ihre Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Stefan Bodora für seine Hilfe bei allen Fragen, die den Computer betreffen.

Dr. Gunter Eckert für die nette Institutsführung beim Vorstellungsgespräch, für seine Hilfe bei den ersten Fluoreszenzspektrometer-Messungen und für die Institutsorganisation.

Frau Förster, Frau Mucha und Frau Merbitz für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Caren Hildebrandt für die tolle Zusammenarbeit bei der Raumplanung der klinischen Pharmazie.

Jörg Weyermann und Herrn Schewe für die gute Einarbeitung am konfokalen Laserscanmikroskop.

Meinem Freund Daniel für seine tolle Unterstützung und seine wertvollen Anregungen während dieser Arbeit, für seine Aufmunterungen, wenn es mal Probleme gab, für seine beruhigenden Worte und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und für ihr ständiges Interesse während des Studiums und während dieser Arbeit, für ihr immer offenes Ohr und ihre aufrichtenden Worte.

Die Anfertigung dieser Dissertation wurde ermöglicht durch ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung Hessen vom 01.01.2002 bis 31.12.2003.



## 10. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Vor- und Zuname:	Uta Keil
Geburtsdatum:	05.05.1976
Geburtsort:	Weinheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### AUSBILDUNG

August 1982 bis Juli 1986	Grundschule Wahlen
August 1986 bis Juni 1995	Überwaldgymnasium Wald-Michelbach
20. Juni 1995	Abitur
Oktober 1995 bis April 2000	Pharmaziestudium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
29. August 1997	1. Staatsexamen
11. April 2000	2. Staatsexamen
08. Juni 2001	3. Staatsexamen
Juli 2001 bis Dezember 2004	Promotion am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der J.W. Goethe-Universität Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Prof. W. E. Müller Thema: Schlüsselfunktion der Mitochondrien in der Pathogenese der Alzheimer Demenz
Juli 2001 bis April 2004	Mitglied des Graduiertenkollegs für Arzneimittelentwicklung und Analytik
Oktober 2001 bis November 2004	Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation

Januar 2002 bis Dezember 2003	Stipendium der Landesgraduiertenförderung Hessen
Oktober 2003	Gewinn des AGNP-Preises für Kongress- und Forschungsreisen

## PRAKTIKA

---

März 1996	Famulatur in der Rodenstein-Apotheke in Weinheim
August 1996	Famulatur in der Hebel-Apotheke in Hemsbach
Mai 2000 bis Oktober 2000	Pharmaziepraktikum in der Abteilung Pharmazeutische Forschung und Entwicklung der Firma Merz + Co. GmbH & Co. in Frankfurt
November 2000 bis April 2001	Pharmaziepraktikum in der Zapfenberg- Apotheke in Heidelberg

## MITGLIEDSCHAFTEN

---

seit Oktober 2001	Mitglied der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG
seit Mai 2002	Mitglied der Society for Neuroscience SfN