

Einfluss von Alzheimer-relevanten Faktoren auf die mitochondriale Funktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Dipl. Biologin
Susanne Kirr, geb. Hauptmann

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

Dekan: Prof. Dr. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. W.E. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Klein

Datum der Disputation: 23.04.2008

„Selbst der längste Weg beginnt mit dem ersten Schritt.“

Lao Tse (~600-400 v. Chr.)

1	EINLEITUNG	11
1.1	Mitochondrien	11
1.1.1	Aufbau der Mitochondrien	11
1.1.2	Funktion der Mitochondrien	12
1.1.2.1	Die mitochondriale Atmungskette	13
1.1.2.1.1	Die Elektronentransportkette	14
1.1.2.1.2	Die Synthese von ATP	17
1.1.2.1.3	Stadien der mitochondrialen Atmung und Atmungskontrolle.....	19
1.1.3	Mitochondriales Genom.....	21
1.2	Morbus Alzheimer	22
1.2.1	Histopathologische Veränderungen im Alzheimer-Gehirn	24
1.2.1.1	Amyloid-Plaques	24
1.2.1.1.1	Bildung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein	26
1.2.1.1.2	Physiologische Funktion von APP/A β	29
1.2.1.2	Neurofibrilläre Bündel.....	30
1.2.1.2.1	Tau und seine Funktion	31
1.2.1.2.2	Hyperphosphorylierung von Tau.....	32
1.2.2	A β und Tau im funktionellen Zusammenhang.....	33
1.2.3	AD und mitochondriale Fehlfunktion.....	34
1.2.4	Risikofaktoren der Alzheimer Demenz	37
1.2.4.1	Das Alter.....	37
1.2.4.2	Genetische Risikofaktoren	37
1.2.4.3	Apolipoprotein E	39
1.2.4.4	Sonstige Risikofaktoren	40
1.3	Therapeutische Interventionsstrategien	41
1.3.1	Acetylcholinesterase-Hemmstoffe	42
1.3.2	Memantine	43
1.3.3	Ginkgo biloba Extrakt.....	43
1.3.4	Piracetam.....	46
1.3.5	Neue Therapieoptionen	48
1.4	Ziel der Arbeit.....	50
2	MATERIAL UND METHODEN	52
2.1	Material	52
2.1.1	Geräte und Materialien	52
2.1.2	Chemikalien	53

2.1.3	Kits und Antikörper	54
2.1.4	Puffer und Lösungen	54
2.1.4.1	Puffer	55
2.1.4.2	Lösungen	57
2.2	Mäuse	57
2.2.1	NMRI-Mäuse	57
2.2.2	C57BL/6J-Mäuse	58
2.2.3	Transgene Mäuse	58
2.2.3.1	Thy-1 APP transgene Mäuse	58
2.2.3.2	P301L-Mäuse	58
2.3	Mausschwanzbiopsien	59
2.4	Polymerase-Kettenreaktion	60
2.5	Gelelektrophorese	61
2.6	Blue-Native (BN) Gelelektrophorese	62
2.6.1	Aufarbeitung der Proben	62
2.6.2	BN-Gelelektrophorese	62
2.6.3	Auftrennung von Proteinkomplexen in der zweiten Dimension (2D-Analyse)	63
2.6.4	Coomassie-Färbung	64
2.7	Isolierung von Mitochondrien aus dem Maushirn	64
2.8	Proteinbestimmung mittels der Lowry-Methode	65
2.9	MTT-Assay	65
2.10	Beta-Amyloid (Aβ) Peptide	67
2.11	Messung des Transmembranpotentials	67
2.12	Sauerstoffverbrauchsmessungen	69
2.12.1	Geräteaufbau und Vorbereitung	70
2.12.2	Versuchsablauf	70
2.12.3	Auswertung	71
2.13	Komplex-I Messungen	72
2.14	Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität	72

2.15	Behandlungsstudien.....	74
2.15.1	Schlundsondierung	74
2.15.2	Studiendesigns	74
2.15.2.1	Studie 1	74
2.15.2.2	Studie 2	75
2.15.2.3	Studie 3	75
2.15.2.4	Studie 4	76
2.16	Statistische Auswertung	76
3	ERGEBNISSE	77
3.1	Auswirkungen von Aβ auf die mitochondriale Funktion.....	77
3.1.1	A β verändert das mitochondriale Membranpotential.....	78
3.1.1.1	Oxidativer, nitrosativer und A β induzierter Stress resultiert in keiner zusätzlichen Schädigung Thy-1 APP transgener Mitochondrien.....	79
3.1.2	Thy-1 APP Mäuse weisen mitochondriale Atmungs-defekte auf	80
3.1.2.1	Einfluss von A β auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe	80
3.1.2.2	Unveränderte Level der Protein-Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe in Thy-1 APP Tieren.....	83
3.1.2.3	Reduzierte COX- und NADH:DBQ-Aktivitäten Thy-1 APP transgener Mäuse	85
3.1.2.4	Reduzierte Atmungsrate isolierter Mitochondrien nach extrazellulärer A β -Behandlung	87
3.1.2.5	Reduzierte Atmungsrate und RCR in Thy-1 APP transgenen Mäusen im Alter	90
3.1.3	Reduziertes Transmembranpotential ist bereits in 3 Monate alten Thy-1 APP Mäusen feststellbar.....	92
3.1.3.1	Oxidativer Stress und A β schädigen non-tg aber nicht Thy-1 APP Mitochondrien .	93
3.2	Einfluss einer P301L Mutation auf die mitochondriale Funktion.....	95
3.2.1	Einfluss von P301L auf das mitochondriale Membran-potential	95
3.2.2	P301L Mäuse weisen mitochondriale Atmungsdefekte auf.....	96
3.2.2.1	Einfluss einer P301L Mutation auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe	96
3.2.2.2	Reduzierte Atmungsrate und RCR P301L transgener Mäuse im Alter.....	99
3.2.2.3	Erhöhte Empfindlichkeit isolierter Mitochondrien von P301L-Mäusen gegenüber A β	103
3.3	Mitochondriale Funktion und Alter	107
3.3.1	Reduktion des mitochondrialen Transmembran-potentials in NMRI-Mäusen mit dem Alter	107
3.3.2	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials von isolierten Mitochondrien nach sekundärem Insult mit H $_2$ O $_2$, SNP und A β ₁₋₄₂	108
3.3.3	Alters-assozierte mitochondriale Atmungsdefekte	110

3.3.3.1	Einfluss des Alters auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe.....	110
3.3.3.2	Reduzierte Atmungsrate und RCR im Alter	114
3.4	Überprüfung von Antidementiva auf ihre protektiven Eigenschaften auf die mitochondriale Funktion	116
3.4.1	Schützender Effekt von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondriale Funktion.....	116
3.4.1.1	Einfluss einer EGb761-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential von NMRI-Mäusen	117
3.4.1.2	Protektiver Effekt von EGb761 auf die H ₂ O ₂ -induzierte mitochondriale Fehlfunktion.....	117
3.4.1.3	Protektiver Effekt von EGb761 auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion.....	118
3.4.2	Einfluss einer Ginkgo biloba Behandlung auf die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe von NMRI-Mäusen	120
3.4.3	Schützender Effekt von Piracetam auf die mitochondriale Funktion.....	122
3.4.3.1	Einfluss einer Piracetam Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential von NMRI-Mäusen	122
3.4.3.2	Protektiver Effekt von Piracetam auf die H ₂ O ₂ -induzierte mitochondriale Fehlfunktion.....	123
3.4.3.3	Piracetam schützt NMRI-Mitochondrien vor dem Angriff von Natriumnitroprussid	124
3.4.4	Einfluss einer Piracetam Behandlung auf die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe von NMRI-Mäusen	125
4	DISKUSSION.....	128
4.1	Hintergrund und Relevanz der Untersuchung altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen an isolierten Mitochondrien.....	128
4.2	Mitochondriale Dysfunktion und AD.....	130
4.2.1	Mitochondriale Funktion und A β	130
4.2.1.1	Einfluss von A β auf das mitochondriale Transmembranpotential	130
4.2.1.2	Effekte von A β auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und die gesamte Atmungskette.....	133
4.2.1.3	Einfluss von intrazellulärem A β auf die mitochondriale Funktion	140
4.2.2	Mitochondriale Funktion und Tau	142
4.2.2.1	Einfluss von P301L-Tau auf das mitochondriale Transmembranpotential	142
4.2.2.2	Einfluss von Tau auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und die Atmungskette	144
4.2.2.3	Effekte von A β auf die mitochondriale Atmungskette P301L transgener Mäuse ..	147
4.2.3	Mitochondriale Funktion im Alter	151
4.2.3.1	Einfluss des Alters auf das mitochondriale Transmembranpotential.....	152

4.2.3.2	Effekte des Alters auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und die gesamte Atmungskette.....	154
4.2.4	Zusammenfassung	157
4.3	Überprüfung von Antidementiva auf ihre protektiven Eigenschaften auf die mitochondriale Funktion	160
4.3.1	Effekte einer Ginkgo biloba-Behandlung auf die mitochondriale Funktion.....	160
4.3.1.1	Effekte von EGb761 auf das mitochondriale Transmembranpotential	160
4.3.1.2	Protektive Effekte von EGb761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe	164
4.3.1.3	Zusammenfassung EGb761	166
4.3.2	Effekte einer Piracetam Behandlung auf die mitochondriale Funktion.....	168
4.3.2.1	Effekte von Piracetam auf das mitochondriale Transmembranpotential	168
4.3.2.2	Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe	169
4.3.2.3	Zusammenfassung Piracetam	170
5	ZUSAMMENFASSUNG	173
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	176
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	203
8	PUBLIKATIONEN.....	206
9	DANKSAGUNG	208
10	CURRICULUM VITAE	210

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer Demenz
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	<i>APP Intracellular Domain</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
APO E	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APP _{sw}	APP mit schwedischer Doppelmutation
A β	Amyloid-beta-Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
AS	Aminosäure
BACE	<i>β-Site APP Cleaving Enzyme</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGb 761	Ginkgo-biloba Extrakt der Firma Schwabe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiäre Form(en) der Alzheimer Demenz
HBBS	HEPES buffered saline solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP Kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaN ₃	Natriumazid
NFT	<i>Neurofibrillary Tangles</i>

PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PC12	Phäochromozytom 12 [Zelllinie]
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration
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>
S.E.M.	<i>Standard error of mean</i>
SNP	Natriumnitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TMRE	Tetramethylrhodamineethylester
TTFA	Thenoyltrifluoroaceton
ZNS	Zentrales Nervensystem
Ψ_m	Mitochondriales Membranpotential

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Bestandteile eukaryotischer Zellen. Ihre Größe kann erheblich variieren und je nach Lokalisation einen Durchmesser von circa 0,5-1,0 μM haben. Mitochondrien sind innerhalb der Zelle oft in der Nähe von Strukturen lokalisiert, die ATP benötigen, z.B. in Muskelgeweben an den kontraktile Filamenten. Zeitrafferaufnahmen von lebenden Zellen machen deutlich, dass Mitochondrien sehr beweglich sind und eine veränderliche Morphologie besitzen. Sie sind Organellen der Zellatmung, wobei sie über die Atmungskette den Energiespeicher und -überträger Adenosintriphosphat (ATP) synthetisieren und damit unter aeroben Bedingungen über 95% der Zellenergie produzieren. Nach der Endosymbiontentheorie stammen Mitochondrien von atmungskompetenten Proteobakterien ab, die vor 1,5 Milliarden Jahren eine Symbiose mit anaeroben Archaeobakterien eingegangen sind (Gray *et al.*, 1999). Diese Theorie gilt heutzutage als gesichert und wird durch zahlreiche strukturelle und funktionelle Parallelen zwischen Mitochondrien und Bakterien sowie DNA-Sequenzierungen und phylogenetische Analysen gestützt.

1.1.1 Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien sind von zwei hoch spezialisierten Membranen, der inneren und der äußeren Membran, umgeben. Hierdurch entstehen zwei getrennte Mitochondrien-kompartimente: die innere Matrix und ein viel schmalerer Intermembranraum.

Die äußere Membran grenzt das Mitochondrium gegenüber dem Zytosol der Zelle ab. In der äußeren Membran findet man überdies das Transportprotein Porin, welches große wasserhaltige Kanäle in der Lipiddoppelschicht bildet (Lloreta-Trull and Serrano, 1998). Hierdurch wird ein Austausch von Ionen und Molekülen mit einer

Größe von 5000 Dalton oder weniger zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol ermöglicht.

Die innere Membran ist ebenfalls hoch spezialisiert und ist charakterisiert durch Cristae genannte Einstülpungen. Die röhren- bzw. lamellenförmigen Cristae unterteilen den Intermembranraum noch einmal physiologisch in unterschiedliche Kompartimente (Frey and Mannella, 2000; Logan, 2007). Weiterhin dienen diese Einstülpungen zur Vergrößerung der Oberfläche der inneren Membran, in der sich auch die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette befinden. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere Membran durch Cardiolipin undurchlässig für Ionen (Capaldi *et al.*, 1983). Allerdings besitzt sie eine Vielzahl von speziellen Transportproteinen, wodurch ein kontrollierter Transport bestimmter Moleküle zwischen Matrixraum und Zytosol möglich ist. Die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix, eine hochkonzentrierte Mischung Hunderter Enzyme, wie z.B. Enzyme des Citratzyklus und für die Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren. Weiterhin findet man in dieser Matrix auch das mitochondriale Genom, spezielle mitochondriale Ribosomen, transferRNAs und vielfältige Enzyme, die für die Expression der mitochondrialen Gene notwendig sind.

1.1.2 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien nehmen wie bereits erwähnt eine Schlüsselstellung im Energiestoffwechsel des Organismus ein. Sie werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da in ihnen der überwiegende Anteil des energiereichen Moleküls ATP produziert wird.

In der mitochondrialen Matrix befinden sich die Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren, der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklusses. Die beiden erstgenannten Reaktionen wandeln Lipide bzw. Kohlenhydrate in Acetyl-Coenzym A um, welches anschließend in den Citratzyklus eingeschleust wird. Aus dem Citratzyklus gehen die energiereichen Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 hervor, deren Elektronen in die Atmungskette eintreten und letztendlich zur Synthese von ATP beitragen. Daneben sind Mitochondrien an einer Vielzahl weiterer wichtiger zellulärer Funktionen beteiligt. Aufgrund der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse

werden Mitochondrien ebenfalls als genereller Syntheseort für Eisen-Schwefel (Fe/S)-Cluster betrachtet, eine für die Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen essentielle Funktion (Lill and Kispal, 2000). Mitochondrien puffern zudem die lokale Ca^{2+} -Konzentration in Axonen und Neuronen, wodurch sie eine entscheidende Funktion in der Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität besitzen (Zucker, 1999). Neuere wissenschaftliche Untersuchungen fokussieren in zunehmendem Maße auf die Rolle der Mitochondrien in der apoptotischen Signaltransduktionskaskade (Papa and Skulachev, 1997; Siesjo *et al.*, 1999; Bernardi, 1999; Logan, 2007). Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass apoptogene Faktoren wie Cytochrom c und AIF (apoptosis inducing factor) aus den Mitochondrien in einem frühen Stadium der Apoptose freigesetzt werden (Green and Reed, 1998; Martinou *et al.*, 2000).

1.1.2.1 Die mitochondriale Atmungskette

Der mitochondriale Elektronentransport und die daran gekoppelte oxidative Phosphorylierung sind fundamentale Prozesse für die Lebensfähigkeit höherer Lebewesen. Die oxidative Phosphorylierung findet an fünf Multienzymkomplexen (Komplexe I bis V) in der inneren Mitochondrienmembran statt (vergleiche Tabelle 1.1), von denen die ersten vier die Elektronentransportkette bilden, während der Komplex V die ATP-Synthase, die eigentliche Phosphorylierungsreaktion katalysiert.

Komplex I	NADH-Ubiquinon (Q)-Reduktase
Komplex II	Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase
Komplex III	Ubiquinon-Cytochrom-C-Reduktase
Komplex IV	Cytochrom-C-Oxidase
Komplex V	ATP-Synthase

Tabelle 1.1: Die fünf Multienzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette

Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung besteht in einem schrittweisen Transport von Wasserstoff und Elektronenpaaren der energiereichen Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 , welche bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus entstehen, über Multienzymkomplexe der Atmungskette auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff. Hierdurch wird das Elektronentransportpotential des $\text{NADH}+\text{H}^+$ bzw. des FADH_2 in das Phosphorylgruppenübertragungspotential des ATP umgewandelt.

1.1.2.1.1 Die Elektronentransportkette

Zu Beginn der Atmungskette überträgt das $\text{NADH}+\text{H}^+$ sein Elektronenpaar auf die NADH-Q-Reduktase. Komplex I ist der größte Multienzymkomplex der Atmungskette. Er besteht aus 42-43 verschiedenen Polypeptidketten, sowie einem Flavinmononucleotid und verschiedenen Fe/S-Clustern als funktionellen Gruppen (Lenaz *et al.*, 2006), welche die Elektronen auf das Coenzym Q transferieren. Die bei diesen Redoxvorgängen freiwerdende Energie wird zum Pumpen von vier Protonen (H^+) durch einen Kanal im Komplex I in den Intermembranraum genutzt.

Über das Coenzym Q treten ebenfalls Elektronen vom FADH_2 in die Atmungskette ein. FADH_2 entsteht im Citratzyklus bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase. Dieses Enzym ist gleichzeitig eine Komponente des Succinat-Q-Reduktase-Komplexes (Komplex II), so dass das bei der Oxidation gebildete FADH_2 den Komplex nicht verlässt und seine Elektronen über Fe/S-Zentren ebenfalls auf das Coenzym Q überträgt (Cecchini, 2003).

Das Coenzym Q kann in der lipophilen Membran gut diffundieren und transportiert die Elektronen zum Komplex III, der Ubiquinon-Cytochrom-C-Reduktase.

Die durch Komplex I und II entstandene reduzierte Form des Ubiquinons gibt nun unter Katalyse des Komplexes III seine Elektronen auf das Cytochrom c, ein kleines Protein mit einer Hämgruppe, ab. Komplex III besteht aus 9-10 Polypeptidketten. Als prosthetische Gruppen lassen sich b_{562} , b_{566} , Häm c_1 und [2Fe-2S]-Cluster nachweisen. Komplex III fungiert als Dimer, wobei jedes Monomer drei Häm-Komponenten enthält, die jeweils an die Cytochrome gebunden sind, sowie ein Fe/S-Protein (Hatefi, 1985). Fließt ein Elektronenpaar durch diesen Komplex werden netto zwei H^+ auf die Zytosolseite transportiert.

Die Cytochrom-C-Oxidase ist der letzte der drei H⁺-pumpenden Komplexe in der Atmungskette. Komplex IV enthält zwei Hämgruppen und zwei Cu-Zentren, um die direkte Übertragung der Elektronen auf den molekularen Sauerstoff durchführen zu können. Zur vollständigen Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser werden vier Elektronen auf den Sauerstoff übertragen. Die freie Enthalpie aus der Reduktion des Sauerstoffs wird an Komplex IV zum Transport von zwei H⁺ in den Intermembranraum genutzt.

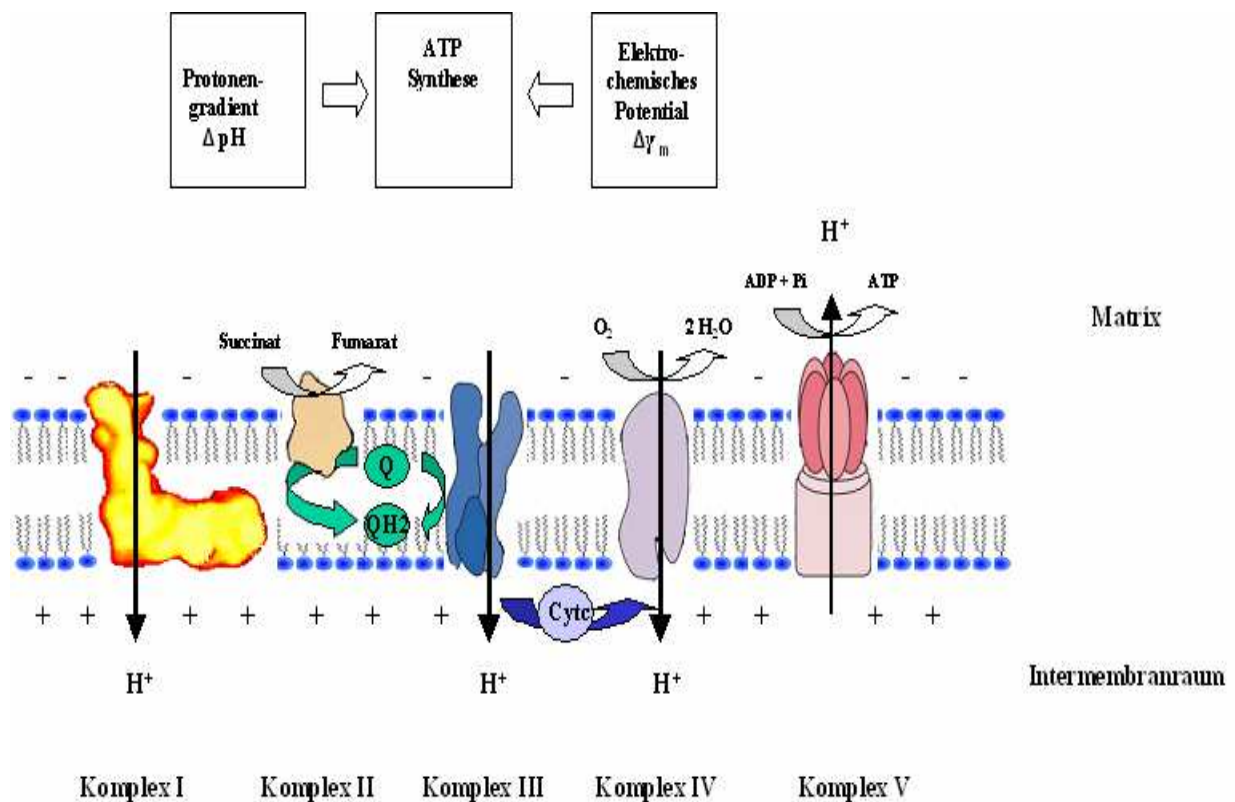


Abbildung 1-1: Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien.

Elektronen werden in der Atmungskette stufenweise auf Sauerstoff übertragen und Protonen in den Intermembranraum transportiert. Die beim Rückfluss dieser Protonen freiwerdende Energie treibt die ATP-Synthese an.

Durch den Transport von H^+ von der Matrix- zu der Zytosolseite ergeben sich zwei wichtige Aspekte:

- 1) Durch den H^+ -gekoppelten Elektronentransport entsteht ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran, wobei der daraus resultierende pH-Wert um etwa 1,4 Einheiten niedriger liegt als in der Matrix.
- 2) Es kommt zur Bildung eines Spannungsgradienten über der inneren Mitochondrienmembran (Membranpotential), mit einer negativen Innenseite und einer positiven Außenseite. Das so entstehende Membranpotential beträgt in etwa -140 mV.

Bei der mitochondrialen Elektronentransportkette werden ca. 1-4 % des Sauerstoffs nicht vollständig zu Wasser reduziert (Chance *et al.*, 1979). Weiterhin kann es in der mitochondrialen Atmungskette zum ungewollten Austreten von Elektronen aus der Elektronentransportkette kommen, welche auf Sauerstoff übertragen werden und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. Der Terminus der reaktiven Sauerstoffspezies umfasst sowohl freie Radikale wie das Superoxidradikal ($\cdot O_2^-$), das Hydroxylradikal ($\cdot HO$) und das Hydroperoxylradikal ($\cdot HOO$), als auch nicht-Radikale wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), singulärer Sauerstoff (1O_2) oder Hypochlorid (OCl). Vor allem zwei Atmungskettenkomplexe, die NADH-Ubiquinon-Reduktase (Turrens and Boveris, 1980) und die Ubiquinon-Cytochrom-C-Reduktase (Cadenas *et al.*, 1977), sind maßgeblich an der Entstehung von ROS beteiligt. Als Hauptquelle von ROS sind Mitochondrien gleichzeitig hohen Konzentrationen an diesen ausgesetzt und reagieren überdies sehr empfindlich hierauf (vergleiche auch Kapitel 1.1.3). ROS können eine Vielzahl von Molekülen im Mitochondrium und in der Zelle schädigen, z.B. die mitochondriale und nukleäre DNA, mehrfach-ungesättigte Fettsäuren und Proteine (Tappel, 1973).

Allerdings besitzen Mitochondrien auch eine Reihe von antioxidativen Abwehrmechanismen um ROS unschädlich zu machen. Diese können in nicht-enzymatische Antioxidantien und Enzyme mit antioxidativen Aktivitäten unterteilt

werden. Zu den erstgenannten zählen eine Vielzahl von Substanzen, wie das Vitamin E (Vatassery *et al.*, 1984), Thioredoxin, Glutathion und das reduzierte Coenzym Q (Aberg *et al.*, 1992). Zu den antioxidativen Enzymen zählen unter anderem die Mangan-Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase (Oshino and Chance, 1977) und die Katalase. Übersteigt die Konzentration freier Radikale die antioxidative Kapazität der Zelle, kommt es zu oxidativem Stress und zur Schädigung unterschiedlicher Zellbestandteile, was letztlich zum programmierten Zelltod, der Apoptose führen kann.

1.1.2.1.2 Die Synthese von ATP

Die Synthese des ATP und seine Freisetzung in die mitochondriale Matrix werden von der F_1F_0 -ATPase katalysiert (vergleiche Abbildung 1.2). Es handelt sich um ein Enzym mit einem komplizierten Rotationsmechanismus, der zu Beginn der 70er Jahre entdeckt wurde (Boyer *et al.*, 1973; Boyer, 1989). Die mitochondriale F_1F_0 -ATP Synthase kann funktionell in zwei unterschiedliche Domänen unterteilt werden: die F_1 - und die F_0 -Untereinheit.

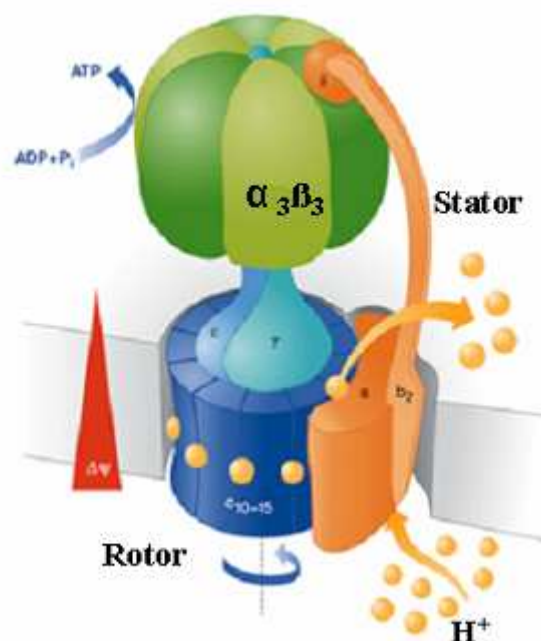


Abbildung 1-2: ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) (Dimroth *et al.*, 2006)

Die F_1 -Untereinheit ist ein hydrophiles, peripheres Membranprotein bestehend aus 5 Untereinheitstypen, die im Wechsel an drei aktiven Zentren die ATP-Synthese katalysieren. Sie ragt in die Matrix und birgt die katalytische Aktivität für die ATP-Synthese und -Hydrolyse.

Die F_0 -Untereinheit ist ein hydrophobes Transmembranprotein, welches in der inneren Membran lokalisiert ist. Durch die Bildung eines Protonenkanals ermöglicht diese Untereinheit einen Protonenausgleich, indem H^+ vom Intermembranraum in die Matrix fließen (Boyer, 1993; Pedersen *et al.*, 1996; Engelbrecht and Junge, 1997; Boyer, 1997). Dieser Kanal besteht aus 10-14 identischen Transmembranuntereinheiten und ist über eine Gruppe von Transmembranproteinen, dem so genannten Stator, mit der F_1 -Untereinheit verbunden. Der Stator ist weiterhin mit dem Rotor verbunden, der aus 10-14 identischen Transmembranuntereinheiten besteht.

Nach der Kopplungshypothese ist die Hydrolyse bzw. Synthese von ATP durch die Rotation einer Achse, dem Proteolipidzylinder, relativ zum Stator mit dem Protonentransport gekoppelt (Weber and Senior, 2003). Passieren H^+ den Kanal, veranlasst ihre Bewegung eine Drehung des Rotors, welche ebenfalls zur Drehung des Stils führt. Der Stil befindet sich innerhalb des enzymatischen Teils (Kopf) der ATP-Synthase. Indem die „Stielproteine“ gegen einen stationären Ring von Kopfproteinen reiben wird die Energie des Protonenflusses in mechanische Energie umgewandelt. Weiterhin wird die entstehende mechanische Energie zur Synthese von ATP in chemische Energie umgewandelt.

Der ständige Wechsel zwischen drei unterschiedlichen Konformationen der F_1F_0 -ATPase bringt die Reaktionspartner Adenosindiphosphat (ADP) und organisches Phosphat (P_i) in eine günstige Lage zueinander, so dass sie am enzymatischen Kopfteil binden (Konformation 1), miteinander reagieren (Konformation 2) und wieder abdiffundieren (Konformation 3). Hierbei setzt der Protonenfluss durch die ATP-Synthase das fest gebundene ATP frei.

1.1.2.1.3 Stadien der mitochondrialen Atmung und Atmungskontrolle

Der Elektronentransport ist unter physiologischen Bedingungen mit der Phosphorylierung eng verknüpft. Normalerweise fließen Elektronen nur durch die Elektronentransportkette zum Sauerstoff, wenn gleichzeitig ADP und P_i angeboten und zu ATP umgewandelt werden. Ein Sauerstoffverbrauch ohne gleichzeitige ATP-Bildung ist nicht möglich. Die Atmungskette kann weiterhin durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Auf der Basis dieser Erkenntnis haben Chance und Williams 1956 für isolierte Mitochondrien fünf Zustände definiert (vergleiche Tabelle 1.2), bei denen die Atmungsgeschwindigkeiten durch jeweils unterschiedliche Faktoren kontrolliert werden (Chance and WILLIAMS, 1956). Ihr Prinzip der Einteilung der mitochondrialen Atmungsaktivität wird noch heute zur Berechnung des Sauerstoffverbrauchs, des ADP/O-Quotienten und des Atmungskontrollindex verwendet. Hierbei gibt der ADP/O-Quotient an, wie viele Moleküle ADP in ATP umgewandelt werden, wenn ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird.

	Im Überschuss vorhanden	Limitierende Faktoren für die Atmung
State 1	Sauerstoff	ADP, Substrat
State 2	Sauerstoff, ADP	Substrat
State 3	Sauerstoff, ADP, Substrat	Katalytische Kapazität der Atmungskettenenzyme
State 4	Sauerstoff, Substrat	ADP
State 5	ADP, Substrat	Sauerstoff
entkoppelt ^a	Sauerstoff, Substrat	Maximalgeschwindigkeit des Elektronentransportes

Tabelle 1.2: Definition der Funktionszustände von isolierten Mitochondrien nach Chance und Williams (1956)

^a In diesem Zustand hat ADP keinen Einfluss auf die Atmungsgeschwindigkeit.

Nach Zugabe von Sauerstoff befinden sich die Mitochondrien zunächst in der State 1-Atmung. In diesem Zustand ist der Sauerstoffverbrauch sehr niedrig und nur endogene Substrate können veratmet werden. Stehen dem Mitochondrium neben Sauerstoff auch P_i und ADP, als Phosphatakzeptor zur Verfügung, spricht man von der State 2-Atmung, gekennzeichnet durch einen leichten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Sind Atmungskettensubstrate wie z.B. Malat-Glutamat (Komplex I) oder Succinat (Komplex II) ebenfalls verfügbar, befinden sich die Mitochondrien in der aktiven Phase, die unter Anwesenheit aller benötigter Substrate abläuft und als State 3-Atmung bzw. unkontrollierte Atmung bezeichnet wird. Nach vollständiger Phosphorylierung des zugesetzten ADP zu ATP beginnt die so genannte State 4-Atmung. Sie wird auch als kontrollierte Phase bezeichnet, gekennzeichnet durch einen deutlich reduzierten Sauerstoffverbrauch. Kommt es infolge von Sauerstoffmangel zu einer geringeren Atmung, spricht man von der State 5-Atmung. Nach Entkopplung der Atmungskette von der Phosphorylierung kommt es zu einem stark gesteigerten Elektronentransport, wobei H^+ an der ATP-Synthase vorbei in den Matrixraum zurückfließen können. Hierbei wird die gespeicherte Enthalpie des Protonengradienten in Form von Wärme frei, gekennzeichnet durch einen hohen Sauerstoffverbrauch.

Die wichtigsten limitierenden Faktoren für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung bleiben jedoch das Vorhandensein von ADP und die Ausschleusung von ATP durch die ADP/ATP-Translokase (Jacobus *et al.*, 1982). Ein Überschuss an ATP bzw. ein Mangel an ADP hemmen die ATP-Synthese und damit den Protonenrückfluss durch die F_1F_0 -ATP-Synthase. Infolgedessen kommt es zum Erliegen des Elektronenflusses durch die Atmungskette zum Sauerstoff, wodurch die oxidierten Formen der Co-Enzyme $NADH^+$ und FAD^+ nicht mehr regeneriert werden, und es folglich zu einem Substratmangel im Citratzyklus kommt. Umgekehrt resultieren aus hohen ADP-Spiegeln gesteigerte Raten der oxidativen Phosphorylierung und der vorausgehenden Reaktionen. Durch diese enge Kopplung wird gewährleistet, dass sich z.B. auch nicht benötigte Endprodukte anhäufen. Diese Tatsache wird als Atmungskontrolle bezeichnet. Experimentell bestimmt man den

Atmungskontrollindex RCR (*respiratory control ratio*) durch Bildung des Quotienten aus den Raten der State 3- und State 4-Atmung (Chance and WILLIAMS, 1956; Jacobus *et al.*, 1982).

1.1.3 Mitochondriales Genom

Im Gegensatz zu anderen Organellen, wie z.B. den Ribosomen und des Golgi-Apparates, sind Mitochondrien die einzigen Organellen abgesehen vom Zellkern, die eine eigene DNA (mtDNA) und eine eigene biosynthetische Maschinerie zur Herstellung von RNA und Proteinen enthalten. Hierbei sind Mitochondrien semiautonom, d.h. das mitochondriale Genom kodiert nur für einen Teil der benötigten Proteine. Die meisten Proteine sind kerncodiert und werden aus dem Zytoplasma importiert, wie z.B. die für die Transkription benötigten Polymerasen. Die Anzahl der vom mitochondrialen Genom kodierten Gene variiert von Spezies zu Spezies. In einer Zelle findet man Hunderte bis Tausende von Mitochondrien, wobei jedes Mitochondrium circa 5 Kopien einer zirkulären mtDNA enthält.

Anderson *et al.* (1981) konnten als erste die 16.569 Basenpaare (bp) umfassende Sequenz des humanen Mitochondriums entschlüsseln (Anderson *et al.*, 1981). Das mitochondriale Genom ist ein zirkuläres, doppelsträngiges und superhelikales DNS-Molekül und enthält insgesamt 37 Gene, die für 13 Proteine kodieren. Von diesen Genen werden 24 zur Translation der mtDNA (2 ribosomale RNAs und 22 transfer RNAs) benötigt. Die übrigen 13 Gene kodieren für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette und zwar sieben Untereinheiten des Komplexes I, eine Untereinheit des Komplexes III, drei Untereinheiten des Komplexes IV und zwei Untereinheiten des Komplexes V (Brandon *et al.*, 2005). Sowohl die fehlenden Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe als auch weitere wichtige Proteine werden von nukleären Genen kodiert.

Im Vererbungsmodus des mitochondrialen Genoms zeigen sich deutliche Unterschiede zum nukleären Genom. Das mitochondriale Genom wird nur maternal vererbt und besitzt im Gegensatz zum nukleären Genom keine Allele im engeren

Sinne. Während der Befruchtung werden nur maternale Mitochondrien aus der Eizelle, jedoch keine paternalen aus den Spermien weitergegeben und innerhalb der Zelle zufällig verteilt, wo sie sich durch eigenständige Teilungsmechanismen vermehren (Brandon *et al.*, 2005). Werden mutierte mtDNA-Moleküle bei der Befruchtung weitergegeben, so liegt bereits in der befruchteten Eizelle eine Mischpopulation (Heteroplasmie) von normaler und mutierter mtDNA vor. Bei weiteren Zellteilungen erfolgt dann die zufällige Verteilung der mutierten mtDNA, so dass es in manchen Geweben sowohl zu einer Vermehrung als auch zu einer Abnahme der mutierten mtDNA kommen kann. Der kompakte Aufbau, das ineffiziente DNA-Reparatursystem, die häufigen Replikationszyklen und der hohe Fluss von Sauerstoffradikalen entlang der benachbarten Atmungskette machen das mitochondriale Genom besonders anfällig für Mutationen, deren Entstehungsrate 10-20 mal höher ist als im Kerngenom (Wallace *et al.*, 1987; Merriwether *et al.*, 1991). Aufgrund der Sauerstoffradikale sind vor allem Gewebe, die sehr stark vom oxidativen Metabolismus abhängig sind, wie z.B. das Gehirn, das Herz oder die Skelettmuskulatur besonders häufig betroffen und somit für mitochondriale Erkrankungen anfällig. Der im Laufe des Lebens zunehmende Prozentsatz mutierter Mitochondrien gilt heute als eine der möglichen Ursachen für degenerative Krankheiten, Krebs und Altern.

1.2 Morbus Alzheimer

Im Jahr 1906 beschrieb der Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) zum ersten Mal eine Erkrankung des Gehirns, nachdem er bei einer seiner Patientinnen, Auguste D., einen progredienten Gedächtnisverlust, gestörte kognitive Funktionen, verändertes Verhalten wie z.B. Paranoia und Wahnvorstellungen und eine gestörte Sprachfunktion feststellte (Alzheimer, 1907). Nach ihrem Tod konnte er durch die Autopsie ihres Gehirns eine massive Atrophie der Hirnrinde feststellen, sowie zwei histopathologische Auffälligkeiten: senile Plaques und Neurofibrillen (vergleiche Abbildung 1.3). Darüber hinaus findet man synaptische Dysfunktion und massiven Neuronenverlust im Hippokampus und im gesamten Kortex (Selkoe, 2002). Dieses

Krankheitsbild wird seit 1910, geprägt durch Kraepelin, als Morbus Alzheimer bezeichnet (Kraepelin, 1910).

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die häufigste Ursache von Demenz und nach Herzinfarkt, Krebs und Schlaganfall die vierthäufigste Todesursache in Ländern mit hoher Lebenserwartung. In Deutschland leben zurzeit ca. 1,2 Millionen Menschen, die an einer Demenz leiden. Rund 700.000 davon sind an der AD erkrankt, gekennzeichnet durch einen starken Gedächtnisverlust und Verlust der kognitiven Fähigkeiten (Bickel *et al.*, 2000; Bickel, 2001). Die derzeitige demographische Entwicklung mit einer Verschiebung der Alterspyramide zugunsten der Älteren wird in den kommenden Jahrzehnten zu einer dramatischen Zunahme der Häufigkeit dieser Erkrankung führen. Da es bisher keine kausale AD-Therapie gibt, könnte durch die demographische Entwicklung die Zahl der an AD-Erkrankten bis 2030 weltweit auf etwa 60 Millionen ansteigen (Fillit *et al.*, 2002). Die AD führt zu langwierigem Leiden der Patienten, zu erheblichen Belastungen der betreuenden Angehörigen und zu hohen Versorgungskosten. Aufgrund dessen ist die Demenzproblematik ein zentrales Problem des heutigen Gesundheitssystems.

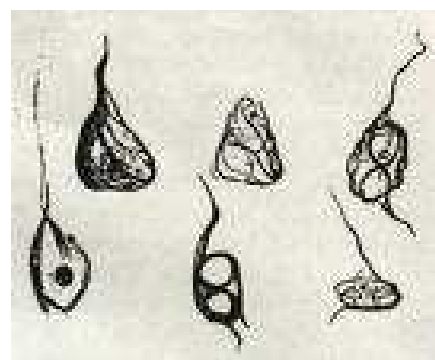
A**B**

Abbildung 1-3: Dokumentation der neurofibrillären Pathologie nach Alois Alzheimer

A: Fotografie der „ersten“ Alzheimer Patientin, Auguste D. **B:** Neurofibrilläre Bündel, gezeichnet von Alois Alzheimer nach lichtmikroskopischer Untersuchung

Der Morbus Alzheimer stellt eine ätiologisch heterogene Gruppe von klinisch und neuropathologisch sehr ähnlichen Krankheitsbildern dar. So werden familiäre Formen von der Gruppe der sporadischen Erkrankungen unterschieden. Bei der sporadischen Form, bei der das Alter der wichtigste Risikofaktor ist, treten die ersten klinischen Symptome meist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres auf. Dagegen manifestiert sich die Symptomatik der seltener auftretenden familiären Form, bei der spezifische Genmutationen identifiziert wurden (vergleiche Kapitel 2.2.3.2), schon häufig vor dem 50., in Einzelfällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr (Haass *et al.*, 1993;Selkoe, 1993). Insgesamt weniger als 5 % der gesamten Erkrankungen sind auf die familiäre AD zurückzuführen.

1.2.1 Histopathologische Veränderungen im Alzheimer-Gehirn

Zu den wichtigsten histopathologischen Veränderungen bei der AD gehören die bereits 1907 von Alois Alzheimer beschriebenen Amyloid-Plaques, bestehend aus A β -Peptiden, sowie neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Beide Veränderungen sind krankheitstypisch, jedoch nicht spezifisch. Sie sind auch bei einer Reihe anderer mit kognitiven Störungen einhergehenden Erkrankungen nachweisbar. Ihr Vorkommen bei der AD ist jedoch besonders ausgeprägt und zeigt eine typische Verteilung, worauf sich die neuropathologische Diagnose begründet.

1.2.1.1 Amyloid-Plaques

Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen Amyloid-Plaques (vergleiche Abbildung 1.4), der Entstehung der Alzheimer Pathologie und der neuronalen Degeneration bisher nicht vollständig geklärt werden konnte, wird der Bildung der Amyloid-Ablagerungen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Krankheit zugesprochen (Selkoe, 1998;Selkoe, 2004;Citron, 2004;Hardy, 2006).

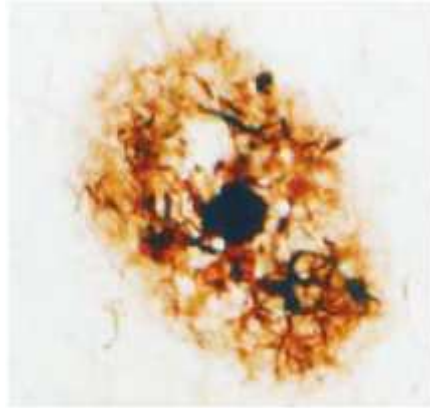


Abbildung 1-4: extrazellulärer Plaque, zum Großteil bestehend aus Aβ (Methamin Färbung (Bogdanovic, 2000))

Aβ wurde zuerst als Bestandteil der Amyloid-Ablagerungen in meningealen Blutgefäßen und kurze Zeit später als Hauptbestandteil der senilen neuritischen Plaques identifiziert (Glenner and Wong, 1984a; Masters *et al.*, 1985). Klonierung des zugehörigen Gens, welches auf Chromosom 21 lokalisiert ist, ergab, dass Aβ ein Peptidfragment des Amyloid-Vorläuferproteins (APP - **A**myloid **P**recursor **P**rotein) ist (Tanzi *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987a).

APP ist Mitglied einer in der Evolution konservierten Proteinfamilie von integralen Membranproteinen, zu der auch die APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 gehören, die jedoch keine Aβ-Region besitzen (Wasco *et al.*, 1992; Slunt *et al.*, 1994). APP ist ein Typ I Transmembranprotein. Es besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen, einer transmembranen sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Das Protein wird ubiquitär exprimiert und ist zwischen Spezies hoch konserviert (De Strooper and Annaert, 2000). Durch alternatives Spleißen der APP-mRNA, welche aus 19 zusammengesetzten Exons besteht, entstehen 8 verschiedene Isoformen (Wilson *et al.*, 1999). Im Gehirn kommen überwiegend drei Isoformen vor: Isoform 695, Isoform 751 und Isoform 770. APP₆₉₅ wird hauptsächlich von Neuronen, APP₇₅₁ und APP₇₇₀ hingegen von Glia- und anderen nichtneuronalen Zellen exprimiert (Small *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1999). Weiterhin werden die Proteine durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. durch Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung weiter modifiziert.

1.2.1.1.1 Bildung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein

APP wird durch drei Proteasen prozessiert, die wegen ihrer Funktion im sekretorischen Zellkompartiment auch als Sekretasen bezeichnet werden (Haass and Steiner, 2002). In einem Zusammenspiel dieser drei Enzyme wird APP in unterschiedliche Fragmente gespalten, woraus unter anderem das A β -Peptid resultiert (vergleiche Abbildung 1.5) (Selkoe, 2001b; Pietrzik and Behl, 2005). Die β - und γ -Sekretase führen zur Bildung des krankheitsauslösenden A β , wohingegen die α -Sekretase die Bildung des toxischen A β verhindert (Sinha and Lieberburg, 1999).

Der größte Anteil von APP wird zunächst durch die α -Sekretase in der Nähe der Zelloberfläche prozessiert (Esch *et al.*, 1990; Kamenetz *et al.*, 2003). Mehrere Mitglieder der ADAM-Familie („*a disintegrin and metalloproteinase*“) (Schlondorff and Blobel, 1999), integrale Typ-1 Membranproteine, sind als Proteasen mit α -Sekretase-Aktivität identifiziert worden. Unter anderem wurde für ADAM 9 (Koike *et al.*, 1999), ADAM 10 (Lammich *et al.*, 1999) und ADAM 17 (Buxbaum *et al.*, 1998) α -Sekretase-Aktivität nachgewiesen. Des Weiteren konnte ebenfalls für BACE 2 (β APP cleaving enzyme 2, Memapsin 1) α -Sekretase-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden, wodurch dieses Enzym die A β -Entstehung verhindern kann (Yan *et al.*, 2001). Eine besondere Rolle kommt hierbei ADAM 10 zu. In APP-transgenen Mäusen kam es durch die Expression von mutierter ADAM 10 zu einer Vermehrung und Vergrößerung der Amyloid-Plaques (Postina *et al.*, 2004).

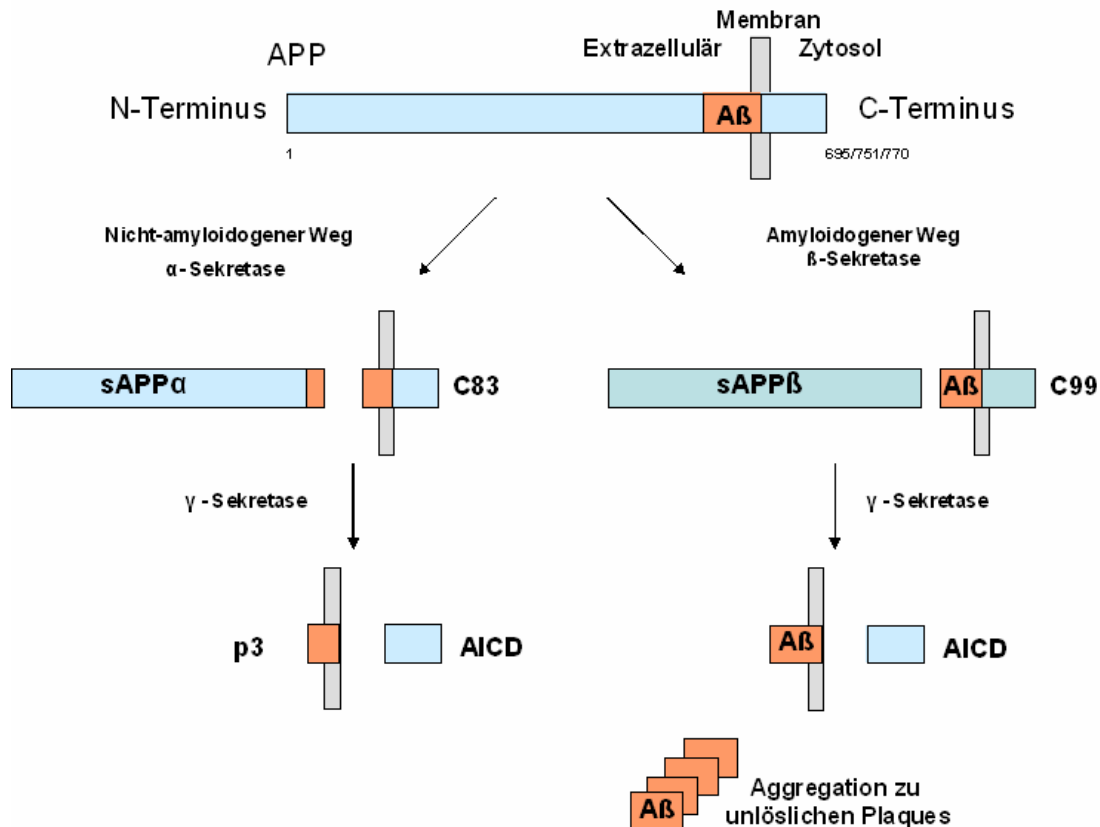


Abbildung 1-5 Prozessierung von APP.

APP wird entweder durch die α- oder die β-Sekretase prozessiert, welche an verschiedenen Stellen in der extrazellulären Domäne des APP spalten. Das Schneiden der α-Sekretase (TACE, ADAM10) resultiert in C83, welches die β-Amyloid (Aβ)-Generierung ausschließt. Nach der γ-Sekretase-Prozessierung von C83 wird ein kleines Peptidfragment p3 generiert. Das sequentielle Schneiden von β-Sekretase (BACE1) und γ-Sekretase führen zu der Produktion von vollständigem Aβ. AICD (APP intracellular domain) entsteht im amyloiden und nicht-amyloiden Weg.

Durch den α-Sekretase-Schnitt kommt es zunächst zur Freisetzung eines löslichen APP-Bruchstücks (solubleAPPα, sAPPα), wobei das C-terminale βAPP-Fragment (C83, CTFα) in der Membran verbleibt. Der in der Membran verbleibende 83 AS lange C-terminale Rest wird anschließend durch die γ-Sekretase gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (AICD, βAPP-intracellular domain) (Sastre *et al.*, 2001) und ein lösliches 3 kDa großes Peptid (p3) freigesetzt werden (Haass *et al.*, 1993). Während sAPPα neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften aufweist (Small *et al.*, 1994; Furukawa *et al.*, 1996) wird für das intrazelluläre Fragment AICD eine nukleäre Signalfunktion vorgeschlagen (Cao and Sudhof, 2001). Der so eben beschriebene Prozessierungsweg schließt die Produktion des amyloiden Aβ aus

und führt letztlich zur Generierung des p3-Fragmentes ($A\beta_{17-40}$ bzw. $A\beta_{17-42}$) (Buxbaum *et al.*, 1998;Lammich *et al.*, 1999;Postina *et al.*, 2004).

Werden APP-Moleküle nicht durch die α -Sekretase geschnitten, unterlaufen sie eine Prozessierung durch die β - und γ -Sekretase. Das Schneiden von APP durch die Typ-1 membrangebundene Aspartyl-Protease BACE-1 (β -site APP-cleaving enzyme) resultiert in der Bildung einer löslichen Form von APP ($_{\text{soluble}}\text{APP}\beta$, $_{\text{s}}\text{APP}\beta$), welches in den Extrazellulärraum abgegeben wird, sowie einem membrangebundenen C-terminalen Fragment (CTF oder C99) (Vassar *et al.*, 1999;Hussain *et al.*, 1999;Sinha and Lieberburg, 1999). Durch nachfolgende, intramembranäre Prozessierung des C99-Fragmentes durch die γ -Sekretase, welche biochemisch aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegen Aspartylproteaseinhibitoren als Aspartylprotease charakterisiert wurde (Wolfe *et al.*, 1999), wird $A\beta_{1-40}$ bzw. $A\beta_{1-42}$ extrazellulär und AICD intrazellulär freigesetzt (Haass and Steiner, 2002;Kimberly and Wolfe, 2003).

Der γ -Sekretase-Komplex setzt sich aus 4 Proteinen zusammen: Präsenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN 2 (De Strooper, 2003). Die Präseniline scheinen hierbei die aktive Pore des Proteasekomplexes zu sein. Man kennt zwei Homologe der Präseniline: PS1 und PS2. Die starke Verbindung der Präseniline mit der γ -Sekretaseaktivität wurde durch die Ausschaltung des PS1-Gens (PS1-Knockout) in der Maus unterstrichen (De Strooper *et al.*, 1998), wodurch in diesen Mäusen die $A\beta$ -Produktion stark reduziert war. Der zusätzliche Knockout von PS2 erlaubte keinerlei $A\beta$ -Produktion mehr (Herreman *et al.*, 2000).

Bei $A\beta$ handelt es sich um ein hydrophobes Peptid, das in der Lage ist zu aggregieren und Oligomere zu bilden. Nach Vergrößerung der Oligomere lagern diese sich zu Fasern zusammen und bilden letztendlich die für die AD charakteristischen $A\beta$ -Plaques. Es konnte zudem gezeigt werden, dass $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$ in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten gebildet werden (Hartmann *et al.*, 1997). Während $A\beta_{1-40}$ eher im späten sekretorischen und endozytotischen Weg erzeugt und anschließend ins Medium sekretiert wird, wird $A\beta_{1-42}$ hauptsächlich im frühen sekretorischen Weg (Endoplasmatisches Retikulum und Intermediär-

kompartiment) gebildet (Hartmann *et al.*, 1997; Greenfield *et al.*, 1999). Zum größten Teil wird A β ₁₋₄₀ gebildet, A β ₁₋₄₂ macht nur 5-10 % des gebildeten A β aus. Weiterhin gibt es Hinweise, dass A β ₁₋₄₂ nicht nur sekretiert wird, sondern bereits intrazellulär oligomerisiert (Walsh *et al.*, 2000). Dies konnte bereits in humanen Gehirnen bzw. transgenen Mäusen beobachtet werden (Takahashi *et al.*, 2002; Oddo *et al.*, 2003a) und wird im Moment mit einem frühen Ereignis der AD, der synaptischen Dysfunktion, in Verbindung gebracht (Selkoe, 2002). Von großer Bedeutung hierfür sind ebenfalls die Ergebnisse von McLean *et al.* und Lue *et al.* (1999). Sie konnten zeigen, dass der Schweregrad der synaptischen und kognitiven Dysfunktion besser mit den löslichen als mit den unlöslichen A β -Spiegeln korreliert (Lue *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 1999).

1.2.1.1.2 Physiologische Funktion von APP/A β

Die genauen Funktionen von APP bzw. von A β sind nicht endgültig geklärt, auch wenn zahlreiche mögliche Aktivitäten postuliert wurden (Reinhard *et al.*, 2005). Generell scheint APP in Prozesse der Zell-Zell-Interaktion (Wang and Ha, 2004), der Zelladhäsion (Soba *et al.*, 2005) und dem Zellwachstum, insbesondere dem Neuritenwachstum (Jin *et al.*, 1994; Mattson, 1997) involviert zu sein. Des Weiteren ist APP über eine Interaktion mit Kinesin I am axonalen Transport beteiligt (Kamal *et al.*, 2000). Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine Rolle von APP in der extrazellulären Signaltransduktionskaskade, da es einen Komplex mit einem GTP-bindenden Protein G₀ bildet (Nishimoto *et al.*, 1993).

Ein wichtiger Ansatzpunkt zur Aufklärung der physiologischen Funktion von APP lieferte die Identifizierung von Interaktionspartnern. APP kann an eine Vielzahl von Proteine binden, allerdings sind nicht alle dieser Interaktionen gleichermaßen für die Aufklärung der Funktion von APP hilfreich. So konnte die Interaktion von APP mit den Proteinen Calreticulin (Johnson *et al.*, 2001) und Clathrin (Nordstedt *et al.*, 1993) festgestellt werden. Es ist zwar bekannt, dass die beiden genannten Proteine in der Proteinentwicklung bzw. Endozytose eine Rolle spielen, allerdings nicht deren genaue Funktion. Diesbezüglich kann man ebenfalls nicht auf eine spezifische Funktion von APP aufgrund der Interaktion schließen. Studien mit Tiermodellen,

welche ein APP-Defizit oder ein Defizit eines APP-Homologen besitzen, führten bisher ebenfalls zu keiner exakten Aufklärung in welchem Ausmaß die oben erwähnten Funktionen von APP im Kontext des gesamten Organismus eine Rolle spielen. So zeigten mutierte Mäuse mit einer Deletion des APP-Gens keine Verkürzung des Lebensalters (Zheng *et al.*, 1995). Dagegen starben Mäuse mit einem dreifachen Knockout der Gene für APP, APLP1 und APLP2 vorzeitig und bildeten charakteristische Merkmale einer seltenen humanen neurologischen Erkrankung, der so genannten Cobblestone-Lissenzephalie (Typ II), aus (Herms *et al.*, 2004). Die molekularen Mechanismen die zu diesem Phänotyp führen, müssen zwar noch vollständig geklärt werden, allerdings weist dieses Ergebnis auf die wichtige Rolle der APP-Familie in neuronaler Zelladhäsion und Migration hin.

Der Hauptfokus in der Aufklärung der Funktion liegt allerdings bei dem Proteolyseprodukt des APP dem A β . Zumeist wird es nur als toxisches Nebenprodukt der APP-Prozessierung betrachtet. Allerdings findet man A β auch in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Blutplasma von gesunden Personen (Seubert *et al.*, 1992). Im Moment wird als Funktion für A β unter anderem eine regulatorische Funktion bei Ionenkanälen vorgeschlagen (Ramsden *et al.*, 2001; Ramsden *et al.*, 2002). Weiterhin wird für A β eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionalität diskutiert (Plant *et al.*, 2003). Interessant hierbei sind vor allem die Resultate von Kamenetz *et al.* (2003). Sie konnten beobachten, dass A β von Neuronen als Antwort auf synaptische Aktivität sekretiert wurde und sich im Gegenzug die synaptische Aktivität verminderte (Kamenetz *et al.*, 2003). Dieser beobachtete negative Rückkopplungsmechanismus führte zu der Hypothese, dass A β möglicherweise als physiologisches Signal zur Regulation der neuronalen Aktivität fungiert. Die Hypothese, dass A β eine wichtige physiologische Funktion besitzt, bleibt dennoch sehr spekulativ.

1.2.1.2 Neurofibrilläre Bündel

Neben den A β -Plaques ist ein typisches Merkmal der AD die verstärkte Bildung von Fibrillenbündeln in den Neuronen (vergleiche Abbildung 1.6). Sie ist Folge einer

Destabilisierung der neuronalen Mikrotubuli, welche im physiologischen Zustand durch verschiedene Tau-Proteine verhindert wird. Erstmals wurde das Tau-Protein 1975 von Weingarten und Mitarbeitern als hitzestabiles Protein beschrieben, welches zusammen mit Tubulin durch mehrere Polymerisationsschritte aufgereinigt werden konnte und maßgeblich an der Formierung von Mikrotubuli beteiligt war (Weingarten *et al.*, 1975).



Abbildung 1-6: Intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau (Bogdanovic, 2000)

1.2.1.2.1 Tau und seine Funktion

Das Tau-Protein gehört zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs), die vorwiegend in Nervenzellen, aber auch in geringerem Maße in Astrozyten und Oligodendrozyten vorliegen (Migheli *et al.*, 1988). Das Tau-Protein in Neuronen ist hauptsächlich im Axon lokalisiert (Binder *et al.*, 1985). Im humanen zentralen Nervensystem existieren 6 Isoformen des Tau-Proteins, die durch alternatives Spleißen der Exone 2, 3 und 10 der mRNA generiert werden. Die Expression der spezifischen Tau-Isoformen wird hierbei entwicklungspezifisch reguliert und ist zudem abhängig von der topographischen Lage der Nervenzellen im ZNS (Brandt, 1996). Während fetal nur die kürzeste Isoform exprimiert wird, findet man im adulten Gehirn alle 6 Isoformen (Goedert *et al.*, 1989).

Eine der wichtigsten Funktionen des Tau-Proteins ist die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli (Drubin and Kirschner, 1986). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion (Jenkins and Johnson, 1998) und beim Neuritenwachstum (Biernat and Mandelkow, 1999). So konnten unter anderem verschiedene Interaktionspartner von Tau identifiziert werden, wie z.B. die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), die Cdc2-ähnliche Protein Kinase, die src-Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase Fyn oder die Phosphatase PP2A (Lee *et al.*, 1988;Sontag *et al.*, 1996;Sobue *et al.*, 2000;Sun *et al.*, 2002), die alle Komponenten wichtiger Signaltransduktionswege sind.

1.2.1.2.2 Hyperphosphorylierung von Tau

Die Phosphorylierung ist eine der wichtigsten Regulationsmechanismen unseres Körpers, da über die Anhängung von Phosphatgruppen an bestimmte Aminosäurereste Enzymaktivitäten oder die Bindung zwischen Proteinen reguliert werden kann. Unter normalen Bedingungen ist Tau ein gut lösliches Protein. Im Zytosol gelöstes Tau-Protein steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem an Mikrotubuli gebundenem Tau-Protein. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Bindung von Tau an Mikrotubuli durch eine spezifische Phosphorylierung im Bereich der Bindungsregion reguliert wird (Drewes *et al.*, 1997). In AD-Gehirnen ist Tau hyperphosphoryliert (Jameson *et al.*, 1980) und stark glykosyliert (Ledesma *et al.*, 1994), wodurch seine Assoziation an die Mikrotubuli gestört wird. Es kommt zur Abdissoziation der hyperphosphorylierten Tau-Proteine, die sich daraufhin zu paarigen helikalen Filamenten (PHF) zusammenlagern. Hierdurch geht ebenfalls die Mikrotubuli-stabilisierende Funktion verloren.

Die nicht physiologische Hyperphosphorylierung von Tau ist auf die Störung des Gleichgewichtes bestimmter Kinasen und Phosphatasen zurückzuführen, dessen Ursache bisher nicht vollständig geklärt werden konnte (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Die Hyperphosphorylierung erfolgt an insgesamt 18 Stellen. Einige dieser Stellen sind auch in Tau aus gesunden Gehirnen phosphoryliert, allerdings in geringerem Maße (Goedert *et al.*, 1989;Matsuo *et al.*, 1994). In verschiedenen Studien konnte eine erhöhte Aktivität von Kinasen im Hirngewebe von AD-Patienten

beobachtet werden, wie z.B. von der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5) und der cAMP-abhängigen Kinase PKA (Jicha *et al.*, 1999;Patrick *et al.*, 1999). Zudem gibt es Daten, die eine verringerte Aktivität verschiedener Protein-Phosphatasen bestätigen (Gong *et al.*, 1993). Man geht heute davon aus, dass eine Fehlregulation der Cdk5, der GSK3 β , der c-Jun-Kinase, p38 oder der extrazellulär regulierten Kinase ERK die Hyperphosphorylierung von Tau hervorrufen können (Liu *et al.*, 2002;Noble *et al.*, 2003). Die Rolle der Hyperphosphorylierung bei der Aggregation von Tau und der Bildung von neurofibrillären Tangles (NFT) ist bisher jedoch weitgehend ungeklärt.

1.2.2 A β und Tau im funktionellen Zusammenhang

Obwohl A β -Plaques und neurofibrilläre Bündel in denselben Gehirnregionen auftreten, fehlt heutzutage noch der Nachweis eines klaren mechanistischen Zusammenhangs.

Die Beobachtungen, dass Mutationen im Tau-Gen zur Formation von Fibrillenbündeln führen, nicht aber zur Bildung von Amyloid-Plaques (Spillantini *et al.*, 1998), während dessen Mutationen in APP-, PS1- oder PS2-Genen beide Pathologien hervorrufen können, führte zu der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Dieser Hypothese folgend erfolgen die Amyloid-Plaques „Upstream“ von der Tau-Pathologie (Price and Sisodia, 1998;Selkoe, 1998). Demgegenüber ist die Tau-Pathologie ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AD und der Chromosom 17 assoziierten Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17). Durch die Identifizierung von Mutationen im Tau-Gen bei der familiären Form der FTDP-17 konnte zudem gezeigt werden, dass eine Dysfunktion des Tau-Proteins ausreicht Neurodegeneration und Demenz auszulösen.

In unterschiedlichen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass A β einen direkten Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von Tau ausübt (Greenberg *et al.*, 1995;Busciglio *et al.*, 1995;Takashima *et al.*, 1998;Takahashi *et al.*, 1999) und eine Hyperphosphorylierung mit anschließender Aggregation der Tau-Filamente

verursacht (Rank *et al.*, 2002). In Studien mit Tau-„knock-out“-hippokampalen Neuronen konnte zudem gezeigt werden, dass die A β -induzierte Neurotoxizität von dem Vorhandensein phosphorylierter Tau-Konstrukte abhängig ist (Rapoport *et al.*, 2002; Fath *et al.*, 2002). Durch die Verwendung verschiedener FAD-transgener Tiermodelle konnte auch *in vivo* ein kausaler Zusammenhang zwischen A β und Tau nachgewiesen werden. So waren transgene Mäuse, welche A β überproduzieren, durch Tau-Hyperphosphorylierung und kognitive Defekte gekennzeichnet (Tomidokoro *et al.*, 2001a; Otth *et al.*, 2002; Echeverria *et al.*, 2004). Interessant hierbei sind ebenfalls die Ergebnisse von Lewis *et al.* (2001). Die Arbeitsgruppe verglich FDTP-17-Tau/FAD-APP doppel-transgene Mäuse mit FDTP-17-Tau einfach-transgenen Mäusen. In den doppel-transgenen Mäusen, welche Plaques als auch NFT aufwiesen, konnte ein stärkeres Ausmaß an NFT im Vergleich zu den einfach-mutierten Tau-Mäusen festgestellt werden (Lewis *et al.*, 2001). Ein paralleler Ansatz wurde durch die Arbeitsgruppe von Götz durchgeführt. Diese injizierten einer FDTP17-Tau-transgenen Maus fibrilläres A β , woraufhin eine erhöhte Tau-Aggregation beobachtet werden konnte (Götz *et al.*, 2001a). Weiterhin konnte Tomidokoro *et al.* (2001b) in einem FAD-APP-Mausmodell eine erhöhte Tau-Phosphorylierung in dystrophischen Neuriten, welche von senilen Plaques umgeben waren, nachweisen. Eventuell spielt hierbei auch intrazelluläres A β eine Rolle. Hierfür sprechen ebenfalls die Befunde von Echeverria *et al.* (2004). Sie konnten in transgenen Ratten, die A β intrazellulär überexprimieren, allerdings keine extrazellulären A β -Plaques ausbilden, verstärkte Phosphorylierung von Tau feststellen. Allerdings scheint intrazelluläres sowie extrazelluläres A β nicht alleine zur Entwicklung einer NFT-Pathologie ausreichend zu sein. In einem Versuchsansatz von Götz *et al.* (2001) wurden Wildtyp (WT)-TAU überexprimierenden Mäusen fibrilläres A β direkt in das Gehirn injiziert, was nicht zur Ausbildung von NFTs führte (Götz *et al.*, 2001b).

1.2.3 AD und mitochondriale Fehlfunktion

In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise, dass mitochondriale Fehlfunktion bei der AD-Pathogenese eine sehr wichtige Rolle spielt (Keil *et al.*, 2006; Hauptmann

et al., 2006; Mancuso *et al.*, 2007). Eine Vielzahl von genetischen, biochemischen und zellulären Studien stützen diese These (Zhu *et al.*, 2004b; Reddy and Beal, 2005). So weisen frühe Defekte in der Glukose-Verwertung in Gehirnen von AD-Patienten auf mögliche Abnormalitäten der mitochondrialen Funktion hin (Hoyer, 2000). Des Weiteren zeigten morphologische Untersuchungen von frontalem und temporalem Kortex von AD-Patienten strukturelle Veränderungen und eine Reduktion in der Anzahl neuronaler Mitochondrien auf (Hirai *et al.*, 2001). Gehirne von AD-Patienten weisen darüber hinaus reduzierte Pyruvat-Dehydrogenase-, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase- und Cytochrom-C-Oxidase (COX)-Aktivitäten auf (Parker, Jr. *et al.*, 1990; Parker, Jr., 1991; Kish *et al.*, 1992; Parker, Jr. *et al.*, 1994a; Parker, Jr. *et al.*, 1994b; Gibson *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2004a). Reduzierte COX-Aktivitäten konnten ebenfalls in Thrombozyten von AD-Patienten nachgewiesen werden (Bosetti *et al.*, 2002). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten Western Blot Untersuchungen von Proben aus dem parietalen und temporalen Kortex von AD-Patienten verminderte Proteinspiegel bei allen vier Untereinheiten der COX auf (Kish *et al.*, 1999). Ojaimi *et al.* fanden eine Erniedrigung der COX-Untereinheit 2 und 4 in Purkinje-Fasern von AD-Patienten (Ojaimi and Byrne, 2001). Darüber hinaus wurde eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung in Gehirnen von AD-Patienten beobachtet (Chagnon *et al.*, 1995). Das Ausmaß dieser Beeinträchtigung war direkt proportional mit der klinischen Einschränkung der AD-Patienten (Blass, 2003). Einige Studien weisen daraufhin, dass A β möglicherweise direkt auf isolierte Mitochondrien toxisch wirkt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der Enzyme, welche auch verringerte Aktivitäten in AD-Gehirnen aufweisen, direkt durch A β inhibiert werden (Casley *et al.*, 2002). In primären Neuronenkulturen konnte eine Verminderung der Aktivität aller Atmungsketten-Komplexe nach Inkubation mit A β_{25-35} festgestellt werden, sowie verringerte Pyruvat-Dehydrogenase- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivitäten (Casley *et al.*, 2002). In einer Studie mit isolierten Rattenleber-Mitochondrien führte A β_{25-35} zu einer Öffnung der mitochondrialen Pore, zu einer Abnahme der COX-Aktivität und zu erhöhtem oxidativem Stress (Parks *et al.*, 2001a). In Übereinstimmung konnte eine veränderte mitochondriale Funktion im Gehirn und peripheren Geweben von AD-Patienten

nachgewiesen werden. Vor kurzem konnte zudem gezeigt werden, dass A β direkt in Neuronen intrazellulär gebildet werden kann.

Studien mit Cybrid-Zelllinien, die mtDNA aus Thrombozyten von Patienten mit sporadischer AD enthalten, weisen zudem mit der Krankheit vergleichbare Charakteristika auf, wie z.B. erhöhte Absonderung und intrazelluläre Ansammlung von A β , verringertes mitochondriales Membranpotential, oxidativer Stress, erniedrigte COX-Aktivität und eine veränderte Mitochondrien-Morphologie (Khan *et al.*, 2000; Trimmer *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2004b). In einer neuen Studie von Trimmer *et al.* (2004) wurden Cybrid-Zellen von AD-Patienten zu unterschiedlichen Passagezeitpunkten untersucht. Nach der sechsten Passage zeigten sich typische AD-Charakteristika auf, wie z.B. eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien, eine reduzierte Größe und 8-fach mehr morphologisch veränderte Mitochondrien als in Kontroll-Cybrids (Trimmer *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten erhöhte intra- und extrazelluläre A β ₁₋₄₀- und A β ₁₋₄₂-Konzentrationen beobachtet werden, was auf eine Beteiligung von A β an der mitochondrialen Fehlfunktion hinweist (Khan *et al.*, 2000). Des Weiteren gibt es Hinweise, die Mitochondrien mit neuronaler Dysfunktion und Degeneration, ausgelöst durch intraneuronales A β , in Verbindung bringen. Diese werden unter anderem durch die *in vivo* Demonstration von A β -Ansammlungen innerhalb der Mitochondrien in Gehirnen von AD-Patienten (Lustbader *et al.*, 2004; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2004, Keil *et al.*, 2004) und der Beobachtung von mitochondrialen strukturellen Veränderungen gestützt (Hirai *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte Lustbader *et al.* A β , gebunden an ABAD (A β -binding alcohol dehydrogenase), in Mitochondrien von AD-Gehirnen und von APP-transgenen Mäusen nachweisen, assoziiert mit erhöhter Cytochrom-C-Freisetzung, ROS-Bildung und erhöhter Apoptoserate (Lustbader *et al.*, 2004).

Obwohl eine Vielzahl von Beobachtungen auf eine mögliche direkte Verbindung von mitochondrialer Dysfunktion und AD hinweisen, ist der exakte Mechanismus der A β -vermittelten mitochondrialen Fehlfunktion noch nicht vollständig geklärt. Eine Vielzahl von weiteren Experimenten wird nötig sein, um diesen Zusammenhang vollständig klären zu können.

1.2.4 Risikofaktoren der Alzheimer Demenz

1.2.4.1 Das Alter

Der wichtigste Risikofaktor für die Erkrankung an der sporadischen AD stellt das Alter dar (Braak *et al.*, 1996;Mayeux *et al.*, 2003). Die Prävalenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter exponentiell an. Während in der Altersgruppe der 60- bis 70-jährigen unter 5% betroffen sind, sind in der Altersgruppe der über 80-jährigen mehr als 20%, einigen Studien zufolge sogar bis zu 35% betroffen (Bermejo *et al.*, 1991). Man geht davon aus, dass der normale Hirnalterungsprozess als krankheitsverstärkender Faktor bei der Pathogenese der AD agiert und möglicherweise krankheitsspezifische und unspezifische Altersfaktoren gemeinsam zum Absterben der Nervenzellen führen (Beckman and Ames, 1998;Eckert *et al.*, 1999).

1.2.4.2 Genetische Risikofaktoren

Weitere Risikofaktoren betreffen die familiäre Form der AD (FAD), bei welcher der Krankheitsbeginn bei <60-65 Jahren liegt. FAD ist eine autosomal dominant erbliche Form der Erkrankung mit 100%-iger Penetranz. Durch Zwillings- und Familienstudien konnten genetische Faktoren für die Entstehung der FAD belegt werden. Die Untersuchung von FAD-assoziierten Mutationen führte zur Entdeckung von drei Alzheimer-assoziierten Genen:

- 1) das APP-Gen auf Chromosom 21 (Kang *et al.*, 1987;Goate *et al.*, 1991);
- 2) das PS1-Gen auf Chromosom 14 (Cruts *et al.*, 1995;Sherrington *et al.*, 1995;Rogaev *et al.*, 1995);
- 3) das PS2-Gen auf Chromosom 1 (Levy-Lahad *et al.*, 1995).

Das Chromosom 21 wurde sehr früh mit der AD in Verbindung gebracht, da Patienten mit Trisomie 21, die ein zusätzliches Chromosom 21 besitzen, jenseits des 35. Lebensjahres die gleichen zerebralen Gewebeveränderungen wie AD-Patienten und eine erhöhte Inzidenz für eine klinische Demenz aufweisen (Oliver and Holland,

1986; Beyreuther *et al.*, 1993). Mutationen in den erwähnten drei Genen führen alle zu erhöhten Spiegeln an A β ₁₋₄₂ und somit zu einer rasch voranschreitenden Amyloid-Plaques-Pathologie (Scheuner *et al.*, 1996).

Bei allen bisher identifizierten Mutationen von APP handelt es sich um Punktmutationen. Die Mutationen liegen innerhalb des A β selbst oder in unmittelbarer Nähe der Sekretase-Schnittstellen und beeinflussen die Prozessierung von APP (Irie *et al.*, 2005). Während N-terminale Doppelmutationen z.B. die schwedische APP-Doppelmutation, (K670N/M671L) zu einer Erhöhung der Gesamtmenge von sekretiertem A β führen, beeinflussen C-terminale Mutationen die γ -Sekretasespaltung, wodurch es zu einer Erhöhung des relativen Anteils von A β ₁₋₄₂ kommt (Selkoe, 1996).

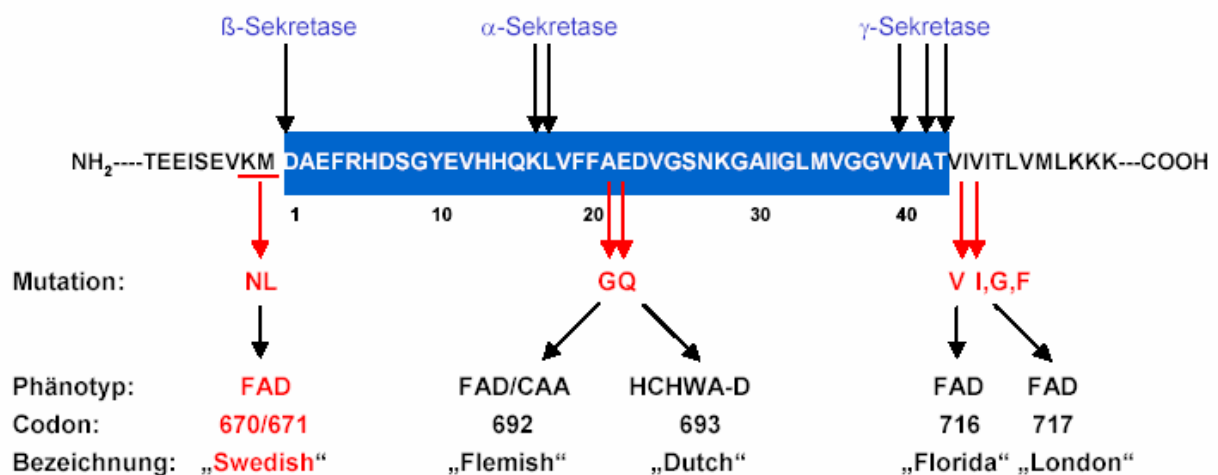


Abbildung 1-7: Schnittstellen der α -, β - und γ -Sekretase im APP-Gen und bekannte APP-Mutationen

Im PS1-Gen konnten bisher mindestens 100 Punkt- sowie 2 Spleißdefekt-Mutationen identifiziert werden, die mit dem frühen Auftreten der AD einhergehen (Rogaeva, 2002). Ein direkter Zusammenhang zwischen PS1-Mutationen und der Bildung von A β wird durch eine erhöhte Anzahl von Amyloid-Plaques in Gehirnen von Patienten mit PS1-Mutationen untermauert (Lemere *et al.*, 1996). Personen mit Mutationen im PS1-Gen erkranken besonders früh an der AD und zwar ab einem Alter von 40-50 Jahren.

PS2-Mutationen treten eher seltener auf und sind im Gegensatz zu PS1-Mutationen nur unvollständig penetrant (Sherrington *et al.*, 1996). Eine Erklärung hierfür ist zum einen die geringe Konzentration von PS2 im Gehirn, sowie die teilweise Kompensation ihrer Aktivität durch PS1.

1.2.4.3 Apolipoprotein E

Ein bereits bekannter genetischer Risikofaktor für die frühe und die späte Form der AD ist der Polymorphismus des Gens für Apolipoprotein E (ApoE) (Schmechel *et al.*, 1993;Saunders *et al.*, 1993;Corder *et al.*, 1993;Corder *et al.*, 1994). Das ApoE-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und es existieren insgesamt drei verschiedene Varianten: APO ϵ 2, APO ϵ 3 und APO ϵ 4 (Mahley, 1988). ApoE ist ein Trägerprotein für Lipide und wurde darüber hinaus in hohen Konzentrationen im zentralen Nervensystem gefunden, wo es in Astrozyten hergestellt wird (Han *et al.*, 2003;Harris *et al.*, 2004) und wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Verteilung von Cholesterin und Phospholipiden spielt (Pitas *et al.*, 1987). In der Alzheimer-Population ist die APO ϵ 4-Variante überdurchschnittlich häufig vertreten (Saunders and Roses, 1993). Das Vorhandensein des APO ϵ 4-Allels ist bei 40% der Erkrankten nachweisbar. Man nimmt an, dass durch die Anwesenheit dieser Variante, das Risiko an der AD zu erkranken steigt, indem das Durchschnittsalter für das Auftreten der Krankheitserscheinungen gesenkt wird (Strittmatter and Roses, 1996). So weisen AD-Patienten mit einem oder zwei APO ϵ 4-Allelen eine höhere Plaquedichte im Gehirn auf im Vergleich zu AD-Patienten, die kein APO ϵ 4-Allel tragen (Schmechel *et al.*, 1993). Darüber hinaus haben homozygote APO ϵ 4-Träger ein höheres Erkrankungsrisiko als heterozygote Träger (Saunders *et al.*, 1993a;Corder *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite scheint die Anwesenheit des APO ϵ 2-Allels das Risiko an AD zu erkranken zu senken (Strittmatter and Roses, 1996). Der genaue Mechanismus, warum das ApoE 4-Protein das Risiko an AD zu erkranken erhöht, ist noch unklar. Eine Hypothese beruht auf den unterschiedlichen Aminosäuren auf den Positionen 112 und 158 der unterschiedlichen Varianten. ApoE 2 enthält zwei Cysteine, ApoE 3 ein Cystein und ein Arginin, und ApoE 4 enthält zwei Arginine

(Mahley, 1988). Cystein ist aufgrund seiner Schwefelwasserstoffgruppe besonders gut geeignet zweiwertige Metalle zu binden. Daher können die Variationen des Apolipoproteins, welche Cysteine enthalten, ApoE 2 und ApoE 3, Schwermetalle in Nervenzellen und Liquor besser binden und folglich entgiften. Eine weitere Hypothese besagt, dass ApoE 4 entweder die A β -Aggregation beschleunigt oder die A β -Clearance verhindert.

1.2.4.4 Sonstige Risikofaktoren

Das α -2-Makroglobulin und sein Rezeptor, LRP 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), deren Gene beide auf Chromosom 12 lokalisiert sind, zählen ebenfalls zu den gegenwärtig diskutierten genetischen Risikofaktoren. Ihre Bedeutung ist aber noch nicht so sicher belegt wie jene des ApoE 4-Proteins. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass beide Proteine eine wichtige Rolle bei der A β -Clearance und dem Abbau von A β spielen (Tanzi, 1999). Ein weiterer wichtiger Kandidat für ein Gen, welches die Suszeptibilität für AD zu beeinflussen scheint, ist das Insulin-degradierende Enzym (IDE)-Gen. Das Insulin-degradierende Enzym ist eine Thiol-Zink-Metalloendopeptidase, welches zusammen mit Neprilysin und anderen Proteasen eine sehr wichtige Rolle bei der A β -Clearance und dem A β -Abbau spielt (Selkoe, 2001a). Weitere Gene, bei denen jedoch erste positive Assoziationsergebnisse nicht immer repliziert werden konnten, sind das Cathepsin-D-Gen, das Interleukin-1-Gen, das Interleukin-6-Gen, das Very Low-density Lipoprotein-Rezeptor (VLDL-R)-Gen, die chromosomale Region D10S1423, das FAS-Rezeptor Gen (TNFRSF6) und das Cholesterin 24S-Hydroxylase (Cyp46)-Gen.

Weiterhin weisen Gehirnmembranen von AD-Patienten spezifische Veränderungen auf (Buchet and Pikula, 2000; Eckert *et al.*, 2003c), wie eine signifikante Abnahme des Cholesterols und des Cholesterol-Phospholipid-Verhältnisses (Mason *et al.*, 1992; Svennerholm and Gottfries, 1994). Nach einer aktuellen Untersuchung von Pappolla *et al.* (2002) korrelieren Amyloid-Ablagerungen im Gehirn bereits im mittleren Lebensalter mit dem Serum-Cholesterin (Pappolla *et al.*, 2002). Allerdings bleibt derzeit die Relevanz dieser Daten noch offen.

Des Weiteren wurde in einigen Studien geringe Schulbildung als Risikofaktor für die Erkrankung an der AD diskutiert. So zeigten Studien von Prencipe et al. (1996), dass Personen mit weniger als 3 Jahren Schulbildung mit 14,6 % eine deutlich höhere Prävalenz von Demenz aufwiesen, als Personen mit längerer Schulbildung (5,9 %) (Prencipe et al., 1996). Studien über den Zusammenhang von Lebensgewohnheiten wie z.B. Alkoholkonsum, Rauchen oder Ernährungsgewohnheiten mit der Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung lieferten dagegen widersprüchliche Erkenntnisse. So konnten einige Studien einen protektiven Effekt des Rauchens auf die Prävalenz von AD feststellen (Graves et al., 1991; van Duijn et al., 1995; Brenner, 2002), vermutlich durch eine inhibierende Wirkung des Nikotins auf die Amyloid-Plaque-Bildung (Salomon et al., 1996). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Ott et al., die das Rauchen als Risikofaktor der AD ansehen (Ott et al., 1998). Weiterhin bestehen Hinweise, dass Schädelhirntraumata einen Einfluss auf die Entwicklung einer AD haben. Übereinstimmend konnten in Gehirnen von Boxern Alzheimer-ähnliche Veränderungen nachgewiesen werden, die mutmaßlich auf die wiederholten Schläge auf den Kopf der Sportler zurückzuführen waren. Man nimmt heute ebenfalls an, dass das weibliche Geschlecht als Risikofaktor der AD angesehen werden kann. Über 70% der AD-Patienten sind weiblich. Allerdings ist zu bedenken, dass Frauen zum einen eine höhere Lebenserwartung als Männer haben und zum anderen, dass die betreffenden Jahrgänge durch eine kriegsbedingte Überpräsentation der Frauen gekennzeichnet sind.

1.3 Therapeutische Interventionsstrategien

Der Wissensstand über die AD ist heute weitaus größer als noch vor 10 Jahren, dennoch ist die Krankheit immer noch unheilbar. Der Patient ist darauf angewiesen, dass die AD zu Lebzeiten korrekt diagnostiziert und folglich durch eine passende symptomatische Therapie behandelt wird. Zwar ist die eindeutige Diagnose von mit zunehmendem Lebensalter stark ansteigenden demenziellen Erkrankungen nur durch eine morphologische Untersuchung des Gehirns *post mortem* eindeutig möglich, allerdings ist die klinische Diagnose in den meisten Fällen korrekt.

Die derzeitig anerkannten Ursachen für das Absterben der Neuronen bei der AD sind außerordentlich vielfältig und umfassen die Anhäufung von A β , die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, mitochondriale Fehlfunktion gefolgt von Apoptose und einer Störung der cholinergen, der dopaminergen und glutamatergen Neurotransmission. Hierdurch ergeben sich verschiedene Angriffsmöglichkeiten zur Verzögerung des Krankheitsverlaufs, wodurch die Wirkmechanismen bekannter Antidementiva auch sehr unterschiedlich sind. In der Behandlung von Patienten mit AD werden heutzutage Acetylcholinesterase-Hemmstoffe, der NMDA-Antagonist Memantine, Ginkgo-biloba-Extrakt und das Nootropikum Piracetam eingesetzt.

1.3.1 Acetylcholinesterase-Hemmstoffe

Bei AD-Patienten konnte ein selektiver Verlust von cholinergen Neuronen gefunden werden (Davies and Maloney, 1976). Basierend auf der „cholinergen Hypothese“ der AD, sind die Acetylcholin (ACh)-Esterase Inhibitoren gegenwärtig das Mittel erster Wahl bei der Therapie der leichten bis mittelschweren AD. Drei ACh-Esterase-Hemmstoffe werden heute zur Therapie der AD verwendet: Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Eine Vielzahl von klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Donepezil (Rogers and Friedhoff, 1996;Rogers *et al.*, 1998;Burns *et al.*, 1999;Winblad *et al.*, 2001), Rivastigmin (Rosler *et al.*, 1999;Greenberg *et al.*, 2000;Greenberg, 2000) und Galantamin (Tariot *et al.*, 2000;Wilcock *et al.*, 2000;Raskind *et al.*, 2000) nachweisen. Der Wirkmechanismus dieser drei Arzneistoffe liegt in der Erhöhung der Verfügbarkeit von ACh durch Inhibition des Enzyms Acetylcholinesterase. Ein Vorteil dieser Stoffe ist, dass sie zwar den Abbau von ACh hemmen, allerdings die Synthese des Neurotransmitters nicht beeinträchtigen. In einer im Jahr 2003 veröffentlichten Metaanalyse konnte der Nutzen der ACh-Esterase-Hemmstoffe bei der AD untermauert werden (Lanctot *et al.*, 2003).

1.3.2 Memantine

Ein weiterer therapeutischer Ansatz beruht auf der Modulation der glutamatergen Neurotransmission. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Glutamaterge Überstimulation kann zu neuronalen Schäden führen, auch Exzitotoxizität genannt. Memantine ist ein N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonist, welcher in Deutschland seit 2003 für die Behandlung mittelschwerer bis schwerer AD zugelassen ist. Der Zulassung von Memantine liegen zwei placebokontrollierte Doppelblindstudien an insgesamt 414 Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Demenz über drei bzw. sechs Monate zugrunde (Reisberg *et al.*, 2003). Memantine konnte über einen Zeitraum von 28 Wochen die Progression der AD vermindern. Pharmakologische, elektrophysiologische und genetische Studien weisen NMDA-Rezeptoren wichtige Funktionen im Rahmen von pathophysiologischen, motorischen, emotionalen Vorgängen sowie Gedächtnisprozessen zu (Rondi-Reig *et al.*, 2001). Durch Memantine wird der NMDA-Kanal in physiologischer Weise blockiert. Aufgrund dessen sind die für Glutamat vermittelten Lern- und Gedächtnisvorgänge zwar verfügbar, wohingegen allerdings die exzitotoxischen Wirkungen von pathologisch erhöhten Glutamatkonzentrationen verhindert werden.

1.3.3 Ginkgo biloba Extrakt

Extrakte der Pflanze Ginkgo biloba werden seit vielen Jahren zur Neuroprotektion und Behandlung von Durchblutungsstörungen eingesetzt. Hierbei wird ein pflanzliches Extrakt aus den getrockneten Blättern des Ginkgo biloba Baumes, eines bis zu 40 Meter hoch werdenden Fächerblattbaumes, als standardisierter und hochgereinigter Spezialextrakt eingesetzt, welcher definiert ist als Trockenextrakt extrahiert mit Aceton/Wasser (Droge-Extrakt-Verhältnis 35-67:1). Standardisierte Extrakte enthalten einen Gehalt von 22-27% Flavonglykoside, 5-7% Terpenlactone (2,8-3,4 % Ginkgolide A, B und C; 2,6-3,2 % Bilobalid) und weniger als 5 ppm Ginkgolsäuren (vergleiche Abbildung 1.8). Die Flavonoidfraktion setzt sich in erster Linie aus Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin-Glykosiden zusammen.

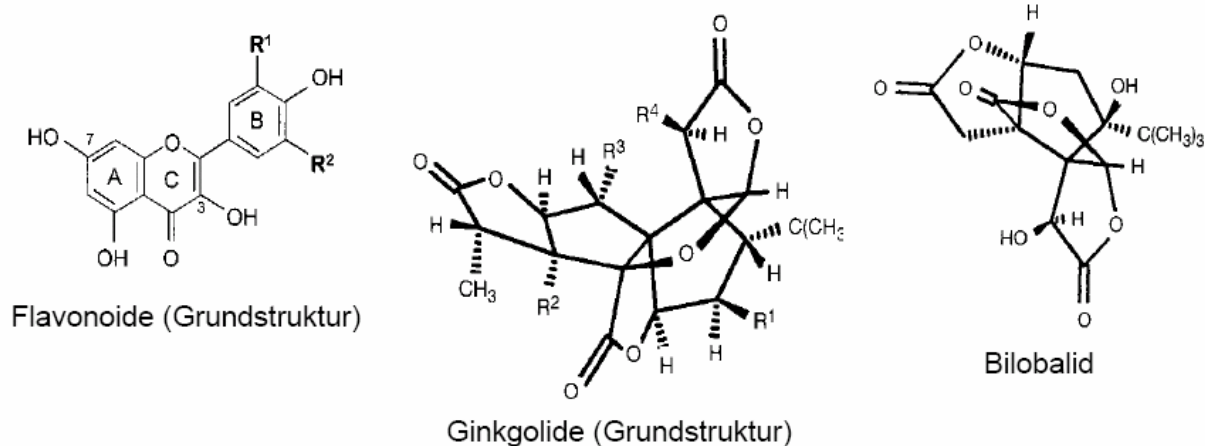


Abbildung 1-8: Strukturformeln der Inhaltsstoffe von Ginkgo-biloba-Extrakt, Flavonoide, Ginkgolide und Bilobalid

Die pharmakologischen Wirkungen und die klinische Wirksamkeit bei der Demenz vom Alzheimer-Typ, bei vaskulärer Demenz und Mischformen wurde hauptsächlich für den standardisierten Ginkgo biloba Extrakt mit der Bezeichnung EGb 761 wissenschaftlich geprüft (Kleijnen and Knipschild, 1992a; Kleijnen and Knipschild, 1992b; Kanowski *et al.*, 1996; Le Bars *et al.*, 1997; Defeudis and Drieu, 2000; Le Bars *et al.*, 2000; Le Bars *et al.*, 2002).

In einer Studie von Kanowski *et al.* (1996), durchgeführt an 216 Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD, Multiinfarkt-Demenz oder vom Mischtyp, konnte ein signifikant verbesserter klinischer Gesamteindruck nach einer Ginkgo biloba Extrakt Behandlung beobachtet werden (Kanowski *et al.*, 1996). Hierzu erhielt die Verumgruppe über einen Behandlungszeitraum von 24 Wochen eine Tagesdosis von 240 mg EGb 761. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe von Le Bars *et al.* (1997). In einer Studie mit 309 Patienten mit AD und vaskulärer Demenz, welche über einen Behandlungszeitraum von 52 Wochen mit 120 mg EGb 761 pro Tag behandelt wurden, konnte ebenfalls eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und eine Steigerung der Alltagskompetenz bei der Verumgruppe im Vergleich zu der Placebo-Gruppe festgestellt werden (Le Bars *et al.*, 1997). Von besonderem Interesse ist die Studie von Maurer *et al.* (1997), bei der zwar lediglich 20 AD-

Patienten in die Bewertung mit einbezogen wurden, die allerdings, obwohl nur eine sehr kleine Gruppe beobachtet wurde, eine signifikante kognitive Überlegenheit der Verumgruppe gegenüber der Placebogruppe aufzeigte (Maurer *et al.*, 1997). Eine neue placebokontrollierte Doppelblindstudie an Patienten mit AD zeigte eine bedeutende Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nach der Einnahme von EGb 761 über einen Zeitraum von 26 Wochen im Vergleich zur Placebo-Gruppe auf (Schulz, 2003). Diese Ergebnisse, in Zusammenhang mit zahlreichen Meta-Analysen von Doppelblindstudien (Kleijnen and Knipschild, 1992a;Kleijnen and Knipschild, 1992b;Ernst, 1999) weisen daraufhin, dass EGb 761 ein wichtiges Medikament zur Behandlung der AD ist.

Der Wirkmechanismus von EGb 761 und seiner Bestandteile ist allerdings derzeit noch nicht vollständig geklärt. Pharmakologisch gesehen konnte eine Vielzahl von Wirkmechanismen beobachtet werden, wobei man annimmt, dass die Wirkung von Ginkgo biloba Extrakt aufgrund seiner multifaktoriellen Eigenschaften herrührt. So konnten u.a. antioxidative (Rong *et al.*, 1996;Bastianetto *et al.*, 2000a;Bastianetto *et al.*, 2000b), neuroprotektive (Ahlemeyer and Krieglstein, 2003) und antiapoptotische Effekte (Smith *et al.*, 2002) von EGb 761 nachgewiesen werden. Weiterhin scheint EGb 761 schützende Effekte auf Mitochondrien auszuüben (Sastre *et al.*, 1998;Sastre *et al.*, 2002). So konnte in einer Studie von Due *et al.* (1999) gezeigt werden, dass isolierte Lebermitochondrien durch EGb 761 vor Sauerstoffmangel geschützt werden (Du *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde beobachtet, dass das adrenerge, dopaminerge, cholinerge, serotonerge und GABAnerge Neurotransmittersystem durch EGb 761 verbessert werden konnte (Ahlemeyer and Krieglstein, 2003). Obwohl der genaue Mechanismus der EGb 761-Wirkung noch nicht vollständig geklärt ist, kann aufgrund der zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimente eine schützende Funktion von Ginkgo biloba Extrakt auf das zentrale Nervensystem angenommen werden (Defeudis and Drieu, 2000).

1.3.4 Piracetam

Piracetam (2-oxo-1-Pyrrolidineacetamid) ist ein medizinisch therapeutischer Wirkstoff aus der Gruppe der Nootropika, welches in den 80er Jahren entwickelt wurde (Giurgea, 1982). Piracetam ist ein zyklisches Derivat von GABA, wobei es allerdings selbst keine GABA-Aktivität aufweist (vergleiche Abbildung 1.9). In vielen Ländern wird Piracetam zur Behandlung von kognitiven Beeinträchtigungen im Alter, sowie bei der Behandlung von Demenz eingesetzt (Croisile *et al.*, 1993; Waegemans *et al.*, 2002). Piracetam wird nach oraler Gabe rasch und vollständig resorbiert. Die relative systemische Bioverfügbarkeit beträgt im Vergleich mit AUC-Werten nach intravenöser Applikation 100 %, wobei Piracetam im Körper nicht metabolisiert wird.

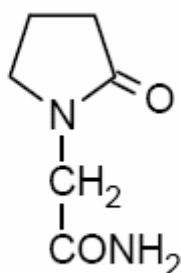


Abbildung 1-9: Strukturformel von Piracetam (2-oxo-1-Pyrrolidineacetamid) (Naftalin *et al.*, 2004)

Ogleich die klinische Wirksamkeit von Piracetam diskutiert wird, führten mehrere placebokontrollierte klinische Studien mit definierten Zielvariablen zu einer positiven Gesamtbewertung von Piracetam in der Behandlung von demenziellen Erkrankungen. So konnte in einer Studie an 33 Patienten mit milder AD gezeigt werden, dass Piracetam, verabreicht über eine Behandlungsdauer von einem Jahr und einer Dosis von 8 g täglich, zur Reduktion der Progression von kognitiven Störungen führt (Croisile *et al.*, 1993). Eine vergleichende Studie zwischen ACh-Esterase-Hemmstoffen im Vergleich zu Piracetam zeigte ähnliche Wirksamkeiten der beiden getesteten Substanzen auf (Tsolaki *et al.*, 2001). In der umfassenden systematischen Literaturanalyse der Cochrane Collaboration ließ sich für den globalen klinischen Gesamteindruck für Piracetam ein signifikant positives Ergebnis sichern, nicht jedoch für kognitive oder andere Parameter (Flicker and Grimley,

2001). Des Weiteren erbrachte eine Metaanalyse aus dem Jahr 2002, bei der insgesamt 19 placebokontrollierte Doppelblindstudien an älteren Patienten mit Demenz und kognitiven Störungen eingeschlossen wurden, eine erhöhte Wirksamkeit von Piracetam im Vergleich zur Placebobehandlung (Dedeyn *et al.*, 1996; Waegemans *et al.*, 2002). Allerdings ist das Wirkprinzip von Piracetam noch nicht vollständig geklärt.

Man nimmt an, dass Piracetam dosisabhängig an Phospholipide der Zellmembran bindet, wodurch sich möglicherweise eine verbesserte Membranstabilität und eine Modulation der postsynaptischen Rezeptordichte mit Veränderungen der Neurotransmission und sich einer daraus resultierenden Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten ergibt (Scheuer *et al.*, 1999). Durch zahlreiche Studien konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von Piracetam normalerweise mit Zuständen gestörter Gehirnfunktion wie z.B. Altern verbunden ist (Muller *et al.*, 1997). So konnte gezeigt werden, dass Piracetam die mit dem Alter abnehmende Membranfluidität im menschlichen Gehirn als auch in der Maus und in der Ratte erhöht (Muller *et al.*, 1997). Dies konnte ebenfalls durch Eckert *et al.* an hippokampalen Membranen von Patienten mit sporadischer AD nachgewiesen werden (Eckert *et al.*, 1999), wobei in der Maus ebenfalls eine Verbesserung der Membranfluidität synaptosomaler und mitochondrialer Membranen beobachtet werden konnte (Muller *et al.*, 1999). Des Weiteren werden noch eine Vielzahl weiterer Wirkmechanismen für Piracetam diskutiert (Jelic *et al.*, 2006). So konnten durch Gabryel *et al.* ebenfalls neuroprotektive Effekte von Piracetam auf Rattenastrozyten nach Hypoxie beobachtet werden (Gabryel *et al.*, 2002). Weiterhin konnte bei Patienten mit sporadischer AD durch Piracetam eine Steigerung des erniedrigten zerebralen Glukoseverbrauchs beobachtet werden (Heiss *et al.*, 1988). Mingeot-Leclercq *et al.* konnten in ihrer Studie aufzeigen, dass Piracetam in der Lage ist, die durch $A\beta_{29-42}$ ausgelöste Membrandestabilisierung zu verhindern (Mingeot-Leclercq *et al.*, 2003; Keil *et al.*, 2006b).

1.3.5 Neue Therapieoptionen

Aufgrund der begrenzten Nutzen der gegenwärtigen Medikamente, die derzeit nur die Symptome der AD beeinflussen können, wird die Notwendigkeit von effizienteren Therapiemöglichkeiten, die darauf abzielen, den zu Grunde liegenden pathologischen Vorgängen bei der AD zu verlangsamen oder ganz aufzuhalten immer größer. Ein Großteil dieser neuen Therapiestrategien zielt auf die Beeinflussung der Amyloid-Pathologie ab. Von großem Interesse hierbei ist die Reduktion der Bildung von Amyloidablagerungen, welche der so genannten Amyloid-Kaskaden-Hypothese folgend einen zentralen Baustein der Pathophysiologie der AD darstellen (Hardy and Selkoe, 2002; Cummings and Cole, 2002). Hier sind insbesondere die in den Amyloidmetabolismus eingreifenden Substanzen (α -Sekretaseaktivatoren, sowie β - und γ -Sekretaseinhibitoren) und Verfahren (aktive/passive Immunisierung) zu nennen.

Insbesondere eine Beeinflussung der γ -Sekretase, die für das Zerschneiden des APP in die pathogenen A β -Peptide verantwortlich ist, stellt ein aussichtsreiches Ziel für eine medikamentöse Beeinflussung dar. Erste Studienergebnisse weisen auf eine klinische Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit der Prüfsubstanz hin (Siemers *et al.*, 2005).

Im Gegensatz hierzu scheint die Entwicklung von β -Sekretase-Hemmstoffen, welche die aktive Seite des Enzyms hemmen, schwieriger zu sein. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der β -Sekretase (Hong *et al.*, 2000) konnten effektive Inhibitoren entwickelt werden, wobei vor kurzem ein auf Hydroxyethylen basierender peptidometrischer Inhibitor durch Hom *et al.* synthetisiert werden konnte (Hom *et al.*, 2004). Von großem Interesse sind ebenfalls die Ergebnisse, die mit β -Sekretase knockout-Mäusen erzielt wurden. Diese Mäuse wiesen keine offensichtlichen Defizite allerdings ein verändertes Verhalten auf (Roberds *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2003).

Ansätze zur Immunisierung transgener Mäuse mit A β lieferten vielversprechende Resultate, wie Verhinderung der Plaquebildung in jungen Mäusen und einer Reduktion der Plaques in älteren Mäusen, verbunden mit verbesserten Gedächtnisleitungen (Schenk *et al.*, 1999; Bard *et al.*, 2000; Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Dodart *et al.*, 2002). Klinische Studien an Patienten mit milder bis

moderater AD mit aktiver A β - Immunisierung mussten jedoch nach Auftreten schwerwiegender Entzündungsreaktionen im ZNS gestoppt werden (Selkoe and Schenk, 2003). Eine Nachuntersuchung der AD-Patienten mit hohen Antikörperspiegeln gegen A β zeigte jedoch ein langsames Fortschreiten der kognitiven Defizite bei diesen Patienten (Hock *et al.*, 2003). Aus diesem Grund werden gegenwärtig präklinische Studien mit anti-A β -Antikörpern durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt fokussiert die Beeinflussung der Bildung von neurofibrillären Tangles. Man vermutet, dass durch eine gezielte Inaktivierung der GSK-3 β (Bhat *et al.*, 2004) oder der Cdk5 (Tsai *et al.*, 2004) und einer daraus resultierenden Reduktion der Phosphorylierung des Tau-Proteins, eine Verminderung dieser in den chronisch-neurodegenerativen Prozess der AD involvierten Noxen erreicht werden könnte.

Des Weiteren zeigten verschiedene Studien, dass cholesterinsenkende Medikamente bei der Verhütung oder sogar der Behandlung der AD nützlich sein können. So konnten in zwei großen Beobachtungsstudien eine um 60-73% verminderte Prävalenz der AD bei Personen beobachtet werden, die eine Statintherapie hatten (Jick *et al.*, 2000). In Studien mit Meerschweinchen und transgenen Mäusen konnte durch eine Behandlung mit Statinen die zerebrale A β -Konzentration reduziert werden (Fassbender *et al.*, 2001;Petanceska *et al.*, 2002). Bei niedrigen Cholesterin-Werten spaltet die α -Sekretase das APP physiologisch (Kojro *et al.*, 2001), wohingegen bei hohen Cholesterinwerten die β -Sekretase zur Entstehung von Amyloidplaques führt (Simons *et al.*, 1998). Trotz Hinweisen auf die Wirksamkeit dieses Ansatzes (Wolozin *et al.*, 2000;Jick *et al.*, 2000), wurde bis heute in retrospektiven Kurzzeitstudien bei der Anwendung mit Statinen in der Behandlung der AD nur ein geringer Erfolg verzeichnet (Simons *et al.*, 2002).

1.4 Ziel der Arbeit

Hauptcharakteristika der AD sind extrazelluläre Plaques, bestehend aus dem Amyloid- β -Peptid und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein, welche beide in ähnlicher Weise bei der familiären und der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit auftreten. Dieser Umstand deutet daraufhin, dass möglicherweise gemeinsame Endpunkte pathogenetischer Mechanismen bei beiden Krankheitsformen vorliegen. Allerdings ist bisher wenig über die intrazellulären zugrunde liegenden Mechanismen dieser beiden histopathologischen Merkmale hinsichtlich der Ausbildung der AD-Pathologie bekannt.

Da vorhergehende Untersuchungen gezeigt haben, dass mitochondriale Veränderungen eine zentrale Rolle bei der AD spielen, war das Ziel dieser Arbeit die mitochondriale Funktion bzw. Dysfunktion im Zusammenhang mit der A β -Pathologie, der Tau-Pathologie und dem Alter im Detail zu untersuchen. Die durchgeführten Untersuchungen basierten auf den bisherigen Befunden der Arbeitsgruppe und stellten eine Fortführung der viel versprechenden Studien mit Zellsystemen (PC12, HEK und SY5Y) und dissoziierten Hirnzellen dar.

Um die AD-relevanten mitochondrialen Veränderungen im Detail zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit isolierte Mitochondrien von Thy-1 APP und P301L-Tau transgenen Mäusen verwendet. Thy-1 APP transgene Tiere exprimieren die schwedische Doppelmutation (KM670/671NL) sowie die London Mutation (V717L) des APP-Proteins unter der Kontrolle des murinen Thy-1 Promoters (Blanchard et al., 2003). Die Mäuse weisen erhöhte A β -Level ab einem Alter von 3 Monaten auf. Weiterhin sind erste Plaques bei diesen Tieren bereits ab einem Alter von 6 Monaten zu detektieren (Blanchard et al., 2003), wodurch sie ein äquivalentes Modell zur Pathogenese der FAD darstellen. Demgegenüber überexprimieren P301L transgene Mäuse das Tau-Protein mit der Mutation P301L. Diese Mäuse weisen eine Anhäufung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein auf, sowie kommt es in diesen Tieren ab einem Alter von 6 Monaten zur NFT-Formation (Gotz et al., 2001b).

Thy-1 APP transgene Tiere zeigen je nach Alter unterschiedliche Ausmaße an extrazellulären Ablagerungen bestehend aus dem Amyloid-beta-Peptid, wohingegen Taumäuse ebenfalls altersabhängig neurofibrilläre Bündel aus hyperphosphoryliertem Tauprotein ausbilden. Hierdurch waren diese beiden transgenen Tierlinien geeignet, den Einfluss von A β bzw. Tau im Zusammenhang mit dem Alter auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen.

Zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion diente die mitochondriale Membranpotentialmessung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamine 123. Das mitochondriale Transmembranpotential stellt einen wichtigen und sensiblen Marker der mitochondrialen Funktion dar. Aufgrund dessen wurde es zum einen basal bestimmt, sowie nach oxidativem und nitrosativem Stress. Hierzu wurden die isolierten Mitochondrien zusätzlich mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Natriumnitroprussid (SNP), einem NO-Donor behandelt und anschließend das Membranpotential mittels R123 bestimmt. Des Weiteren wurden die isolierten Mitochondrien mit spezifischen Komplexinhibitoren behandelt um erste Aufschlüsse über mögliche Defekte der Atmungsketten-Komplexe zu erhalten. Zur weiteren Charakterisierung wurden durch direkte Messmethoden die Komplex I- und Komplex IV-Aktivitäten bestimmt. Zusätzlich wurden die Atmungsraten von Thy-1 APP und P301L transgenen Mäusen unterschiedlicher Altersstufen im Vergleich jeweils gleich alter nicht transgener Mäuse mittels einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss des Alters auf die mitochondriale Funktion untersucht. Hierzu wurde die Funktion isolierter Mitochondrien unterschiedlich alter NMRI-Mäuse, welche keinerlei Mutationen aufweisen und somit den Einfluss des Alters alleine auf die mitochondriale Funktion widerspiegeln, ebenfalls mit den oben erwähnten Parametern getestet.

Abschließend sollte überprüft werden, inwiefern derzeitig eingesetzte Therapieoptionen, wie Ginkgo biloba Extrakt und Piracetam möglicherweise einen protektiven Effekt auf die mitochondriale Funktion ausüben. Zu diesem Zweck wurden Behandlungsstudien mit jungen und alten NMRI-Mäuse mit Ginkgo biloba Extrakt oder Piracetam durchgeführt. Durch Bestimmung des Membranpotentials ohne und mit H₂O₂, SNP und Komplexinhibitoren wurde der Effekt von Ginkgo biloba und Piracetam auf die Funktion isolierter Mitochondrien überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

- Autoklav Modell Bioclav, Firma Schütt Labortechnik, Göttingen
- Blockthermostat Modell HB-130, Firma CLF, Emersacker
- Brutschrank Modell BB 6 220 Firma Heraeus, Hanau
- Deckgläschen, Firma Fischer (Merck), Darmstadt
- Feinwaage Modell AB204, Firma Mettler, Giessen, Schweiz
- Feinwaage Modell AT261, Firma Mettler, Giessen, Schweiz
- Fluoreszenzmikroskop Modell Eclipse %800 mit Kamera, Firma Nikon, Düsseldorf
- Kühlzentrifuge Modell J2-21 mit JA-20 und JA-20.1 Rotor, Firma Beckman, München
- Kühlzentrifuge Modell Microfuge, Firma Beckmann, München
- Kühlzentrifuge Modell RC 5c Plus, Rotor SS-34, Firma Sorvall, Hanau
- Kühlzentrifuge Modell Microfuge, Firma Beckmann, München
- Kühlzentrifuge Modell Allegra 6R, Firma Beckmann, München
- Magnetrührer, Modell Variamag, Firma Mono, München
- Mikro-Kühlzentrifuge Modell Mikrofuge R, Firma Nunc, Wiesbaden
- Orbitalschüttler, Promax 1 020, Firma Heidolph, Kelkheim
- Parafilm, Firma Roth, Karlsruhe
- Pasteur-Pipetten, Firma Fischer (Merck), Darmstadt
- PH-Meter Modell CG825, Firma Schott, Hofheim
- Photometer für Mikrotiterplatten Modell Digiscan, Firma Asys Hightech, Eugendorf
- Pipetten Modelle Pipetman 2, 10, 20, 100, 1 000, 5 000 μ l, Firma Abimed, Langenfeld
- Pipettierhilfe Modell vacu-petus, Firma Qualilab, Heidelberg

- Plastik-Pipetten (steril), 5ml, 10ml, 25ml, Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen
- Potter, Glashomogenisator mit Teflonpistill, Firma B. Braun, Melsungen
- Quarzküvetten, Firma Zeiss, Jena
- Reaktionsgefäße 1, 5, 2 ml, Firma Eppendorf, Hamburg
- Sicherheitswerkbank Modell DLF/Rec 4, KL 2 A , Firma Heraeus, Hanau
- Spektralphotometer Modell -2 000, Firma Hitachi, München
- Transferpipetten Modell E800 10-100µl und 100-300µl, Firma Brand, wertheim
- Vortexer Modell Reax 2 000, Firma Heidolph, Kelkheim
- Wasserbad Modell 1 002, Firma GFL, Burgwedel

2.1.2 Chemikalien

2-Thenoyltrifluoroacetone (TTFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Merck, Darmstadt
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blue juices (Gel-Ladepuffer)	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)	Fluka, München
Complete, Protease Inhibitor Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisentrichlorid (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ginkgo-biloba Extrakt (EGb761)	Schwabe, Karlsruhe
Hank`s Balanced Salt, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ - frei (HBSS)	Sigma-Aldrich, München
Hydroxyethylpiperazinethansulfonat (HEPES)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligomycin (OM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Piracetam	UCB, Belgien
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhodamin 123 (R 123)	Calbiochem, Darmstadt
Rotenon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose, Sigma Ultra >99,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
β -Amyloid1-42, globulomer (A β 1-42oligo.)	Abbott Laboratories,
β -Amyloid1-42, Lot: 0535120 (A β 1-42fibr.)	Bachem, Heidelberg
β -Amyloid1-42, monomer (A β 1-42mono.)	Abbott Laboratories,
β -Amyloid1-42, solid powder (A β 1-42fibr.)	Abbott Laboratories,
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma, München

2.1.3 Kits und Antikörper

Kits

Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry)	Bio Rad, München
Cell Proliferations Kit I (MTT-Assay)	Roche, Mannheim
Cytochrome c Oxidase Assay Kit	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilde
Master Taq Kit (PCR)	Eppendorff, Hamburg

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit den unter 1.1.1. aufgeführten Reagenzien in analytischer Reinheit und gereinigtem Millipore-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit einem Photometer der Marke Schott Modell CG 825 (Hofheim) eingestellt. Das pH-Meter wurde jeden Tag vor Gebrauch mittels geeigneter Kalibrierungslösungen (pH 7 und pH 4) neu kalibriert.

2.1.4.1 Puffer

Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)-Puffer (pH 7,4)

Zur Herstellung dieses Puffers wurde zunächst HBSS-Fertigpulvermedium in 990 ml Millipore-Wasser gelöst. Anschließend wurden je 5 ml CaCl_2 -Lösung (200 mM) und MgSO_4 -Lösung (200 mM) sowie 2,358 g HEPES hinzugefügt. Nachfolgend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Puffer-Sauerstoffverbrauchsmessungen (pH 7,0)

65 mM	Saccharose
10 mM	Kalium-Phosphat
10 mM	Tris-HCl
10 mM	MgSO_4
2 mM	EDTA

Puffer-Komplex I Messungen (pH 7,2)

2 mM	Na^+ /MOPS
50 mM	NaCl
2 mM	KCN

Mitochondrien-Isolierungs-Puffer (pH 7,5)

210 mM	Mannitol
70 mM	Saccharose
10 mM	HEPES
1 mM	EDTA
0,45 %	BSA
0,5 mM	DTT

Protease Inhibitor Tablette (complete^R)

Puffer für DNA Gelelektrophorese

TAE Puffer (pH 7,4)

4,84 g	Tris	
1,142 ml	Essigsäure	
1 mM	Na EDTA	in 1 l Millipore Wasser

Tris-Puffer 5 mM:

Zur Herstellung dieses Puffers wurden 1,21 g/ml Tris in 2 l Millipore-Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

TBST (10x)

24,2 g Tris
 80 g NaCl
 13 ml HCl konz.
 5 ml Tween 20

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt. 100 ml wurden mit 900 ml ddH₂O₂ verdünnt.

Saccharosepuffer für BN-Page (pH 7,0)

250 mM Sucrose
 20 mM NaP_i

Solubilisierungspuffer für BN-Page (pH 7,0)

50 mM NaCl
 50 mM Imidazole/HCl
 2 mM 6-Aminohexan-Säure
 1 mM EDTA

Puffer für BN-Page

	Kathoden-Puffer B	Kathoden-Puffer B/10	Anoden-Puffer	Gelpuffer (3x)
Tricin (mM)	50	50	-	-
Imidazol (mM)	7,5	7,5	25	75
Coomassie blue (%)	0,02	0,002	-	-
6-Aminohexanios Säure	-	-	-	1,5
pH	~ 7,0	~ 7,0	7,0	7,0

2.1.4.2 Lösungen

Rhodamine 123-Stammlösung (R123):

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

2.2 Mäuse

Alle für die Versuche verwendeten Mäuse wurden im zentralen Tierstall des pharmakologischen Instituts in Standard-Altrominkäfigen (Makrolon Typ II, Altromin GmbH, Deutschland) mit je maximal 6 Tieren pro Käfig gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter (Standard 1320 Ratte/Maus Haltdungsdiät, Altromin GmbH, Deutschland) und zum Wasser ad libitum. Die Käfige enthielten neben Streu eine Plastikrolle und einige Cellulosetücher. Die Temperatur im Tierstall betrug konstant 25° Celsius bei ebenfalls konstanter Luftfeuchtigkeit. Der Tag/Nacht-Rhythmus (Hell/Dunkel-Rhythmus) betrug 12 Stunden. Alle Käfige wurden 1mal wöchentlich gereinigt und mit Perform desinfiziert.

Vor den Versuchen wurde der Gesundheitszustand der Tiere in Augenschein genommen, und nur gesunde Tiere wurden für die Experimente verwendet. Des Weiteren wurden die Experimente unter Berücksichtigung der Tierschutzgesetze zur Haltung und zum Umgang mit Tieren durchgeführt.

2.2.1 NMRI-Mäuse

Für Vorversuche, Alterungsstudien und *in vivo* Untersuchungen mit Ginkgo oder Piracetam wurden in dieser Arbeit NMRI-Mäuse (Naval Medical Research Institute) von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH verwendet. Die Tiere wurden in einem Alter von 3 Monaten von der Firma geliefert und alterten bis zu den entsprechenden Altersstufen im Tierstall des Biozentrums. NMRI-Mäuse unterliegen als Auszuchtstamm einer ständigen Veränderung des Genpools durch Auskreuzen der Tieren und weisen insofern einen heterogenen genetischen Hintergrund auf.

2.2.2 C57BL/6J-Mäuse

Als weiteres Tiermodell wurden in dieser Arbeit Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet. C57BL/6J@ICO Mäuse stammen von Iffa Credo, Frankreich. C57BL/6J Mäuse wurden 1921 von C.C. Little aus einer Kreuzung der weiblichen N⁵⁷ mit der männlichen N⁵² des Bestandes von "Miss Abby Lathrop" entwickelt. Die Weiterzucht ab der Generation F22 erfolgte nach 1948 durch das Jackson Labor und ab dem Jahr 1981 durch IFFA-CREDO.

2.2.3 Transgene Mäuse

2.2.3.1 Thy-1 APP transgene Mäuse

Thy-1 APP transgene Mäuse exprimieren die 751 lange Aminosäureform des humanen APP mit der Schwedischen (KM670/671NL) und der London Mutation (V717L) unter der Kontrolle des murinen Thy-1 Promoters (Blanchard *et al.*, 2003). Der Thy-1 Promoter führt zu einer erhöhten und selektiven Expression in Neuronen. Des Weiteren wurde zur Optimierung der Expression ein Kozak-Element in die 5'-UTR-Region des APP-Gens eingefügt. Zusätzlich enthält die APP₇₅₁-Isoform die 56 AS große Kunitz-Protease Inhibitor Region. Es konnte gezeigt werden, dass diese Region für eine veränderte APP-Prozessierung verantwortlich ist, wodurch es zu erhöhten A β -Leveln in Zellkulturen kommt (Ho *et al.*, 1996). Thy-1 APP transgene Mäuse weisen erhöhte A β -Level ab einem Alter von 3 Monaten auf, wobei erste Plaques bereits ab einem Monat von 6 Monaten zu beobachten sind (Blanchard *et al.*, 2003).

2.2.3.2 P301L-Mäuse

P301L-Tau transgene Mäuse (P301L-Mäuse) exprimieren die längste Tau-Protein-Isoform (hTau40-Protein) mit der human-pathogenen Mutation P301L unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Promoters mThy1.2 (Gotz *et al.*, 2001a). Diese Isoform enthält das Exon 2 und 3, sowie 4 Mikrotubuli-Bindungsdomänen (2+3+4R, human tau40). Phänotypisch gesehen zeigen diese Mäuse abnormale Tau-Filament Formationen.

Für die Versuche wurden unterschiedliche Altersstufen verwendet, welche verschiedenen Stadien in der Entwicklung einer Tau-Pathologie entsprechen. P301L-Mäuse zeigen bereits ab einem Alter von 3 Monaten eine Tau-Hyperphosphorylierung auf (Gotz et. al. 2001a). NFT-Formation beginnt ab 6 Monaten (Gotz, 2001).

2.3 Mausschwanzbiopsien

Die Isolierung der genomischen DNA aus Mausschwanzspitzengewebe wurde mittels des „DNeasy tissue Kits“ nach dessen genauer Arbeitsanweisung vorgenommen. Alle Schritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen um mögliche Kreuzkontaminationen zwischen den unterschiedlichen DNA-Proben zu vermeiden.

Vorab wurden die nicht charakterisierten Mäuse mit durchnummerierten Ohrclips zur späteren Identifikation versehen. Nach Betäubung der Mäuse mittels Isofluran, erfolgte die Mausschwanzspitzenbiopsie, bei der mit Hilfe einer vorher desinfizierten Schere circa 0,5 mm vom Schwanzende entfernt wurden. Das so erhaltene Gewebe wurde anschließend mit einem ebenfalls desinfizierten Skalpell zerkleinert und einem Proteinkinase K-Verdau (Proteinkinase K 1:10 verdünnt in Lysepuffer) über Nacht bei 55°C im Schüttelwasserbad ausgesetzt. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben gemäß der Herstellerangaben weiterbearbeitet. Die Isolation mit dem „DNeasy Tissue Kit“ beruht wie alle DNA-Isolationsverfahren auf einer Verdauung des Gewebes und einer anschließenden Aufreinigung der so freigesetzten DNA. Hierzu wurden im nächsten Schritt zunächst störende Fellbestandteile mit einem Ethanol-haltigen Puffer aufgeschlemmt und im Anschluss daran abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, RT). Daraufhin wurde die DNA an eine DNeasy Mini-Säule gebunden und in mehreren Schritten durch Zugabe von Waschpuffern und anschließender Zentrifugation von Stoffen befreit, die sich bei der PCR störend auswirken könnten. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 200 µl AE-Puffer (Ethanol-frei) von der Säule eluiert und stand nunmehr in reiner Form für die PCR-Amplifikation zur Verfügung.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Identifizierung von Thy-1 APP transgenen Mäusen wurde die Expression des humanen APP und des murinen fetalen Hämoglobins als interne Kontrolle für die DNA-Isolation mittels PCR nachgewiesen. Die PCR-Amplifikation wurde mittels des „MasterTaq Kits“ von Eppendorf durchgeführt. Nach Herstellerangaben beinhaltete der PCR Mix pro PCR-Ansatz (25 µl Endvolumen):

- 1 U Taq-DNA-Polymerase
- 2 µM des jeweiligen Primers
- 0.2 mM dNTPs
- 1 µl der zuvor eluierten DNA-Probe
- Puffer

Im ersten Schritt wurden die Proben zunächst auf 94°C für 5 Minuten erhitzt. Daran schlossen sich insgesamt 35 Amplifikations-Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 1:30 Minuten bei 72°C an. Nach der Reaktion wurden die Proben auf 4°C herunter gekühlt und bis zur Gelelektrophorese bei dieser Temperatur aufbewahrt.

Für die PCR wurden die folgenden Primer verwendet:

Humanes APP

„sense“ 5'-GTA GCA GAG GAG GAA GAA GTG-3'

„antisense“ 5'-CAT GAC CTG GGA CAT TCT C-3'

MFH

„sense“ 5'-GAT CAT GAC CGC CGT AGG-3'

„antisense“ 5'-CAT GAA CTT GTC CCA GGC TT-3'

Für die PCR-Reaktion wurden als Positivkontrolle Templates der APP₇₅₁ DNA und als Negativkontrolle autoklaviertes Millipore Wasser verwendet.

2.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikation wurden 15 µl der erhaltenen PCR-Produkte gemeinsam mit jeweils 1 µl Blue juice 10x Gelladepuffer auf ein 1%, mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurde zunächst 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Erhitzen auf 100°C gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agaroselösung mit 8 µl/100 ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Das noch flüssige Agarosegel wurde daraufhin in ein 10x25 cm Bio Rad Sub Zell Model mit zwei 51-Well Kämmen gegossen und 1 Stunde lang auspolymerisiert. Das feste Gel wurde daraufhin in eine mit TAE-Puffer gefüllte Sub Cell Kammer eingespannt und mit den Proben beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch Anlegung einer Spannung von 80 Volt für eine Stunde mit Hilfe des Bio Rad Power Pac 300 Set. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden durch einen UV-Transilluminator (Herolab) sichtbar und zur Vereinfachung der späteren Auswertung mit einer Videokamera (Kodac) fotografiert und ausgedruckt (vergleiche Abbildung 2.1).

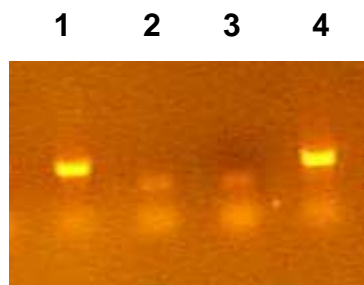


Abbildung 2-1: Beispiel einer Gelelektrophorese zur Genotypisierung der transgenen Mäuse

PCR Reaktionsprodukte der isolierten DNA Proben aus Mausschwanzgewebe wurden mittels Elektrophorese in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt.

Spur 1: Positivkontrolle des APP₇₅₁ (425 bp); Spur 2: Negativkontrolle (nur Wasser); Spur 3: keine Bande → nicht transgene Maus; Spur 4: Bande bei 425 bp → Thy-1 APP transgene Maus

Die PCR-Reaktion ergibt ein 425 bp großes Produkt für die Positivkontrolle und die DNA-Proben von transgenen Mäusen und ein 311 bp großes Produkt für MFH.

2.6 Blue-Native (BN) Gelelektrophorese

2.6.1 Aufarbeitung der Proben

Die Mäuse wurden zunächst durch Überstreckung und anschließender Dekapitation getötet. Nach Präparation des Gehirns wurde dieses mittels PBS gewaschen und gewogen. Im Anschluss daran wurden die Mäuse-Gehirne mit Saccharose-Puffer auf 100 mg Feuchtgewicht/ml eingestellt. Weiterhin wurden die Gehirn-Stückchen bis zu weitgehender Homogenität gepottert (etwa 20 x 2000 rpm). Das so erhaltene Hirn-Homogenat wurde zu jeweils 20 mg Feuchtgewicht (entspricht 200 µl) aliquotiert und 10 Minuten bei 10.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet konnte hierbei bis zur weiteren Verwendung mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80°C gelagert werden. Das Pellet wurde im Anschluss mit 70 µl Solubilisierungslösung NaCl/Imidazol (50/50) versetzt und gründlich gemischt. Daraufhin wurden 10 µl einer 20%-igen Laurylmatosid-Lösung hinzugefügt und 5-10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 100.000 g für 15 Minuten bei 4°C. Der so erhaltene Überstand wurde mit 10 µl 5%-iger SBG-Lösung (5 µl Serva Blue G-250-Lösung in 50%-iger Glycerin) versetzt und konnte hiernach auf das Gel aufgetragen werden.

2.6.2 BN-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von nativen Membrankomplexen wurde die Blue-Native (BN) - Gelelektrophorese nach Schagger und Jagow (1991) angewandt. Die Proteine bleiben bei BN-Gelelektrophorese im Unterschied zu der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in ihrer dreidimensionalen Struktur weitgehend erhalten. Sie werden durch die Beladung mit dem sauren Coomassie-Farbstoff (Serva Blue G-250) negativ geladen und wandern dadurch im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes. Der Farbstoff bindet an die hydrophoben Oberflächenstrukturen der Proteine und zerstört weder ihre Struktur noch ihre biologische Funktion. Durch die Beladung werden die Proteine nur leicht beeinflusst. Zur Auftrennung der mitochondrialen Komplexe wurden 3,5%/4-13%-ige Gradientengele verwendet.

	Sammelgel	Gradienten-Trenngel	
	3,5 % Acrylamid	4 % Acrylamid	13 % Acrylamid
AM-3 Mix	0,4 ml	1,5 ml	3,9 ml
Gelpuffer 3 x	2 ml	6 ml	5 ml
Glycerol	-	-	3 g
Wasser	3,4 ml	10,4 ml	3 ml
Totales Volumen	6 ml	18 ml	15 ml
10 % APS	50 µl	100 µl	75 µl
TEMED	5 µl	10 µl	7,5 µl

Tabelle 2.1 Pipettierschema Gradientengel

Sobald die Proben auf die Gele aufgetragen wurden, wurde die vertikale Elektrophorese bei konstanter Spannung durchgeführt (100 V bei der Passage durch das Sammelgel, danach 500 V für ca. 5 Stunden). Als Kathodenpuffer diente zunächst ein Puffer mit 0,02% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Nach der Hälfte der Zeit wurde dieser durch einen Kathodenpuffer mit 1/10 des Coomassie-Brilliant-Blau Farbstoffes, aber sonst gleicher Zusammensetzung ersetzt.

2.6.3 Auftrennung von Proteinkomplexen in der zweiten Dimension (2D-Analyse)

Bei der Gelelektrophorese in zwei Dimensionen erfolgten nacheinander eine BN-Gelelektrophorese und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Nach Abschluss der BN-Gelelektrophorese (vergleiche Kapitel 2.6.2) wurde der weiter zu untersuchende Teil des Gels in Form eines 18 mm breiten Streifens vom Rest des Gels abgetrennt und zunächst für 20 Minuten mit 1%-iger SDS-Lösung inkubiert. Nach gutem Spülen des Gelstreifens wurde dieser zwischen zwei Glasplatten gespannt, ein 10%-iges SDS-Acrylamidgel gegossen und die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese als zweite Dimension durchgeführt. Der Gel-Lauf erfolgte bei 200 V (max. 90 mA) mit einer Einlaufphase bei 100 V.

2.6.4 Coomassie-Färbung

Zum Fixieren und Anfärben von Proteinbanden wurden die BN-2-D-Gele für mind. 30 Minuten in einer Farblösung (0,025% (w/v) Serva-Blau G-250, 10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in Wasser) geschwenkt. Das anschließende Entfärben erfolgte in der Entfärberlösung (10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in Wasser), bis die angefärbten Proteinbanden ausreichend zu erkennen waren.

2.7 Isolierung von Mitochondrien aus dem Maushirn

Die Isolierung der Mitochondrien wurde modifiziert nach der Methode nach Eskes et al. (1998) durchgeführt.

Zur Isolierung von Mitochondrien aus murinen Gehirnen wurden die Mäuse zunächst durch Überstreckung und anschließender Dekapitation getötet. Nach Präparation des Gehirns wurde dieses mittels eines Skalpell vorsichtig zerkleinert und im Anschluss daran in ein vorher auf Eis gekühltes 2 ml Pottergefäß überführt. Die Gehirnstückchen wurden in 2 ml Mitochondrienpuffer bis zu weitgehender Homogenität gepottert (etwa 15 x 400 rpm). Zur Abtrennung grober Zelltrümmer und der Zellkerne wurde zunächst einmal 7` bei 1.400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und daraufhin erneut 3` bei 1.400xg zentrifugiert. Zur Gewinnung der Mitochondrien wurde der Überstand 5` bei 10.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in 1 ml Mitochondrienpuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde erneut für 3` bei 1.400xg und der daraus resultierende Überstand wiederum für 5' bei 10.000xg zentrifugiert. Das Pellet, welches freie Mitochondrien und Synaptosomen enthielt, wurde in einem möglichst kleinen Volumen Mitochondrienpuffer aufgenommen und direkt im Anschluss daran weiter verwendet.

2.8 Proteinbestimmung mittels der Lowry-Methode

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry wird ein Kupfer-Zink-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (Lowry et al., 1951). Dieser Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz), wobei eine intensiv-blaue Färbung entsteht.

In einer 96-Lochplatte wurden 5 µl Probe (in geeigneter Verdünnung) bzw. Leerwert (HBSS-Puffer) oder Standard in HBSS-Puffer pipettiert. Dazu wurden zunächst 25 µl Reagenz A und daraufhin 200 µl Reagenz B zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation auf dem Schüttler konnte die Absorption bei 620 nm abgelesen werden. Die Standardgerade erstreckte sich von 1 bis 5 µg/µl.

2.9 MTT-Assay

Der erstmals von Mosmann et al. (1993) beschriebene MTT-Test dient zur Bestimmung der Bioaktivität/Vitalität von Zellen bzw. der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen und unlöslichen Formazan, dessen Absorption zwischen 550 und 600 nm vermessen werden kann (vergleiche Abbildung 2.2).

Für die Bestimmung der Aktivität von isolierten Hirn-Mitochondrien wurde der „Cell Proliferation Kit I“ (Firma Roche, Mannheim) verwendet. Für die Messung wurden jeweils 50 µl Mitochondriensuspension in Mitochondrien-Puffer bzw. für den Leerwert nur Mitochondrien-Puffer in einer 96-Well-Mikrotiterplatte für die jeweiligen Inkubationsdauern auf dem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Jeweils 2 Stunden vor Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden 20 µl MTT-Reagenz dazu pipettiert und die Reaktion mit jeweils 100 µl Solubilisationslösung beendet. Die hierdurch gebildeten Formazinkristalle wurden letztendlich über Nacht gelöst (mikroskopische Kontrolle) und am darauf folgenden Tag die Absorption im Mikrotiterplattenphotometer bei 570 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt.

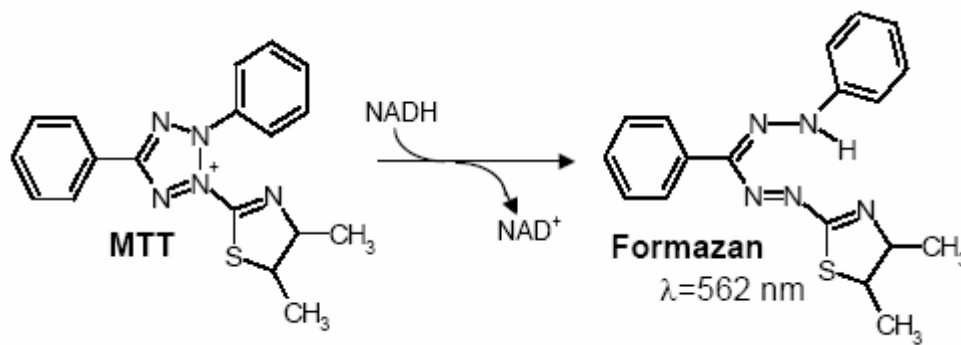


Abbildung 2-2: Reduktion von MTT zu Formazan

Zur Etablierung von Messungen mit isolierten Mitochondrien, wurde zunächst die maximal mögliche Inkubationsdauer für nachfolgenden Versuche mittels eines MTT-Assays bestimmt. Hierzu wurde die Viabilität isolierter Mitochondrien über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass die Lebensfähigkeit der Mitochondrien bereits nach zwei Stunden rapide abnahm (vergleiche Abbildung 2.3), so dass für nachfolgende Experimente ein Zeitfenster von zwei Stunden nach Isolierung festgelegt wurde. Zwar minimierte dies die Möglichkeiten der Experimente, allerdings konnte so gewährleistet werden, dass mögliche Effekte nicht aufgrund der stark abnehmenden Viabilität verursacht wurden.

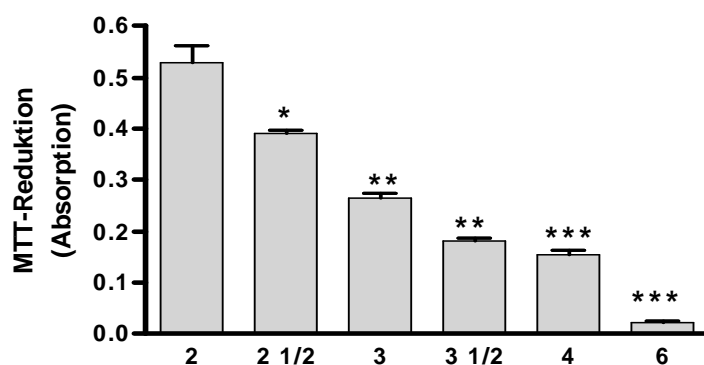


Abbildung 2-3: Viabilitätsbestimmung von isolierten Mitochondrien

Viabilität von isolierten Mitochondrien, gemessen mittels der MTT-Reduktion über einen Zeitraum von 6 Stunden. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 4 Experimenten. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus Kontrolle nach 2 h).

2.10 Beta-Amyloid (A β) Peptide

A β ₁₋₄₂-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 zuvor 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 Stammlösung wurde sofort nach dem Auflösen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Des Weiteren wurden die Peptide vor Beginn der Experimente für 24h voraggregiert. Hierzu wurde die Stammlösung in Tris-Puffer verdünnt und anschließend für 24h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit A β ₁₋₄₂ globulomere und monomere Peptide getestet. Diese wurden, gelöst in 5 mM Natriumphosphat und 35 mM NaCl (pH 7,4) von der Firma Abott, Ludwigshafen bezogen. Die Weiterverdünnungen zu den Stammlösungen mit jeweils 2,5 μ M erfolgten in HBSS-Puffer.

2.11 Messung des Transmembranpotentials

Das Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamine 123 (R123) (Baracca et al., 2003) gemessen (vergleiche Abbildung 2.4). Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist kationischer Natur. Aufgrund seiner positiven Ladung lagert er sich selektiv in Abhängigkeit vom negativen Membranpotential in die mitochondriale Matrix ein. Folglich ist die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional mit der Höhe des mitochondrialen Membranpotentials, d.h. je intensiver die Fluoreszenz desto negativer das mitochondriale Transmembranpotential.

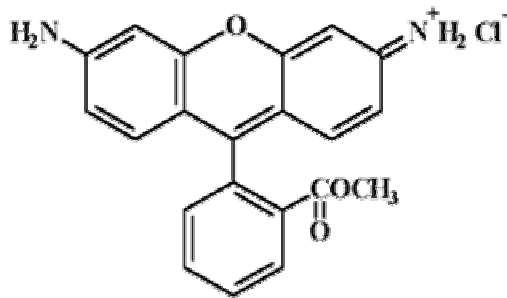


Abbildung 2-4: Strukturformeln von R123

Hierzu wurde der Farbstoff zu den isolierten Mitochondrien mit einer Endkonzentration von $0,4 \mu\text{M}$ für 15 Minuten gegeben. Im Anschluss wurden die Suspensionen zweimal mit HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma, Deutschland) gewaschen. Die Messung erfolgte am Victor[®] Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (Einstellung: Rhodamine Bottom).

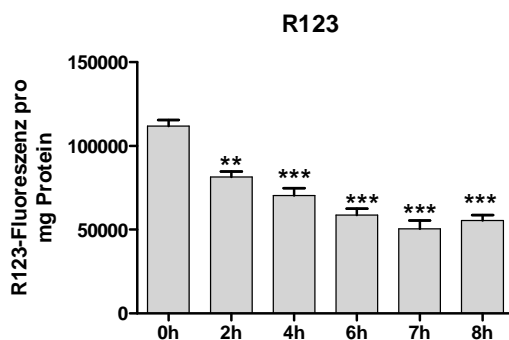


Abbildung 2-5: Viabilitätsbestimmung von isolierten Mitochondrien

Viabilität von isolierten Mitochondrien, gemessen mittels der R123-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 8 Stunden. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 4 Experimenten. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus Kontrolle nach 0h).

Zusätzlich zur Bestimmung der Viabilität der Mitochondrien mittels des MTT-Tests (vergleiche Kapitel 2.9), wurde das mitochondriale Membranpotential über einen Zeitraum von 8 Stunden mittels R123 bestimmt. Bereits nach zwei Stunden konnte eine signifikante Abnahme des Membranpotentials unbehandelter isolierter Mitochondrien festgestellt werden (vergleiche Abbildung 2.5), vergleichbar mit der Abnahme der gemessenen MTT-Reduktion nach 2 Stunden. Aufgrund dessen bestätigten diese Daten den MTT-Test und untermauerten unsere Entscheidung,

nachfolgende Experimente innerhalb von zwei Stunden durchzuführen, um mögliche Einflüsse bedingt durch Vitalitätsverluste zu minimieren.

2.12 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien wurde mit Hilfe eines geschlossenen Respirometers (Sauerstoff-Analysegerät Oxygraph-2k) der Firma Oroboros (vergleiche Abbildung 1.7) mit zwei identischen Versuchskammern ermittelt.

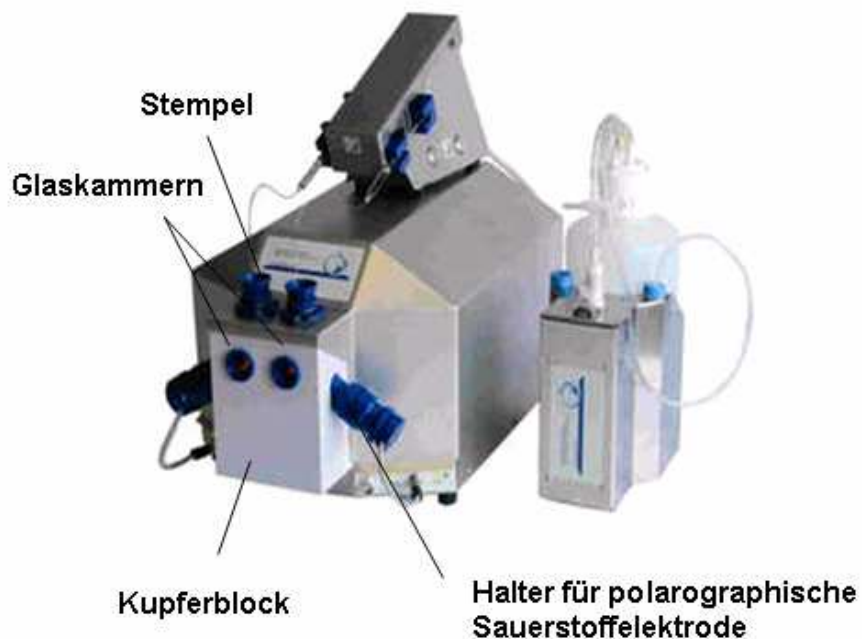
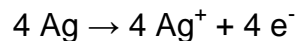
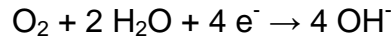


Abbildung 2-6: Darstellung des Oroboros Oxygraphen.

2 Glaskammer sind in einen Kupferblock eingelassen, der temperaturreguliert und isoliert ist. Peltier-Thermodrähte verbinden den Kupferblock und die Peltier-Wärmeverteilerplatte. Die polarographischen Sauerstoffsensoren (POS) sind durch eine Kautschukglocke geschützt. Die Stempel (Stopper) mit einem Titaniumkanal in der Mitte können variabel in die Kammer eingelassen werden, um das Volumen zu verändern.

An der Goldkathode der polarographischen Sauerstoffelektroden vom Clark-Typ wird eine Polarisierungsspannung von 0,8 V angelegt. Der Sauerstoff diffundiert aus dem Medium durch eine 25 μm dicke FEP-Membran zur Oberfläche der Kathode, an der er reduziert wird, während an der Silber/Silberchlorid-Anode elementares Silber oxidiert wird:



Der resultierende Strom ist zur Menge der verbrauchten O₂-Moleküle proportional. Als Elektrolyt wird eine 1 molare Kaliumchlorid-Lösung verwendet.

2.12.1 Geräteaufbau und Vorbereitung

Zu Beginn einer Messreihe wurden die beiden Versuchskammern mit je 2 ml Reaktionspuffer gefüllt. Zur Vermeidung von Interferenzen mit dem Signal der Elektroden wurden die integrierten Magnetrührer mit leicht unterschiedlichen Frequenzen betrieben (490 bzw. 520 rpm). Zur Aufzeichnung der Sauerstoffsättigung der Lösungen in den Kammern pro Sekunde wurde das Softwareprogramm DatLab 2.1. (Oroboros, Österreich) verwendet. Vor jedem Versuchstag wurden die polarographischen Sauerstoffsensoren (POS) mittels belüftetem Reaktionsmedium und durch anschließende Zugabe von DTT und Schließung der Kammern kalibriert. Gewartet wurde jeweils bis ein konstanter Wert erreicht war. Im ersten Schritt wurde das belüftete Reaktionsmedium in die Kammern gegeben. Der sich daraufhin einstellende Wert betrug in etwa 100 % Sauerstoffsättigung. Der Nullpunkt der Elektroden wurde im Anschluss durch die Zugabe von DTT in die geschlossenen Elektrodenkammern bestimmt. Hierdurch wurde sämtlicher gelöster Sauerstoff reduziert und der Wert, der sich innerhalb von etwa 2 Minuten einstellte entsprach der Null-Linie. Nach Kalibrierung des Nullpunktes wurden die ermittelten Werte (100 %-ige und 0 %-ige Sauerstoffsättigung) sowie der Faktor 0,865 (geringe Löslichkeit von Sauerstoff im Reaktionsmedium im Vergleich zu Wasser) automatisch durch das Programm DatLab 2.1. zur Kalibrierung der Sauerstoffelektrode verwendet. Luftdruck und Temperatur wurden automatisch registriert und berücksichtigt.

2.12.2 Versuchsablauf

In die beiden Kammern des Oxygraphen wurden je 2 ml Reaktionsmedium gegeben und diese luftblasenfrei verschlossen. Nach Einstellung eines konstanten Signals

wurden daraufhin 50 μl Mitochondriensuspension ($\sim 0,2 \text{ mg/ml}$) mittels einer Hamilton-Pipette hinzugegeben. Die Abnahme des O_2 -Gehaltes in den Kammern wurde etwa 10 min nach Erreichen einer konstanten Rate aufgezeichnet. Die jeweiligen Substrate bzw. Hemmstoffe (siehe Tabelle unten) wurden ebenfalls mit einer Hamilton-Spritze in beide Kammern injiziert. Nach jeder Injektion wurde der O_2 -Verbrauch für mindestens 3-5 min aufgezeichnet.

Substrat/Hemmstoff	μl eingesetzt	Konz.- Stammlösung	Konz. in Messung
Mitochondrien	50 μl	$\sim 8 \text{ mg/ml}$	$\sim 0,2 \text{ mg/ml}$
Malat/Glutamat	40 μl	240 mM /280 mM	4,8 mM/5,6 mM
ADP	10 μl	100 mM	0,5 mM
FCCP	1 μl	0,1 mM	0,05 mM
Rotenon	3 μl	0,1 mM	0,15 mM
Succinat	10 μl	1 M	5 mM
KCN	8 μl	0,5 M	2 nM

Tabelle 2.2: Zusammenfassende Darstellung der eingesetzten Konzentrationen

2.12.3 Auswertung

Die Atmungsraten [$\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] der Mitochondrien wurden mit Hilfe des Software-Programmes DatLab 2.1. berechnet. Das Programm berechnet unter Berücksichtigung der im Oxygraphen eingestellten Daten aus der Kalibrierung sowie der Temperatur und des Luftdrucks die prozentuale Sauerstoffsättigung des Reaktionsmediums in die Sauerstoffkonzentration [μM] um. Die Ableitung dieser Sauerstoffkonzentration [μM] in der Versuchskammer über jeweils fünf Datenpunkte (d.h. 0,083 Minuten) entspricht der Änderung des Sauerstoffgehaltes über die Zeit.

2.13 Komplex-I Messungen

Zur Bestimmung der NADH-Ubiquinone Oxidoreduktase (NADH:DBQ) und der NADH:hexaammineruthenium (III)-chloride (NADH:HAR) Aktivität, wurden die Mitochondrien zunächst aus den Gehirnen der entsprechenden Mäuse isoliert (vergleiche Kapitel 2.7). Im Anschluss wurden die Mitochondrien mit n-dodecyl-D-Maltoside (0,7 %) (Sigma-Aldrich) solubilisiert. Die Bestimmung der NADH:HAR-Aktivität erfolgte bei 30 °C in einem Puffer, der 2 mM Na/MOPS, 50 mM NaCl und 2 mM KCN, bei einem pH-Wert von 7,2 enthält. Als Substrate für die Reaktion fungierten 2 mM HAR und 200 µM NADH. Durch die Bestimmung der NADH:HAR-Aktivität kann der Gehalt an Komplex I der Präparation bestimmt werden. Die Bestimmung der NADH-DBQ erforderte den Einsatz von 100 µM n-Decylubiquinone (DBQ) und 100 µM NADH als Substrate (David et al., 2005). Die Oxidationsraten von NADH wurden mittels eines Shimadzu Multi Spec-1501 Diode Array Spectrometer aufgenommen.

2.14 Bestimmung der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität

Die Cytochrom-C-Oxidase (COX)-Aktivität wurde mit Hilfe des „Cytochrom-C-Oxidase-Assay-Kits“ der Firma Sigma bestimmt (Rasmussen, U. F. and Rasmussen, H. N., 2000). Das Messprinzip des „Cytochrom-C-Oxidase-Kit“ ist die Tatsache, dass die Absorption von Cytochrom C bei einer Wellenlänge von 550 nm abhängig von seinem Oxidationsstatus ist. Cytochrom C wird durch Natriumhydrogensulfit zu Ferrocycytochrom C reduziert und anschließend durch COX zu Ferricytochrom C reoxidiert. Die Oxidation von Ferrocycytochrom C durch Cytochrom-C-Oxidase ist eine biphasische Reaktion mit einem schnellen Anstieg der Aktivität gefolgt von einer langsamen Reaktionsrate. Die Reaktion läuft innerhalb von 45 Sekunden ab.

Die isolierten Mitochondrien wurden mit PBS auf einen Proteingehalt von 80 µg Protein eingestellt. An jedem Messtag wurden die Natriumhydrogensulfitlösung und die Ferrocycytochrom-C-Substrat-Lösung frisch hergestellt. Zur Herstellung der Ferrocycytochrom-C-Lösung wurde Cytochrom C in Wasser gelöst und anschließend Natriumhydrogensulfitlösung 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 diene 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

Tabelle 2.3: Reaktionsschemata der Cytochrom-C-Oxidase Bestimmung

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 Mitochondrien führten zu einem Abfall der Absorption bei 550 nm.

Die COX-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

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

Abbildung 2-7: Formel zur Berechnung der COX-Aktivität

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

2.15 Behandlungsstudien

Es wurden während dieser Arbeit mehrere 14-tägige Behandlungsstudien mit weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte unter Standard-Bedingungen (vergleiche Kapitel 2.2). Während der Behandlungsstudien wurden die Tiere getrennt nach Alter und Behandlungsgruppe gehalten. Die Gruppengröße pro Käfig betrug maximal 10 Tiere, wobei die Gruppengrößen pro Studie so klein wie möglich gewählt wurden. Die Gesamtzahl der Tiere pro Studie ergab sich aus der Untersuchung von verschiedenen Substanzen versus Placebo-Gruppen, aus dem Einsatz verschiedener Altersgruppen, sowie aus der Notwendigkeit einer aussagekräftigen Statistik. Nach Beendigung der jeweiligen Fütterungsstudie wurden isolierte Mitochondrien (vergleiche Kapitel 2.7) präpariert und unterschiedliche Parameter der Atmungskette überprüft.

2.15.1 Schlundsondierung

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde den Tieren ein Mal täglich eine Einzeldosis des zu untersuchenden Wirkstoffes (Suspension/Lösung in 0,2%igem Agarose-Gel) bzw. des Vehikels (Agarose-Gel 0,2%) per os mittels Schlundsondierung appliziert. Das Agarose-Gel bzw. die Wirkstoff-Lösungen (Ginkgo oder Piracetam) wurden jeden Tag kurz vor der Fütterung frisch angesetzt. Die eingesetzten Tagesdosen richteten sich hierbei jeweils nach dem Gewicht der Mäuse und nach den durch Vorversuche ermittelten Konzentrationen der jeweiligen Substanzen.

2.15.2 Studiendesigns

2.15.2.1 Studie 1

Untersuchung des Einflusses von Piracetam auf die mitochondriale Funktion im Alter

Es handelte sich bei allen Tieren um alte (22 Monate) weibliche NMRI-Mäuse. Es wurde eine Dosis von 500 mg/kg Kg Piracetam für diese Behandlungsstudie gewählt

Die Gesamtzahl der gefütterten Tiere betrug 16, die folgendermaßen auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt wurden.

Kontrolle-Gruppe	Piracetam
8	8

2.15.2.2 Studie 2

Untersuchung des Einflusses von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe im Alter

Es handelte sich bei den Tieren um junge (3 Monate) bzw. alte (22 Monate) weibliche NMRI-Mäuse. Es wurde eine Dosis von 500 mg/kg Kg Piracetam für diese Behandlungsstudie gewählt Die Gesamtzahl der gefütterten Tiere betrug 32, die folgendermaßen auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt wurden.

	Kontrolle	Piracetam
3 Monate	8	8
22 Monate	8	8

2.15.2.3 Studie 3

Untersuchung des Einflusses von Ginkgo auf die mitochondriale Funktion im Alter

Es handelte sich bei den Tieren um junge (3 Monate) bzw. alte (22 Monate) weibliche NMRI-Mäuse. Es wurde eine Dosis von 100 mg/kg KG Ginkgo für diese Behandlungsstudie gewählt Die Gesamtzahl der gefütterten Tiere betrug 32, die folgendermaßen auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt wurden.

	Kontrolle	Ginkgo
3 Monate	8	8
22 Monate	8	8

2.15.2.4 Studie 4

Untersuchung des Einflusses von Ginkgo auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe im Alter

Es handelte sich bei den Tieren um junge (3 Monate) bzw. alte (22 Monate), weibliche NMRI-Mäuse. Es wurde eine Dosis von 100 mg/kg Kg Ginkgo für diese Behandlungsstudie gewählt Die Gesamtzahl der gefütterten Tiere betrug 32, die folgendermaßen auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt wurden.

	Kontrolle	Piracetam
3 Monate	8	8
22 Monate	8	8

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der Prism4[®]-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 anschließender Tukey's posthoc Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von A β auf die mitochondriale Funktion

Eine Vielzahl von Daten weist auf einen Zusammenhang von A β und mitochondrialer Dysfunktion hin. So konnte bereits an verschiedenen Zellmodellen, welche APP mit der Schwedischen Mutation exprimieren (APP^{sw}), gezeigt werden, dass A β abhängig vom Expressionslevel unterschiedliche Effekte auf das mitochondriale Membranpotential ausübt. APP^{sw}-PC12-Zellen sind durch eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials gekennzeichnet. Demgegenüber weisen APP^{sw}-HEK-Zellen, welche 20-fach erhöhte A β -Spiegel gegenüber APP^{sw}-PC12-Zellen besitzen, ein signifikant erniedrigtes Membranpotential im Vergleich zu Vektor- und Wildtyp (WT)-transfizierten Kontrollzellen auf (Keil *et al.*, 2006). Des Weiteren resultiert die Zugabe von extrazellulärem A β zu untransfizierten Zellen ebenfalls in einem konzentrationsabhängigen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials.

Um diese AD-relevanten Effekte von A β auf die mitochondriale Funktion im Detail weiter zu untersuchen, sollten daher fortführend Versuche mit isolierten Mitochondrien nicht-transgener (non-tg) und Thy-1 APP transgener Tiere durchgeführt werden.

Die hierfür verwendeten Thy-1 APP transgenen Mäuse exprimieren die schwedische Doppelmutation (KM670/671NL) sowie die London Mutation (V717L) des APP-Proteins unter der Kontrolle des murinen Thy-1 Promoters (Blanchard *et al.*, 2003). Die Tiere weisen erhöhte A β -Level ab einem Alter von 3 Monaten auf, wobei erste Plaques bereits ab einem Alter von 6 Monaten zu detektieren sind (Blanchard *et al.*, 2003). Hierdurch stellen Thy-1 APP transgene Mäuse ein geeignetes Modell zur Pathogenese der familiären AD dar.

3.1.1 A β verändert das mitochondriale Membranpotential

Das Membranpotential stellt einen wichtigen und sensiblen Marker für die mitochondriale Funktion dar. Zur Charakterisierung der mitochondrialen Kapazität Thy-1 APP transgener Tiere wurde daher zunächst das Transmembranpotential unter basalen Bedingungen mittels des kationischen Fluoreszenzfarbstoffes R123 bestimmt. Die für die folgenden Versuche verwendeten Tiere waren in einem Alter von 6-8 Monaten, da in diesem Alter Thy-1 APP transgene Mäuse neben erhöhten A β -Leveln ebenfalls extrazelluläre Plaques aufweisen (Blanchard *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass Thy-1 APP Mitochondrien ein signifikant erniedrigtes Membranpotential aufweisen (Abb. 3.1).

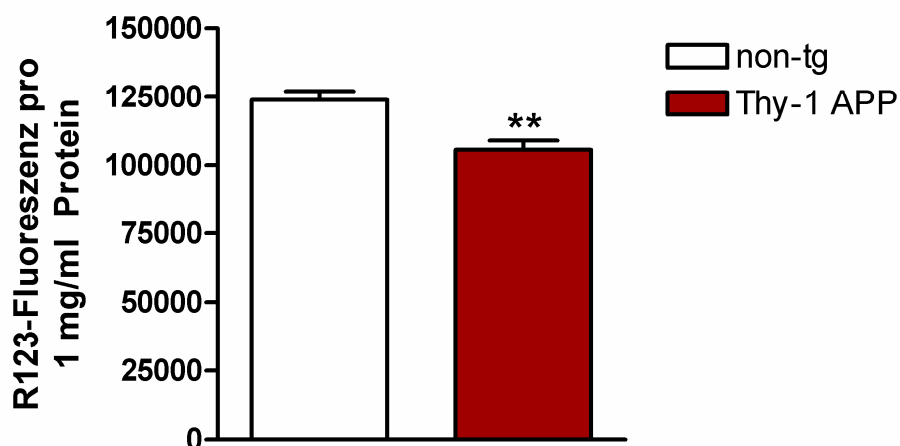


Abbildung 3-1: Vermindertes mitochondriales Transmembranpotential Thy-1 APP transgener Mäuse.

Das mitochondriale Membranpotential von isolierten Mitochondrien 6-8 Monate alter non-tg und Thy-1 APP transgener Tiere wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 vermessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6-8 Experimenten. (** $p < 0,01$; non-tg versus Thy-1 APP, student's t-test).

3.1.1.1 Oxidativer, nitrosativer und A β induzierter Stress resultiert in keiner zusätzlichen Schädigung Thy-1 APP transgener Mitochondrien

Es mehren sich die Hinweise, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD spielt (Pratico and Delanty, 2000; Zhu *et al.*, 2004a; Pratico, 2005; Zhu *et al.*, 2007). In den letzten Jahren konnte darüber hinaus eine Beteiligung von NO an der AD-Pathogenese belegt werden (Smith *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007). Aus diesem Grund sollte der Effekt von oxidativem und nitrosativem Stress auf die mitochondriale Funktion in Zusammenhang mit der A β -Pathologie untersucht werden. Diesbezüglich wurden isolierte Hirn-Mitochondrien von non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen für 2 Stunden mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Natriumnitroprussid (SNP) gestresst. Des Weiteren sollte zusätzlich die Auswirkung von extrazellulär zugefügtem, fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Leistungskapazität dieser Tiere überprüft werden.

Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass isolierter Hirn-Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse nach einer 2-stündigen Inkubation mit H₂O₂ und SNP durch ein unverändertes Membranpotential gekennzeichnet sind. Demgegenüber reagieren Mitochondrien von non-tg Mäusen nach oxidativem und nitrosativem Stress mit einer starken Abnahme des Membranpotentials, das heißt es kommt hierbei zu einer verstärkten Depolarisation (Abb. 3.2 A, B). Die Stimulation mit extrazellulärem A β ₁₋₄₂ führt ebenfalls nur in non-tg Tieren zu einem tendenziellen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.2 C).

Isolierte Hirn-Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse scheinen aufgrund der chronischen Vorbelastung durch das neuronal überproduzierte A β bereits massiv vorgeschädigt zu sein. Dies könnte der Grund dafür sein, dass ein weiterer Stressor, mit den von uns gewählten Bedingungen, in keiner weiteren Verminderung des Membranpotentials resultiert. Hierbei ist vermutlich eine Vielzahl von Kompensationsmechanismen beteiligt.

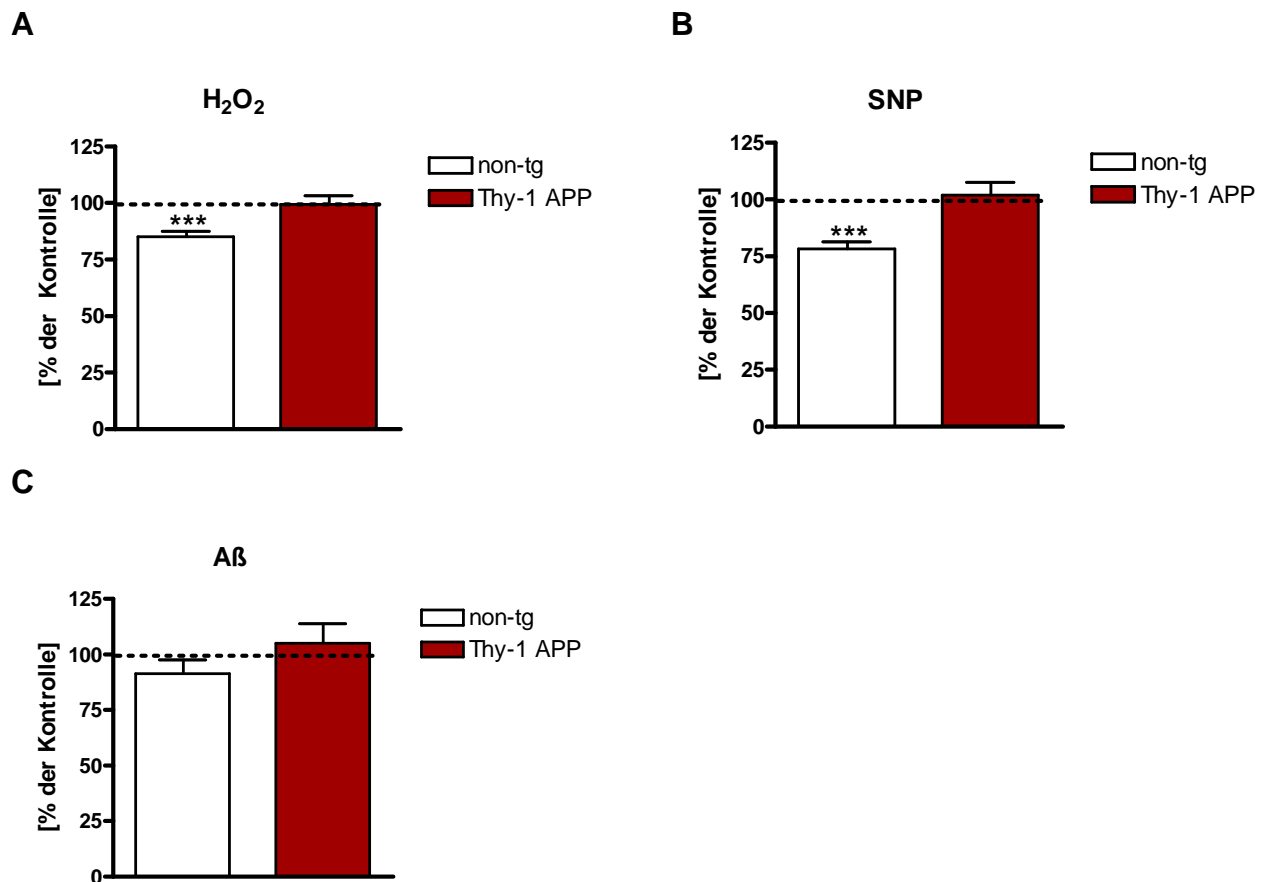


Abbildung 3-2: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials isolierter Mitochondrien von non-tg und Thy-1 APP transgenen Tieren nach sekundärem Insult mit H₂O₂, SNP und Aβ₁₋₄₂.

Isolierte Mitochondrien von 6-8 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen wurden für 2 Stunden mit 2mM H₂O₂, 2mM SNP und 50nM Aβ₁₋₄₂ inkubiert. Das mitochondriale Transmembranpotential wurde im Anschluss mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien nach A) Stimulation mit H₂O₂, B) Stimulation mit SNP und C) Stimulation mit Aβ₁₋₄₂. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 6 Experimenten. (***)p<0,001; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien, student's t-test).

3.1.2 Thy-1 APP Mäuse weisen mitochondriale Atmungsdefekte auf

3.1.2.1 Einfluss von Aβ auf die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe

Die Atmungskette besteht aus mehreren hintereinander geschalteten Enzymkomplexen mit redoxaktiven und prosthetischen Gruppen. In der

Atmungskette werden Elektronen vom NADH oder Succinat auf molekularen Sauerstoff übertragen. Während des Elektronentransportes werden gleichzeitig H^+ von innen nach außen transportiert, wodurch ein Membranpotential aufgebaut wird. Der Befund, dass Thy-1 APP transgene Tiere bereits unter basalen Bedingungen ein signifikant vermindertes Membranpotential aufweisen (vergleiche Kapitel 3.1.1), lässt ein Defizit der mitochondrialen Atmungskette vermuten. Um eine konkrete Aussage über eventuelle Defekte einzelner Atmungsketten-Komplexe treffen zu können, wurden daher isolierte Mitochondrien mit spezifischen Inhibitoren der Komplexe I bis V inkubiert. Daran anschließend wurde das mitochondriale Transmembranpotential mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 bestimmt.

Die Hemmung aller fünf Atmungsketten-Komplexe resultiert jeweils in einer generellen Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials. Mitochondrien non-tg und transgener Mäuse weisen nach Inkubation mit den Komplexinhibitoren Rotenon (Komplex I), Thenoyltrifluoroacetan (Komplex II), Antimycin (Komplex III) und Oligomycin (Komplex V) eine vergleichbare Membranpotentialänderung auf (Abb. 3.3 A,B,C,E). Demgegenüber führt die Inkubation mit Natriumazid (Komplex IV) in transgenen Mäusen zu einer signifikant stärkeren Depolarisation des Membranpotentials im Vergleich zu non-tg Mitochondrien (Abb. 3.3 D). In Übereinstimmung mit diesem Befund wurden erniedrigte Komplex IV-Aktivitäten in Blutplättchen von AD-Patienten beobachtet (Bosetti *et al.*, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass A β direkt mit mitochondrialen Membranen interagiert und infolgedessen zu einer Hemmung der Komplex IV-Aktivität führt (Canevari *et al.*, 1999; Mancuso *et al.*, 2003; Mancuso *et al.*, 2007)

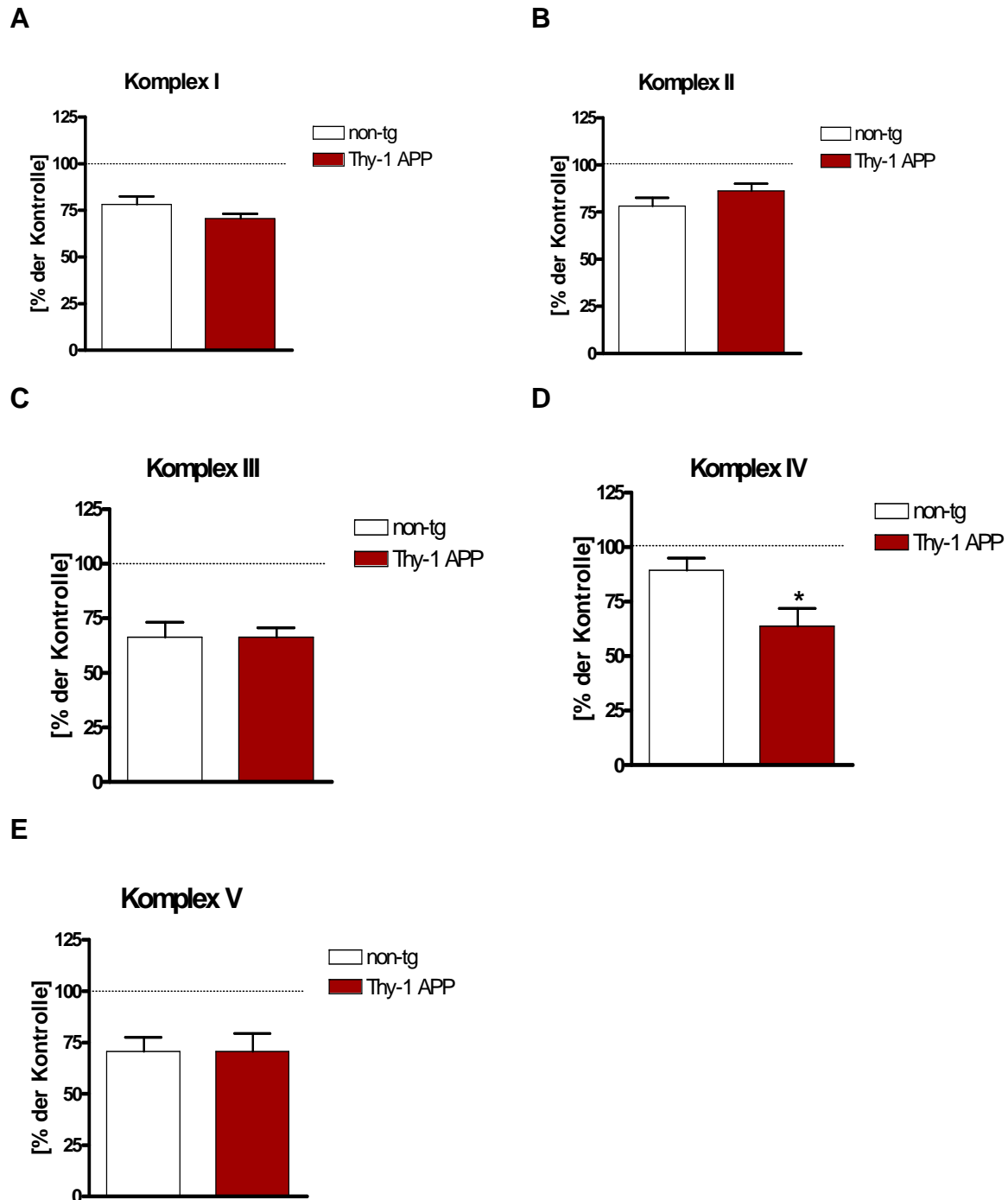


Abbildung 3-3: Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials isolierter Mitochondrien von 6-8 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen nach 1-stündiger Stimulation mit spezifischen Komplexinhibitoren.

A) Stimulation mit Rotenon, B) TTFA, C) Antimycin und E) Oligomycin resultiert in einer identischen Membranpotentialänderung non-tg und Thy-1 APP transgener Mitochondrien. E) Stimulation mit Natriumazid führt bei Thy-1 APP Mitochondrien zu einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zu dem von non-tg Mitochondrien. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; non-tg versus Thy-1 APP, student's t-test).

In der nachfolgenden Tabelle sind die oben dargestellten Ergebnisse zusammengefasst:

Hemmung der Atmungskette	Thy-1 APP
Komplex I durch Rotenon (50 μ M)	n.s.
Komplex II durch Thenoyltrifluoroacetan (TTFA) (60 μ M)	n.s.
Komplex III durch Antimycin (10 μ M)	n.s.
Komplex IV durch Natriumazid (60 μ M)	+ 25,33% (*)
Komplex V durch Oligomycin (50 μ M)	n.s.

Tabelle 3.1: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials Thy-1 APP transgener Mitochondrien nach Stimulation mit Komplexinhibitoren in Bezug zu dem von non-tg Mitochondrien (Schädigung non-tg Mitochondrien= 100%)

3.1.2.2 Unveränderte Level der Protein-Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe in Thy-1 APP Tieren

Des Weiteren wurde zur Überprüfung der Funktion der mitochondrialen Atmungskettenenzyme Thy-1 APP transgener Mäuse 2D-Blue Native (BN)-Gele (Schagger *et al.*, 1994) durchgeführt. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteinkomplexe in der ersten Dimension gemäß ihres Molekulargewichtes unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Auf diese Weise wird die native Konformation der Proteine und folglich die Struktur von Proteinkomplexen erhalten. In der zweiten Dimension erfolgt eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der die Komplexstrukturen durch die denaturierenden Bedingungen aufgehoben werden.

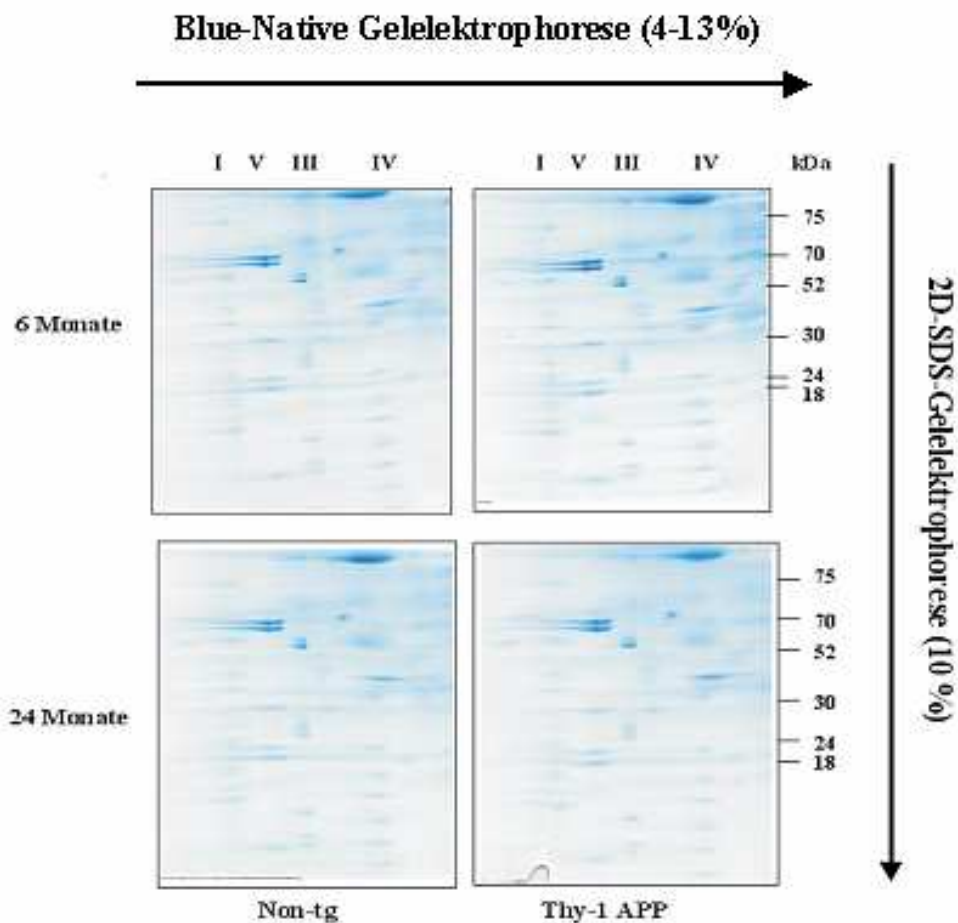


Abbildung 3-4: Identifizierung der Proteinzusammensetzung der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe nach 2D-BN/SDS-Gelelektrophorese.

Die Abbildung zeigt 2D-Gele von 6 Monate alten (obere Reihe) non-tg (links) und Thy-1 APP transgenen (rechts) Mitochondrien bzw. von 24 Monate alten (untere Reihe) non-tg (rechts) und Thy-1 APP transgener (links) Mitochondrien nach Färbung mit Coomassie-Farbstoff.

Hierbei zeigte sich, dass die 2D-Gele von 6 und 24 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Mitochondrien anhand der Proteinmuster miteinander vergleichbar sind (Abb. 3.4). Auf Grund dessen kann vermutet werden, dass die Level der Proteinuntereinheiten der einzelnen Atmungsketten-Komplexe in Thy-1 APP transgenen Mäusen im Vergleich zu denen von non-tg Mäusen unverändert sind.

3.1.2.3 Reduzierte COX- und NADH:DBQ-Aktivitäten Thy-1 APP transgener Mäuse

Zwar resultiert die Inkubation mit Rotenon in einer gleichgroßen Membranpotentialänderung in non-tg und transgenen Mitochondrien (vergleiche Kapitel 3.1.2.1), allerdings weisen neuere Ergebnisse von Aleardi et al. (2005) auf einen direkten inhibitorischen Effekt von extrazellulärem, fibrillärem A β auf die Komplex I-Aktivität (10% Inhibition) hin (Aleardi *et al.*, 2005). Daher sollte weiterhin durch ein direktes Messverfahren die Komplex I-Aktivität bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass 6-8 Monate alte non-tg und transgene Mäuse identische NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase (NADH:DBQ)- und NADH:hexaammineruthenium (III)-chloride (NADH:HAR)-Aktivitäten aufweisen (Abb. 3.5 C,D). Die Bestimmung der NADH:HAR-Aktivität dient zur Quantifizierung des Komplex I-Gehaltes der Mitochondrien-Präparation. Da diese in non-tg und transgenen Mäusen identisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Gehalt an intaktem Komplex I der verschiedenen Mäuse miteinander vergleichbar ist. Die Normalisierung der Komplex I-Aktivität mittels des Komplex I-Gehaltes resultiert erwartungsgemäß in einer unveränderten Komplex I-Aktivität transgener Mäuse im Vergleich zu der von non-tg Tieren (Abb. 3.5 E).

Übereinstimmend mit der stärkeren Depolarisation des Membranpotentials transgener Mitochondrien nach Inhibition des Komplexes IV (vergleiche Kapitel 3.1.2.1) und Literaturdaten über verminderte COX-Aktivitäten bei AD-Patienten (Bosetti *et al.*, 2002; Mancuso *et al.*, 2003), weisen Thy-1 APP transgene Tiere eine signifikant verminderte Komplex IV-Aktivität auf (Abb. 3.5 F).

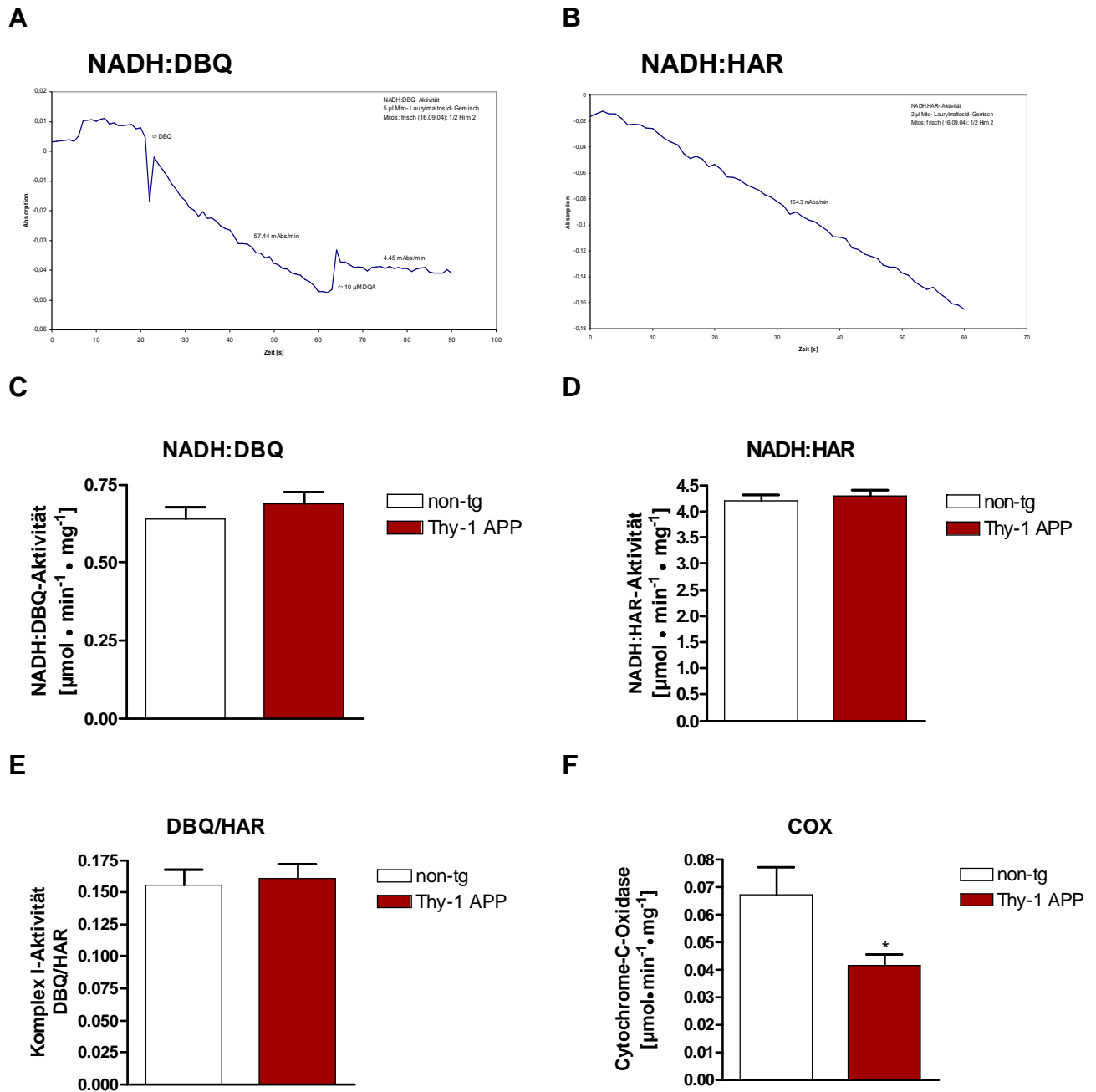


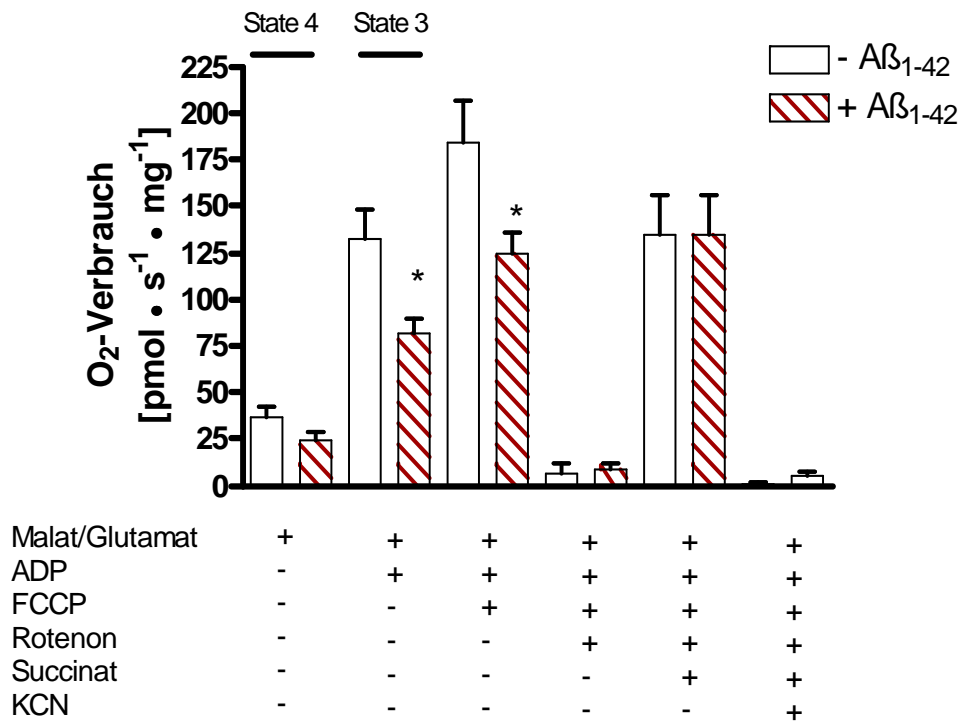
Abbildung 3-5: Reduzierte COX-Aktivität Thy-1 APP transgener Tiere.

A-B) Schematische Darstellung der Komplex I-Messung der A) NADH:DBQ-Aktivität und B) der NADH:HAR-Aktivität. C-F) Bestimmung der Komplex I-Aktivität von zerebralen Mitochondrien von 6-8 Monate alten non-tg und Thy-1 APP Mäusen ergibt C) unveränderte NADH:DBQ-Aktivitäten und D) unveränderte NADH:HAR-Aktivitäten. E) Komplex I-Aktivität normiert auf den Komplex I-Gehalt der mitochondrialen Präparation als DBQ/HAR-Verhältnis. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 9-10 Experimenten. (n.s.; non-tg versus Thy-1 APP, student's t-test). F) Weiterhin ergibt die Messung eine signifikant reduzierte COX-Aktivität Thy-1 APP transgener Mäuse. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7-8 Experimenten. (* $p < 0,05$; non-tg versus Thy-1 APP, student's t-test).

3.1.2.4 Reduzierte Atmungsrate isolierter Mitochondrien nach extrazellulärer A β -Behandlung

Um die toxischen Effekte von A β auf die mitochondriale Funktion weiter zu charakterisieren, sollte im Anschluss die Auswirkung von extrazellulär zugefügtem, fibrillärem A β_{1-42} auf die Atmungsrate untersucht werden. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien von 6-8 Monate alten non-tg Mäusen zunächst mit 3,75 nM A β_{1-42} bzw. als Kontrolle mit dem Lösungsmittel für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daran anschließend wurde der Sauerstoffverbrauch mittels eines Oxygraphen vermessen.

A



B

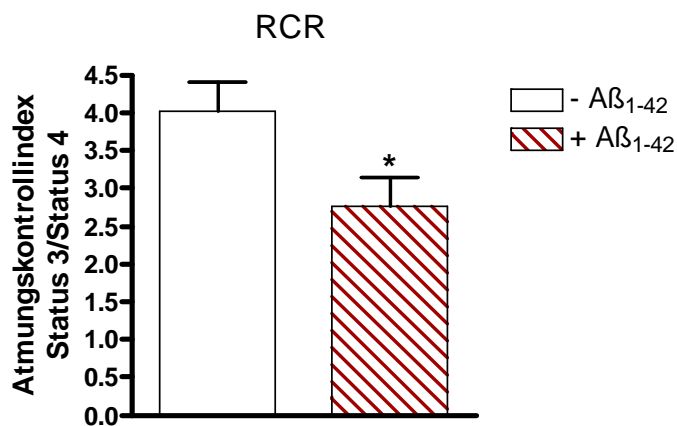


Abbildung 3-6: Reduzierter Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien nach einer $A\beta_{1-42}$ -Behandlung.

A) Sauerstoffverbrauchsmessung von frisch isolierten zerebralen Mitochondrien von 6-8 Monate alten non-tg Mäusen mit und ohne $A\beta_{1-42}$ -Inkubation. Die State 4-Atmung wurde nach Zugabe von Malat/Glutamat gemessen. Anschließend wurde ADP hinzugefügt und State 3 der Atmung gemessen. Nach Bestimmung der gekoppelten Atmung wurde FCCP hinzugefügt und die Atmung in Abwesenheit eines Protonengradienten gemessen. Um die Komplex I-Aktivität zu hemmen, wurde im Anschluss Rotenon dem Reaktionsgemisch hinzugefügt. Daran anschließend wurde der parallele Input der Atmungskette durch Zugabe von Succinat bestimmt. Abschließend wurde durch Zugabe von KCN die Komplex IV-Aktivität und folglich der Sauerstoffverbrauch gehemmt. B) Weiterhin wurde durch den Quotienten der Atmungsraten State 3/State 4 die RCR bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7 Experimenten. (* $p < 0,05$; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien, student's t-test).

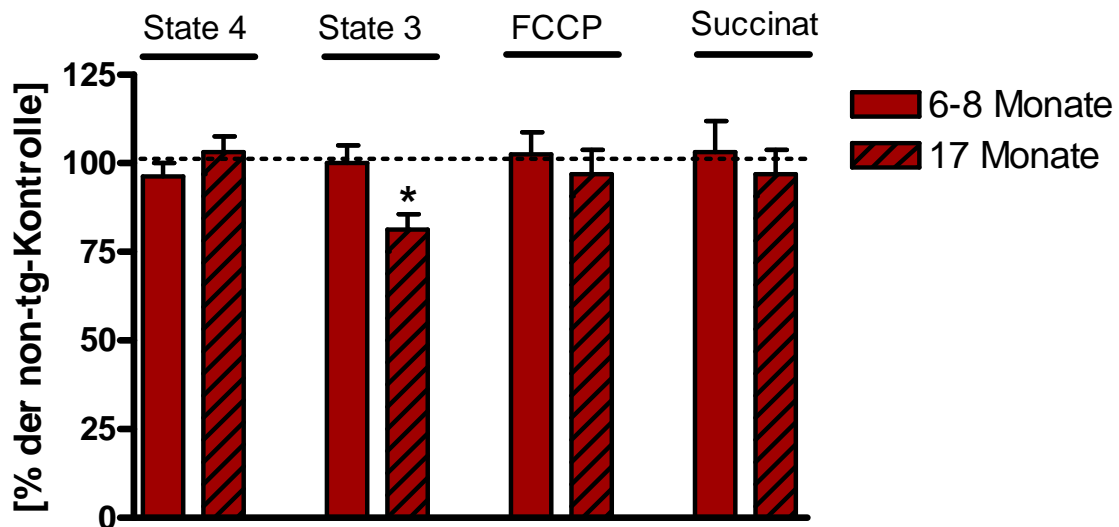
Diesbezüglich wurde zunächst die State 3- und State 4-Atmung in Abhängigkeit von Komplex I-Substraten (Malat/Glutamat) bestimmt (Abb. 3.6 A). Die State 4-Atmung ist die nicht-phosphorylierende Atmung. Sie entspricht der Atmung in Abwesenheit von ADP und ist gleichzusetzen mit dem Ruhezustand der Mitochondrien. Die State 4-Atmung wird auch als kontrollierter Zustand bezeichnet und ist weiterhin von der Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran abhängig. Mitochondrien, deren PTP geöffnet oder die aus anderen Gründen entkoppelt sind, haben eine erhöhte State 4-Atmung. A β scheint allerdings die Komplex I-abhängige State 4-Atmung nicht zu beeinträchtigen. Demgegenüber resultiert die extrazelluläre A β -Behandlung in einer signifikanten Reduktion der State 3-Atmung. Die State 3-Atmung entspricht der Kapazität von Mitochondrien, Sauerstoff und das jeweils vorhandene Substrat in Anwesenheit einer definierten Menge ADP zu metabolisieren. Die Geschwindigkeit der biologischen Oxidation ist hierbei durch die Maximalgeschwindigkeit der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung limitiert. Die Bestimmung des Atmungskontrollindex (RCR - respiratory control ratio), als Verhältnis zwischen den Atmungsraten in State 3 und State 4, ist ebenfalls durch eine signifikante Abnahme nach extrazellulärer A β -Behandlung gekennzeichnet (Abb. 3.6 B). Es scheint, dass extrazellulär zugefügtes A β die relative Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe beeinträchtigt. Des Weiteren führt die Zugabe von FCCP zur Entkopplung der Atmungskette und infolgedessen zu einer Atmung in Abwesenheit eines Protonengradienten. Es zeigte sich, dass die Inkubation mit extrazellulärem A β in einer Verminderung der FCCP entkoppelten Atmung resultiert (Abb. 3.6 A). Weiterhin wurde nach vollständiger Hemmung des Komplexes I durch Rotenon Succinat als Substrat für Komplex II hinzugefügt. Hierbei weisen Mitochondrien ohne und mit A β -Inkubation keine Unterschiede der Komplex II-abhängigen Atmungsraten auf (Abb. 3.6 A). Demzufolge scheint eine Beeinträchtigung der Komplex II-abhängigen Atmung durch extrazelluläres A β unwahrscheinlich.

3.1.2.5 Reduzierte Atmungsrate und RCR in Thy-1 APP transgenen Mäusen im Alter

Die extrazelluläre A β -Behandlung isolierter Mitochondrien resultiert in einer signifikanten Abnahme der metabolischen Kapazität und einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe (vergleiche Kapitel 3.1.2.4). Um zu überprüfen, ob intrazelluläres A β ebenfalls einen derartigen Phänotyp in isolierten Mitochondrien verursacht, wurden die Atmungsraten von non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen eines Alters von 6-8 Monaten bzw. 17 Monaten an einer Sauerstoffelektrode vermessen.

Von großem Interesse hierbei ist, dass in einem Alter von 6-8 Monaten isolierte Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse keine unterschiedlichen Atmungsraten gegenüber denen von non-tg Mäusen aufweisen. Dieses Ergebnis ist überraschend, da transgene Tiere bereits ab diesem Alter durch ein vermindertes Membranpotential, reduzierte ATP-Level (Hauptmann et al., submitted) sowie verringerte COX-Aktivitäten gekennzeichnet sind. Des Weiteren zeigte die Versuchsreihe, dass erst Altern im Zusammenhang mit einer Zunahme der A β -Pathologie mit einer signifikanten Reduktion der Komplex I-abhängige State 3-Atmung assoziiert ist (Abb. 3.7 A). Dies spiegelt sich ebenfalls in einem signifikant verminderten Atmungskontrollindex wider (Abb. 3.7 B). Es scheint, dass APP-Mutationen die relative Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe erst im Alter beeinträchtigen. Demgegenüber weisen transgene Mitochondrien von 17 Monate alten Tieren eine unveränderte Komplex I-abhängige State 4- und FCCP entkoppelte Atmung auf. Übereinstimmend mit den unveränderten Atmungsraten für Succinat nach extrazellulärer A β -Behandlung, weisen isolierte Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse keine Unterschiede der Komplex II-abhängigen Atmung zu der von non-tg Tieren auf (Abb. 3.7 A).

A



B

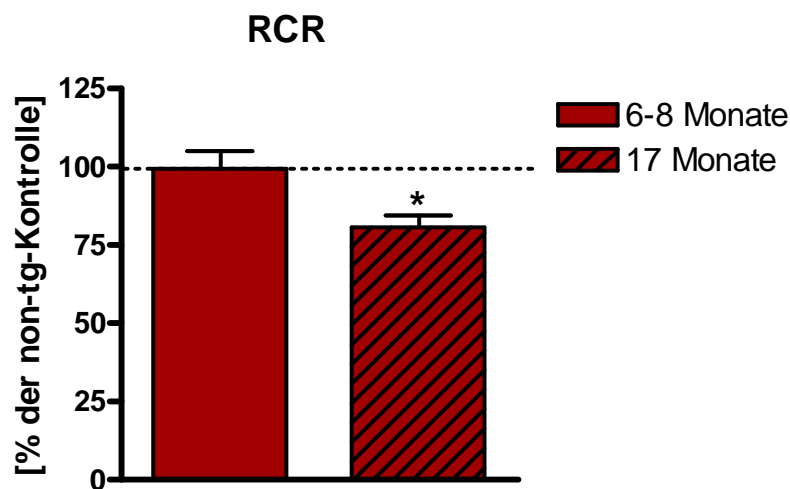


Abbildung 3-7: Reduzierter Sauerstoffverbrauch Thy-1 APP transgener Mitochondrien im Alter.

Sauerstoffverbrauchsmessung von frisch isolierten zerebralen Mitochondrien von 6-8 bzw. 17 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen.

A) Zusammenfassende Darstellung der State 3-, der State 4-, der FCCP entkoppelten und der Succinat-Atmungsraten. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der Atmungsraten Thy-1 APP Mitochondrien in Bezug auf die Atmungsraten non-tg Mitochondrien. Die State 4-Atmung wurde nach Zugabe von Malat/Glutamat gemessen. Anschließend wurde ADP hinzugefügt und State 3 der Atmung gemessen. Nach Bestimmung der gekoppelten Atmung, wurde FCCP hinzugefügt und die Atmungsrate in Abwesenheit eines Protonengradienten gemessen. Zur Hemmung der Komplex I-abhängigen Atmung, wurde im Anschluss Rotenon dem Reaktionsgemisch hinzugefügt. Anschließend wurde der parallele Input der Atmungskette über Komplex II durch Zugabe von Succinat überprüft. B) Weiterhin wurde durch den Quotienten State 3/State 4 die RCR bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7 Experimenten. (* $p < 0,05$; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien, student's t-test).

Zusammenfassend führen sowohl extrazellulär *in vitro* zugefügtes A β sowie die vermehrte Kummulation von A β in Gehirnen von APP-transgenen Mäusen zu einer Beeinträchtigung der relativen Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe.

3.1.3 Reduziertes Transmembranpotential ist bereits in 3 Monate alten Thy-1 APP Mäusen feststellbar

Unseren Experimenten liegen ausführliche histopathologische Befunde über Thy-1 APP Mäuse zugrunde. Nach diesen weisen transgene Tiere bereits ab einem Alter von 3 Monaten eine erhöhte A β -Belastung auf, wobei allerdings noch keine A β -Plaques zu detektieren sind (Blanchard *et al.*, 2003). Um ebenfalls die Effekte von diesen vermutlich intrazellulär erhöhten A β -Spiegeln auf die mitochondriale Funktion zu überprüfen, wurde daher das Membranpotential 3 Monate alter non-tg und Thy-1 APP transgener Mäusen bestimmt.

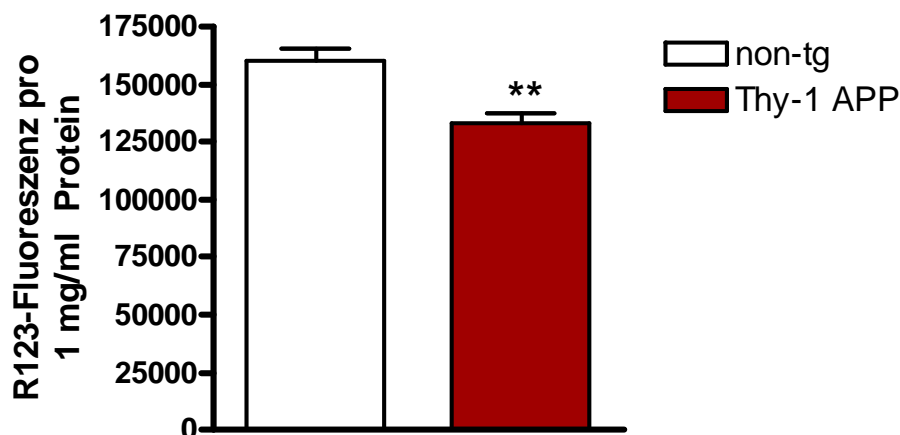


Abbildung 3-8: Vermindertes mitochondriales Transmembranpotential 3 Monate alter Thy-1 APP transgener Mäuse unter basalen Bedingungen.

Das basale Mitochondrienpotential von isolierten Mitochondrien 3 Monate alter non-tg und Thy-1 APP transgener Tiere wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 gemessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6-8 Experimenten. (** $p < 0,01$; non-tg versus Thy-1 APP, student's t-test).

Hierbei zeigte sich, dass Mitochondrien 3 Monate alter transgener Tiere ebenfalls durch ein signifikant erniedrigtes Membranpotential gekennzeichnet sind (Abb. 3.8).

Interessanterweise ist der beobachtete Membranpotentialabfall mit der Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials 6 Monate alter Thy-1 APP Mäuse vergleichbar (vergleiche Abbildung 3.1).

3.1.3.1 Oxidativer Stress und A β schädigen non-tg aber nicht Thy-1 APP Mitochondrien

Analog zu den Versuchen mit 6 Monate alten Mäusen (vgl. Kapitel 3.1.1.1), sollte der Effekt von oxidativem und nitrosativem Stress sowie fibrillärem A β_{1-42} auf die mitochondriale Funktion 3 Monate alter Thy-1 APP transgener Tiere überprüft werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen 6 Monate alter Mäuse, führt eine 2-stündige Inkubation mit H₂O₂, SNP und A β_{1-42} zu keiner Veränderung des Membranpotentials von Thy-1 APP Mitochondrien. Demgegenüber reagieren non-tg Mitochondrien mit einer starken Depolarisation des Membranpotentials nach oxidativem, nitrosativem und A β_{1-42} -induziertem Stress (Abb. 3.9).

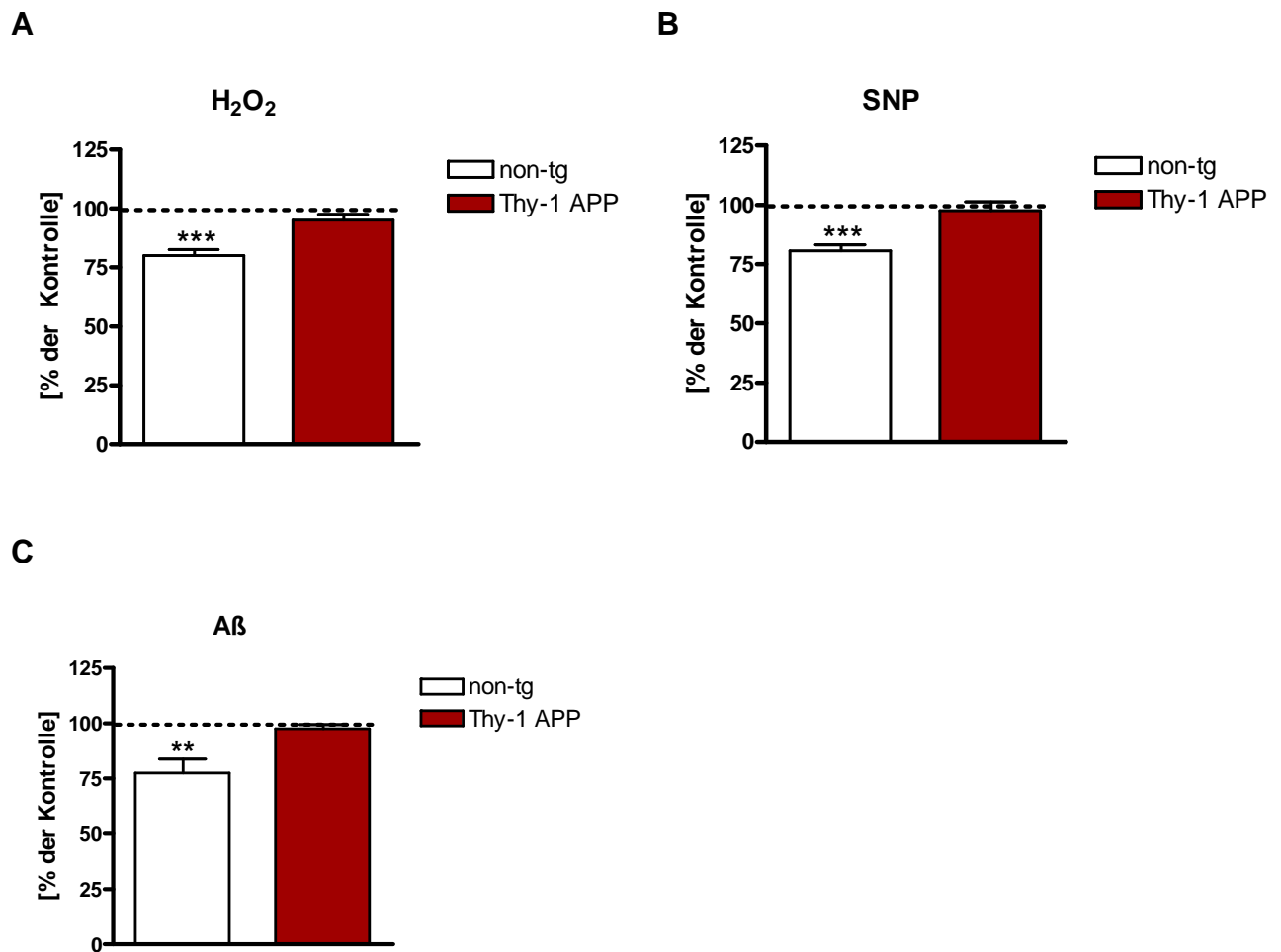


Abbildung 3-9: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials isolierter Mitochondrien von 3 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Tieren nach sekundärem Insult mit H₂O₂, SNP und Aβ₁₋₄₂.

Isolierte Mitochondrien von 3 Monate alten non-tg und Thy-1 APP transgenen Mäusen wurden für 2 Stunden mit 2mM H₂O₂, 2mM SNP und 50nM Aβ₁₋₄₂ inkubiert. Das mitochondriale Transmembranpotential wurde im Anschluss mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien nach A) Stimulation mit H₂O₂, B) Stimulation mit SNP und C) Stimulation mit Aβ₁₋₄₂. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 6 Experimenten. (**p < 0,01, ***p < 0,001; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien, student's t-test).

Aufgrund der Ergebnisse scheinen sowohl die vermutlich intrazellulär erhöhten Aβ-Spiegel als auch extrazelluläre Aβ-Plaques in der Lage zu sein, eine mitochondriale Dysfunktion auszulösen.

3.2 Einfluss einer P301L Mutation auf die mitochondriale

Funktion

Die Tau-Pathologie ist ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, inklusive der AD und der FTDP-17. Durch die Identifizierung von Mutationen im Tau-Gen bei der familiären Form der FTDP-17 konnte zudem gezeigt werden, dass eine Dysfunktion des Tau-Proteins ausreicht Neurodegeneration und Demenz auszulösen. Aufgrund dessen sollte im nächsten Abschnitt überprüft werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Tau-Pathologie und mitochondrialer Dysfunktion besteht.

Als Modell der Tau-Pathologie *in vivo* fungierten transgene Mäuse, welche das Tau-Protein mit der Mutation P301L überexprimieren. P301L-Mäuse weisen eine Anhäufung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein auf, sowie kommt es in diesen Tieren ab einem Alter von 6 Monaten zur NFT-Formation (Gotz *et al.*, 2001a). Für die Versuche wurden verschiedene Altersstufen verwendet, welche unterschiedlichen Stadien in der Entwicklung einer Tau-Pathologie entsprechen.

3.2.1 Einfluss von P301L auf das mitochondriale Membranpotential

Analog zu den Versuchen mit Thy-1 APP Tieren (vergleiche Kapitel 1.1.1) erfolgte zunächst eine Charakterisierung der mitochondrialen Funktion P301L transgener Mäuse über die Bestimmung des Membranpotentials.

Hierbei zeigte sich, dass 15 Monate alte P301L-Mäuse ein nahezu vergleichbares Membranpotential zudem von Wildtyp (WT)-Tieren aufweisen (Abb. 3.10). Zwar führt P301L-Tau zu einem leichten Abfall des Membranpotentials, allerdings ist dieser nicht signifikant.

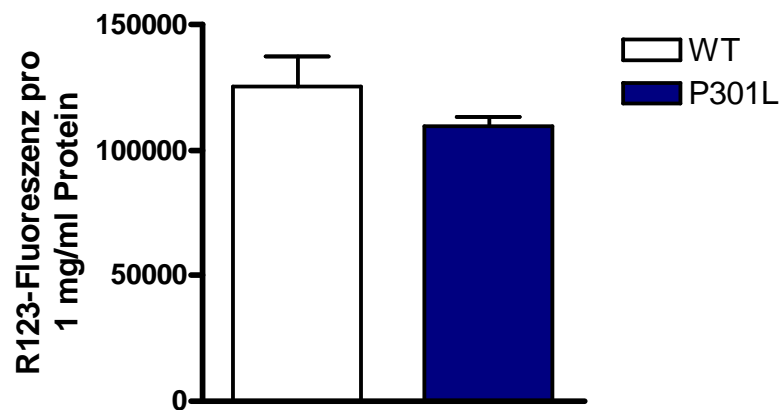


Abbildung 3-10: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials isolierter Mitochondrien von WT- und P301L-Mitochondrien.

Das mitochondriale Membranpotential isolierter Mitochondrien von 15 Monate alten WT- und P301L-Tieren wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 vermessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (n.s.; WT versus P301L, student's t-test).

3.2.2 P301L Mäuse weisen mitochondriale Atmungsdefekte auf

3.2.2.1 Einfluss einer P301L Mutation auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

Vorausgehende Studien an P301L-Mäusen belegen, dass die Expression von Untereinheiten der Komplexe I und V in diesen Tieren vermindert ist (David *et al.*, 2005). Aufgrund dessen sollte im nächsten Schritt die metabolische Kapazität und Funktion isolierter Mitochondrien von P301L transgenen Mäusen überprüft werden. Diesbezüglich wurden isolierte WT- und P301L-Mitochondrien mit spezifischen Komplexinhibitoren inkubiert. Im Anschluss wurde das mitochondriale Membranpotential mittels R123 bestimmt.

Mitochondrien weisen nach Hemmung aller fünf Atmungsketten-Komplexe eine generelle Reduktion des Transmembranpotentials auf. Übereinstimmend mit der Down-Regulierung der Komplex I- und V-Untereinheiten der mitochondrialen Elektronentransportkette (David *et al.*, 2005), reagieren P301L-Mitochondrien im Vergleich zu WT-Mitochondrien mit einer signifikant stärkeren Depolarisation des

Transmembranpotentials nach Hemmung des Komplexes I mit Rotenon und des Komplexes V mit Oligomycin (Abb. 3.11).

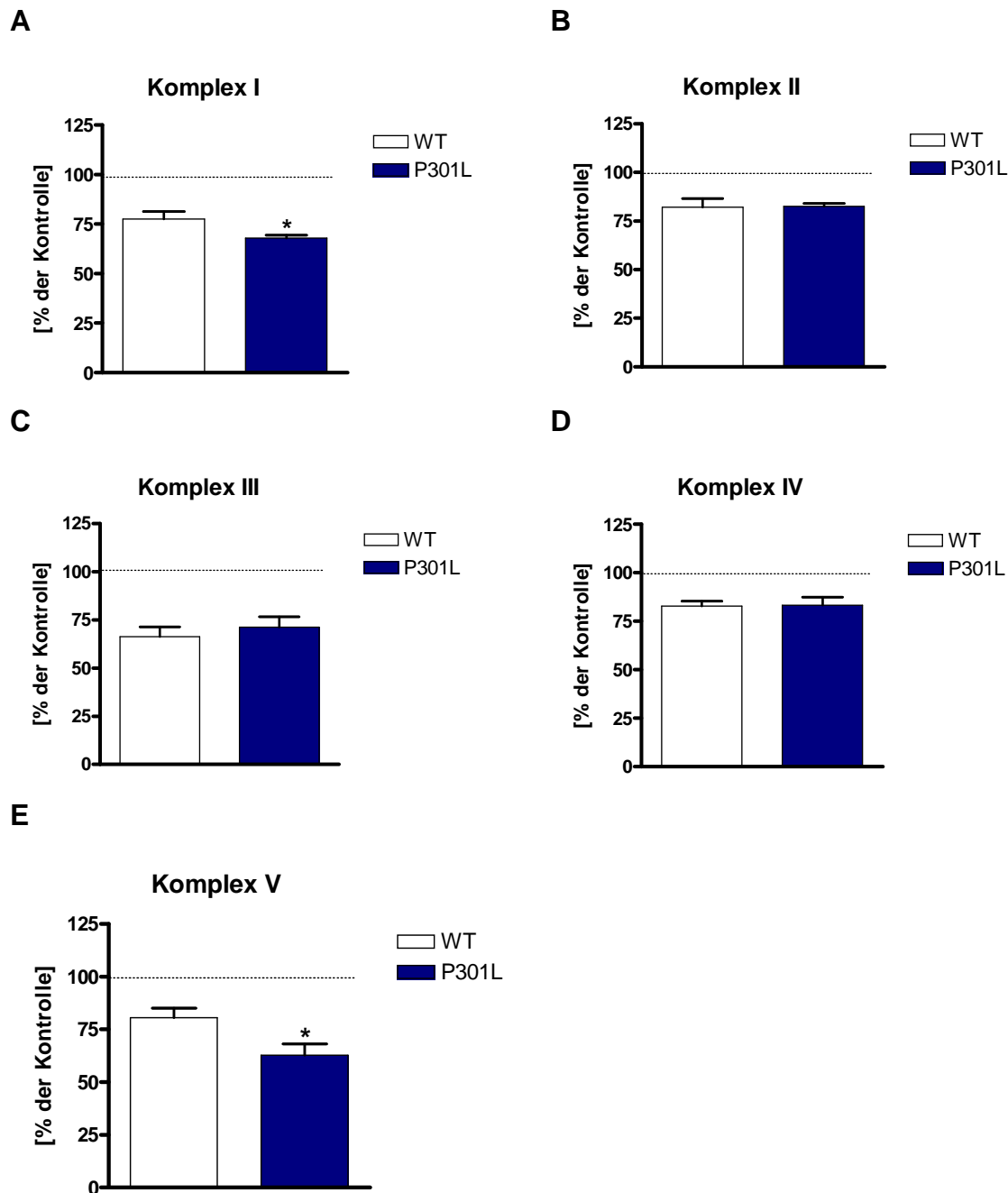


Abbildung 3-11: Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials isolierter Mitochondrien 15 Monate alter WT- und P301L-Mäusen nach 1-stündiger Stimulation mit spezifischen Komplexinhibitoren.

A) Stimulation mit Rotenon und E) Oligomycin resultiert in einer stärker ausgeprägten Membranpotentialänderung bei P301L-Mitochondrien. Stimulation mit B) TTFA, C) Antimycin und D) Natriumazid resultiert in einer gleich ausgeprägten Membranpotentialänderung bei WT- und P301L-Mitochondrien. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; WT versus P301L, student's t-test).

In der nachfolgenden Tabelle sind die oben dargestellten Ergebnisse zusammengefasst:

Hemmung der Atmungskette	P301L
Komplex I durch Rotenon (50 μ M)	+ 11,42 % (*)
Komplex II durch Thenoyltrifluoroacetan (60 μ M)	n.s.
Komplex III durch Antimycin (10 μ M)	n.s.
Komplex IV durch Natriumazid (60 μ M)	n.s.
Komplex V durch Oligomycin (50 μ M)	+ 17,86% (*)

Tabelle 3.2: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit Atmungsketteninhibitoren im Vergleich zu WT-Mitochondrien (Schädigung WT= 100%; * $p < 0,05$; WT versus P301L, student's t-test).

Des Weiteren führt die P301L-Mutation zu einer signifikant reduzierten NADH:DBQ-Aktivität 12 Monate alter Mäuse (Abb. 3.12 A). Demgegenüber weisen P301L- und WT-Mitochondrien identische NADH:HAR Aktivitäten auf, insofern der Gehalt an intaktem Komplex I dieser Mäuse vergleichbar ist (Abb. 3.12 B). Die Normalisierung der Komplex I-Aktivität mit dem Komplex I-Gehalt zeigt auf, dass P301L transgene Mäuse durch einen funktionellen Defekt der Komplex I-Aktivität gekennzeichnet sind. Dieser spiegelt sich in einer Reduktion der Aktivität um 30,75% wider (Abb. 3.12 C). Demgegenüber scheint die P301L-Mutation die Komplex IV-Aktivität nicht zu beeinträchtigen, da unveränderte COX-Aktivitäten in P301L- und WT-Mitochondrien zu beobachten sind (Abb. 3.12 D).

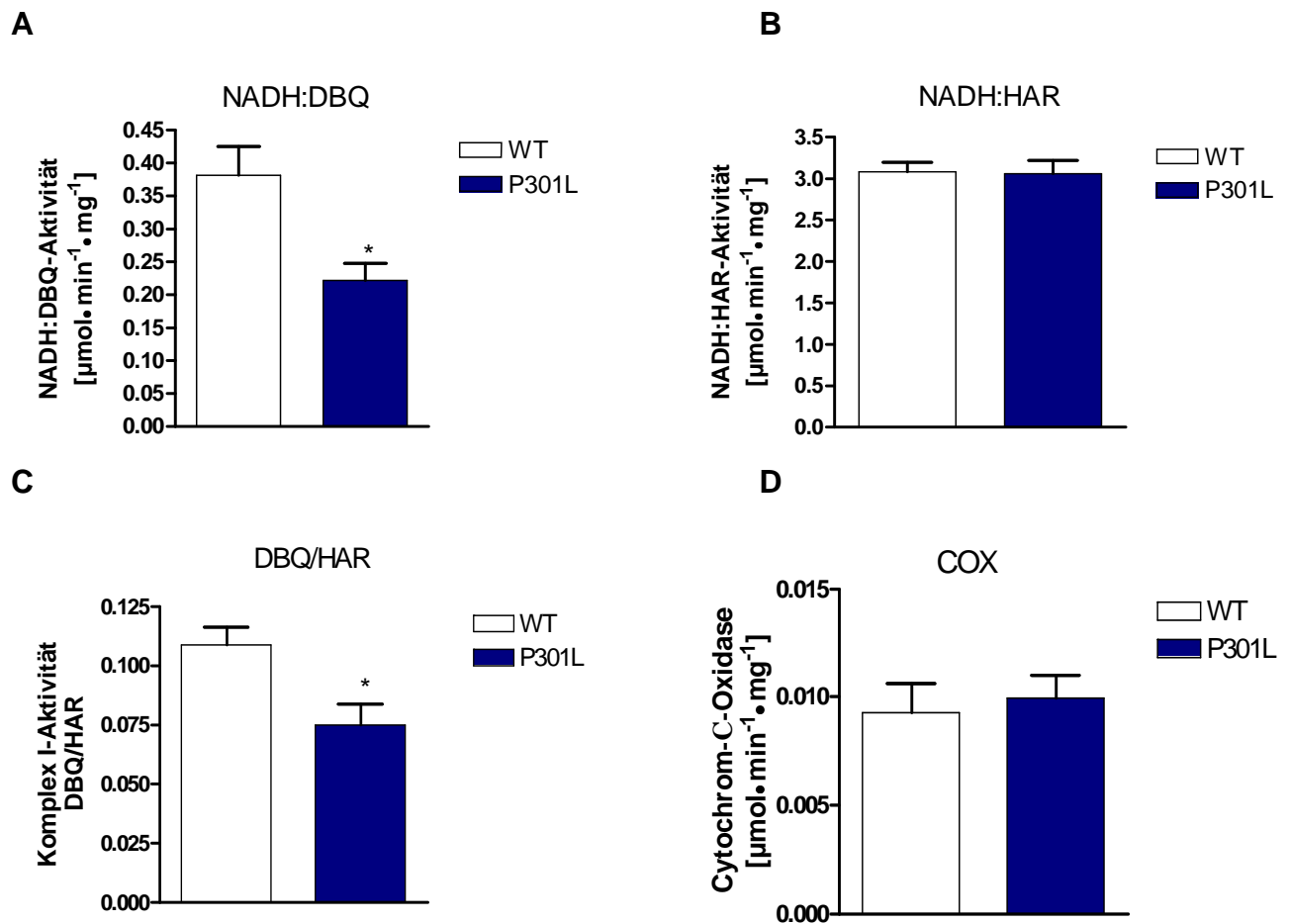


Abbildung 3-12: Reduzierte NADH:DBQ-Aktivität P301L transgener Mäuse

A-C) Komplex I-Aktivität von zerebralen Mitochondrien 12 Monate alter WT- und P301L-Mäusen des gleichen Alters ergibt A) eine reduzierte NADH:DBQ-Aktivität P301L-Mitochondrien und B) unveränderte NADH:HAR-Aktivitäten WT- und P301L-Mitochondrien. C) Komplex I-Aktivität normiert auf den Komplex I-Gehalt der mitochondrialen Präparation als DBQ/HAR-Verhältnis. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; WT versus P301L, student's t-test). F) Weiterhin ergibt die Messung unveränderte COX-Aktivitäten. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 9 Experimenten. (n.s.; WT versus P301L, student's t-test).

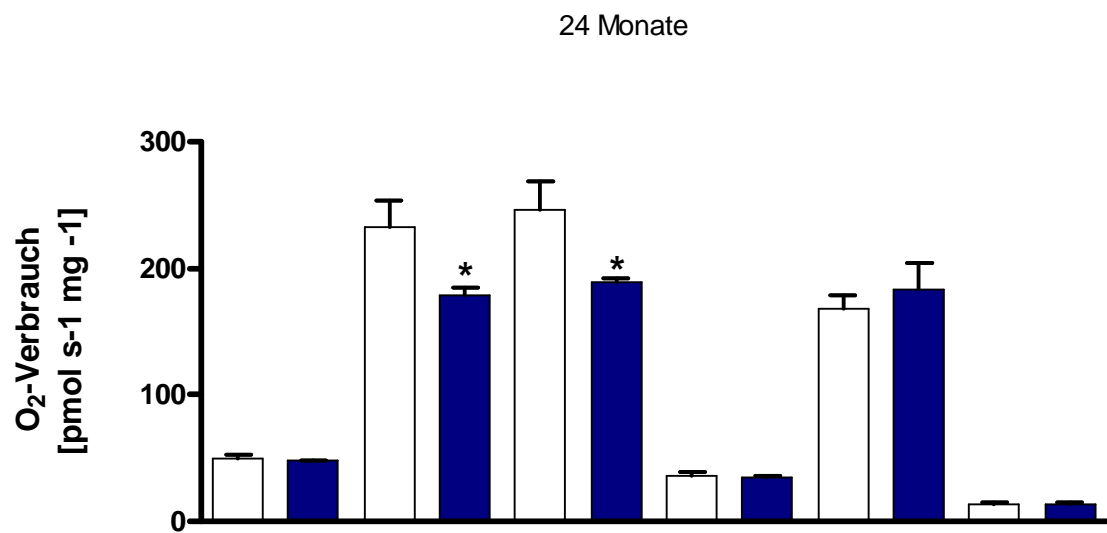
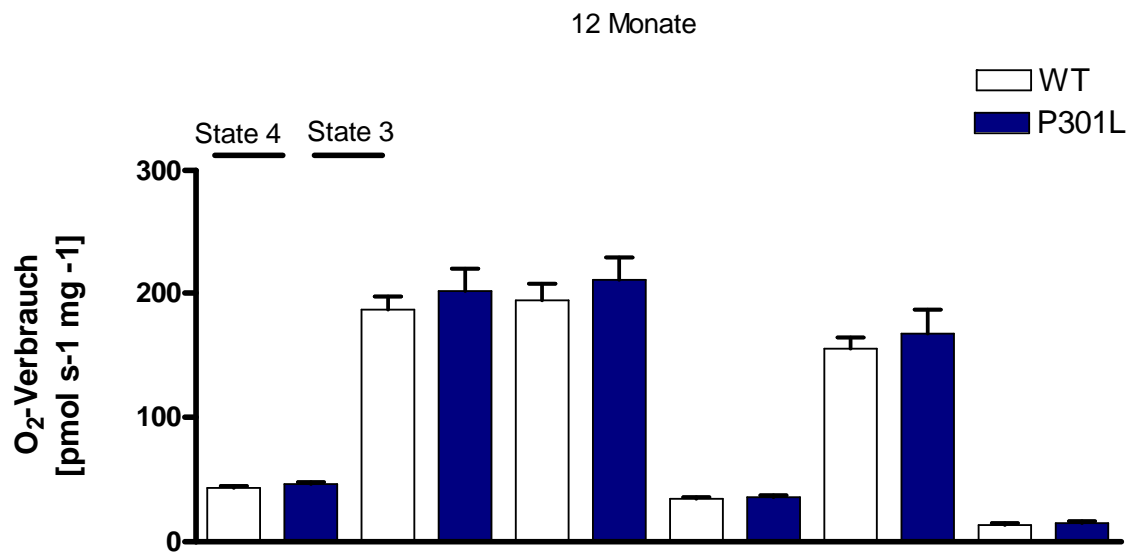
3.2.2.2 Reduzierte Atmungsrate und RCR P301L transgener Mäuse im Alter

Ergänzend zu der Bestimmung der Komplexaktivitäten wurden die mitochondrialen Atmungsraten von WT- und P301L-Mäusen mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode aufgenommen. Die Komplex I-abhängigen State 3- und State 4-Atmungsraten 12 Monate alter P301L-Mäuse sind im Vergleich zu denen von WT-Mäusen

unverändert. Demgegenüber weisen 24 Monate alte P301L transgene Mäuse signifikant reduzierte State 3- und State 4-Atmungsraten auf (Abb. 3.13 A). Dies spiegelt sich ebenfalls in einem verminderten Atmungskontrollindex 24 Monate alter P301L-Mäuse wider (Abb. 3.13 D). Es scheint, dass P301L-Tau die relative Effizienz der mitochondrialen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe im Alter beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigte sich, dass nach Entkopplung der Atmungskette mit FCCP, 24 Monate alte P301L-Mäuse einen signifikant verminderten Sauerstoffverbrauch aufweisen (Abb. 3.13 A). Demzufolge scheinen P301L-Mäuse im Alter weiterhin durch eine verminderte maximale Kapazität der Elektronentransportkette gekennzeichnet zu sein. Nach vollständiger Hemmung des Komplexes I durch Rotenon, wurde anschließend die Komplex II-abhängige Atmung durch Zugabe von Succinat bestimmt. Dies ergab, dass die Komplex II-abhängige Atmung in P301L-Mäusen nicht beeinträchtigt ist (Abb. 3.13 A).

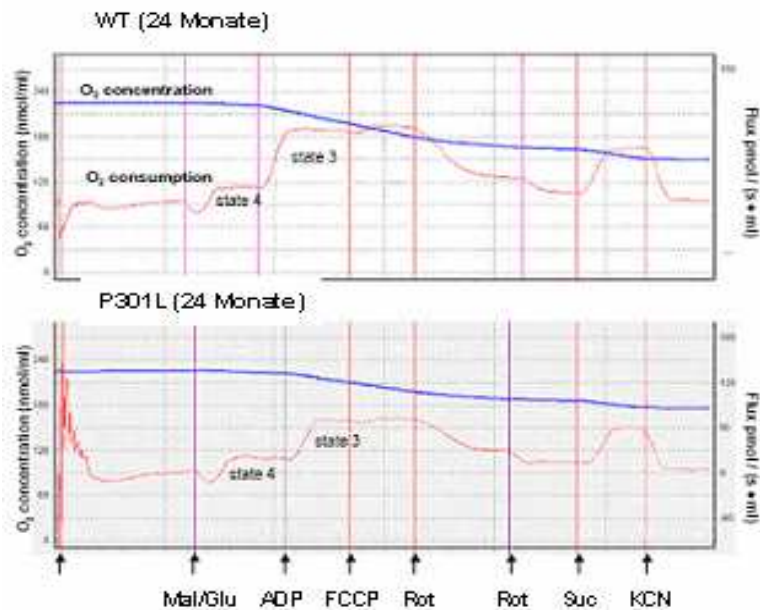
Abschließend weisen die Ergebnisse auf eine Reduktion der Komplex I-Aktivität P301L transgener Mäuse hin, welche sich mit fortschreitendem Alter der Mäuse in einer verminderten Atmungsrate und RCR widerspiegelt.

A

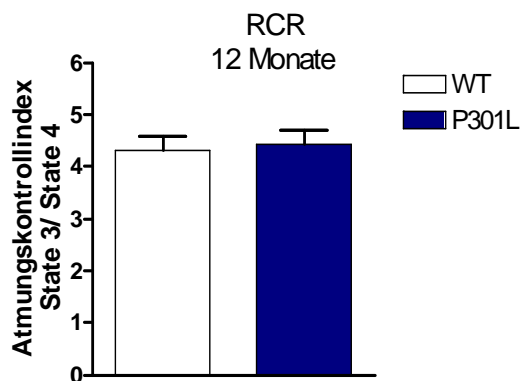


Malat/Glutamat	+	+	+	+	+	+
ADP	-	+	+	+	+	+
FCCP	-	-	+	+	+	+
Rotenon	-	-	-	+	+	+
Succinat	-	-	-	-	+	+
KCN	-	-	-	-	-	+

B



C



D

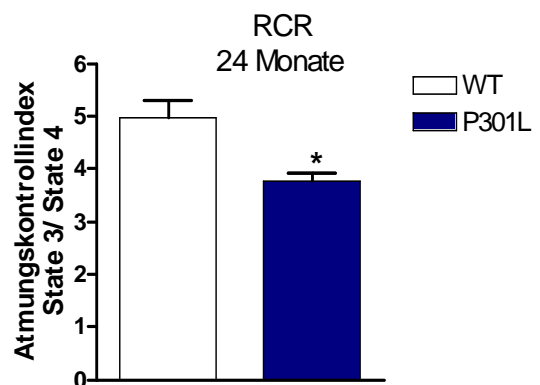


Abbildung 3-13: Reduzierter Sauerstoffverbrauch P301L- Mitochondrien im Alter.

A) Sauerstoffverbrauch frisch isolierter zerebraler Mitochondrien von 12 Monate alten (oberer Graph) und 24 Monate alten (unterer Graph) Mäusen. State 4-Atmung wurde nach Zugabe von Malat/Glutamat gemessen. Anschließend wurde ADP hinzugefügt und State 3 der Atmung gemessen. Nach Bestimmung der gekoppelten Atmung, wurde FCCP hinzugefügt und die Atmung in Abwesenheit eines Protonengradienten gemessen. Um die Komplex I-abhängige Atmung zu hemmen, wurde im Anschluss Rotenon dem Reaktionsgemisch hinzugefügt. Daran anschließend wurde der parallele Input der Atmungskette durch Zugabe von Succinat gemessen. Abschließend wurde durch die Zugabe von KCN Komplex IV und folglich der Sauerstoffverbrauch gehemmt. B) Repräsentatives Diagramm der Sauerstoffverbrauchsmessung isolierter Mitochondrien einer 24 Monate alten WT Kontroll-Maus (obere Abbildung) und einer gleich alten P301L-Maus (untere Abbildung), welches deutlich den Abfall der Sauerstoffkonzentration während der Messung anzeigt. Der Sauerstoff-Flux und die Atmungsrate der Mitochondrien wurden nach Zugabe verschiedener Stoffe gemessen (gekennzeichnet durch Pfeile). Malat/Glutamat (State 4), ADP (State 3), FCCP, Rotenon, Succinat und KCN. C-D) Weiterhin wurde durch den Quotienten State 3/State 4 die RCR von C) 12 Monate alten und D) 24 Monate alten Tieren bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7 Experimenten. (* $p < 0,05$; WT versus P301L, student's t-test).

3.2.2.3 Erhöhte Empfindlichkeit isolierter Mitochondrien von P301L-Mäusen gegenüber A β

Obwohl A β -Plaques und neurofibrilläre Bündel in denselben Gehirnregionen auftreten, fehlt heutzutage noch der Nachweis eines klaren mechanistischen Zusammenhangs. Aufgrund dessen sollte die Wirkung von extrazellulär zugefügtem A β auf die mitochondriale Funktion von WT- und P301L-Mäusen überprüft werden. Weiterhin sollte basierend auf neueren Befunden, dass die A β -Toxizität abhängig von dem Aggregatsausmaß des Peptides ist (Walsh *et al.*, 2002b;Ye *et al.*, 2004;Walsh and Selkoe, 2004;Cleary *et al.*, 2005), neben fibrillärem ebenfalls oligomeres A β_{1-42} getestet werden. Hierzu wurden isolierte Hirn-Mitochondrien P301L- und WT-Mäuse zunächst mit 3,75 nM der jeweiligen A β -Spezie bzw. als Kontrolle mit dem Lösungsmittel für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Atmungsraten an einer Sauerstoffelektrode vermessen. Um weiterhin den Einfluss des Alters in diesem Zusammenhang zu überprüfen, wurden Mitochondrien von 15 und 21 Monate alten Tieren verwendet.

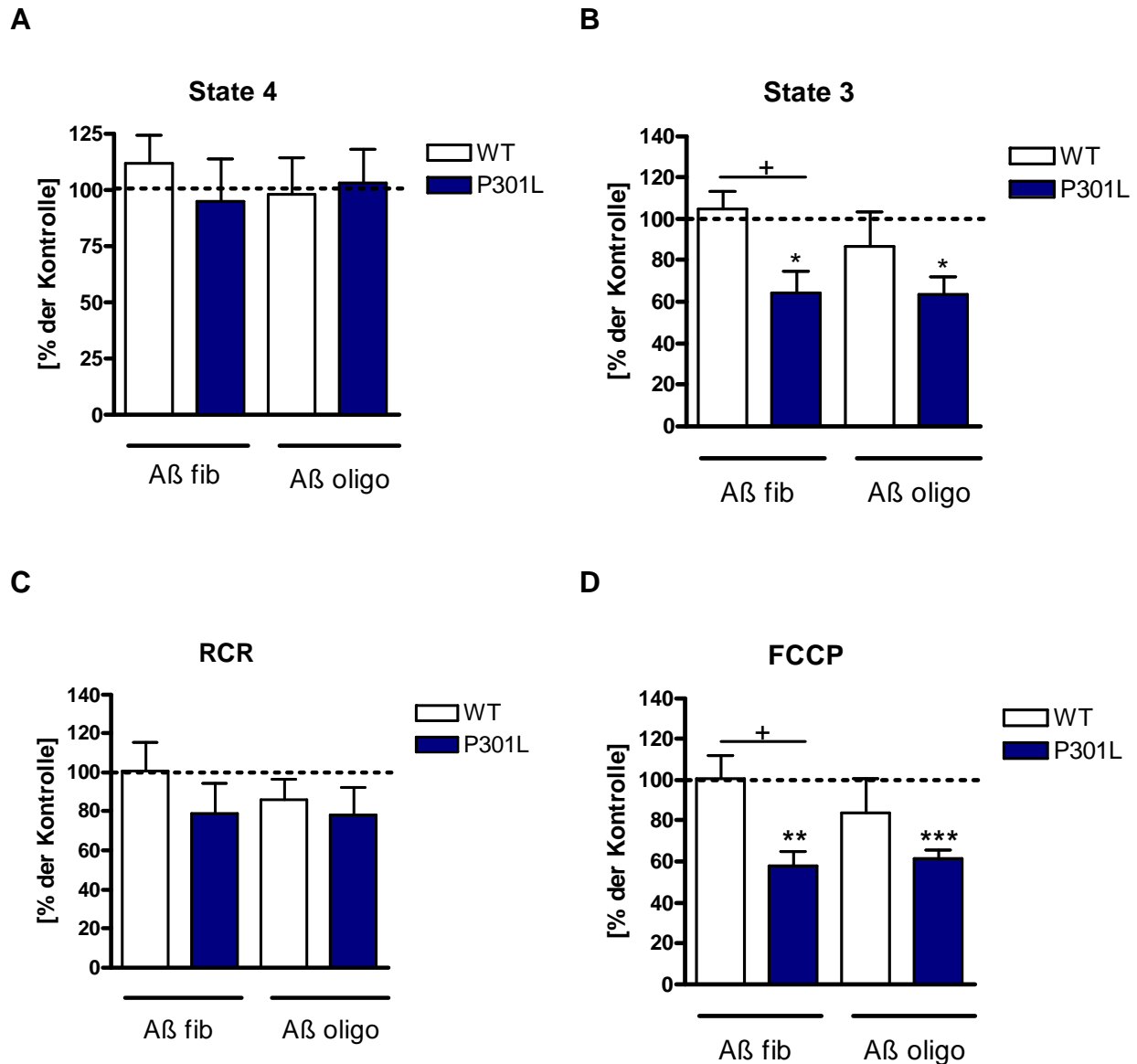


Abbildung 3-14: Erhöhte Empfindlichkeit isolierter Mitochondrien 15 Monate alter P301L-Mäuse gegenüber A β ₁₋₄₂.

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Abfall der Atmungsrate von 15 Monate alten WT- und P301L transgenen Mäusen bezogen auf die Atmungsraten der unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. A) State 4-Atmung wurde nach Zugabe von Malat/Glutamat nach vorheriger Inkubation mit fibrillärem A β (fib) oder oligomerem A β (oligo) gemessen. B) Messung der State 3-Atmung nach Zugabe von ADP. C) Weiterhin wurde durch den Quotienten State 3/State 4 der Atmungskontrollindex bestimmt. D) Des Weiteren wurde der Sauerstoffverbrauch nach Entkopplung der Atmungskette mittels FCCP bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien; + $p < 0,05$; WT versus P301L, student's t-test).

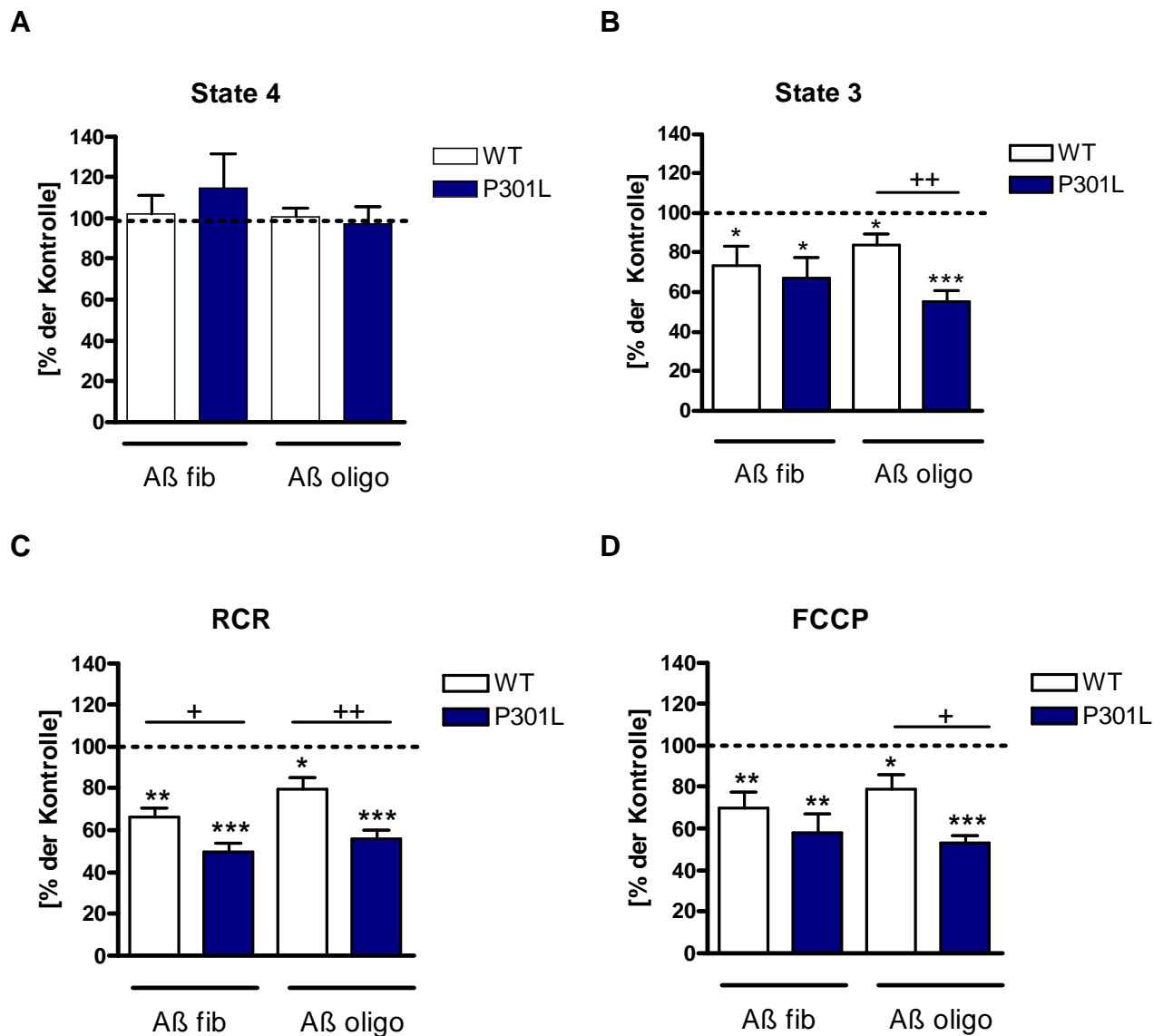


Abbildung 3-15: Erhöhte Empfindlichkeit isolierter Mitochondrien 21 Monate alter P301L-Mäuse gegenüber A β ₁₋₄₂

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Abfall der Atmungsrate von 21 Monate alten WT- und P301L transgenen Mäusen bezogen auf die Atmungsraten der unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. A) State 4-Atmung wurde nach Zugabe von Malat/Glutamat nach vorheriger Inkubation mit fibrillärem A β (fib) oder oligomerem A β (oligo) gemessen. B) Messung der State 3-Atmung nach Zugabe von ADP. C) Weiterhin wurde durch den Quotienten State 3/State 4 der Atmungskontrollindex bestimmt. D) Des Weiteren wurde der Sauerstoffverbrauch nach Entkopplung der Atmungskette mittels FCCP bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; versus unbehandelten Kontroll-Mitochondrien; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$; WT versus P301L, student's t-test).

Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass fibrilläres und oligomeres A β ₁₋₄₂ im Rahmen der beschriebenen Experimente keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Toxizität aufweisen.

Die extrazelluläre Behandlung mit dem A β -Peptid, sowohl fibrillärem als auch oligomerem, beeinträchtigt nicht die Komplex I-abhängige State 4-Atmung (Abb. 3.14 A + Abb. 3.15 A). Demgegenüber verursacht sie allerdings unterschiedliche Effekte auf die State-3 Atmung je nach verwendetem Genotyp bzw. Alter der Mäuse. In einem Alter von 15 Monaten reagieren lediglich P301L-Mitochondrien empfindlich gegenüber A β (Abb. 3.14 B). Mit fortschreitendem Alter (21 Monate) sind dann ebenfalls Mitochondrien von WT-Mäusen durch eine deutliche A β -induzierte Reduktion der State 3-Atmung gekennzeichnet (Abb. 3.15 B). Das Ausmaß der A β -Toxizität in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse wird weiterhin durch die Bestimmung des Atmungskontrollindexes deutlich. So führt die Inkubation mit extrazellulär zugefügtem A β beider Spezies nur bei 21 Monate alten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der RCR (Abb. 3.14 C + 3.15 C). Demzufolge scheint oligomeres und fibrilläres A β in alten Tieren eine Verminderung der Effizienz der mitochondrialen Kopplung zu verursachen. Von großem Interesse hierbei ist der Befund, dass P301L-Mitochondrien empfindlicher gegenüber dem Peptid reagieren als WT-Mitochondrien. Die unterschiedliche und zudem altersabhängige A β -Sensibilität isolierter Mitochondrien von WT- und P301L-Mäusen wird ebenfalls nach Entkopplung der Atmungskette mit FCCP deutlich. Während die Inkubation mit den Peptiden bei 15 Monate alten P301L-Mäusen zu einer signifikant reduzierten FCCP entkoppelten Atmung führt, zeigen A β behandelte WT-Mitochondrien nach FCCP-Gabe keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch gegenüber unbehandelten WT-Mitochondrien auf (Abb. 3.14 D). Ferner resultiert die extrazelluläre A β -Behandlung bei alten (21 Monate) Tieren, sowohl WT- als auch P301L-Mäusen, gleichermaßen in einer Reduktion der entkoppelten Atmung (Abb. 3.15 D).

3.3 Mitochondriale Funktion und Alter

3.3.1 Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials in NMRI-Mäusen mit dem Alter

Der Hauptrisikofaktor für die sporadische AD stellt das Altern dar. Aus diesem Grund sollte der Einfluss des Alters auf die mitochondriale Funktion untersucht werden. Hierzu wurde zunächst das Membranpotential isolierter Mitochondrien unterschiedlich alter NMRI-Mäuse mittels des kationischen Fluoreszenzfarbstoffes R123 bestimmt. Es wurden Tiere 3 verschiedener Altersstufen verwendet: a) 3-4 Monate, b) 12-13 Monate (~1 Jahr) und c) 21-24 Monate (~2 Jahre).

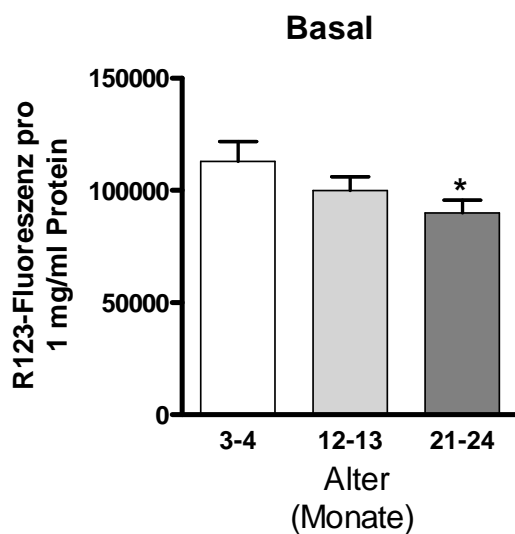


Abbildung 3-16: Vermindertes mitochondriales Membranpotential im Alter.

Das basale Membranpotential isolierter Mitochondrien von 3-4, 12-13 und 21-24 Monate alten NMRI-Mäusen wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 vermessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; versus 3 Monate, student's t-test).

Hierbei zeigte sich, dass das Membranpotential 12-13 Monate alter Mäuse im Vergleich zu dem von jungen Tieren noch relativ stabil ist. Es ist zwar ein tendenzieller Abfall des Membranpotentials zu erkennen, welcher allerdings noch nicht signifikant ist (Abb. 3.16). Demgegenüber sind Mitochondrien von 21-24

Monate alten Mäusen durch eine signifikant stärkere Depolarisation des Membranpotentials gekennzeichnet.

3.3.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials von isolierten Mitochondrien nach sekundärem Insult mit H₂O₂, SNP und A β ₁₋₄₂

Im Alter nimmt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu. Einerseits als Folge abnehmender Effizienz der oxidativen Phosphorylierung, zum anderen durch eine Abnahme antioxidativer Schutzmechanismen innerhalb der Mitochondrien und des Zytoplasmas. Aufgrund dessen sollte überprüft werden, welchen altersabhängigen Effekt oxidativer und nitrosativer Stress auf die mitochondriale Funktion ausübt. Weiterhin sollte die Auswirkung von fibrillärem A β ₁₋₄₂ untersucht werden.

Hierbei zeigte sich, dass nach einer 2-stündiger Inkubation mit H₂O₂ und SNP isolierte Mitochondrien von Mäusen aller drei Altersstufen eine gleichgroße Schädigung des Membranpotentials aufweisen (Abb. 3.17 A,B). Im Gegensatz hierzu führt die Inkubation mit extrazellulärem A β ₁₋₄₂ nur in Mitochondrien von 21-24 Monate alten NMRI-Mäusen zu einem signifikanten Abfall des Membranpotentials (Abb. 3.17 C).

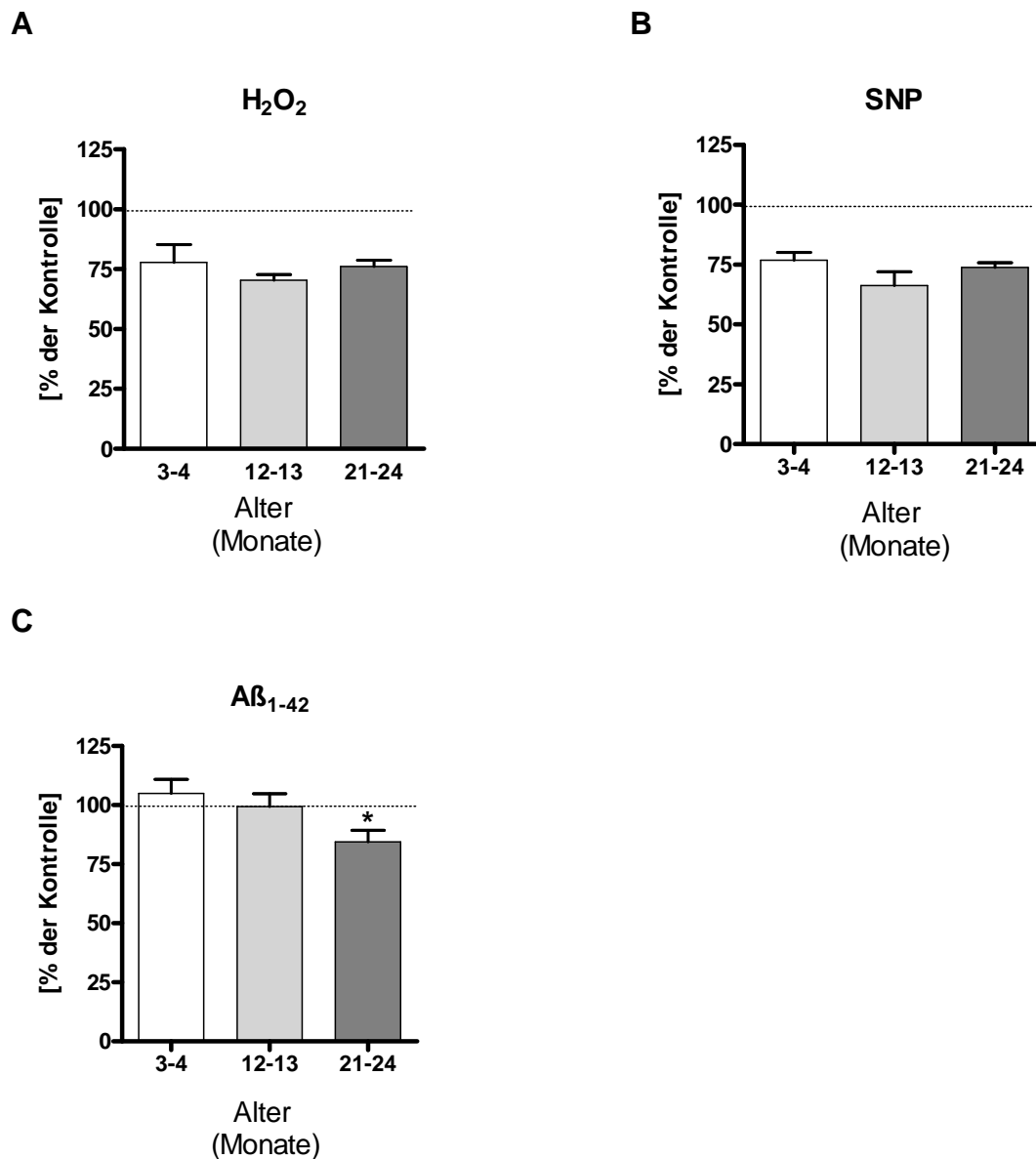


Abbildung 3-17: Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials isolierter Mitochondrien nach sekundärem Insult mit H₂O₂, SNP und Aβ₁₋₄₂.

Isolierte Mitochondrien von 3-4, 12-13 und 21-24 Monate alten NMRI-Mäusen wurden für 2 Stunden mit 2mM H₂O₂, 2mM SNP und 50nM Aβ₁₋₄₂ inkubiert. Das mitochondriale Transmembranpotential wurde im Anschluss mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien nach A) Stimulation mit H₂O₂, B) Stimulation mit SNP und C) Stimulation mit Aβ₁₋₄₂. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 6 Experimenten. (*p<0,05; versus 3-4 Monate, student's t-test).

3.3.3 Alters-assozierte mitochondriale Atmungsdefekte

3.3.3.1 Einfluss des Alters auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

Eine experimentell anerkannte Tatsache hinsichtlich des Alterns und der Energiebereitstellung ist das Auftreten verringerter Elektronentransferaktivitäten in mitochondrialen Membranen. Während die Komplexe I und IV eine selektiv verringerte Enzymaktivität in isolierten Mitochondrien aus Ratten- und Mäuse-Leber, -Hirn, -Herz und -Nieren im Alter aufweisen, scheinen die Komplexe II und III im Großen und Ganzen davon unberührt zu sein (Benzi *et al.*, 1992;Martinez *et al.*, 1994;Lenaz *et al.*, 1997;Nakahara *et al.*, 1998;Navarro, 2004;Navarro and Boveris, 2004;Kumaran *et al.*, 2005;Navarro and Boveris, 2007a;Navarro and Boveris, 2007b)

Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, inwiefern in unserem Tiermodell der Alterungsprozess einen Einfluss auf die Sensitivität der Atmungsketten-Komplexe gegenüber spezifischen Komplexinhibitoren ausübt. Hierbei zeigte sich, dass isolierte Mitochondrien 21-24 Monate alter Mäuse nach Inkubation mit Inhibitoren der Komplexe I (Rotenon), III (Antimycin) und IV (Natriumazid) eine signifikant stärkere Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials aufweisen als Mitochondrien junger Tiere (Abb. 3.18 A,C,D). Demgegenüber führt die Inhibition der Komplexe II und V in alten Mäusen nur zu einer tendenziell stärkeren Reduktion des Transmembranpotentials (Abb. 3.18 B,E).

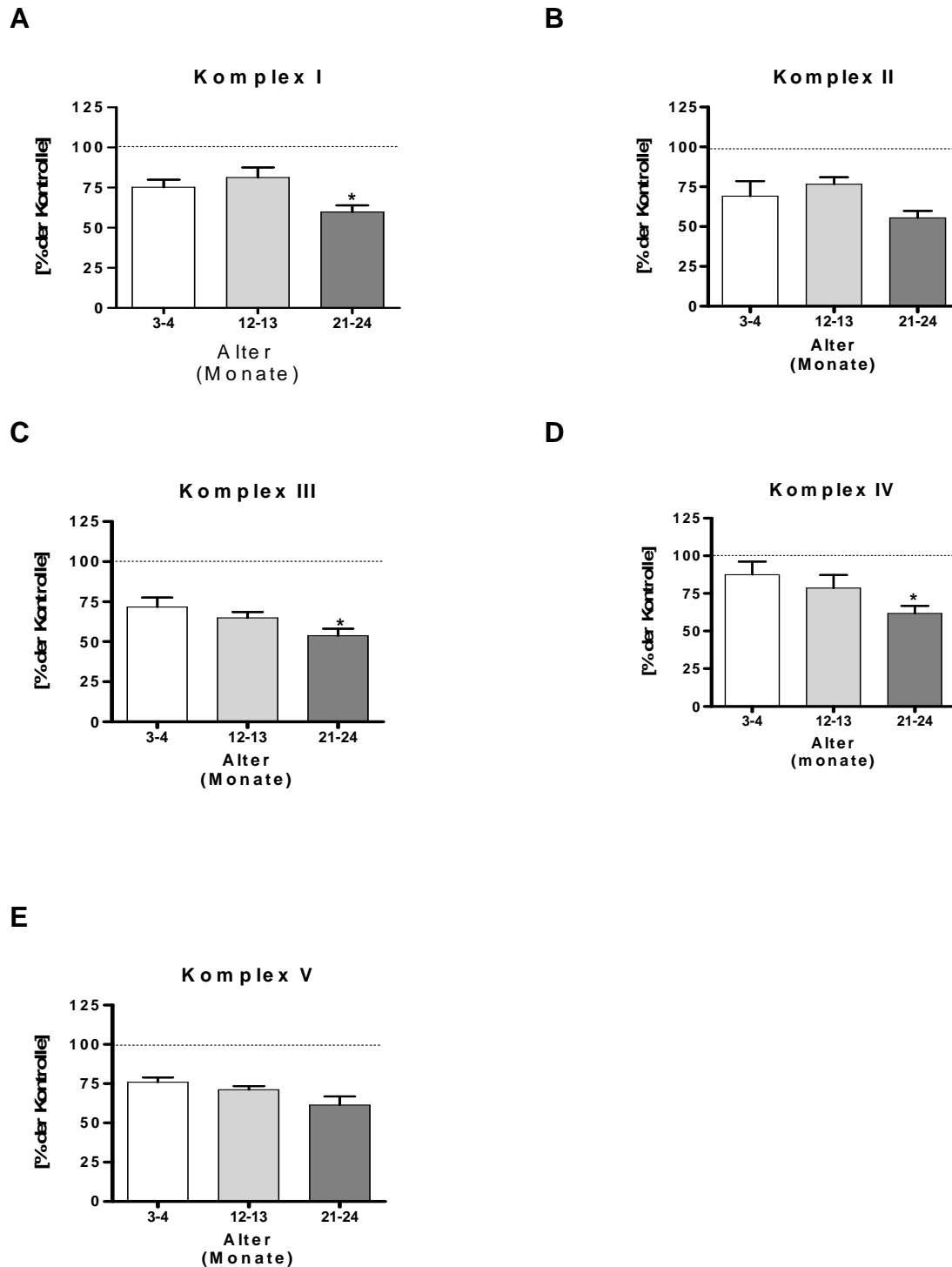


Abbildung 3-18: Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials isolierter Mitochondrien von NMRI-Mäusen nach 1-stündiger Stimulation mit Komplexinhibitoren.

A) Stimulation mit Rotenon, B) TTFA, C) Antimycin, D) Natriumazid und E) Oligomycin führt altersabhängig zu einer größeren Membranpotentialänderung. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten (* $p < 0,05$; 3-4 Monate versus 21-24 Monate, student's t-test).

In der nachfolgenden Tabelle sind die oben dargestellten Ergebnisse zusammengefasst:

Hemmung der Atmungskette	12-13 Monate	21-24 Monate
Komplex I durch Rotenon (50 μ M)	n.s.	+ 13,14 (*)
Komplex II durch Thenoyltrifluoroacetan (60 μ M)	n.s.	n.s.
Komplex III durch Antimycin (10 μ M)	n.s.	+ 15,13 (*)
Komplex IV durch Natriumazid (60 mM)	n.s.	+ 18,25 (*)
Komplex V durch Oligomycin (50 μ M)	n.s.	n.s.

Tabelle 3.3: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation mit spezifischen Komplexinhibitoren verglichen mit der Schädigung 3 Monate alter NMRI-Mitochondrien (Schädigung 3 Monate = 100%, * $p < 0,05$; 3-4 Monate versus 21-24 Monate, student's t-test.)

Weiterhin weisen 12-13 und 21-24 Monate alte Mäuse signifikant reduzierte NADH:DBQ-Aktivitäten auf (Abb. 3.19 A). Ferner scheint der Gehalt an intaktem Komplex I durch den Alterungsprozess nicht beeinträchtigt zu sein, da unveränderte NADH:HAR-Aktivitäten bei allen drei Altersgruppen zu beobachten sind (Abb. 3.19 B). Die Normalisierung der Komplex I-Aktivität mit dem Komplex I-Gehalt ergibt einen funktionellen Defekt der Komplex I-Aktivität 21-24 Monate alter NMRI-Mäuse, welcher durch eine Reduktion der Enzymaktivität um 28,79% gekennzeichnet ist (Abb. 3.19 C).

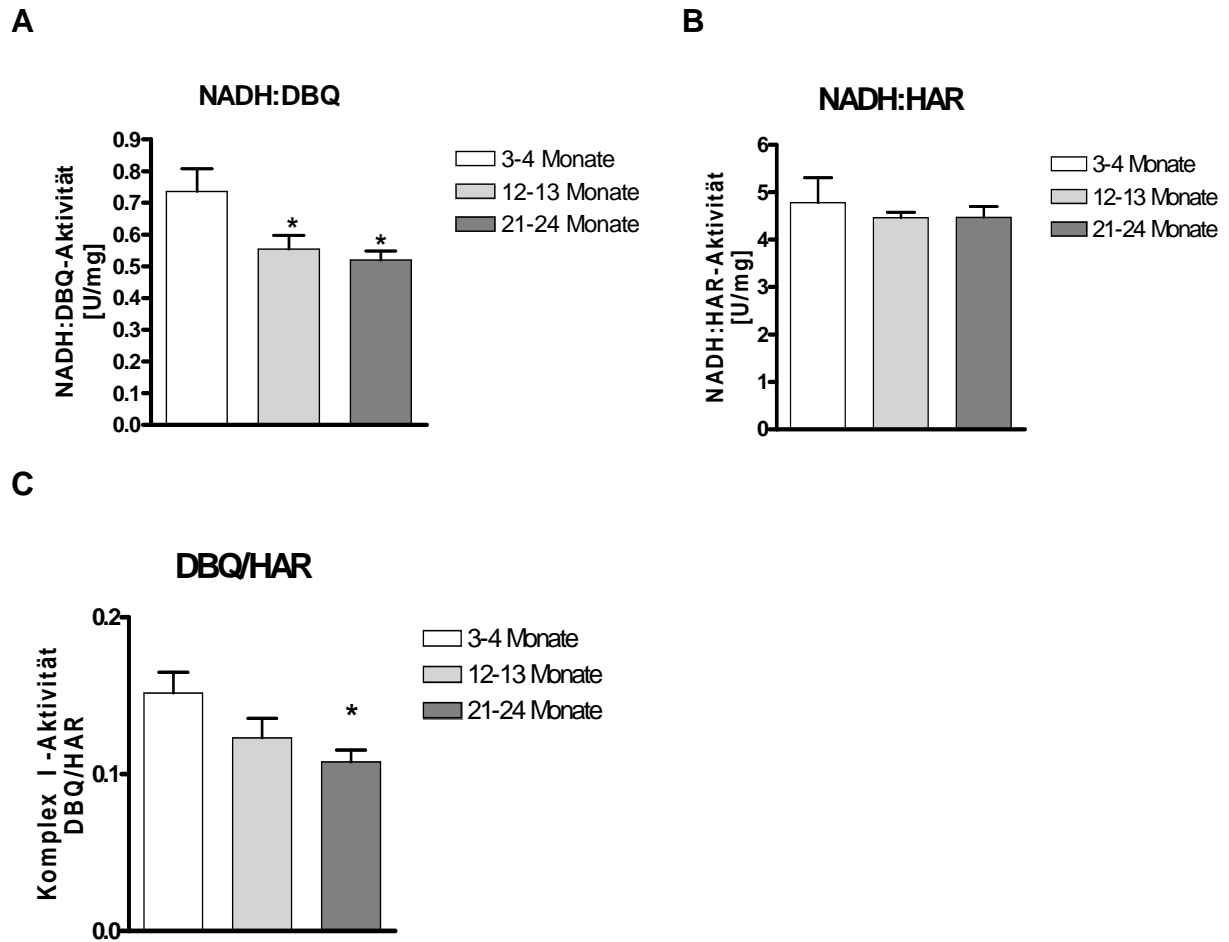


Abbildung 3-19: Reduzierte Aktivität der NADH:DBQ-Aktivität mit dem Alter

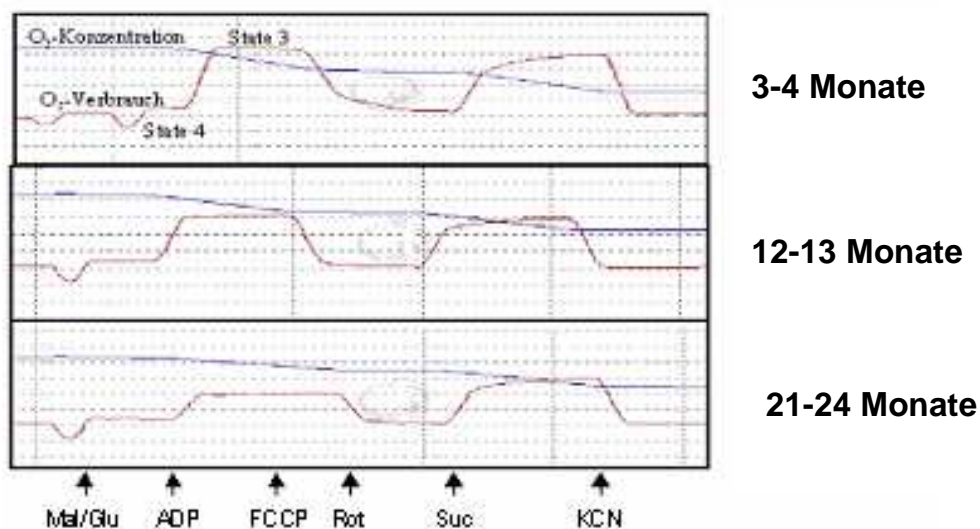
A-C) Komplex I-Aktivität von zerebralen Mitochondrien 3-4, 12-13 und 21-24 Monate alter NMRI-Mäuse ergibt A) reduzierte NADH:DBQ-Aktivitäten in 12-13 und 21-24 Monate alten Mäusen gegenüber B) unveränderten NADH:HAR-Aktivitäten. C) Komplex I-Aktivität normiert auf den Komplex I-Gehalt der mitochondrialen Präparation als DBQ/HAR- Verhältnis. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; versus 3-4 Monate, student's t-test).

3.3.3.2 Reduzierte Atmungsrate und RCR im Alter

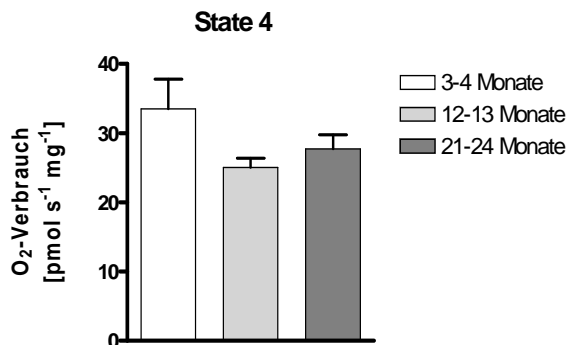
Zur weiteren Charakterisierung der altersbedingten Defekte der mitochondrialen Atmungskette, sollte zusätzlich der Sauerstoffverbrauch isolierter Hirn-Mitochondrien mit Hilfe eines Oxygraphen bestimmt werden.

Hierbei zeigte sich, dass die State 4-Atmung durch den Alterungsprozess nicht beeinträchtigt wird (Abb. 3.20 A). Demgegenüber weisen Mitochondrien 21-24 Monate alter NMRI-Mäuse eine signifikant verminderte State 3-Atmung auf, welche sich ebenfalls in einem signifikant reduzierten Atmungskontrollindex manifestiert (Abb. 3.20 B,C). Der Alterungsprozess scheint mit einer zunehmenden Verminderung der relativen Effizienz der mitochondrialen Kopplung der Elektronentransport-Komplexe assoziiert zu sein. Nach Entkopplung der Elektronentransportkette mit FCCP weisen Mitochondrien alter Mäuse zwar eine tendenzielle Reduktion der Atmungsrate auf, wobei diese gegenüber der von jungen Tieren nicht signifikant ausgeprägt ist (Abb. 3.20 E). Weiterhin wurde nach Hemmung der Komplex I-abhängigen Atmung mittels Rotenon durch Zugabe von Succinat die Komplex II-abhängige Atmung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass diese nicht durch das Altern beeinträchtigt wird.

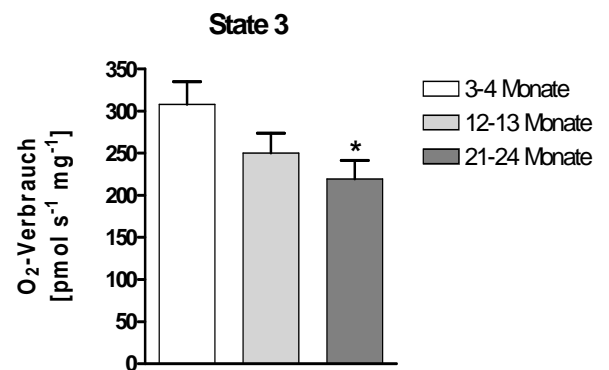
A



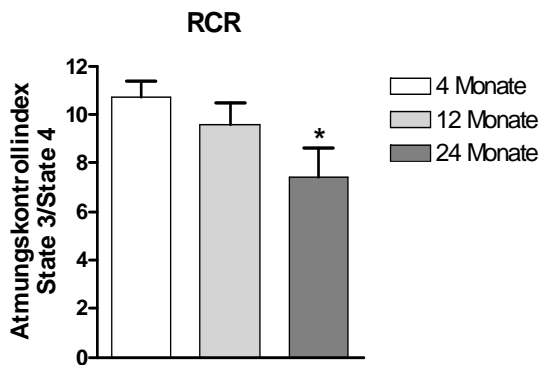
B



C



D



E

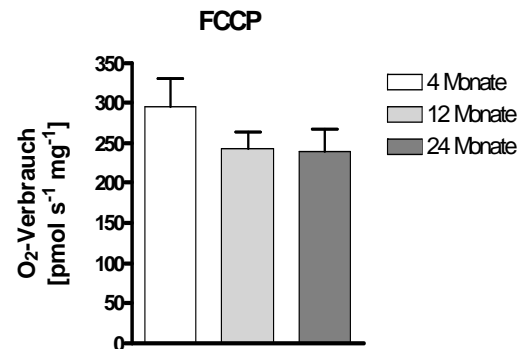


Abbildung 3-20: Sauerstoffverbrauchsmessung von frisch isolierten zerebralen Mitochondrien von 3-4, 12-13 bzw. 21-24 Monate alten NMRI-Mäusen.

A) Repräsentatives Diagramm der Sauerstoffverbrauchsmessung von 3-4 (oben), 12-13 (Mitte) bzw. 21-24 (unten) Monate alter NMRI-Mäuse, welches deutlich den Abfall der Sauerstoffkonzentration während der Messung anzeigt. Der Sauerstoff-Flux und die Atmungsrate der Mitochondrien wurden nach Zugabe verschiedener Stoffe gemessen (gekennzeichnet durch Pfeile). Malat/Glutamat (State 4), ADP (State 3), FCCP, Rotenon, Succinat und KCN. B) State 4-Atmung nach Zugabe von Malat/Glutamat. C) Anschließend wurde ADP hinzugefügt und State 3 der Atmung gemessen. D) Nach Bestimmung der gekoppelten Atmung, wurde FCCP hinzugefügt und die Atmung wurde in Abwesenheit eines Protonengradienten gemessen. E) Weiterhin wurde durch den Quotienten State 3 / State 4 die RCR bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7 Experimenten. (* $p < 0,05$; versus 3-4 Monate, student's t-test).

3.4 Überprüfung von Antidementiva auf ihre protektiven

Eigenschaften auf die mitochondriale Funktion

In nächsten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in der AD-Therapie eingesetzte Antidementiva einen protektiven Effekt auf die mitochondriale Funktion direkt ausüben. Es standen Ginkgo biloba Extrakt und Piracetam zur Verfügung. Für diese beiden Substanzen konnten bereits an Zellmodellen und dissoziierten Hirnzellen protektive Effekte auf die Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden (Eckert *et al.*, 2003; Eckert *et al.*, 2005; Keil *et al.*, 2005; Keil *et al.*, 2006b). Aufgrund dessen sollte zur näheren Charakterisierung der Wirkweise der beiden Substanzen Versuche an isolierten Mitochondrien durchgeführt werden. Hierzu wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen weibliche NMRI-Mäuse ein Mal täglich eine Einzeldosis des zu untersuchenden Wirkstoffes (Suspension/Lösung in 0,2%-igem Agarose-Gel) bzw. des Vehikels (Agarose-Gel 0,2%) mittels Schlundsondierung appliziert. Im Anschluss daran wurden die Effekte der beiden Substanzen auf die mitochondriale Funktion durch unterschiedliche Parameter überprüft.

3.4.1 Schützender Effekt von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondriale Funktion

Der Ginkgo biloba Extrakt EGb761 wird in Deutschland seit 20 Jahren bei nachlassender kognitiver Leistungsfähigkeit und Demenzerkrankungen eingesetzt. Weiterhin ist neuen Forschungsergebnissen zufolge eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion ein wichtiger Baustein im Puzzle um die Ursachen nachlassender mentaler Leistungsfähigkeit im Alter und bei der AD. Um zu überprüfen, ob Ginkgo biloba Extrakt einen protektiven Effekt auf die Mitochondrienfunktion direkt ausübt, wurden isolierte Mitochondrien von 3 und 22 Monate alten NMRI-Mäusen nach einer Behandlungsstudie mit 100 mg/kg KG Ginkgo untersucht.

3.4.1.1 Einfluss einer EGb761-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential von NMRI-Mäusen

Hierzu wurde zunächst das mitochondriale Membranpotential mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 unter basalen Bedingungen vermessen. In Übereinstimmung mit unseren Altersstudien (vgl. Kapitel 3.3) weisen isolierte Mitochondrien 22 Monate alter Mäuse ein signifikant reduziertes Transmembranpotential auf. Allerdings führt die Behandlungsstudie mit EGb761 zu keiner bzw. nur tendenziellen Verbesserung des basalen Transmembranpotentials (Abb. 3.21).

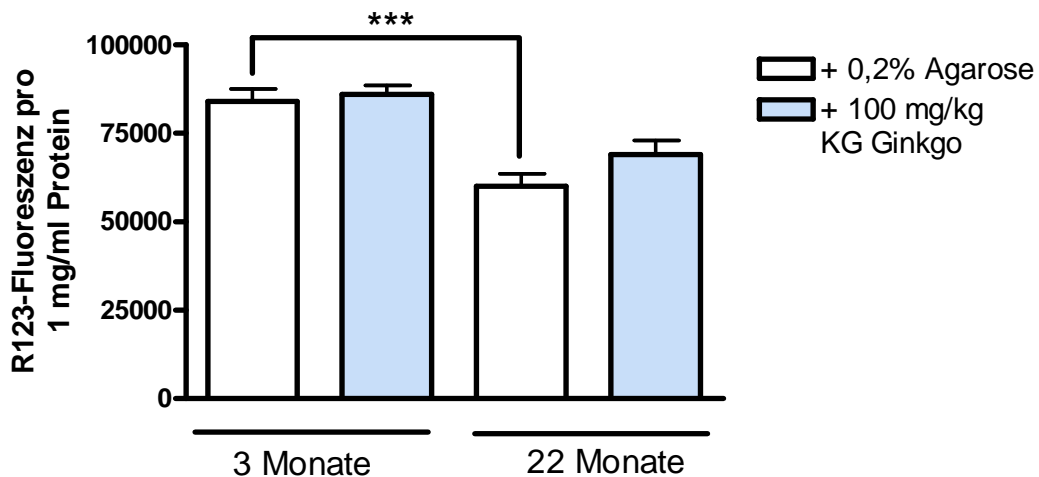


Abbildung 3-21: Unverändertes mitochondriales Transmembranpotentials nach einer EGb761-Behandlung.

Eine Gruppe der 3 bzw. 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 100 mg/kg Ginkgo/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Das Membranpotential isolierter Mitochondrien wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 vermessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 7-8 Experimenten. (***) $p < 0,001$; 3 Monate versus 22 Monate, ungepaarter student's t-test).

3.4.1.2 Protektiver Effekt von EGb761 auf die H₂O₂-induzierte mitochondriale Fehlfunktion

Ein wesentlicher Mitochondrien schädigender Faktor ist der oxidative Stress, ausgelöst etwa durch freie Sauerstoffradikale. Um zu überprüfen, ob Ginkgo biloba Extrakt protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion nach oxidativem Stress

ausübt, wurden isolierte Mitochondrien mit 2mM H₂O₂ für 2 Stunden gestresst und anschließend das Transmembranpotential mittels des Farbstoffes R123 bestimmt.

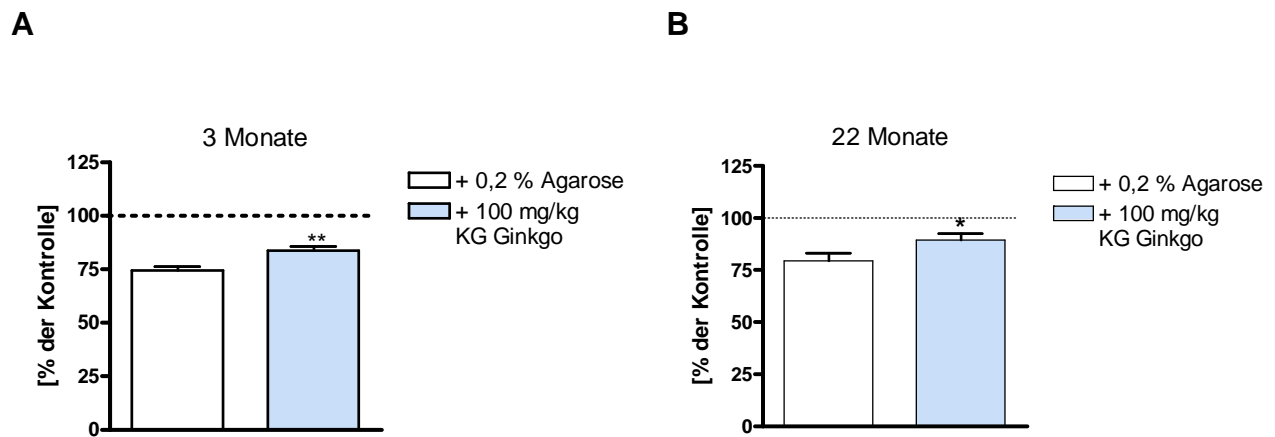


Abbildung 3-22: Protektiver Effekt von EGb761 auf die Wasserstoffperoxid-induzierte mitochondriale Fehlfunktion

Eine Gruppe der 3 bzw. 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 100 mg/kg Ginkgo/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach sekundärem Insult in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien von A) 3 und B) 22 Monate alten Tiere für 2 Stunden mit 2mM H₂O₂ inkubiert. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 7-8 Experimenten. (*p<0.05, **p<0,01; Agarose- versus Ginkgo-behandelte Tiere, student`s t-test).

Die R123-Fluoreszenz wird durch Inkubation mit H₂O₂ deutlich vermindert, was auf einen Abfall des Membranpotentials und folglich auf eine Schädigung der Mitochondrien hinweist. Die Behandlungsstudie mit EGb761 resultiert sowohl bei Mitochondrien 3 als auch 22 Monate alter Mäuse in einer Erhöhung der R123-Fluoreszenz und demzufolge einer geringeren Schädigung durch H₂O₂ (Abb. 3.22). Demzufolge scheint Ginkgo biloba Extrakt protektive Effekte gegenüber H₂O₂-induzierter mitochondrialer Fehlfunktion aufzuweisen.

3.4.1.3 Protektiver Effekt von EGb761 auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Behandlungsstudie mit Ginkgo biloba Extrakt ebenfalls protektive Effekte auf Mitochondrien nach nitrosativem Stress ausübt. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien mit SNP über einen Zeitraum von 2

Stunden gestresst. Dabei zeigte sich, dass durch eine Behandlung mit EGb761 die SNP-induzierte Membranpotentialänderung in Mitochondrien 3 Monate alter Mäuse verringert wird (Abb. 3.23 A). Demgegenüber weisen Mitochondrien 22 Monate alter Mäuse nach einer EGb761-Behandlung nur eine tendenzielle Verringerung der Membranpotentialänderung auf (Abb. 3.23 B)

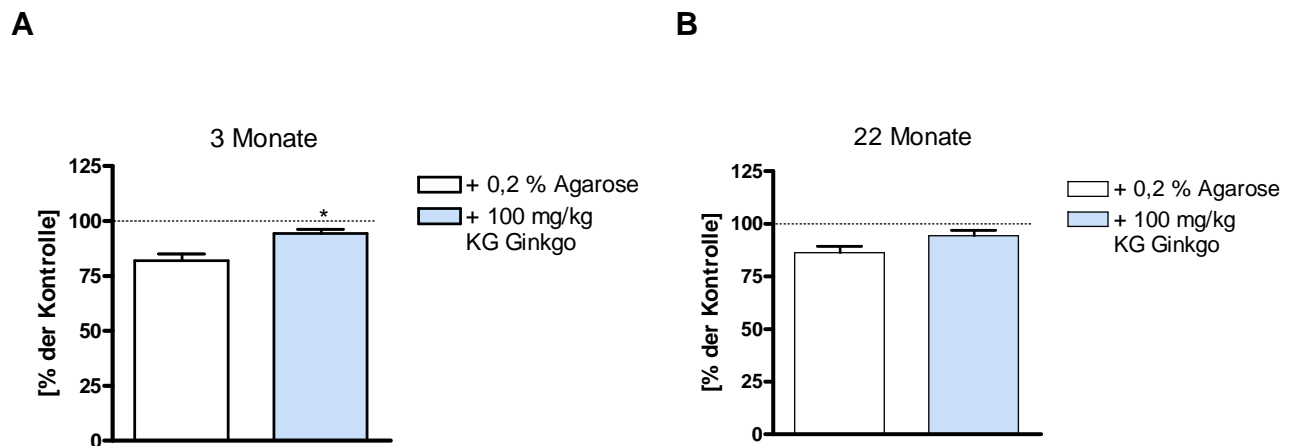


Abbildung 3-23: Protektiver Effekt von EGb761 auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion.

Eine Gruppe der 3 bzw. 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 100 mg/kg Ginkgo/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach sekundärem Insult in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien von A) 3 und B) 22 Monate alten Tiere für 2 Stunden mit 2mM H₂O₂ inkubiert. Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von 7-8 Experimenten. (*p<0.05; Agarose- versus Ginkgo-behandelte Tiere, student's t-test).

3.4.2 Einfluss einer Ginkgo biloba Behandlung auf die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe von NMRI-Mäusen

Defekte der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe scheinen eine entscheidende Rolle bei der AD zu spielen. Aus diesem Grund sollten die Effekte einer EGb761-Behandlung auf die einzelnen Komponenten der Atmungskette untersucht werden. Hierzu wurde wiederum eine Behandlungsstudie mit EGb761 über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt. Die isolierten Mitochondrien von Agarose- und EGb761-behandelten Tieren wurden mit den Komplexinhibitoren Rotenon (Komplex I), TTFA (Komplex II), Antimycin (Komplex III), Natriumazid (Komplex IV) und Oligomycin (Komplex V) für 1 Stunde inkubiert und anschließend das Transmembranpotential mittels R123 bestimmt.

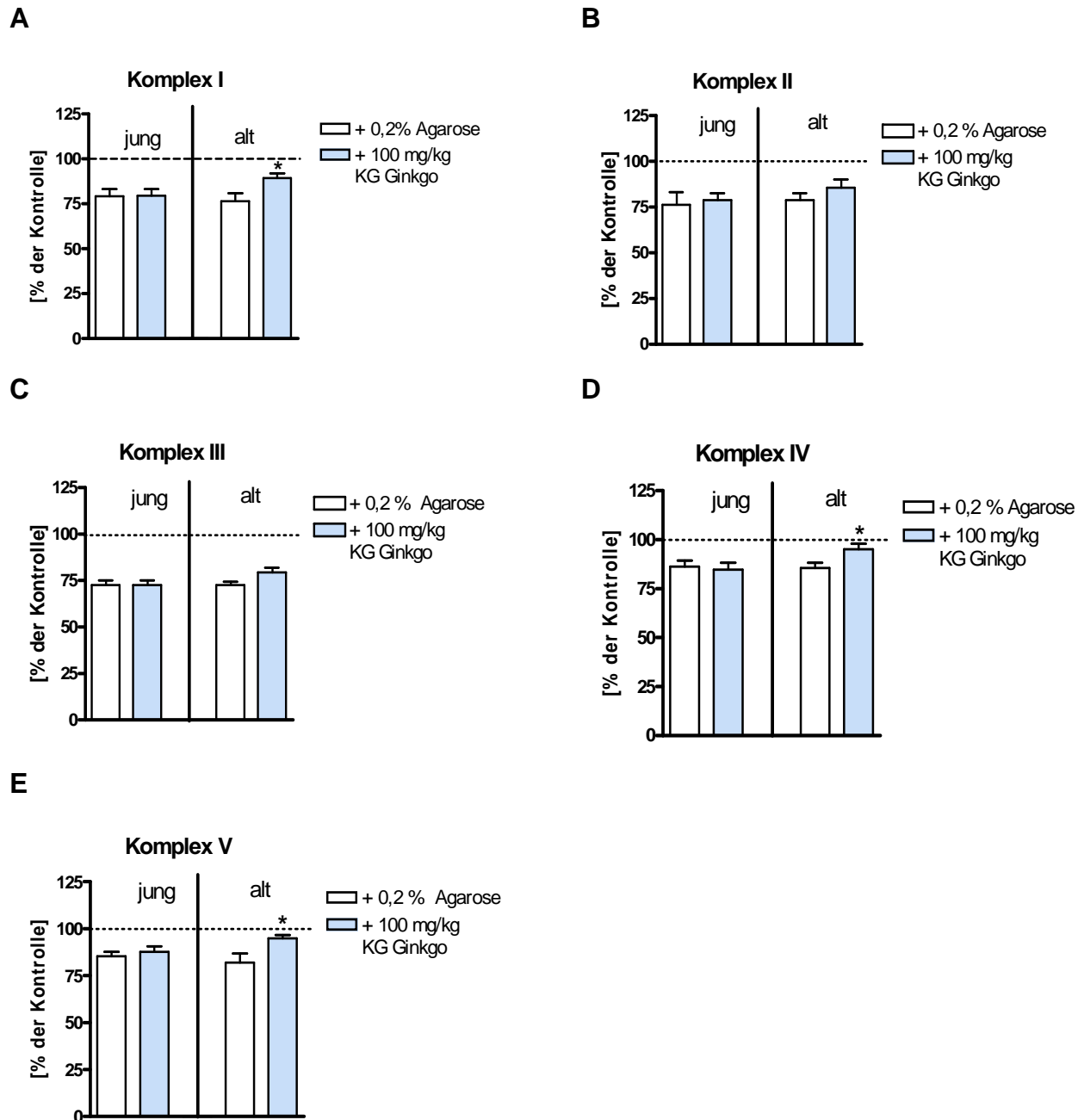


Abbildung 3-24: Protektiver Effekt von EGb761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe.

Eine Gruppe der 3 (jung) bzw. 22 (alt) Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 100 mg/kg Ginkgo/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach Stimulation mit Komplexinhibitoren in Bezug zu unbehandelten Kontrolle-Mitochondrien. Bestimmung des Transmembranpotentials isolierter Mitochondrien nach 1-stündiger Stimulation mit A) Rotenon, B) TTFA, C) Antimycin, D) Natriumazid und E) Oligomycin. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0.05$; Agarose- versus Ginkgo-behandelte Tiere, student's t-test).

In der folgenden Tabelle sind die Effekte von EGb761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zusammengefasst:

Schädigung		Protektion durch EGb761 (100 mg/kg KG)	
		jung	alt
Komplex	I Rotenon (50 μ M)	n.s.	- 13,22 (*)
	II TTFA (60 μ M)	n.s.	n.s.
	III Antimycin (10 μ M)	n.s.	n.s.
	IV Natriumazid (60 μ M)	n.s.	- 12,60 (*)
	V Oligomycin (50 μ M)	n.s.	- 14,13 (*)

Tabelle 3.4: Protektive Effekte von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe (Schädigung Agarose behandelte Tiere = 100%; *p<0.05, Agarose- versus Ginkgo-behandelte Tiere, student`s t-test)

Die Behandlung mit EGb761 führt bei jungen Tieren zu keinem Schutz der einzelnen Atmungsketten-Komplexe. Demgegenüber zeigte sich, dass eine 2-wöchige Behandlung mit Ginkgo biloba Extrakt bei alten Tieren zu einer geringeren Membranpotentialänderung nach Inkubation mit Hemmstoffen der Komplexe I, IV und V resultiert (Abb. 3.24 A,D,E). Im Gegensatz hierzu scheinen die Komplexe I und III unter den von uns gewählten Bedingungen nicht geschützt zu werden (Abb. 3.24 B,C).

3.4.3 Schützender Effekt von Piracetam auf die mitochondriale Funktion

3.4.3.1 Einfluss einer Piracetam Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential von NMRI-Mäusen

Piracetam zeigte bereits in untransfizierten PC12-Zellen protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential und die ATP-Spiegel nach nitrosativem und

oxidativem Stress auf (Keil *et al.*, 2006b). Um zu überprüfen, ob Piracetam ebenfalls protektive Effekte auf isolierte Mitochondrien ausübt, wurden 22 Monate alte NMRI-Mäuse im Zuge einer Behandlungsstudie mit 500 mg/kg KG Piracetam schlundsondiert. Im Anschluss wurde das mitochondriale Membranpotential mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 unter basalen Bedingungen bestimmt. Es zeigte sich, dass Piracetam nach einer Behandlungsstudie keine Effekte auf das basale Transmembranpotential aufweist (Abb. 3.25).

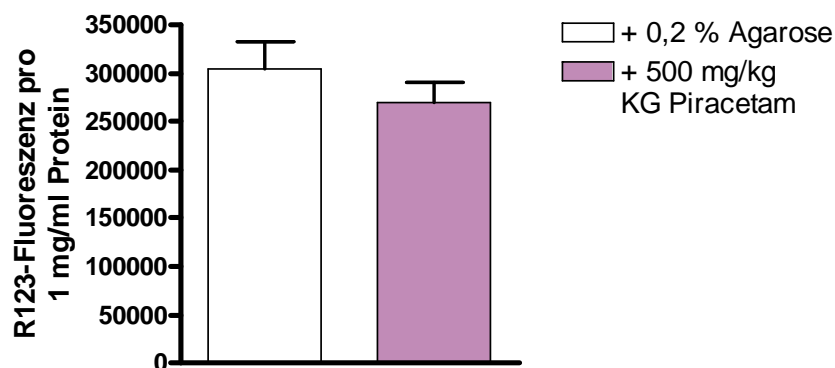


Abbildung 3-25: Unverändertes mitochondriales Transmembranpotentials nach einer 2-wöchigen Piracetam-Behandlung.

Eine Gruppe der 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 500 mg/kg Piracetam/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Das basale Mitochondrienpotential wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes R123 vermessen. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6-8 Experimenten. (n.s.; Agarose- versus Piracetam-behandelte Tiere, student's t-test).

3.4.3.2 Protektiver Effekt von Piracetam auf die H₂O₂-induzierte mitochondriale Fehlfunktion

Analog zu den Versuchen mit Ginkgo biloba Extrakt (vergleiche Kapitel 3.4.1.2) sollte der protektive Effekt von Piracetam nach oxidativem Stress untersucht werden. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien von Agarose- und Piracetam-behandelten Tieren für zwei Stunden mit H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurde durch Bestimmung des Membranpotentials die mitochondriale Funktion überprüft. Dabei zeigte sich, dass Piracetam gegenüber H₂O₂-induzierter mitochondrialer Fehlfunktion protektive Effekte aufweist (Abb. 3.26).

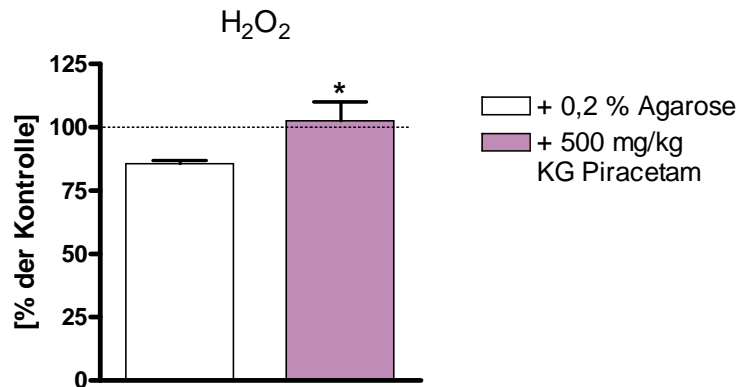


Abbildung 3-26: Protektiver Effekt von Piracetam auf die H_2O_2 -induzierte mitochondriale Fehlfunktion.

Eine Gruppe der 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 500 mg/kg Piracetam/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Isolierte Mitochondrien von 22 Monate alten Tieren wurden 2 h mit 2mM H_2O_2 inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach sekundärem Insult in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Man erkennt einen Abfall der R123-Fluoreszenz, was gleichbedeutend ist mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0.05$; Agarose- versus Piracetam-behandelte Tiere, student's t-test).

3.4.3.3 Piracetam schützt NMRI-Mitochondrien vor dem Angriff von Natriumnitroprussid

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob Piracetam ebenfalls protektive Effekte auf die Mitochondrien nach nitrosativem Stress ausübt. Hierfür wurden isolierte Mitochondrien mit SNP über einen Zeitraum von 2 Stunden gestresst. Es zeigte sich, dass durch eine Behandlung mit Piracetam die mitochondriale Membranpotentialänderung nach nitrosativem Stress verringert wird. Demzufolge führt eine Piracetam-Behandlung zu einer geringeren SNP-induzierten Schädigung (Abb. 3.27).

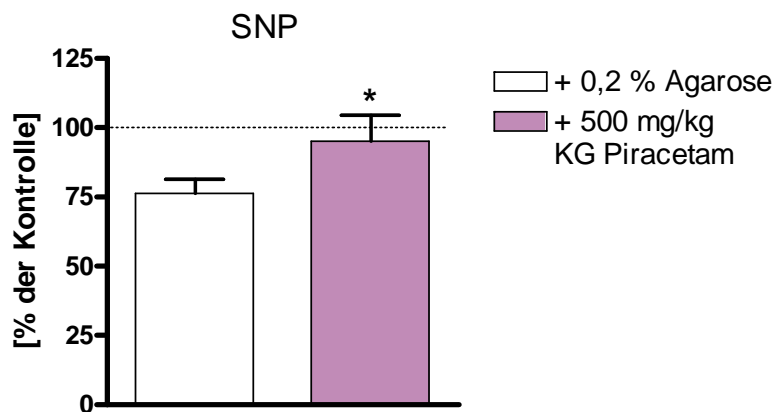


Abbildung 3-27: Protektiver Effekt von Piracetam auf die SNP-induzierte mitochondriale Fehlfunktion.

Eine Gruppe der 22 Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 500 mg/kg Piracetam/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Isolierte Mitochondrien von 22 Monate alten Tieren wurden 2 h mit 2mM SNP inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach sekundärem Insult in Bezug zu unbehandelten Kontroll-Mitochondrien. Man erkennt einen Abfall der R123-Fluoreszenz, was gleichbedeutend ist mit einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6-7 Experimenten. (* $p < 0.05$; Agarose- versus Piracetam-behandelte Tiere, student's t-test).

3.4.4 Einfluss einer Piracetam Behandlung auf die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe von NMRI-Mäusen

Da eine Behandlung mit Piracetam protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential aufweist und durch Studien an PC12-Zellen ebenfalls ein protektiver Effekt auf die mitochondriale Atmungskette beobachtet werden konnte (Keil *et al.*, 2006b), sollte im Anschluss untersucht werden, ob Piracetam ebenfalls *in vivo* einen protektiven Effekt auf die mitochondrialen Atmungskette-Komplexe aufweist.

Piracetam reduziert in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse die Effekte der verschiedenen Komplexinhibitoren auf das mitochondriale Membranpotential. Während bei jungen Tieren eine Behandlung mit Piracetam zu einem Schutz der Komplexe I, II und IV führt, werden bei alten Tieren alle Atmungsketten-Komplexe durch Piracetam geschützt (Abb. 3.28).

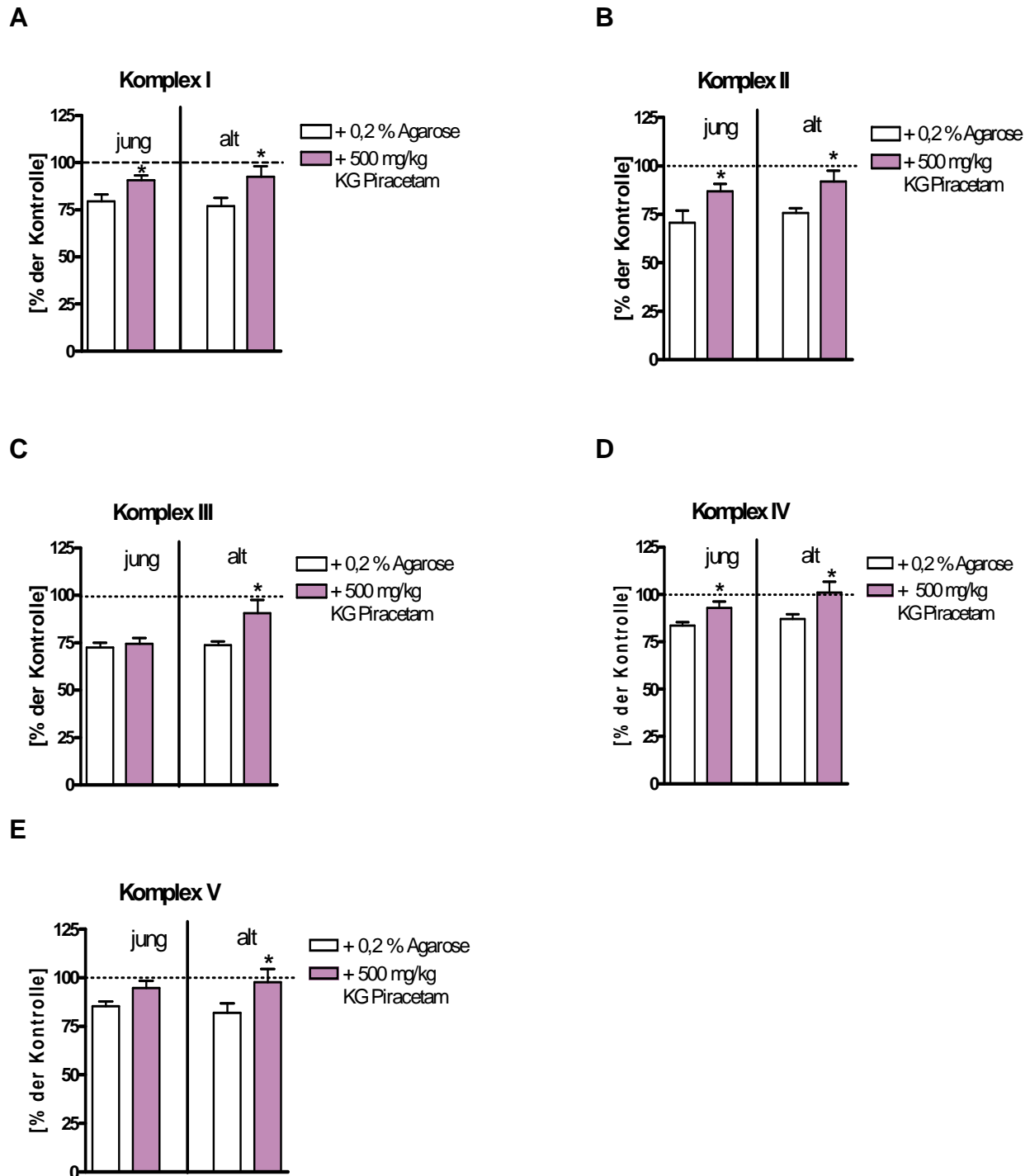


Abbildung 3-28: Protektiver Effekt von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe.

Eine Gruppe der 3 (jung) bzw. 22 (alt) Monate alten NMRI-Mäuse wurde entweder mit 500 mg/kg Piracetam/KG in 0.2% Agarose-Lösung bzw. mit 0.2% Agarose-Lösung ein Mal täglich für zwei Wochen behandelt. Dargestellt ist der prozentuale Abfall des Transmembranpotentials nach Stimulation mit Komplexinhibitoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials isolierter Mitochondrien nach 1-stündiger Stimulation mit A) Rotenon, B) TTFA, C) Antimycin, D) Natriumazid und E) Oligomycin. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 6 Experimenten. (* $p < 0,05$; Agarose- versus Piracetam-behandelte Tiere, student's t-test).

In der folgenden Tabelle sind die Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zusammengefasst:

Schädigung		Protektion durch Piracetam (500 mg/kg KG)		
		jung	alt	
Komplex	I	Rotenon (50 µM)	- 15,14 (*)	- 14,60 (*)
	II	TTFA (60 µM)	- 18,00 (*)	- 26,46 (*)
	III	Antimycin (10 µM)	n.s.	- 17,31 (*)
	IV	Natriumazid (60 µM)	- 11,57 (*)	- 16,29 (*)
	V	Oligomycin (50 µM)	n.s.	- 15,88 (*)

Tabelle 3.5: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe (Schädigung Agarose behandelte Tiere = 100%, *p<0.05; Agarose- versus Piracetam-behandelte Tiere, student's t-test)

4 Diskussion

4.1 Hintergrund und Relevanz der Untersuchung

altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen an isolierten Mitochondrien

Die demographische Entwicklung ist in industrialisierten Ländern drastischen Veränderungen ausgesetzt. Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamtes wird die Altersgruppe der über 80-jährigen in Zukunft die am schnellsten wachsende Altersgruppe sein, wodurch sich eine „Überalterung“ der bundesdeutschen Bevölkerung ergeben wird (Abb. 4.1).

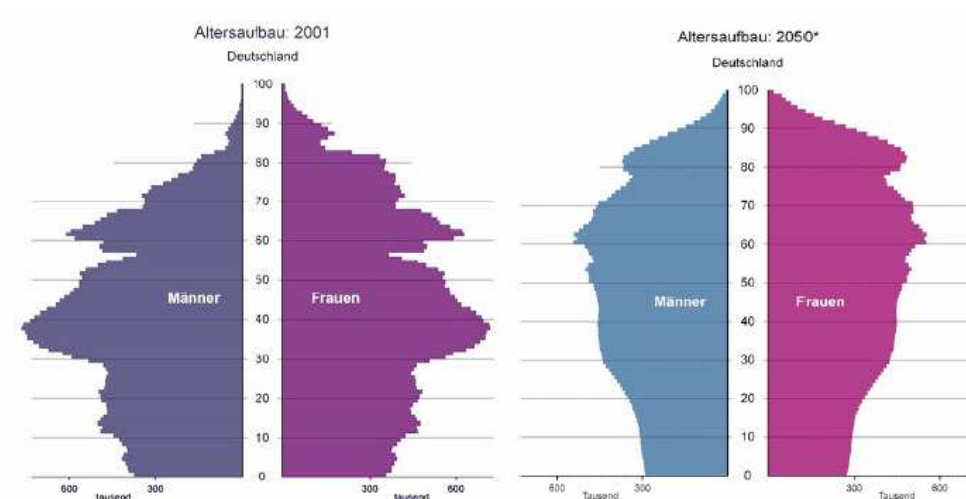


Abbildung 4-1: Demographische Entwicklung der BRD (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

Das Alter ist zudem der größte Risikofaktor für viele neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. für Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer.

Insbesondere die Alzheimer Demenz (AD) weist hierbei eine hohe Prävalenz auf (Riedel-Heller *et al.*, 2001). Im Allgemeinen zeichnet sich die AD durch einen langsamen Krankheitsverlauf aus. Sie ist mit einer Störung und einem Verlust von Gehirnleistungen verbunden, wodurch es bei den Betroffenen im Endstadium der Erkrankung zu einem Verlust der individuellen Persönlichkeit kommt. Die AD führt zu langwierigem Leiden der Patienten, zu erheblichen Belastungen der betreuenden Angehörigen und zu hohen Versorgungskosten. Weltweit sind circa 24 Millionen Menschen von der AD betroffen. Ferner ist die Therapie der AD trotz intensiver Forschungsanstrengungen bislang rein symptomatisch. Sollte ein therapeutischer Durchbruch ausbleiben, wird im Hinblick auf die demographische Entwicklung unserer Gesellschaft die Zahl der AD-Patienten zukünftig weiter dramatisch ansteigen und sich bis in das Jahr 2030 voraussichtlich mehr als verdoppeln (Fillit *et al.*, 2002). Angesichts dessen sind die Erforschung und das Verständnis AD-relevanter Pathomechanismen von großer Bedeutung. Insbesondere Erkenntnisse, die zur Entwicklung neuer Präventionen und Therapien führen, bedeuten eine Steigerung der Lebensqualität für den Einzelnen und gleichzeitig eine Entlastung der Gesundheits- und Sozialsysteme.

Einzelne AD-relevante Pathomechanismen sind bereits intensiv erforscht worden. Dies führte zu neuen, zum Teil auch erstaunlichen Erkenntnissen über die Pathogenese dieser Erkrankung. So gibt es zahlreiche Hinweise, die auf eine Verbindung zwischen mitochondrialer Dysfunktion und der AD hindeuten. So konnten unter anderem frühe Defekte in der Glucose-Verwertung in Gehirnen von AD-Patienten beobachtet werden (Hoyer, 2000; Blass *et al.*, 2002). Weiterhin wird dies durch zahlreiche genetische, biochemische und molekular-biologische Studien untermauert (Zhu *et al.*, 2004b; Reddy and Beal, 2005). Dennoch ist der exakte zugrunde liegende Mechanismus bzw. die Komplexität der Pathomechanismen, welche zu mitochondrialer Dysfunktion führen, noch nicht vollständig geklärt. Dieses fehlende Verständnis macht weitere Forschungsbemühen nötig. Erst bei umfassenderem Verständnis der einzelnen Pathomechanismen können in Zukunft längerfristige

Therapieoptionen entwickelt werden, die den progredienten Nervenzellabbau hinauszögern und eines Tages sogar nachhaltig hemmen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mitochondriale Dysfunktion in Zusammenhang mit der AD eingehender untersucht.

Neben der Untersuchung von *post mortem* Hirngewebe, Laboruntersuchungen von Zerebrospinalflüssigkeit und Blut, sowie der Anwendung von bildgebender Verfahren bei AD-Patienten spielen seit langem auch Tiermodelle zum besseren Verständnis dieser Erkrankung eine entscheidende Rolle. So bieten u.a. Labormäuse durch gezielte experimentelle Studien am lebenden, komplexen Organismus bzw. an Organen/ Zell-Organellen (isolierte Mitochondrien) *ex vivo* die Möglichkeit biochemische und physiologische Grundprozesse zu untersuchen. Daneben ermöglichen transgene Mäuse eine detaillierte Analyse spezifischer pathologischer Prozesse und bieten außerdem ein außerordentliches Potential für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Durch die Verwendung von isolierten Mitochondrien dieser Mäuse kann zudem der Einfluss AD-relevanter Pathomechanismen direkt auf die mitochondriale Atmungskette untersucht werden.

4.2 Mitochondriale Dysfunktion und AD

4.2.1 Mitochondriale Funktion und A β

4.2.1.1 Einfluss von A β auf das mitochondriale Transmembranpotential

Diverse Studien weisen daraufhin, dass das Amyloid- β -Peptid (A β) direkt toxisch auf isolierte Mitochondrien wirkt. So konnte bereits an verschiedenen Zellmodellen, welche APP mit der Schwedischen Mutation exprimieren (APP^{sw}), gezeigt werden, dass A β abhängig vom Expressionslevel unterschiedliche Effekte auf das mitochondriale Membranpotential ausübt (Keil

et al., 2006a). Weiterhin konnte an untransfizierten PC12-Zellen gezeigt werden, dass extrazelluläres A β konzentrationsabhängig oxidativen Stress und mitochondriale Dysfunktion verursacht (Keil *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen diesen Befund. Unsere Versuche mit isolierten Hirn-Mitochondrien bestätigen, dass extrazelluläres und intrazelluläres A β mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert ist.

So konnte gezeigt werden, dass isolierte Hirn-Mitochondrien von 6-8 Monate alten Thy-1 APP transgenen Mäusen unter basalen Bedingungen ein signifikant erniedrigtes Membranpotential im Vergleich zu dem von non-tg Tieren aufweisen. In Übereinstimmung mit diesem Befund sind dissoziierte Hirnzellen von 6 Monate alten Thy-1 APP transgenen Mäusen durch eine Reduktion des Membranpotential und der ATP-Level gekennzeichnet (Hauptmann *et al.*, 2006). Demgegenüber weisen APPsw-PC12-Zellen eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials auf (Keil *et al.*, 2006a). Von den Autoren wird spekuliert, dass APPsw-PC12-Zellen zur Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und folglich ihrer Zellviabilität einen Abwehrmechanismus besitzen, welcher durch eine Umkehrung der ATP-Synthase zu einer gesteigerten Glykolyserate führt. Dieses zu unseren Beobachtungen kontroverses Ergebnisse muss allerdings mit Sorgfalt betrachtet werden. Bei PC12-Zellen handelt es sich um auf Tumorzellen basierende Modelle, welche von vornherein einen veränderten Energiemetabolismus aufweisen. Die Energieversorgung in diesen Zellen wird überwiegend durch die Glykolyse gewährleistet und nicht wie in unserem Modell durch die oxidative Phosphorylierung. Effekte von extrazellulärem bzw. intrazellulärem A β resultieren daher hauptsächlich in einer Beeinflussung der Glykolyse und nicht der mitochondrialen Atmungskette (Bigl and Eschrich, 1995).

Eine denkbare Erklärung für das verminderte Membranpotential Thy-1 APP transgener Mäuse könnte in einer Reduktion der Anzahl neuronaler Mitochondrien begründet liegen. Von großem Interesse in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Hirai und Mitarbeitern. Sie konnten

durch morphologische Untersuchungen des frontalen und temporalen Kortex von AD-Patienten strukturelle Veränderungen und eine Reduktion der Anzahl neuronaler Mitochondrien aufzeigen (Hirai *et al.*, 2001). Jedoch ist die Gesamtmenge neuronaler Mitochondrien in non-tg und Thy-1 APP Mäusen identisch. Hierdurch kann der oben erwähnte Pathomechanismus in dem von uns verwendeten Versuchsmodell nahezu vollständig ausgeschlossen werden (Hauptmann *et al.*, 2006). Aus diesem Grund scheint es, dass die erhöhte A β -Produktion und die daraus resultierende chronische A β -Belastung über eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion die beobachtete Störung auslöst. In Übereinstimmung resultiert die erhöhte A β -Produktion in APPsw-PC12-Zellen in signifikant erhöhten NO-Leveln, veränderten COX-Aktivitäten und reduzierten ATP-Leveln (Eckert *et al.*, 2001;Leutz *et al.*, 2002).

Des Weiteren führt die Inkubation mit H₂O₂ und SNP zu einem signifikant reduzierten mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien von non-tg Tieren. Demgegenüber scheinen Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse offenbar nicht durch oxidativen und nitrosativen Stress zusätzlich geschädigt werden zu können. Im Gegensatz dazu reagieren APPsw-PC12-Zellen nach oxidativem und nitrosativem Stress mit einer stärkeren Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials, einer Reduktion der ATP-Spiegel und einer erhöhten Apoptose-Rate im Vergleich zu APPwt- und Vektor-transfizierten Zellen (Eckert *et al.*, 2001;Marques *et al.*, 2003;Keil *et al.*, 2004). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu unseren Daten könnte wiederum in dem veränderten Energiemetabolismus von PC12-Zellen begründet liegen. In Übereinstimmung mit unserer Beobachtung weisen allerdings dissoziierte Hirnzellen von Thy-1 APP transgenen Tieren ebenfalls keinen bzw. nur einen geringen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach nitrosativem und oxidativem Stress auf (Hauptmann *et al.*, 2006). Eine mögliche Ursache für die geringe Empfindlichkeit gegenüber einem weiteren toxischen Insult könnte die chronische A β -Belastung der Thy-1 APP transgenen Tiere sein. Thy-1 APP Mitochondrien scheinen bereits massiv vorgeschädigt zu sein. Ein exogen zugeführter Stressor könnte lediglich wie ein Tropfen Wasser auf dem heißen

Stein wirken, sodass eine zusätzliche Schädigung mit der von uns gewählten Messmethode nicht ersichtlich wird. Des Weiteren könnte der beobachtete Phänotyp in Thy-1 APP transgenen Mäusen von gewissen Kompensationsmechanismen herrühren. Es ist durchaus denkbar, dass diese zur Aufrechterhaltung eines gewissen, zum Überleben notwendigen Membranpotentials trotz sekundärer Schädigung beitragen. Eine weitere derzeitig diskutierte Möglichkeit ist, dass A β in der Lage ist oxidativen Stress zu reduzieren (Nunomura *et al.*, 2001). So konnten Cuajungcom *et al.* (2000) demonstrieren, dass A β als Superoxid-Dismutase antioxidativ wirkt und folglich protektive Eigenschaften aufweist (Cuajungcom *et al.*, 2000). Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen des beobachteten Phänotyps von Thy-1 APP transgenen Mäusen nach oxidativem und nitrosativem Stress sind allerdings bisher rein spekulativ und müssten durch weiterführende Versuche geklärt werden.

4.2.1.2 Effekte von A β auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und die gesamte Atmungskette

Um zu überprüfen, ob A β einen direkten Effekt auf die Atmungskette hat, wurden weiterhin isolierte Mitochondrien von non-tg und transgenen Mäusen mit spezifischen Inhibitoren der Komplexe I bis V gestresst. Die anschließende Bestimmung des Membranpotentials erbrachte, dass nach der Hemmung des Komplexes IV mit Natriumazid Thy-1 APP transgene Mäuse mit einem signifikant stärkeren Abfall des Membranpotentials reagieren als non-tg Tiere.

Der beobachtete Phänotyp könnte durch eine Vielzahl von Mechanismen verursacht werden, wie u.a. durch:

- a) eine erhöhte Membranpermeabilität der inneren Mitochondrienmembran;
- b) einer Abnahme des COX-Gehaltes;
- c) einer reduzierten COX-Aktivität bzw.
- d) in einer Kombination der oben genannten Ursachen.

Eine konkrete Aussage über die verantwortliche/n Ursache/n kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden. Allerdings wird durch die direkte Bestimmung der Komplex IV-Aktivität eine signifikante Reduktion der COX-Aktivität in Thy-1 APP Mäusen bestätigt. Passend zu diesem Befund konnten in zahlreichen Studien eine Beeinträchtigung der COX-Aktivitäten bei AD-Patienten nachgewiesen werden (Cottrell *et al.*, 2002;Cardoso *et al.*, 2004a). Ergänzend wurden in Blutplättchen von AD-Patienten ebenfalls erniedrigte Komplex IV-Aktivitäten beobachtet (Bosetti *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung für die beeinträchtigte COX-Aktivität Thy-1 APP transgener Tiere könnte das Vorhandensein von APP bzw. A β im Mitochondrium und folglich eine direkte Hemmung der Aktivität sein. Diese Theorie wird durch eine Vielzahl von Studien bekräftigt. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass APP in neuronalen Mitochondrien von APP-transgenen Tieren lokalisiert ist und mitochondriale Dysfunktion auslöst (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003). In Übereinstimmung konnte Keil *et al.* (2004) die Co-Lokalisation des APP-Antikörpers mit dem mitochondrienselektiven ATP-Synthase Antikörper in APPsw-PC12-Zellen feststellen (Keil *et al.*, 2004). Ferner wiesen Lustbader und Mitarbeiter (2004) A β , gebunden an ABAD (A β -binding alcohol dehydrogenase), in Mitochondrien von AD-Gehirnen und von APP-transgenen Mäusen nach. Dies war ebenfalls mit einer erhöhten Cytochrom-c-Freisetzung, verstärkter ROS-Bildung und erhöhter Apoptoserate assoziiert (Lustbader *et al.*, 2004). Daneben wurde in Mitochondrien kortikaler Neurone von AD-Patienten eine Anreicherung von A β demonstriert (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass A β COX direkt inhibiert (Parks *et al.*, 2001;Casley *et al.*, 2002). Angesichts dessen ist zu vermuten, dass die Verminderung der COX-Aktivität in Thy-1 APP transgenen Mäusen durch direkte Effekte des überproduzierten doppelmutierten A β auf die Mitochondrien hervorgerufen wird. Da die Aktivitäten der Atmungskettenenzyme einen direkten Einfluss auf den Energiemetabolismus haben, könnte eine derartige Aktivitätsminderung eines Enzyms die neuronale Degeneration, wie sie ebenfalls bei der AD zu beobachten ist, teilweise bedingen.

Die Hemmung der COX-Aktivität könnte möglicherweise durch eine strukturelle Veränderung des Enzyms bedingt sein. Eine ähnliche Erklärung wurde bereits von Parker und Mitarbeitern (1991) vorgeschlagen. Sie vermuten, dass die Bindung von A β an das Enzym zu strukturellen Veränderungen der kinetischen Bindestellen führt, welche zu einer Affinitätsänderung für Cytochrom c resultiert (Parker, Jr., 1991). So konnten sie nachweisen, dass isolierte COX aus AD-Gehirnen einen Verlust von zwei Cytochrom c-Bindestellen aufweist.

Ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang von mitochondrialer Dysfunktion und A β wird durch unsere Sauerstoffverbrauchsmessungen demonstriert. Die Inkubation mit extrazellulär zugefügtem A β zu non-tg Mitochondrien führt zu einer Verminderung der Komplex I-abhängigen State 3-Atmung. In diesem Zustand der Atmung stehen den Mitochondrien ausreichend Sauerstoff, Substrate (Malat/Glutamat), ADP und Phosphat zur Verfügung, sodass die oxidative Phosphorylierung mit maximaler Geschwindigkeit abläuft. Demgegenüber übt A β keine Effekte auf die Komplex II-abhängige Atmung aus. Durch Zugabe des Substrates Succinat werden die Elektronen auf der Stufe des Komplexes II in die Atmungskette eingeschleust und über die Komplexe III und IV, ohne Mitwirkung des Komplexes I, auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff übertragen. Da hierbei keine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs zu beobachten ist, kann vermutet werden, dass die beobachtete Verminderung der Komplex I-abhängigen State 3-Atmung nach extrazellulärer A β -Behandlung ebenfalls in einer Beeinträchtigung des Komplexes I begründet liegt. Die reduzierte State 3-Atmung manifestiert sich ebenfalls in einer verminderten RCR. Demzufolge scheint A β zu einer Verminderung der relativen Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkomplexe zu führen. Weiterhin ermöglicht man durch die Zugabe von Entkopplern wie FCCP, einen passiven Rückfluss von H⁺ über die innere mitochondriale Membran, was in einer Aufhebung des elektrochemischen Potentials resultiert. In diesem Zustand wird die im Protonengradienten gespeicherte Energie nicht im ATP gespeichert, sondern als Wärme freigesetzt. Dieser Zustand ist durch einen erhöhten

Sauerstoffverbrauch gekennzeichnet. Hierbei zeigte sich, dass die Inkubation mit A β ebenfalls zu einer Verminderung der FCCP-entkoppelten Atmungsrate führt.

Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer kürzlich erschienenen Studie von Aleari *et al.* (2005). Die Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von verschiedenen A β -Formen auf die mitochondriale Atmungskette. Sie konnten demonstrieren, dass der Anstieg der mitochondrialen Membranviskosität durch A β_{1-42} mit einem Abfall des ATP/O Verhältnisses assoziiert ist (Aleari *et al.*, 2005). Weiterhin schlagen Sie verschiedene Mechanismen der A β -Toxizität auf die mitochondriale Funktion vor, wie unter anderem eine direkte inhibitorische Wirkung auf die einzelnen Atmungsketten-Komplexe. So konnten sie eine 10%-ige Inhibition des Komplexes I, eine 23%-ige Hemmung des Komplexes III und eine bis zu 51%-ige Hemmung der COX nachweisen. Weiterhin postuliert diese Arbeitsgruppe, dass A β die Produktion von mitochondrialem H $_2$ O $_2$ stimuliert und zu einer Cytochrom c Freisetzung führt (Aleari *et al.*, 2005). Unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit den in der Literatur veröffentlichten Daten sprechen für eine kausale Verbindung der A β -Toxizität mit der mitochondrialen Dysfunktion.

Von großem Interesse hierbei ist, dass isolierte Mitochondrien 6-8 Monate alter Thy-1 APP Tiere einen identischen Sauerstoffverbrauch wie non-tg Tiere aufweisen. Dieses Ergebnis ist zunächst überraschend, da transgene Mäuse in diesem Alter bereits durch mitochondriale Defizite, wie ein verringertes Membranpotential, reduzierte ATP-Level (Hauptmann *et al.*, submitted) und eine signifikante Reduktion der COX-Aktivität gekennzeichnet sind. Vor allem die verminderte Komplex IV-Aktivität scheint im Widerspruch mit der nicht beeinträchtigten Komplex I-abhängigen Atmung Thy-1 APP transgener Tiere zu stehen. Durch die Zugabe von Malat/Glutamat werden die Elektronen auf der Stufe des Komplexes I in die Atmungskette eingeschleust und über die Komplexe III und IV auf Sauerstoff übertragen. Die Effizienz der Atmungskette hängt in diesem Zustand von der Intaktheit aller drei Atmungsketten-Komplexe

ab. Auf Grund dessen würde man erwarten, dass sich das Defizit der Komplex IV-Aktivität im Sauerstoffverbrauch widerspiegeln müsste. Es ist daher anzunehmen, dass der beobachtete Defekt des Komplexes IV hierbei allerdings noch nicht limitierend auf die gesamte Atmungskette wirkt.

Diese denkbare Erklärung stützt sich auf die Annahme, dass Enzymaktivitäten während der Evolution so angelegt wurden, dass gewisse Enzymverminderungen keine schwerwiegenden Defekte verursachen, da die Enzyme in überschüssiger Kapazität vorhanden sind. Hiernach teilen sich alle Enzyme eines metabolischen Systems die Kontrolle über die Flussrate, wobei eine Dominanz eines einzelnen Enzyms entfällt (Kacser and Burns, 1979). Bei Aktivitätsverminderungen einzelner Enzyme, wie in unserem Fall einer Reduktion der COX-Aktivität um 30,44% in 6-8 Monate alten Thy-1 APP transgenen Tieren, müsste demzufolge mit dem Phänomen überschüssiger Enzymkapazitäten im Vergleich zum gesamten metabolischen System gerechnet werden. Weiterhin basiert die in dieser Arbeit verwendete biochemische Methode zur Bestimmung der Komplex IV-Aktivität auf dem Prinzip der photometrischen Konzentrationsbestimmung des durch die Enzymreaktion umgewandelten Substrates Cytochrom c unter maximaler Auslastung des Enzyms. Im Gegensatz hierzu spiegelt die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches isolierter Mitochondrien die gesamte Kapazität der Elektronentransportkette wider. Ein weiterer Faktor der berücksichtigt werden muss ist die Tatsache, dass in unseren Versuchen der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien unter experimentellen Bedingungen gemessen wurde. Diese können sich von den Bedingungen *in vivo* unterscheiden und somit einen Rückschluss auf die tatsächliche respiratorische Kapazität *in vivo* erschweren. So können bekannte Regulatoren der Atmungsfunktion, wie unter anderem NO während der Isolation der Mitochondrien verloren gehen, so dass deren zusätzlicher Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien nicht bestimmt wird. *In vivo* bzw. in ganzen Zellen hingegen können solche Regulatoren vorhanden sein und die respiratorische Kapazität beeinflussen (Brookes *et al.*, 2001).

In nachfolgenden Experimenten zeigte sich, dass mit erhöhter A β -Produktion im Alter, die anderen Komplexe der Atmungskette nicht mehr in der Lage sind dieses Defizit auszugleichen. In einem Alter von 17 Monaten weisen Thy-1 APP transgene Tiere eine reduzierte State 3-Atmung auf. Es ist daher zu vermuten, dass Mitochondrien Thy-1 APP transgener Tiere mit dem Alter eine verminderte Kapazität aufweisen, Sauerstoff in Anwesenheit von Komplex I-Substraten und einer limitierten Menge an ADP zu metabolisieren. Ferner konnten reduzierte Komplex I- und Komplex IV-Aktivitäten in isolierten Gehirn-Mitochondrien von alten Mäusen und Ratten festgestellt werden (Nakahara *et al.*, 1998; Navarro, 2004; Navarro and Boveris, 2004). Daher ist weiterhin zu vermuten, dass die Aktivitätsverluste im Alter das Komplex I- und IV-Defizit Thy-1 APP transgener Mäuse verstärken, wodurch eine Beeinträchtigung der Atmungsrate resultiert. Es ist davon auszugehen, dass der beobachtete Phänotyp in alten Thy-1 APP transgenen Tieren durch einen synergistischen Effekt von Alterseffekten und der A β -Pathologie hervorgerufen wird (vgl. Abb. 4.2).

Eine mögliche Ursache für den toxischen Effekt von A β , könnte in der Membran-destabilisierenden Eigenschaft begründet liegen (Müller *et al.*, 2001). Weiterhin könnte die Toxizität von A β zu einer direkten Hemmung der einzelnen Atmungsketten-Komplexe führen.

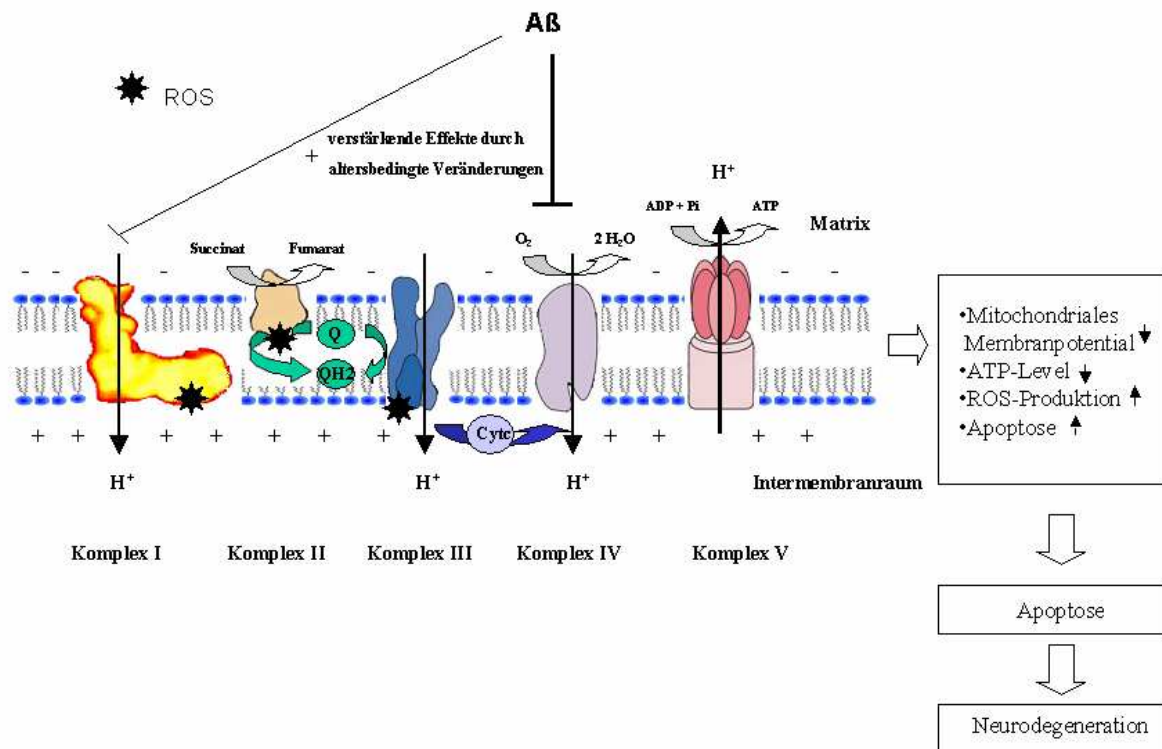


Abbildung 4-2: Synergistischer Effekt des Alters und Aβs auf die mitochondriale Dysfunktion

Die Aβ-Pathologie ist mit einer signifikanten Reduktion der COX-Aktivität assoziiert. Zusammen mit der altersbedingten Abnahme der Komplex I und Komplex IV-Aktivität führt dies zu einer verminderten Effizienz der Kopplung zwischen den Atmungskettenkomplexen in alten Thy-1 APP transgenen Tieren.

Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer kürzlich erschienenen Studie von Caspersen et al. (2005). Diese Gruppe arbeitete mit isolierten Mitochondrien von Tg mAPP Mäusen. Sie beobachteten vergleichbare Sauerstoffverbrauchswerte in 4 Monate alten, tendenziell erniedrigte Level in 8 Monate alten und statistisch erniedrigte Level in 12 Monate alten Tg mAPP Mäusen im Vergleich zu jeweils gleich alten non-tg Mäusen (Caspersen *et al.*, 2005). Durch die Bestimmung der Aβ₁₋₄₂-Level in den Gehirnen der Mäuse konnten sie zudem zeigen, dass Aβ₁₋₄₂ schrittweise in Mitochondrien akkumuliert und 12 Monate alten Tg mAPP Mäuse eine Konzentration von ~2800 pg/mg des mitochondrialen Gesamtproteins erreicht (Caspersen *et al.*, 2005). Weiterhin demonstrierten sie, dass eine Assoziation zwischen der zunehmenden Akkumulation von Aβ mit veränderter mitochondrialer Funktion

auf der Ebene des Sauerstoffverbrauchs und der Funktion der Komplexe III und IV besteht. In Übereinstimmung wurde ebenfalls eine Beeinträchtigung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung in Gehirnen von AD-Patienten beschrieben (Chagnon *et al.*, 1995). Ebenso war der Grad dieser Beeinträchtigung proportional mit dem klinischen Gesamteindruck (Blass, 2003).

4.2.1.3 Einfluss von intrazellulärem A β auf die mitochondriale Funktion

Die von vielen Wissenschaftlern lange Zeit favorisierte „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ postuliert, dass die Akkumulation von A β der erste und entscheidende Schritt bei der Entstehung der AD ist (Selkoe, 1997). Alle anderen Erscheinungen, inklusive dem Auftreten von Tau-Ablagerungen sind dieser Hypothese zufolge als sekundär anzusehen. Die anfängliche „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ deckt einen großen Teil zur Erklärung der AD-Pathogenese ab. Dennoch fehlen einige Details und einige neuere Befunde passen nicht in diese einfache Hypothese, wie unter anderem dass neuronale und synaptische Funktionsstörungen bereits vor dem ersten Auftreten von A β -Plaques und neurofibrillären Tangles zu beobachten sind (de la Torre, 2004). Ein weiterer kritischer Aspekt ist, dass senile A β -Plaques im Gehirn von AD-Patienten in geringem Ausmaß in der Amygdala, dem Hippokampus und dem Gyrus parahippokampalis konzentriert sind. Das Vorkommen der NFTs tritt dagegen verstärkt im limbischen System auf und korreliert eng mit den Orten der neuronalen Degeneration (Braak *et al.*, 1993). Zudem konnte nicht in jedem FAD-APP-Tiermodell neuronaler Zelltod nachgewiesen werden. Deswegen wird derzeit diskutiert, dass möglicherweise intrazelluläres A β für das Absterben von Neuronen verantwortlich ist. So konnte La Ferla und Mitarbeiter zeigen, dass transgene Mäuse, welche intrazelluläres A β exprimieren, neuronale Degeneration aufweisen (LaFerla and Oddo, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Daten sind Beobachtungen von Studien mit transgenen Mausmodellen, welche A β intraneuronal akkumulieren, ohne dass es zur Bildung von

extrazellulären Plaques kommt. Interessanterweise konnte in den Gehirnen dieser Tiere eine Hyperphosphorylierung von Tau (Echeverria *et al.*, 2004) und ein Absterben von Neuronen nachgewiesen werden (Chui *et al.*, 1999). Hieraus lässt sich schließen, dass die Bildung von extrazellulären A β -Plaques nicht eine Notwendigkeit ist, eine Tau-Hyperphosphorylierung und eine Degeneration auszulösen. Vielmehr weisen diese Studien auf die wichtige Rolle von intrazellulärem A β hin.

Im Gegensatz zur „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ postuliert die so genannte „Intrazelluläre Hypothese“, dass für die neuronale Funktionsstörung und Degeneration eine stufenweise intraneuronale Ansammlung von A β und nicht der extrazelluläre Prozess verantwortlich ist (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2004). Einige neuere Studien unterstützen diese These. Diese konnten zeigen, dass A β innerhalb von Neuronen gebildet wird und sich innerhalb dieser ansammelt (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2004). Weiterhin kommt es zur Freisetzung von A β durch neuronale Lyse und letztendlich zur Bildung von A β -Plaques (D'Andrea *et al.*, 2001). Die Wichtigkeit der frühen synaptischen und mitochondrialen Veränderungen vor Plaque-Entstehung, wird ebenfalls durch die modifizierte „Amyloid-Kaskaden-Theorie“ berücksichtigt (Selkoe, 2002). Aufgrund dessen ist ein wichtiger derzeitiger Diskussionspunkt die Identität der toxischen Formen von A β *in vivo* und inwiefern extrazelluläre A β -Ablagerungen oder die Überproduktion von intrazellulärem A β den Krankheitsprozess der AD vorantreiben.

Die Daten dieser Arbeit weisen daraufhin, dass vermutlich intrazellulär erhöhte A β -Level bereits zu mitochondrialer Dysfunktion führen. In 3 Monate alten Thy-1 APP Tieren, welche noch keine A β -Plaques ausbilden, konnte ein signifikant erniedrigtes Membranpotential festgestellt werden, ähnlich dem Abfall in 6-8 Monate alten Mäusen. In Übereinstimmung weisen Mäuse in einem Alter von 3 Monaten bereits erniedrigte ATP-Level auf (Hauptmann *et al.*, submitted). Zwar manifestieren sich diese Effekte noch nicht in einer veränderten RCR, dennoch weisen sie daraufhin, dass intrazelluläres A β eine wichtige Rolle bei der

Entwicklung der mitochondrialen Dysfunktion spielen könnte. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist anzunehmen, dass zunächst intrazelluläres A β zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion führt, wie einem erniedrigten Membranpotential und verringerten ATP-Leveln (Hauptmann *et al.*, 2006). Mit zunehmendem Alter und dem Auftreten von extrazellulären A β -Ablagerungen wird die Beeinträchtigung der Atmungskette verstärkt. Allerdings kommt es erst durch die weitere Verminderung der Komplex I- und Komplex IV-Aktivität als Konsequenz des Alterns zu einer Verminderung der RCR und folglich zu einer Verringerung der relativen Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkomplexe. Weitere Studien sind allerdings notwendig, um das genaue Zusammenspiel extrazellulärer A β -Ablagerungen und erhöhter intrazellulärer A β -Level für den Krankheitsverlauf zu bestimmen.

4.2.2 Mitochondriale Funktion und Tau

4.2.2.1 Einfluss von P301L-Tau auf das mitochondriale Transmembranpotential

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Tau-Pathologie auf die mitochondriale Funktion untersucht. Die Tau-Pathologie ist ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie der AD und der FTDP-17. Bisher sind bei der AD noch keine Mutationen im Tau-Protein bekannt. Durch die Identifizierung von Tau-Mutationen bei der familiären Form der FTDP-17 konnte allerdings bewiesen werden, dass eine Dysfunktion des Tau-Proteins in der Lage ist Neurodegeneration und Demenz auszulösen.

Die Daten in dieser Arbeit deuten daraufhin, dass die Tau-Pathologie eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung mitochondrialer Dysfunktion in Zusammenhang mit der AD einnimmt. Die Expression der human pathogenen Mutation P301L führt in isolierten Mitochondrien 15 Monate alter Mäuse zu

einem tendenziell erniedrigten Membranpotential. In diesem Alter ist der Abfall noch nicht signifikant. In Anbetracht der weiteren Daten dieser Arbeit kann allerdings vermutet werden, dass das Membranpotential zu einem späteren Alter signifikant vermindert ist. In Übereinstimmung mit dieser These weisen P301L transgene Mäuse in einem Alter von 12 Monaten unveränderte ATP-Level auf, welche im Alter signifikant verringert sind (David *et al.*, 2005).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Tau-Protein nicht nur Mikrotubuli stabilisiert, sondern sie ebenfalls bei einer Fehlfunktion verkleben und unbrauchbar machen kann. Dies führt zu einer Störung der vom Zellinneren nach außen gerichteten Transportvorgänge, so dass es zu einer Unterversorgung der äußeren Bereiche der Zelle kommt (Mandelkow *et al.*, 2003). Durch diese Störung können Mitochondrien nicht mehr in die Zellfortsätze einwandern und verbleiben folglich im Zellkörper liegen. Die Folge ist eine Unterversorgung der Zellfortsätze, was folglich zum Absterben der Synapsen und zur Apoptose der ganzen Nervenzelle führt. In Übereinstimmung mit dieser These zeichnet sich in einem Zellmodell die Überexpression von WT-Tau in einer Beeinträchtigung des Plus-Ende gerichteten Transportes ab, wodurch es zu verminderten Mitochondrien-Level in diesen Neuriten kommt (Ebner *et al.*, 1998). Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser Pathomechanismus ebenfalls in unserem Tiermodell auftritt, ist die Gesamtmenge neuronaler Mitochondrien von P301L- und WT-Mäusen identisch. Weiterhin konnte durch Co-Immunofärbungen von Mitochondrien und Mikrotubuli und einer nachfolgenden Bestimmung der proximalen und distalen Mitochondrien von Neuriten in der CA1-Region des Hippokampus eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Transportes entlang der Neuriten in P301L-Mäusen weitgehend ausgeschlossen werden (David *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass P301L-Tau einen anderen pathogenen Mechanismus als überexprimiertes WT-Tau induziert oder dass der Effekt von Tau in Zellkulturen auf den mitochondrialen Transport nicht auf den in Mausmodellen übertragen werden kann. Alternativ könnte die Akkumulation von Tau eine direkte Auswirkung auf die mitochondriale Funktion ausüben. So wurde ebenfalls in

zunehmendem Maße die Ansammlung der unlöslichen ATP-Synthase α -Kette assoziiert mit NFTs in AD-Gehirnen festgestellt (Sergeant *et al.*, 2003).

4.2.2.2 Einfluss von Tau auf die mitochondrialen

Atmungsketten-Komplexe und die Atmungskette

In Übereinstimmung mit der Down-Regulierung der kernkodierten Untereinheiten der Komplexe I und V (David *et al.*, 2005), weisen P301L transgene Mäuse nach Inkubation mit den spezifischen Komplexinhibitoren Rotenon (Komplex I) und Oligomycin (Komplex V) eine stärkere Abnahme des Membranpotentials im Vergleich zu WT-Mäusen auf. Die erhöhten Empfindlichkeiten der Komplexe I und V deuten auf einen möglichen Defekt der Elektronentransportkette hin. Durch die Bestimmung der Komplex I-Aktivität bestätigte sich diese erste Vermutung. So weisen 12 Monate alte P301L transgene Mäuse einen funktionellen Defekt der NADH-Ubiquinon-Reduktase auf, welcher durch eine Reduktion der Aktivität um 30,75% gekennzeichnet ist. Weiterhin wurden die Atmungsraten isolierter Mitochondrien von P301L transgenen Mäusen mittels einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Durch die Zugabe von Malat/Glutamat werden die Elektronen über den Komplex I in die Atmungskette eingeschleust. Es war zunächst zu erwarten, dass der funktionelle Defekt des Komplexes I nach Zugabe von lediglich Komplex I-Substraten sich auch in einer verminderten Atmungsrate widerspiegelt. Allerdings führt die Expression von P301L-Tau in 12 Monate alten Mäusen zu keiner ersichtlichen Beeinträchtigung der Komplex I-abhängigen State 3-, State 4- sowie FCCP entkoppelten Atmung. Daher ist zu vermuten, dass der Komplex I-Defekt durch die anderen Atmungsketten-Komplexe ausgeglichen werden kann. Mit dem Alter und demzufolge einer Zunahme der Tau-Pathologie greifen diese Kompensationsmechanismen nicht mehr. Mitochondrien von 24 Monate alten Mäusen sind durch eine signifikante Reduktion der State 3-Atmung gekennzeichnet. Diese Verminderung manifestiert sich ebenfalls in einer reduzierten RCR. Dies spricht für eine Beeinträchtigung der relativen Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkette. Weiterhin führt

P301L-Tau im Alter zu einer verminderten FCCP entkoppelten Atmungsrate. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen weisen P301L transgene Mäuse erst im Alter signifikant reduzierte ATP-Level auf (David *et al.*, 2005). Ferner stimmen unsere Ergebnisse mit früheren Studien überein, welche die AD mit einer zum Teil entkoppelten mitochondrialen Atmungskette in Verbindung bringen (Sims *et al.*, 1987). Überdies wird die AD mit einer veränderten Komplex I-Untereinheit (Aksenov *et al.*, 1999) und verminderten ATP Synthase-Leveln assoziiert (Schagger, 1996). In Primaten konnte zudem gezeigt werden, dass die Komplex I-Aktivität im Alter stark verringert ist (Bowling *et al.*, 1993). Weiterhin wurden reduzierte Komplex I- und Komplex IV-Aktivitäten in isolierten Gehirn-Mitochondrien von alten Mäusen und Ratten festgestellt (Nakahara *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2004; Navarro and Boveris, 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die altersbedingten Aktivitätsverluste das Komplex I-Defizit in P301L transgenen Mäusen verstärken, wodurch im Alter eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungsrate resultiert (vgl. Abb. 4.3).

Die P301L-Mutation führt weiterhin zu einer Veränderung des oxidativen Status im Gehirn von transgenen Mäusen. So sind 24 Monate alte P301L transgene Mäuse durch erhöhte Level an Superoxidradikalanionen und cytosolischem H_2O_2 gekennzeichnet (David *et al.*, 2005). Die erhöhten ROS-Level könnten eine direkte Konsequenz der beeinträchtigten Komplex I-Aktivität sein. Turrens und Boveris *et al.* konnten bereits aufzeigen, dass eine Hemmung der Komplex I-Aktivität zu einem Anstieg der Superoxidbildung führt (Turrens and Boveris, 1980). Wegen der hohen Reaktivität der ROS können sie praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zellen reagieren, was je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis zum Zelltod führen kann. Hierbei ist erstaunlich, dass P301L transgene Mäuse im Alter reduzierte Lipidperoxidations-Level aufweisen, obwohl sie gleichzeitig erhöhten ROS-Leveln ausgesetzt sind (David *et al.*, 2005). Eine denkbare Erklärung hierfür ist, dass Zellen welche durch Lipidperoxidation beeinflusst sind, durch Apoptose entfernt werden. Allerdings konnten keine Unterschiede bezüglich der Level apoptotischer Zellen zwischen

P301L- und WT-Mäusen mittels TUNEL-Färbung festgestellt werden (David *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass P301L transgene Mäuse über eine Hochregulierung antioxidativer Enzyme die vermehrt gebildeten ROS abfangen, noch bevor es zu einer Schädigung der Membranen kommt. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung weisen P301L transgene Mäuse eine erhöhte Aktivität der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Reduktase auf (David *et al.*, 2005). Weiterhin wird diese These durch die Ergebnisse von Schüssel *et al.* untermauert. Sie konnten demonstrieren, dass in alten Mäusegehirnen erhöhte Aktivitäten der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase gegen Lipidperoxidation schützen (Schussel *et al.*, 2004). Weiterhin ist die Superoxid-Dismutase *in vivo* als auch *in vitro* in der Lage, Lipidperoxidation zu verhindern (Tien *et al.*, 1981; Bonnes-Taourel *et al.*, 1993).

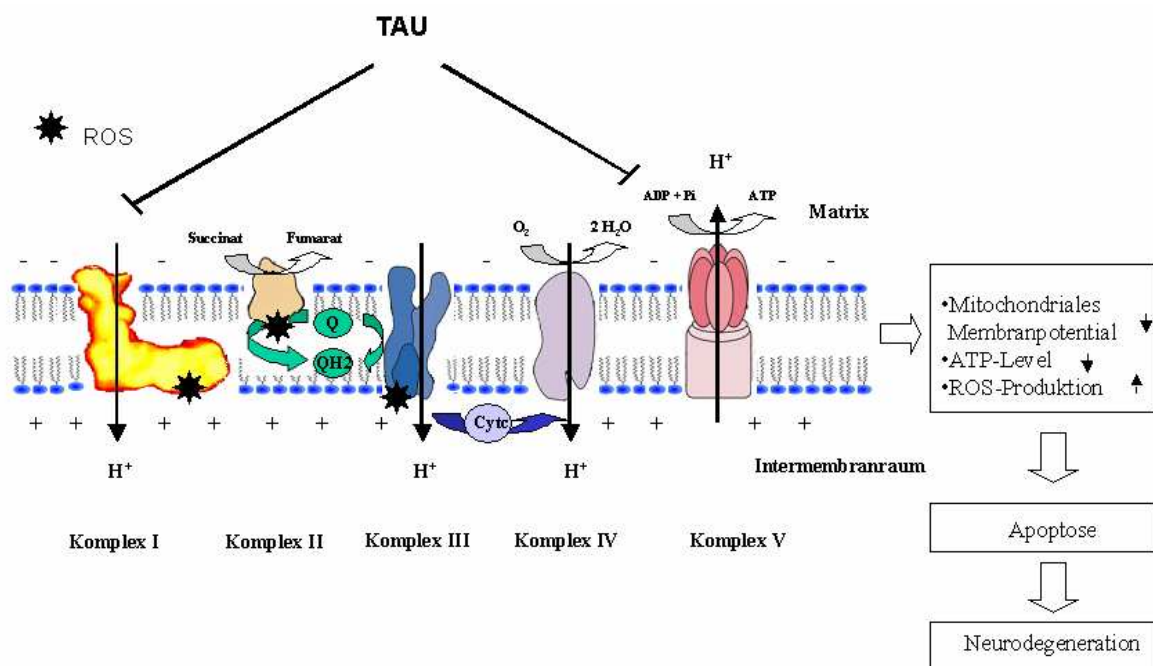


Abbildung 4-3: Synergistischer Effekt des Alters und Tau auf die mitochondriale Dysfunktion

Die Tau-Pathologie ist mit einer signifikanten Reduktion der Komplex I-Aktivität assoziiert. Zusammen mit der altersbedingten Abnahme der Komplex I und Komplex IV-Aktivität führt dies zu einer verminderten Effizienz der Kopplung zwischen den Atmungskettenkomplexen in alten P301L transgenen Tieren.

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse die These, dass die Tau-Pathologie eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen und metabolischen Dysfunktion einnimmt, wie sie ebenfalls bei der AD zu beobachten ist. Es bleibt dennoch unklar, in welcher Weise Tau-Ansammlungen diese Veränderungen bewirken.

4.2.2.3 Effekte von A β auf die mitochondriale Atmungskette

P301L transgener Mäuse

Man unterscheidet verschiedene Reifegrade von A β und zwar je nach Morphologie, Bindungseigenschaften bezüglich des Farbstoffes Kongo Rot und der Assoziation zellulärer Elemente wie Neuriten oder Mikroglia. Allen Stufen gemeinsam ist jedoch der Hauptbestandteil, das A β -Peptid (Glennner and Wong, 1984). Extrazelluläres, sezerniertes A β lagert sich bedingt durch eine Umlagerung von einer α -Helix zu einer β -Faltblatt-Konformation zu Oligomeren zusammen. Hieraus bilden sich Protofibrillen (PF), die sich dann zu Fibrillen-Strukturen zusammenlagern, welche die Vorstufe der neuritischen Plaques darstellen (Jarrett *et al.*, 1993a; Jarrett *et al.*, 1993b). Nach der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ ist der Beginn und die Progression der Erkrankung eine Folge der vermehrten Produktion von A β -Peptiden und ihrer progressiven Akkumulation in senile Plaques (Selkoe, 1998). Während die Bedeutung von A β für die Pathogenese der AD aufgrund zahlreicher Tiermodell- und Zellkulturdaten angenommen werden kann, ist die Rolle der extrazellulär abgelagerten Plaques (d.h. aggregiertes/ fibrilläres A β) aufgrund der schlechten Korrelation mit dem synaptischen bzw. neuronalen Schaden noch umstritten. Neuerdings wird auch A β -Monomeren und -Dimeren bzw. bestimmten Vorstufen der A β -Fibrillen, den so genannten Protofibrillen (PF), eine im Sinne der Neurotoxizität pathogen bedeutsame Rolle bei der Progression der AD zugeschrieben (Harper and Lansbury, Jr., 1997; Harper *et al.*, 1997a; Harper *et al.*, 1997b; Hartley *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2002b; Demuro *et al.*, 2005). Während A β -Monomere und -Dimere in gemischten Nervenzellkulturen konzentrations- und zeitabhängig neurotoxisch zu wirken

scheinen, führen PF zusätzlich zu messbaren Potentialveränderungen an Nervenzellmembranen und ähneln damit in ihrer biologischen Wirkung den reifen A β -Fibrillen. Dies deutet zumindest auf eine mögliche Mitbeteiligung dieser A β -Vorstufen bei dem Prozess der Krankheitsprogression hin (Hartley et al, 1999). Des Weiteren wurden dissoziierte Hirnzellen von WT-Tau-Mäusen mit A β -Monomeren, -Dimeren und -Fibrillen behandelt. Die monomere Form des A β_{1-42} -Peptides zeigte im Vergleich zu der oligomeren und fibrillären Formen keine Toxizität auf. Ferner führte die Inkubation mit fibrillärem A β zu einer stärkeren Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials als oligomeres A β . In Übereinstimmung hiermit weisen lösliche A β -Monomere in Nervenzellkultur-Experimenten nur eine geringe Toxizität im Vergleich zu fibrillärem A β auf (Lorenzo and Yankner, 1994;Howlett *et al.*, 1995;Busciglio *et al.*, 1995). Diese Resultate stehen im Einklang mit *in vivo* Beobachtungen, die zeigten, dass neuropathologische Veränderungen in der Nachbarschaft neuritischer Plaques (mit fibrillärem A β) ausgeprägter sind als die Veränderungen in der Umgebung diffuser Plaques, welche überwiegend amorphes, nicht-fibrilläres A β -Material enthalten (Abe *et al.*, 1989;Mann, 1989a;Mann, 1989b).

Eine strittige Frage in der AD-Forschung bleibt dennoch die Toxizität der unterschiedlichen Aggregationszustände des A β . Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass A β -Oligomere und -Fibrillen in unserem Versuchsdesign auf die mitochondriale Funktion gleichermaßen toxisch wirken. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Toxizität der beiden verschiedenen A β -Aggregationszustände beobachtet werden, weder bei WT- noch bei P301L-Mäusen. So führt in alten Mäusen sowohl die Inkubation mit A β_{1-42} -Fibrillen als auch -Oligomeren zu einer gleichgroßen Reduktion der State 3-Atmung, der RCR und der FCCP entkoppelten Atmung. Weiterhin weisen isolierte Mitochondrien von 15 Monate alten WT-Mäusen nach Inkubation mit A β_{1-42} -Fibrillen und -Oligomeren keine veränderte RCR auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die in einem vorherigen Kapitel bereits angesprochenen Kompensationsmechanismen der anderen nicht durch A β affizierten

Atmungsketten-Komplexe sein. Im Alter sind diese Mechanismen allerdings nicht mehr in der Lage diese Defizite auszugleichen, so dass WT-Mitochondrien nach Inkubation mit A β ebenfalls beträchtliche Defekte aufweisen.

In offenbarem Widerspruch zu dieser Beobachtung stehen Experimente, die besagen, dass die Neurotoxizität des A β -Peptides von seinem Aggregationsgrad abhängig ist (Walsh *et al.*, 2002a; Walsh *et al.*, 2002b). Laut der erstmals von Oda *et al.* (1994) aufgestellten Oligomer-Hypothese, sind weder A β -Monomere noch unlösliche Fibrillen, sondern lösliche A β -Oligomere für die Neuronen- bzw. Synapsenschädigung bei der AD verantwortlich (Oda *et al.*, 1994; Oda *et al.*, 1995). So konnte gezeigt werden, dass A β -Oligomere und PF ebenfalls toxische Effekte auslösen und somit unter Umständen die toxischere Form von A β darstellen (Walsh *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2002a; Walsh *et al.*, 2002b). Die A β -Oligomerisierung beginnt wahrscheinlich intrazellulär in Neuronen (Walsh *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Anreicherung von A β wurde bereits in humanen Gehirnen bzw. in transgenen Mäusen nachgewiesen (Takahashi *et al.*, 2002; Oddo *et al.*, 2003b). Weiterhin wird dies in Zusammenhang mit synaptischer Dysfunktion, einem frühen Ereignis der AD, gebracht (Selkoe, 2002). Interessanterweise korreliert der Schweregrad der synaptischen und kognitiven Dysfunktion ebenfalls besser mit den löslichen als mit den unlöslichen A β -Spiegeln (McLean *et al.*, 1999b; Lue *et al.*, 1999).

Unsere Daten stehen daher im Widerspruch mit den zuvor erwähnten Studien. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen A β -Spezies falsch gewählt wurden. In der Annahme, dass die von uns eingesetzten A β -Konzentrationen möglicherweise zu hoch gewählt wurden, würden sich unterschiedliche Effekte aufgrund der zu hohen konzentrationsabhängigen Toxizität nicht herauskristallisieren. Allerdings wurden ähnliche Versuche bereits durch Aleardi *et al.* durchgeführt. In deren Studie wurde die Toxizität von A β_{1-42} und A β_{25-35} miteinander verglichen (Aleardi *et al.*, 2005). Die von Ihnen gewählten Konzentrationen waren 10 bzw.

100 μM und somit wesentlich höher als die von uns gewählte Konzentration von 3,75 μM . Des Weiteren wurden die von uns eingesetzten Konzentrationen durch Vorversuche empirisch ermittelt und die kleinste wirksame Konzentration für die nachfolgenden Versuche festgelegt. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die von uns selbst hergestellte Fibrillen-Lösung eine Mischung unterschiedlicher Aggregationszustände, wie A β -Fibrillen, -Monomeren und -Oligomeren enthält. Aufgrund dessen kann der toxische Effekt der Fibrillen-Lösung nicht ausschließlich auf fibrilläres A β begrenzt werden.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass isolierte Mitochondrien von P301L transgenen Mäusen empfindlicher gegenüber A β reagieren als die von WT-Tieren. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass dissoziierte Hirnzellen von P301L-Mäusen empfindlicher gegenüber extrazellulärem A β reagieren als WT-Mäuse. Von großem Interesse hierbei ist, dass diese Unterschiede lediglich bei dissoziierten Hirnzellen des Zerebrums auftreten und nicht des Zerebellums, einem Gehirnareal mit geringeren P301L-Tau-Leveln (David *et al.*, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Daten, weist eine Vielzahl von Studien auf einen mechanistischen Zusammenhang der Tau-Pathologie mit der A β -Toxizität hin. So konnte Rapoport *et al.* (2002) durch Verwendung von Tau-„knock-out“-Neuronen zeigen, dass Tau essentiell für die A β -induzierte Neurotoxizität ist (Rapoport *et al.*, 2002). Weiterhin wurde durch die Verwendung von FAD-transgenen Tiermodellen auch *in vivo* eine Verbindung zwischen A β und Tau demonstriert. Es wird vermutet, dass in Neuronen, welche kein mutiertes Tau besitzen, die Neurotoxizität von A β durch dynamischere Mikrotubuli-Populationen eventuell verhindert wird. Ferner konnte durch die Verwendung verschiedener FAD-transgener Tiermodelle ein kausaler Zusammenhang zwischen A β und Tau nachgewiesen werden. So zeigten unterschiedliche FAD-transgene Mäuse, welche A β überproduzieren, erhöhte Tau-Phosphorylierung und kognitive Defekte auf (Tomidokoro *et al.*, 2001b; Otth *et al.*, 2002; Echeverria *et al.*, 2004). In doppel-transgenen FAD-APP/-PS1-Mäusen wurden, im Gegensatz zu einer früheren Studie von Xu *et al.* (2002), neben hyperphosphoryliertem Tau, PHF-

ähnliche Filamente nachgewiesen (Kurt *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Lewis *et al.* (2001) zu nennen. In FDTP-17-Tau/FAD-APP doppel-transgenen Mäusen, die Plaques und NFTs aufweisen, konnte ein stärkeres Ausmaß an NFTs im Vergleich zu einzel-Tau transgenen Mäusen festgestellt werden. Zusätzlich wurden NFTs in Regionen beobachtet, die in einzel-transgenen Tieren nicht betroffen sind (Lewis *et al.*, 2001). In einem parallelen Ansatz von Götz *et al.* (2001) wurde in einer FDTP17-Tau-transgenen Maus durch die Injektion von fibrillärem A β eine erhöhte Tau-Aggregation in NFTs nachgewiesen (Götz *et al.*, 2001b). Unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit den in der Literatur veröffentlichten Daten sprechen für einen klaren mechanistischen Zusammenhang der A β -Toxizität mit der Tau-Pathologie.

4.2.3 Mitochondriale Funktion im Alter

Der wichtigste Risikofaktor für die Erkrankung an der sporadischen AD stellt das Alter dar (Braak *et al.*, 1996;Mayeux *et al.*, 2003). Durch die steigende Lebenserwartung und einen immer größeren Anteil älterer Menschen in unserer Gesellschaft und den damit zunehmenden alters-assozierten Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, nimmt die Relevanz des Themas Alterung für die Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Medizin einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Funktion der mitochondrialen Atmungskette in höherem Lebensalter, besonders in postmitotischen Geweben wie dem Gehirn, dem Herzen oder der Skelettmuskulatur, abnimmt. So weisen eine Vielzahl von Daten auf die wichtige Rolle der mitochondrialen Atmungskette im Alterungsprozess hin (Navarro and Boveris, 2004;Navarro and Boveris, 2007a;Navarro and Boveris, 2007b). Des Weiteren geht man heutzutage davon aus, dass der normale Hirnalterungsprozess als krankheitsverstärkender Faktor unter anderem bei der AD-Pathogenese agiert und möglicherweise krankheitsspezifische und unspezifische Altersfaktoren gemeinsam zum Absterben der Nervenzellen führen (Beckman and Ames, 1998;Eckert *et al.*, 1999).

4.2.3.1 Einfluss des Alters auf das mitochondriale Transmembranpotential

Das mitochondriale Membranpotential stellt einen sehr wichtigen Marker der mitochondrialen Funktion dar. Ausgehend von NADH werden die Elektronen über die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zum terminalen Akzeptor Sauerstoff transportiert. Dieser Elektronentransfer ist gekoppelt mit dem Pumpen von H^+ in den Intermembranraum, wodurch ein Spannungsgradient (Membranpotential) aufgebaut wird. Unter physiologischen Bedingungen wird ein mitochondriales Membranpotential von ca. -150 bis -180 mV aufrechterhalten. Die Bestimmung des Membranpotentials isolierter Hirn-Mitochondrien von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen ergab, dass mit fortschreitendem Alter es zu einer signifikant stärker ausgeprägten Depolarisation kommt. Die Ursache hierfür könnte zum einen die mit dem Alter exponentiell zunehmende Rate mitochondrialer DNA Mutationen sein. So konnte gezeigt werden, dass mtDNA-Mutationen im Alter, bedingt durch eine höhere Mutationsrate, akkumulieren (Michikawa *et al.*, 1999). Da die mtDNA für subzelluläre Komponenten innerhalb der Mitochondrien kodiert, führen genannte Mutationen ab einem gewissen Ausmaß zu funktionellen Störungen der Elektronentransportkette. Eine weitere denkbare Erklärung könnte in einer erhöhten H^+ -Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran begründet liegen. Im Hinblick auf diese Möglichkeit kann der H^+ elektrochemische Gradient nicht mehr vollständig aufrechterhalten werden, woraus ein Abfall des Transmembranpotentials resultiert. Neuere Daten an Astrozyten von alten Tieren weisen in diesem Zusammenhang auf ein erniedrigtes Membranpotential hin, welches mit einer Beeinträchtigung der H^+ -Impermeabilität der inneren mitochondrialen Membran assoziiert ist (Lin *et al.*, 2007). Interessanterweise besitzen auch isolierte Hirn-Mitochondrien von alten Ratten ein größeres Volumen und eine erhöhte Wasserpermeabilität in hypotonem Medium (Navarro and Boveris, 2004). Ferner ist in kortikalen und striatalen Mitochondrien von

alten Ratten ein erniedrigtes Membranpotential mit einer erhöhten Suszeptibilität der Permeabilitäts-Transition verbunden (LaFrance *et al.*, 2005).

Weiterhin führt die Inkubation mit H₂O₂ und SNP zu einer vom Alter der Mäuse unabhängigen Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials. Auf den ersten Blick erscheint diese Beobachtung überraschend. Eine anerkannte Tatsache hinsichtlich des Alterns ist eine Zunahme der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, welche durch zahlreiche Daten in der Literatur unterstützt werden (Navarro and Boveris, 2004; Navarro and Boveris, 2007a; Navarro and Boveris, 2007b). Alte Mäuse sind zusätzlich zur Schädigung mit exogen zugesetztem H₂O₂ und SNP einer erhöhten endogenen ROS-Belastung als junge Tiere ausgesetzt, wodurch eine stärkere Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in alten Mäusen zu erwarten wäre. Eine denkbare Erklärung für unsere Beobachtung ist, dass der physiologische Alterungsprozess in gesunden Tieren kompensatorisch zu einer Erhöhung der antioxidativen Enzymaktivitäten führt. Demnach würden Mitochondrien von alten Tieren gegenüber der Akkumulation von ROS und folglich vor oxidativen Schäden im Alter geschützt werden. Untermauert wird diese Vermutung durch Daten von Schüssel *et al.* (2005). Sie konnten zeigen, dass der Alterungsprozess im Gehirngewebe von Mäusen zu erhöhten Aktivitäten der Enzyme Cu/Zn-Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase führt. In der gleichen Studie konnten die Autoren zeigen, dass alte Mäuse durch erniedrigte Spiegel an Lipidperoxidationsprodukten, wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal gekennzeichnet sind. Weiterhin resultiert die *in vitro* Stimulation der Lipidperoxidation in erniedrigten oder unveränderten MDA-Spiegeln gealterter Tiere. Diese Beobachtung untermauert die wichtige Rolle antioxidativer Enzyme zum Schutz gegenüber oxidativen Schäden *in vivo* und *in vitro* (Schussel *et al.*, 2003). Es ist daher durchaus vorstellbar, dass eine Erhöhung der antioxidativen Enzyme die endogen hohe ROS-Belastung alter Tiere abschwächen kann. Folglich fallen in unserem Versuchsdesign die Effekte von exogen zugefügtem H₂O₂ und SNP ins

Gewicht, wodurch die gleichgroße Schädigung junger und alter Tiere erklärt werden könnte.

4.2.3.2 Effekte des Alters auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe und die gesamte Atmungskette

Des Weiteren reagieren isolierte Mitochondrien von alten Tieren nach Inkubation mit spezifischen Inhibitoren der Komplexe I, III und IV mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials als junge Tiere. Von besonderem Interesse für die hier vorliegende Arbeit ist vor allem die erhöhte Empfindlichkeit der Komplexe I und IV in alten Mäusen. So wurden Defizite dieser Komplexe ebenfalls bei vorherigen Versuchen mit der Tau- und A β -Pathologie in Verbindung gebracht (vergleiche Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.2). Weiterhin ergab die direkte Messung der Komplex I-Aktivität eine signifikante Verminderung der NADH-Ubiquinon-Reduktase-Aktivität im Alter. Leider war es uns aufgrund von methodischen Problemen nicht möglich, ebenfalls die Aktivität des Komplexes IV zu bestimmen. Allerdings weisen zahlreiche Studien, neben einer selektiv verminderten Enzymaktivität des Komplexes I, auf eine Beeinträchtigung des Komplexes IV in isolierten Mitochondrien aus Leber, Hirn, Herz und Nieren in alten Ratten und Mäusen hin (Chirino *et al.*, 1989; Benzi *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1994; Lenaz *et al.*, 1997; Nakahara *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2002; Navarro, 2004; Navarro *et al.*, 2004; Navarro and Boveris, 2004; Kumaran *et al.*, 2005; Navarro and Boveris, 2007a; Navarro and Boveris, 2007b). Die Ursache für die verminderten Aktivitäten der NADH-Ubiquinon-Reduktase und der COX könnte in einer direkten Hemmung deren Aktivitäten begründet liegen, so z.B. durch im Alter freigesetzte Inhibitoren. Darüber hinaus könnte die Reduktion der Aktivitäten durch eine altersbedingte Modifikation der Enzyme oder einer verringerten Proteinexpression hervorgerufen werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde durch Northern Blot Analysen von murinen Hirn-Mitochondrien demonstriert, dass die Expression der mitochondrial kodierten Gene der Komplexe I, III, IV und V bei

12 und 18 Monate alten Tieren im Vergleich zu der junger Tiere signifikant erhöht ist (Manczak *et al.*, 2005). Dieser Befund deckt sich mit unserer Beobachtung, dass isolierte Hirn-Mitochondrien von 13 Monate alten Tieren noch nicht sensitiver gegenüber Komplexinhibitoren reagieren als die junger Mäuse. Es ist durchaus vorstellbar, dass in 13 Monate alten Tieren die Überproduktion von Elektronentransferproteinen kompensatorisch zur Aufrechterhaltung eines gewissen mitochondrialen Membranpotentials nach Hemmung eines Komplexes beiträgt. Ferner konnte Manczak *et al.* (2005) eine Verminderung der mRNA Expressionslevel in 24 Monate alten Mäuse nachweisen (Manczak *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass die Hochregulierung bestimmter Gene zur Kompensation nur über einen gewissen Zeitraum funktioniert. In Übereinstimmung mit diesem Befund reagieren isolierte Mitochondrien von 24 Monate alten Mäusen mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Inkubation mit Rotenon und Natriumazid im Gegensatz zu dem junger Tieren. Zusammenfassend weisen Hirn-Mitochondrien von alten Mäusen selektiv verminderte Aktivitäten von Enzymen auf, welche integrale und wesentliche Bestandteile der inneren mitochondrialen Membran sind. Hierbei waren vor allem die Komplexe I und IV durch den Alterungsprozess betroffen und können als wesentliche Marker des Alterns angesehen werden.

Des Weiteren zeigte die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien unter Verwendung von Komplex I-Substraten eine mit dem Alter zunehmende Verminderung der Atmungsraten auf. Die State 4-Atmung scheint durch den Alterungsprozess weitgehend unberührt zu sein. Demgegenüber weisen isolierte Mitochondrien alter Mäuse eine signifikante Reduktion der State 3-Atmung auf. Diese spiegelt sich ebenfalls in einem signifikant erniedrigten Atmungskontrollindex wider. Die respiratorische Funktionseinschränkung im Alter scheint größtenteils eine Folge der verminderten Komplex I- und Komplex IV-Aktivität zu sein. Ausgehend vom Komplex I werden die Elektronen von NADH schrittweise über die anderen Atmungsketten-Komplexe auf Sauerstoff übertragen. So führt die Hemmung des mitochondrialen

Komplexes I in mehreren Stufen zu einer, durch verschiedene Mechanismen ausgelösten Beeinträchtigung der maximalen Atmungskapazität (Barrientos and Moraes, 1999). In Ergänzung hierzu wird die Atmungskapazität alter Hirn-Mitochondrien durch eine zusätzliche Verminderung der Komplex IV-Aktivität abgeschwächt. Es ist daher anzunehmen, dass diese Mechanismen für die reduzierte Atmungskapazität bei Maximalauslastung (State 3) verantwortlich sind, obwohl genügend Substrat für Komplex I zur Verfügung steht. Weiterhin kann die Verminderung der Komplex I-Aktivität funktionelle Konsequenzen für die Bildung von ATP und die mitochondriale Radikalbildung haben. So konnte beobachtet werden, dass der Komplex I neben Komplex III eine Quelle erhöhter mitochondrialer Radikalbildung ist.

Die Ansammlung von oxidativen Schäden und die Abnahme der mitochondrialen Kompetenz ATP zu produzieren im Alter sind zwei grundlegende Konzepte der „mitochondrialen Hypothese des Alterns“ (Beckman and Ames, 1998). Aufgrund der in unserer Arbeit erhobenen Daten in Zusammenhang mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass der Alterungsprozess durch eine disproportionale Atmungskette gekennzeichnet ist. Zusammenfassend spricht vieles dafür, dass altersabhängige mtDNA-Schäden durch eine disproportionale Atmungskette hervorgerufen werden, was wiederum in einer erhöhten mitochondrialen Radikalbildung resultiert (vgl. Abb. 4.4). Die Folge ist eine mitochondriale Fehlfunktion und folglich eine erniedrigte ATP-Produktion im Alter (Navarro and Boveris, 2007a).

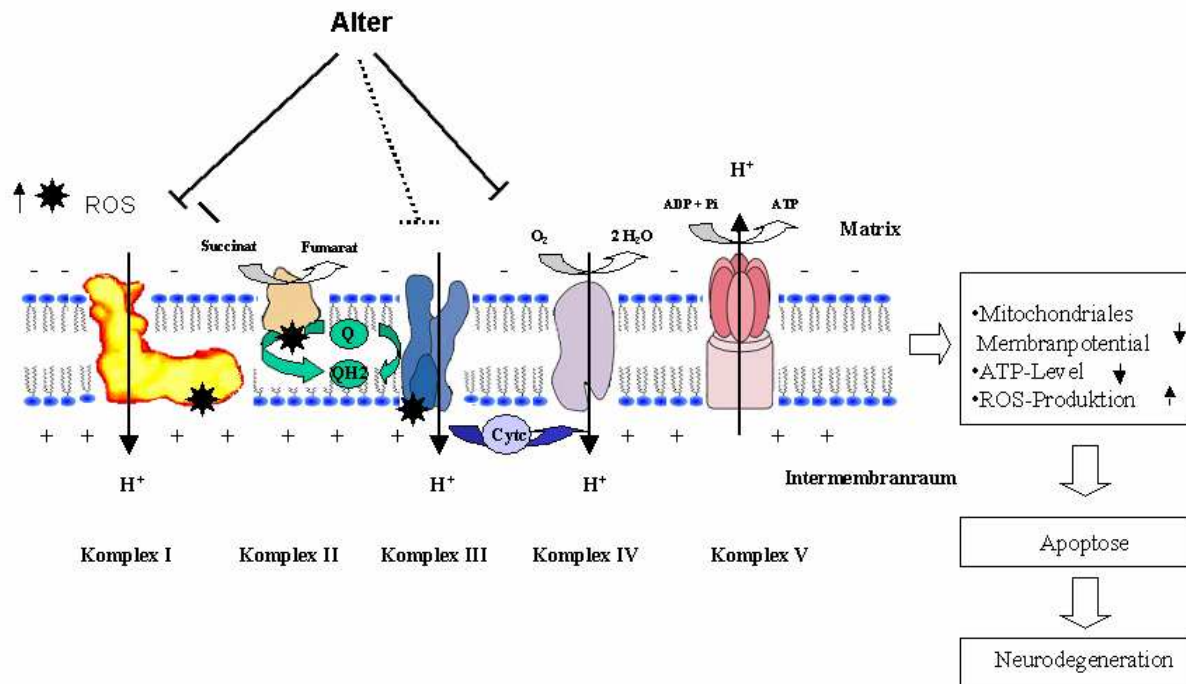


Abbildung 4-4: Einfluss des Alters auf die mitochondriale Dysfunktion

Altersbedingte Abnahme der Komplex I- und Komplex IV-Aktivität resultiert in einer verminderten Effizienz der Kopplung zwischen den Atmungsketten-Komplexen. Die Folge ist eine verminderte energetische Ausbeute. Weiterhin führt die Beeinträchtigung der Atmungskette zu einer erhöhten Produktion an ROS, welche wiederum die mtDNA schädigen.

4.2.4 Zusammenfassung

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass die mitochondriale Dysfunktion mit herabgesetzter energetischer Funktion eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AD einnimmt.

Die konkreten Auslöser der mitochondrialen Fehlfunktion bei der AD sind bisher noch umstritten. Wir konnten allerdings demonstrieren, dass sowohl A β als auch Tau in Abhängigkeit vom Alter für die mitochondriale Dysfunktion in den von uns gewählten Tiermodellen eine entscheidende Rolle spielen. So zeigten wir, dass die A β - als auch die Tau-Pathologie in einem reduzierten Membranpotential resultiert. Thy-1 APP transgene Mäuse weisen hauptsächlich einen Defekt der Komplex IV-Aktivität auf, wohingegen P301L transgenen Mäuse durch einen Defekt des Komplexes I gekennzeichnet sind. Auf der Basis

unserer Entdeckungen im Zusammenhang mit zuvor veröffentlichten Arbeiten lässt sich schlussfolgern, dass beide Aktivitätsverluste zu reduzierten ATP-Leveln führen (David *et al.*, 2005; Hauptmann *et al.*, 2006), begleitet von einer erhöhten ROS-Produktion. Hat die Inhibition der mitochondrialen Funktion einen bestimmten Schwellenwert erreicht, führt dies zu synaptischer und mitochondrialer Dysfunktion und letztendlich zu Apoptose. Eine ähnliche Erklärung wurde bereits von Aleari *et al.* (2005) vorgeschlagen. Aleari und Mitarbeiter (2005) postulieren, dass bei Erreichen eines spezifischen Schwellenwertes der Inhibition der Komplexaktivitäten, der plötzliche Abfall der Energieproduktion zu neuronaler Dysfunktion und Beeinträchtigung der kognitiven Kapazität führt (Aleari *et al.*, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass Mitochondrien für die neuronale Funktion essentiell sind, und neuronale Zellen durch ihre limitierte glykolytische Kapazität von der aeroben oxidativen Phosphorylierung abhängig sind, führt dieser Teufelskreis letztendlich zu erhöhter Apoptose (David *et al.*, 2005).

Es wird klar, dass die zum Teil als eigenständig diskutierten Mechanismen nicht voneinander getrennt betrachtet werden sollten. So führen sowohl die Tau-Pathologie als auch die A β -Pathologie unter bestimmten Umständen zur Apoptose der Zellen und demzufolge zu Neurodegeneration. Die AD ist daher eine komplexe und multifaktoriell bedingte Erkrankung. Zahlreiche interagierende Komponenten sind für die Pathogenese verantwortlich, von denen einige bisher noch nicht identifiziert sind bzw. erst angefangen wurde, sie eingehender zu untersuchen. Weiterhin muss auf die wichtige Rolle des Alterns hingewiesen werden. Das vermehrte Auftreten mitochondrialer Mutationen im Alter in Kombination mit spezifischen Defekten der Atmungsketten-Komplexe, könnte durch synergistische Effekte das späte Einsetzen der mitochondrialen Dysfunktion in Thy-1 APP und P301L transgenen Tieren bzw. bei der AD erklären (vgl. Abb. 4.5).

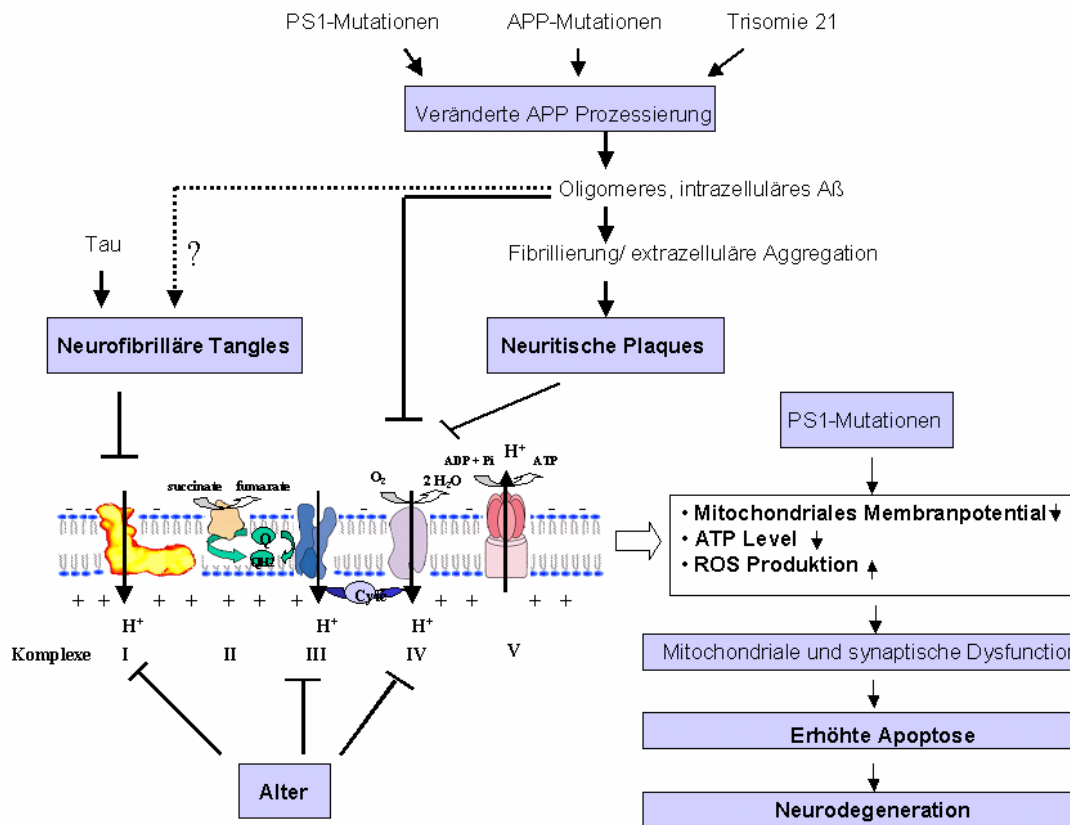


Abbildung 4-5: Die AD als eine komplexe und multifaktoriell bedingte Erkrankung.

Mitochondriale Fehlfunktion als eine frühe gemeinsame pathologische Folge der Aβ- und Tau-Pathologie, des Alterns und weiteren Risikofaktoren der sporadischen AD. Weiterhin beeinflussen das Alter und PS1-Mutationen unabhängig die Aβ-Kaskade und somit die mitochondriale Funktion.

4.3 Überprüfung von Antidementiva auf ihre protektiven Eigenschaften auf die mitochondriale Funktion

In den vergangenen zwei Jahrzehnten konnte eine ganze Reihe von Erkenntnissen über die Entstehung der AD gewonnen werden. Neuroprotektiven Stoffen wird ein immer größeres Interesse entgegengebracht, denn bedingt durch die demographische Entwicklung zeigt sich eine Zunahme von Hirnleistungsstörungen, z.B. des Morbus Alzheimer. Trotz allem ist man von einer viel versprechenden Therapie noch sehr weit entfernt. Die derzeitige Behandlung von AD-Patienten erfolgt lediglich durch die Linderung der Symptome und nicht durch Behebung der Ursachen. Wie die vorangegangenen Ergebnisse gezeigt hatten, stellt die mitochondriale Dysfunktion ein wichtiges Ereignis in der AD-Pathogenese dar. Aufgrund dessen ist es sehr wichtig, Arzneistoffe zu finden, die den Energiehaushalt der Mitochondrien stabilisieren und somit Neuronen vor apoptotischen Zelltod schützen können.

4.3.1 Effekte einer Ginkgo biloba-Behandlung auf die mitochondriale Funktion

4.3.1.1 Effekte von EGb761 auf das mitochondriale Transmembranpotential

Aufgrund seiner bekannten Radikalfänger-Eigenschaften wird EGb761-Extrakt zur Behandlung von altersbedingten kognitiven Erkrankungen, wie der AD eingesetzt. Eine Vielzahl von klinischen Studien konnte bereits den Nutzen von EGb761 bei der Behandlung von ZNS-Störungen belegen (Kanowski *et al.*, 1996c; Le Bars *et al.*, 1997; Le Bars *et al.*, 2000; Le Bars *et al.*, 2002) und

zusätzlich vasoregulatorische, antioxidative, antiischämische, antiödematöse, antiapoptotische und neuroprotektive Effekte als mögliche Wirkmechanismen aufzeigen. Aufgrund neuerer Befunde scheint Ginkgo biloba Extrakt ebenfalls protektive Effekte auf die mitochondriale Atmungskette direkt auszuüben (Janssens *et al.*, 1999, Abdel-Kader *et al.*, 2007). Allerdings ist der Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von EGb761 noch nicht vollständig aufgeklärt. Daher ist es von großem Interesse, zu welchem Ausmaß EGb761 die mitochondriale Funktion gegenüber schädlichen Einflüssen schützen kann.

Unsere Studien ergaben, dass Ginkgo biloba Extrakt nach einer 2-wöchigen Behandlungsstudie in der Lage ist, dass mitochondriale Membranpotential isolierter Hirn-Mitochondrien nach oxidativem und nitrosativem Stress zu stabilisieren. In Übereinstimmung mit unseren Daten konnten protektive Effekte von EGb761 in untransfizierten PC12-Zellen nach oxidativer und nitrosaminer Schädigung beobachtet werden (Eckert *et al.*, 2003). Von großem Interesse hierbei ist, über welche Mechanismen Ginkgo biloba Extrakt protektiv wirkt.

Für die protektiven Effekte nach H₂O₂-Inkubation scheinen maßgeblich die Radikalfänger-Eigenschaften von EGb761 verantwortlich zu sein, die bereits in zahlreichen Studien belegt wurden (Schindowski *et al.*, 2001; Smith and Luo, 2003; Smith and Luo, 2004). Freie Radikale wie Superoxidradikalanionen und Hydroxyl-Radikale spielen eine entscheidende Rolle bei Alterungsprozessen und neurodegenerativen Erkrankungen. Insbesondere den Hydroxyl-Radikalen wird heute eine entscheidende Rolle bei der peroxidativen Degradation zugeschrieben, die mit einer strukturellen Desorganisation von Membranen verbunden ist (Wei *et al.*, 2000). So wirkt EGb761 durch seine Eigenschaft als Radikalfänger gleichfalls membranstabilisierend. Weiterhin können Flavonoide in zellfreien Systemen ROS abfangen (Robak and Gryglewski, 1988). Man nimmt an, dass deren Polyphenolstruktur hierfür verantwortlich ist (Saija *et al.*, 1995). Ferner konnten in zellfreien Systemen für die EGb761-Komponenten Bilobalid und die Ginkgolide B, C und J nachgewiesen werden, dass sie ROS abfangen können (Scholtyssek *et al.*, 1997). Überdies besitzen in

zellulären Systemen Bilobalid (Zhou and Zhu, 2000) und die Flavonoidfraktion (Oyama *et al.*, 1994; Smith and Luo, 2003) ebenfalls antioxidative Eigenschaften. Hierbei weisen vor allem die Flavonoide Kämferol und Quercetin Radikalfänger-Eigenschaften auf (Smith and Luo, 2003). Zusätzlich hierzu konnten einige Arbeitsgruppen demonstrieren, dass Ginkgo biloba Extrakt zu einer Erhöhung der Proteinspiegel und Aktivitäten antioxidativer Enzyme führt. So wurden im Hippokampus von Ratten erhöhte Spiegel an Superoxid-Dismutase und Katalase beobachtet (Bridi *et al.*, 2001), sowie in der Leber von Mäusen eine erhöhte Aktivität der Glutathion-Reduktase (Sasaki *et al.*, 2002). Ferner führt Bilobalid zu einer Erhöhung der Aktivität der Superoxid-Dismutase und Katalase. Aufgrund dessen vermuten die Autoren, dass die Erhöhung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten gleichermaßen zum protektiven Effekt von Bilobalid beitragen. Übereinstimmend mit diesen Daten, weisen Bilobalid und die Ginkgolide A, B, C und J in untransfizierten PC12-Zellen, welche 24 Stunden oxidativem Stress ausgesetzt waren, protektive Effekte auf das mitochondriale Membranpotential auf (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang weisen ebenfalls *Caenorhabditis elegans* Würmer, welche mit EGb761 behandelt wurden, eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativen Stress auf (Wu *et al.*, 2002), wobei diese Würmer eine um 8% verlängerte Lebensspanne als Kontrollwürmer besitzen. In weiteren Studien mit *C.elegans* konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekte von EGb761 durch eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativen Stress und einer Verminderung der ROS-Akkumulation herrührt (Kampkotter *et al.*, 2007).

EGb761 ist darüber hinaus in der Lage, isolierte Mitochondrien von Ginkgo biloba Extrakt behandelten Tieren vor der Schädigung durch nitrosativem Stress zu schützen. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien für 2 Stunden mit SNP inkubiert und anschließend das Membranpotential bestimmt. SNP fungiert als NO-Donor. NO selbst ist relativ unreaktiv, kann jedoch in sehr reaktive Moleküle umgewandelt werden, in so genannte reaktive NO-Spezies. NO reagiert beispielsweise mit Sauerstoff, wobei NO_2 gebildet wird. Dieses ist in der Lage mit einem zweiten NO zu N_2O_3 zu reagieren. N_2O_3 kann Thiole wie z.B.

Glutathion nitrosylieren. NO kann außerdem mit dem Superoxidradikalanion zu Peroxynitrit reagieren. NO und Peroxynitrit üben einen hemmenden Effekt auf die mitochondriale Atmungskette aus. NO führt zu einer schnellen, selektiven und reversiblen Hemmung der COX, wohingegen Peroxynitrit zu einer langsamen, nichtselektiven und irreversiblen Hemmung von mehreren Atmungsketten-Komplexen führt (Cassina and Radi, 1996;Radi *et al.*, 2002a;Radi *et al.*, 2002b). Peroxynitrit ist in der Lage die Komplexe I, II, III IV und V, die Aconitase und die Mn-Superoxid-Dismutase zu hemmen (Brown and Bal-Price, 2003;Brown and Borutaite, 2004). Ein schneller Effekt von Peroxynitrit stellt die Hemmung des Komplexes I dar. Diese Hemmung wird hervorgerufen durch S-Nitrosylierung. Peroxynitrit ist ebenfalls in der Lage den Komplex V der Atmungskette zu hemmen. Diese Hemmung kommt zustande durch Oxidation von kritischen Thiolgruppen im ATP-Synthase-Komplex (Radi *et al.*, 1994). Der protektive Effekt von Ginkgo biloba gegenüber SNP-induzierter mitochondrialer Dysfunktion resultiert höchstwahrscheinlich zum Teil auf seinen Radikalfänger-Eigenschaften. So wird durch die Neutralisation von Superoxidradikalanionen weniger Peroxynitrit aus NO gebildet und der hemmende Einfluss auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe vermindert. In hippokampalen Rattenneuronen wurde ebenfalls eine Reduktion der NO-Toxizität durch EGb761 beobachtet. Des Weiteren konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass vor allem die Flavonoidfraktion für diesen protektiven Effekt verantwortlich ist (Bastianetto *et al.*, 2000b). Zudem konnte für Bilobalid auch eine Reduktion der NO-Toxizität nachgewiesen werden (Zimmermann *et al.*, 2002). Demzufolge scheinen Bilobalid und die Ginkgolide an der Reduktion der Neurotoxizität von NO beteiligt zu sein. Der protektive Gesamteffekt von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondriale Funktion resultiert scheinbar aus einem additiven Effekt der einzelnen Komponenten des Extraktes.

Zusätzlich können die antioxidativen Eigenschaften von Ginkgo biloba Extrakt auf Grund der Tatsache erklärt werden, dass EGb761 in der Lage ist Metallionen, wie z.B. Fe^{2+} zu chelatieren (Gohil and Packer, 2002;Gohil, 2002).

Demzufolge wird die Generation neuer ROS durch die Atmungskette vermindert. Weiterhin ist es möglich, dass EGb761 durch die Stabilisation der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe die mitochondriale Funktion nach NO-induziertem Stress stabilisieren kann.

4.3.1.2 Protektive Effekte von EGb761 auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

Ferner konnte gezeigt werden, dass EGb761 in der Lage ist, die Komplexe I, IV und V vor dem Angriff von spezifischen Komplexinhibitoren zu schützen. Dies deutet auf direkte protektive Effekte von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe hin. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus könnte in einer Erhöhung der Expressionslevel der Atmungsketten-Komplexe liegen. So konnte bereits gezeigt werden, dass EGb761 und Bilobalid zu einem Anstieg der mRNA-Spiegel der Untereinheit I der NADH-Dehydrogenase und der Untereinheit III der COX führt. Die geringere Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials nach Inkubation mit Rotenon (Komplex I) und Natriumazid (Komplex IV) könnte hierdurch erklärt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die durch EGb761 und Bilobalid verursachte Erhöhung der mRNA-Transkription auf einer Erhöhung der Expression und Bindung von Transkriptionsfaktoren am Promoter der Gene resultiert, welche für die mitochondriale Transkription verantwortlich sind (Tendi *et al.*, 2002). Die protektive Wirkung von Ginkgo biloba Extrakt auf die mitochondriale Atmungskette wird weiterhin durch Versuche von Janssen *et al.* bestätigt. Sie konnten zeigen, dass isolierte Mitochondrien aus der Ratten-Leber nach einer Behandlung mit Bilobalid eine erhöhte RCR und eine erniedrigte State 4-Atmung aufweisen (Janssens *et al.*, 1999). Eine Erniedrigung der State 4-Atmung geht mit einer verminderten Bildung von ROS einher und ist demzufolge ein Marker für die Bildung von ROS. In einer weiteren *in vitro* Studie zeigte sich, dass Ginkgo biloba Extrakt in Herzmitochondrien von Ratten konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der State 2-Atmung führt (Trumbeckaite *et al.*, 2006). Darüber hinaus war Bilobalid in der Lage, die

Atmungsketten-Komplexe I und III vor dem Angriff von Komplexinhibitoren zu schützen und die Komplex I-Aktivität zu erhöhen (Janssens *et al.*, 1999). Protektive Effekte auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe von Ginkgo biloba Extrakt konnten ebenfalls in PC12-Zellen beobachtet werden. EGb761 war hierbei in der Lage alle Atmungsketten-Komplexe zu schützen. Abschließend scheint EGb761 aufgrund der Erhöhung der Expression von Genen, die für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe kodieren, in der Lage zu sein, die Funktion der mitochondrialen Atmungskette zu verbessern.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass EGb761 die Glutathion-Spiegel von alten Ratten stabilisiert (Sastre *et al.*, 1998). So konnte in retinalen Gliazellen *in vitro* eine Steigerung der Glutathion-Synthese durch EGb761 beobachtet werden (Rimbach *et al.*, 2003). Ein wichtiger Punkt hierbei ist, dass mitochondriales Glutathion zum Schutz der mtDNA vor oxidativem Stress beiträgt. Besonders im Alter kommt es zu erhöhtem oxidativem Stress (Navarro and Boveris, 2004; Navarro and Boveris, 2007b). Interessanterweise ist EGb761 in der Lage, die Glutathion-Oxidation in Leber-Mitochondrien von alten Mäusen signifikant zu erniedrigen und gleichzeitig oxidative Schäden von mitochondrialer DNA im Gehirn und in der Leber zu vermindern. Ferner scheint EGb761 altersabhängige Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und die Größe der Gehirn- und Leber-Mitochondrien zu verhindern (Sastre *et al.*, 2002). Die Stabilisation der mitochondrialen Morphologie durch EGb761 ist in Leber- und Gehirn-Mitochondrien von alten Ratten zudem mit einer Reduktion der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials assoziiert (Sastre *et al.*, 1998). Des Weiteren führte EGb761 zu einer Modulation der synaptischen und mitochondrialen Plastizität in Vitamin-E-defizienten Ratten (Bertoni-Freddari *et al.*, 2002). Dies ist vor allem interessant im Hinblick darauf, dass synaptische Dysfunktion ein frühes Ereignis der AD darstellt. Unsere Ergebnisse zusammen mit den in der Literatur veröffentlichten Daten belegen, dass die Stabilisation der mitochondrialen Funktion durch EGb761 durch Addition mehrerer Einzeleffekte resultiert.

4.3.1.3 Zusammenfassung EGb761

Schon vor Jahrtausenden wurde Ginkgo biloba eine heilende Wirkung zugeschrieben. Seit den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts, nachdem der Extrakt des Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe isoliert worden waren, erfolgten zahlreiche Studien und Experimente, die zeigen konnten, dass Ginkgo biloba unter anderem eine neuroprotektive Wirkung besitzt. Heutzutage wird hauptsächlich ein Extrakt aus Blättern von Ginkgo biloba (*Salisburia adiantifolia*, Fächerblattbaum), dessen wirksame Bestandteile (Ginkgoflavonglykoside und Terpenlactone wie Ginkgolide und Bilobalid) in konstanter Konzentration vorliegen (EGb761) verwendet. Klinische Studien konnten den Nutzen von EGb761 für kognitive Störungen im Alter und bei der Demenz zeigen. Hierbei scheinen die einzelnen Bestandteile von Ginkgo biloba Extrakt, wie Flavonoide, Bilobalid und Ginkgolide additiv zu wirken.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen daraufhin, dass die neuroprotektive Effekte des Ginkgo biloba Extraktes durch antioxidative und Mitochondrien-stabilisierende Eigenschaften des Extraktes hervorgerufen werden. Vor allem die Mitochondrien-stabilisierende Eigenschaft des Extraktes ist von großem Interesse, da neuere Befunde auf einen Zusammenhang mitochondrialer Dysfunktion und neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, hindeuten. Synaptische Dysfunktion stellt überdies ein sehr frühes Ereignis der Pathogenese der AD dar und wird heutzutage häufig mit mitochondrialer Dysfunktion in Verbindung gebracht. Aufgrund seiner Mitochondrien-stabilisierenden Funktion scheint EGb761 geeignet zu sein synaptische Dysfunktion vorzubeugen (vgl. Abb. 4.6).

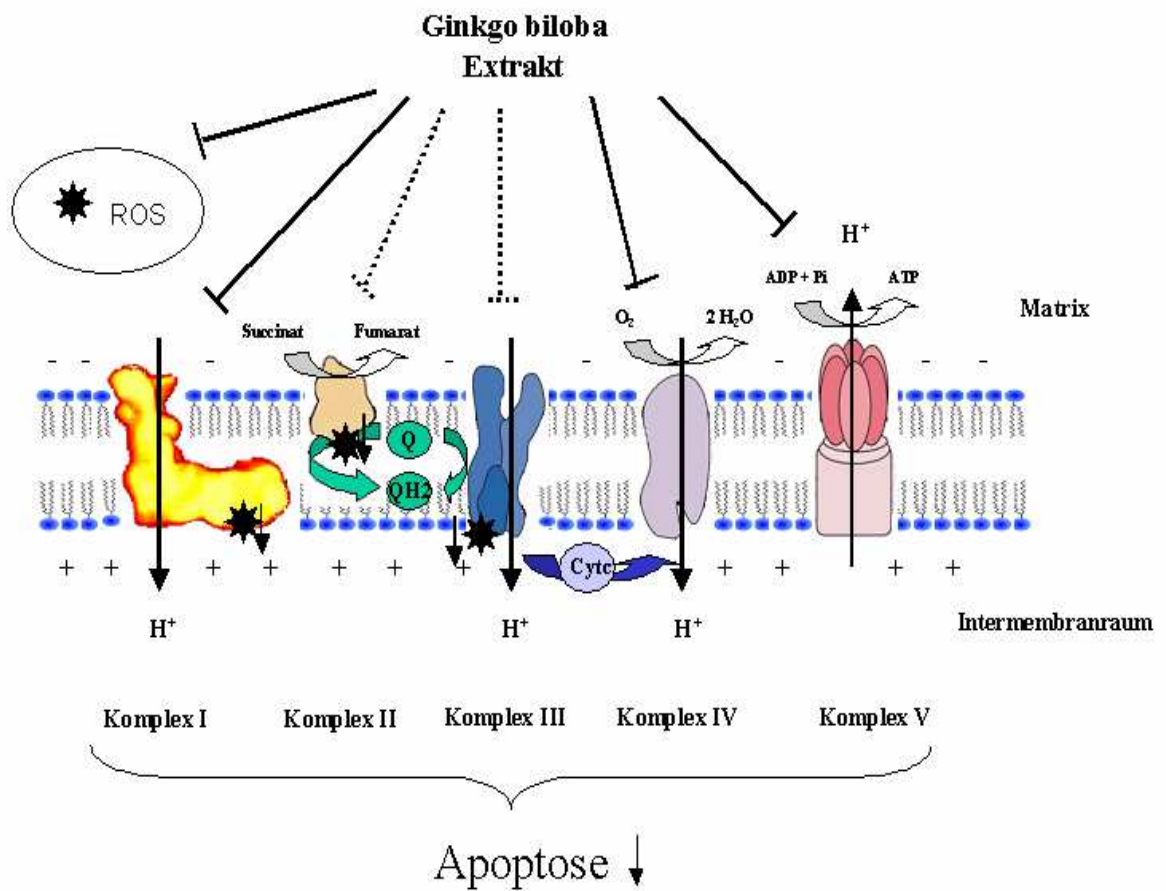


Abbildung 4-6: Protektive Effekte von Ginkgo biloba Extrakt aufgrund seiner Radikalfänger-Eigenschaften und Stabilisation der Mitochondrienfunktion.

EGb761 kann eine Vielzahl von ROS, wie z.B. Superoxid-Anionen, Hydroxyl- und Peroxyl-Radikale abfangen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EGb761 in der Lage war, die Komplexe I, IV und V vor dem Angriff von spezifischen Komplexinhibitoren zu schützen. In der Literatur ist ebenfalls ein protektiver Effekt von Ginkgo biloba Extrakt auf die Komplexe II und III beschrieben.

Zum jetzigen Standpunkt der Forschung kann allerdings noch keine Aussage über die humanmedizinische Relevanz der Ergebnisse gemacht werden. Diese lassen jedoch hoffen, dass Ginkgo biloba Präparate, die bereits als Antidementiva eingesetzt werden und eine gute Verträglichkeit aufweisen, in Zukunft gezielt bei bestimmten Hirnleistungsstörungen des Menschen als Therapieansatz berücksichtigt werden. Weiterhin sprechen hierfür die einfache Handbarkeit, der geringe Kostenaufwand und die wenigen Nebenwirkungen von EGb761.

4.3.2 Effekte einer Piracetam Behandlung auf die mitochondriale Funktion

4.3.2.1 Effekte von Piracetam auf das mitochondriale Transmembranpotential

Piracetam weist ebenso wie Ginkgo biloba Extrakt protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion auf. Nach einer 14-tägigen Behandlungsstudie zeigte sich, dass Piracetam in der Lage ist, das mitochondriale Membranpotential nach oxidativem und nitrosativem Stress zu stabilisieren. Es ist anzunehmen, dass Piracetam dies über seine membranstabilisierende Eigenschaft vollzieht.

Zahlreiche Daten weisen daraufhin, dass Piracetam direkt mit Membranen interagiert (Fassoulaki *et al.*, 1985). So konnte unter anderem mittels einer ^{31}P -NMRI-Methode die Interaktion von Piracetam mit synthetischen Phospholipid-Doppelschichten nachgewiesen werden. Hierbei interagiert Piracetam direkt mit den Phosphatkopfgruppen der Phospholipid-Doppelschicht von Membranen (Fassoulaki *et al.*, 1985). Infolgedessen resultiert eine Neuorganisation der Lipidmoleküle und die Bildung von Piracetam-Phospholipidkomplexen (Peuvot *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt vor allem in alten Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der Membranfluidität führt, wohingegen die Effekte in jungen Mäusen nur geringfügig ausgeprägt sind (Muller *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Piracetam in alten Tieren zu einer Erhöhung der Dichte der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Cohen and Muller, 1993) und der NMDA-Rezeptoren (Pilch and Muller, 1988; Scheuer *et al.*, 1999) führt, was in einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten resultiert (Scheuer *et al.*, 1999). Von großem Interesse hierbei ist, dass Piracetam ebenfalls die Membranfluidität mitochondrialer Membranen verbessert (Muller *et al.*, 1999).

Weiterhin scheinen die protektiven Effekte von Piracetam auf die mitochondriale Funktion nicht in einer antioxidativen Natur begründet liegen, da Piracetam *in vitro* in therapeutischen Konzentrationen keine antioxidativen Eigenschaften aufweist (Horvath *et al.*, 2002). In Übereinstimmung konnte in unserem Arbeitskreis durch Sebastian Schaffer im Guajacol-Assay, sowie im Oxyhämoglobin-Assay keine antioxidativen Effekte von Piracetam in Konzentrationen bis zu 5 mM festgestellt werden. Bentue-Ferrer *et al.* konnte ebenfalls keine Radikalfänger-Eigenschaften von Piracetam feststellen, nachdem sie Ratten mit Piracetam in einer Konzentration von 200 und 400 mg/kg Körpergewicht fütterten (Bentue-Ferrer *et al.*, 1989). In einer Studie mit Rattenastrozyten, welche Hypoxie ausgesetzt wurden, konnte ebenfalls ein stabilisierender Effekt von Piracetam auf die mitochondriale Funktion beobachtet werden (Gabryel *et al.*, 2002). Hierbei zeigte sich, dass die durch Hypoxie verursachten Effekte, wie ein Abfall der MTT-Reduktion, ein Abfall der ATP-Spiegel sowie eine Zunahme der Apoptose durch Piracetam vermindert werden konnten. Weiterhin konnte eine Erhöhung der ATP-Spiegel nach Hypoglykämie durch Piracetam beobachtet werden (Benzi *et al.*, 1985). In Übereinstimmung erhöhte Piracetam auch in PC12-Zellen die ATP-Spiegel nach nitrosativem Stress (Keil *et al.*, 2006b). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Piracetam in der Lage ist, die Folgen von oxidativem Stress über eine Hochregulierung antioxidativer Enzyme, wie Superoxid-Dismutase, Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase zu normalisieren. Es ist daher anzunehmen, dass Piracetam oxidativen Stress über eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion vermindert.

4.3.2.2 Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

Die Funktionsfähigkeit des mitochondrialen Multienzym- und Protonentransportsystems ist an die strukturelle und funktionelle Integrität seiner nukleär und mitochondrial kodierten Untereinheiten gebunden. Interessanterweise ist Piracetam ebenfalls in der Lage, die mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe

zu schützen. Bei jungen Tieren sind vor allem die Komplexe I, II und IV durch Piracetam geschützt, wohingegen bei alten Tieren alle fünf Komplexe der Atmungskette stabilisiert werden. In Übereinstimmung ist Piracetam auch in der Lage, alle Atmungsketten-Komplexe in PC12-Zellen zu schützen (Keil *et al.*, 2006b). Bei niedrigen Piracetam-Konzentrationen werden vor allem die Komplexe I, II und III besonders gut geschützt, wohingegen ab einer Konzentration von 1000 μM Piracetam auf alle Komplexe einen protektiven Effekt aufweist. In Übereinstimmung hierzu zeigten Daten mit Rattengehirn-Mitochondrien nach traumatischem Ödem einen stabilisierenden Effekt auf die oxidative Phosphorylierung auf (Novikov and Sharov, 1991). Ferner konnte gezeigt werden, dass Piracetam in Rattengehirn-Schnitten die Atmung und die glykolytische Aktivität um 30% erhöht.

Es ist zu vermuten, dass Piracetam über eine Erhöhung der Membranfluidität der inneren Mitochondrienmembran (Muller *et al.*, 1999) protektiv auf die Atmungsketten-Komplexe wirkt. Die Komplexe der Atmungskette sind in der inneren Membran lokalisiert, wodurch es denkbar ist, dass Piracetam über die Veränderung der Membraneigenschaften diese schützt und zur Verbesserung deren Funktion beiträgt. Es wäre beispielsweise interessant zu untersuchen, ob Piracetam direkte Effekte auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe ausübt. Weiterhin könnte Piracetam über die Stabilisation der Membraneigenschaften ein ungewolltes Eindringen von H^+ aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix verhindern und folglich das mitochondriale Membranpotential stabilisieren.

4.3.2.3 Zusammenfassung Piracetam

Piracetam gehört zu den so genannten Nootropica, was griechisch so viel bedeutet wie „Substanzen, die auf das Gehirn wirken“. Piracetam wird nach oraler Gabe rasch und vollständig resorbiert, wobei die relative systemische Bioverfügbarkeit 100% beträgt. Hierbei ist Piracetam das erste Nootropikum (Giurgea, 1982), das klinisch eingesetzt wurde. Heutzutage wird Piracetam bei

Myoklonus und bei kognitiven Störungen eingesetzt. Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt.

Die Daten in dieser Arbeit belegen einen eindeutigen protektiven Effekt einer Piracetam Behandlung auf die mitochondriale Funktion nach oxidativem und nitrosativem Stress. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Piracetam alle Komplexe der mitochondrialen Atmungskette stabilisiert. Die Stabilisierung der mitochondrialen Funktion ist höchstwahrscheinlich durch die Membranstabilisierenden Eigenschaften von Piracetam begründet. Die Substanz bindet dosisabhängig an Phospholipide der Zellmembranen, wodurch sich möglicherweise eine verbesserte Membranstabilität und eine Modulation der postsynaptischen Rezeptordichte mit konsekutiven Veränderungen der Neurotransmission ergibt. Weiterhin ist zu vermuten, dass Piracetam über die Stabilisierung der mitochondrialen Funktion neuroprotektive Effekte ausübt. So konnten protektive Effekte von Piracetam ebenfalls in Schlaganfallstudien belegt werden (Enderby *et al.*, 1994;Dedeyn *et al.*, 1996;Orgogozo, 1999;Therot and Orgogozo, 2000).

Kombiniert mit der Verbesserung der mitochondrialen Membranfluidität erhöht Piracetam in alten Tieren die Dichte der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Cohen and Muller, 1993) und der NMDA-Rezeptoren (Pilch and Muller, 1988;Scheuer *et al.*, 1999). Die Kombination aus der Verbesserung der Membranfluidität, der Neurotransmission sowie der neuroprotektiven Eigenschaften scheinen entscheidend zur Wirksamkeit von Piracetam bei kognitiven Störungen beizutragen. Aufgrund des geringen Nebenwirkungspotential und der ausgeprägten Mitochondrien-stabilisierenden Effekte machen Piracetam zu einem wertvollen Arzneimittel bei leichten kognitiven Störungen.

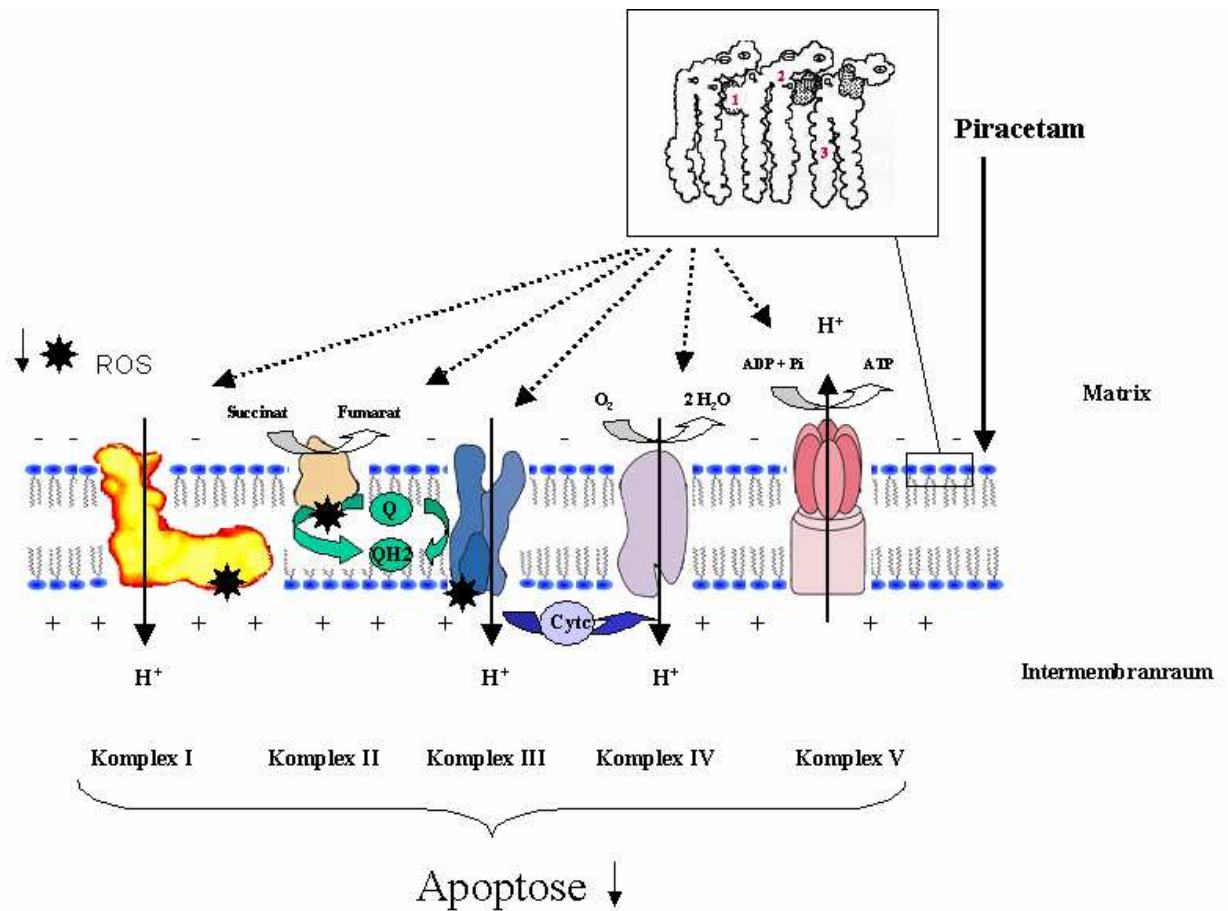


Abbildung 4-7: Protektive Effekte von Piracetam auf die mitochondrial Funktion

Piracetam bindet dosisabhängig an die Phospholipide der mitochondrialen Membran, infolgedessen eine Neuorganisation der Lipidmoleküle und die Bildung von Piracetam-Phospholipidkomplexen resultiert. Dies führt zu einer Erhöhung der Membranfluidität. Die Komplexe der Atmungskette sind in der inneren Membran lokalisiert, wodurch es denkbar ist, dass Piracetam über die Veränderung der Membranzusammensetzung diese schützt und zur Verbesserung deren Funktion beiträgt. Piracetam (1) bindet an polare Kopfgruppen (2) von Phospholipid-Doppelschichten (3).

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung, die weltweit die häufigste Form der Demenz darstellt und im mittleren bis späten Lebensabschnitt auftritt. Die auffälligsten histopathologischen Merkmale der AD beinhalten –neben dem Untergang von Nervenzellen und Synapsen vorwiegend im Temporal- und Parietallappen – das Auftreten von extrazellulären Ablagerungen aus fibrillogenen A β ₁₋₄₂-Peptiden in senilen Plaques und intraneuronalen Akkumulationen von hyperphosphoryliertem Tau in so genannten neurofibrillären Bündeln. Derzeitig häufen sich Anhaltspunkte, nach denen die mitochondriale Dysfunktion eine entscheidende Rolle beim Nervenzelluntergang bei der AD spielt. Um genauere Informationen über die Ursache der mitochondrialen Dysfunktion zu erhalten, wurden in dieser Arbeit der Einfluss von Alzheimer-relevanten Faktoren, wie der A β - und der Tau-Pathologie, sowie das Alter als wichtigster Risikofaktor der AD auf die mitochondriale Funktion untersucht. Als Tiermodelle standen hierfür Thy-1 APP transgene Mäuse, welche erhöhte A β -Level ab einem Alter von 3 Monaten aufweisen (Blanchard et al., 2003), P301L transgene Mäuse, bei denen es ab einem Alter von 6 Monaten zur NFT-Formation kommt (Gotz et al., 2001b) und NMRI-Mäuse als Altersmodell zur Verfügung.

Isolierte Hirn-Mitochondrien von Thy-1 APP transgenen Mäusen weisen unter basalen Bedingungen ein signifikant erniedrigtes Membranpotential im Vergleich zu dem von non-tg Tieren auf. Die Inkubation mit H₂O₂ und SNP führt weiterhin zu einem signifikant reduzierten mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien von non-tg Tiere. Demgegenüber können Mitochondrien Thy-1 APP transgener Mäuse offenbar nicht durch oxidativen und nitrosativen Stress zusätzlich geschädigt werden, wofür wahrscheinlich eine Vielzahl von Kompensationsmechanismen verantwortlich ist. Im Gegensatz hierzu führt die Expression der human pathogenen Mutation P301L in isolierten Mitochondrien 15 Monate alter Mäuse zu einem nur tendenziell erniedrigten Membranpotential. In Anbetracht der weiteren Ergebnisse dieser Arbeit und publizierten Daten kann allerdings davon ausgegangen werden, dass das Membranpotential in P301L-Mitochondrien zu einem

späteren Alter ebenfalls signifikant vermindert ist. Weiterhin demonstrierten fortführende Experimente einen Defekt der Komplex IV-Aktivität bei Thy-1 APP Mitochondrien und eine reduzierte Komplex I-Aktivität bei P301L-Mitochondrien. Passend zu diesen Daten sind sowohl Thy-1 APP- als auch P301L-Mitochondrien im Alter durch einen reduzierten Atmungskontrollindex gekennzeichnet, das heißt beide transgene Mauslinien weisen im Alter eine beeinträchtigte mitochondriale Atmungsrate auf. Ferner konnte der Einfluss von A β auf die mitochondriale Atmungskette durch die Inkubation mit extrazellulär zugefügtem fibrillärem A β zu non-tg Mitochondrien bestätigt werden. Die Inkubation mit A β führt in non-tg Mitochondrien zu einer reduzierten State 3-Atmung, welche sich ebenfalls in einem verminderten Atmungskontrollindex widerspiegelt. Dieses Ergebnis verdeutlicht nochmals den Zusammenhang der mitochondrialen Dysfunktion mit A β . Des Weiteren waren isolierte Hirn-Mitochondrien von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen mit fortschreitendem Alter durch eine signifikant stärker ausgeprägte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials gekennzeichnet. Daneben reagieren isolierte Mitochondrien von alten Tieren nach Inkubation mit spezifischen Inhibitoren der Komplexe I, III und IV mit einer stärkeren Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials als junge Tiere. Von besonderem Interesse für die hier vorliegende Arbeit war vor allem die erhöhte Empfindlichkeit der Komplexe I und IV in alten Mäusen, da diese Defizite ebenfalls mit der Tau- und A β -Pathologie in Verbindung gebracht worden sind. Ferner ergab die direkte Messung der Komplex I-Aktivität eine signifikante Verminderung der NADH-Ubiquinon-Reduktase-Aktivität im Alter. In Übereinstimmung weisen isolierte Mitochondrien unter Verwendung von Komplex I-Substraten eine mit dem Alter zunehmende Verminderung der Atmungsraten. Es scheint, dass das vermehrte Auftreten mitochondrialer Mutationen im Alter in Kombination mit spezifischen Defekten der Atmungsketten-Komplexe durch synergistische Effekte das späte Einsetzen der mitochondrialen Dysfunktion in Thy-1 APP und P301L transgenen Tieren bzw. bei der AD erklären könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Ginkgo biloba Extrakt als auch Piracetam protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion ausüben. Nach jeweils 14-tägigen Behandlungsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl Ginkgo biloba Extrakt als auch Piracetam in der Lage waren, das mitochondriale Membranpotential nach oxidativem und nitrosativem Stress zu

schützen. Des Weiteren konnte bei beiden Stoffen eine Stabilisation der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe nach einer Behandlung mit spezifischen Komplexinhibitoren beobachtet werden. Die protektiven Effekte von Ginkgo biloba können durch zwei Mechanismen erklärt werden, durch seine Radikalfänger-Eigenschaften und zum anderen durch seine stabilisierende Funktion der mitochondriale Funktion. Demgegenüber scheint Piracetam die Mitochondrien durch seine membranstabilisierenden Eigenschaften zu schützen. Durch die Erhöhung der Membranfluidität der inneren mitochondrialen Membran scheint Piracetam die Funktion der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe zu stabilisieren. Ginkgo-biloba Extrakt und Piracetam scheinen demzufolge zwei sehr interessante Präventions- und Therapieoptionen bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen bzw. bei Patienten mit AD dar.

6 Literaturverzeichnis

- Abe,K., Ahrens,L.A., Amako,K., Aronson,S.H., Beier,E.W., Callas,J.L., Cutts,D., Diwan,M.V., Durkin,L.S., Gibbard,B.G., Hedin,D., Hoftun,J.S., Kabe,S., Kurihara,Y., Lanou,R.E., Mann,A.K., Marx,M.D., Murtagh,M.J., Nagashima,Y., Newcomer,F.M., Shinkawa,T., Stern,E., Suzuki,Y., Terada,S., White,D.H., Yamaguchi,Y. (1989). Determination of $\sin^2 \theta_W$ from measurements of differential cross sections for muon-neutrino and -antineutrino scattering by electrons. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*. 62, 1709-1712.
- Aberg,F., Appelkvist,E.L., Dallner,G., Ernster,L. (1992). Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch.Biochem.Biophys.* 295, 230-234.
- Ahlemeyer,B., Krieglstein,J. (2003). Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 36 *Suppl* 1, S8-14.
- Aksenov,M.Y., Tucker,H.M., Nair,P., Aksenova,M.V., Butterfield,D.A., Estus,S., Markesbery,W.R. (1999). The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research* 24, 767-774.
- Albert,D., Zundorf,I., Dingermann,T., Muller,W.E., Steinhilber,D., Werz,O. (2002). Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem.Pharmacol.* 64, 1767-1775.
- Aleardi,A.M., Benard,G., Augereau,O., Malgat,M., Talbot,J.C., Mazat,J.P., Letellier,T., Dachary-Prigent,J., Solaini,G.C., Rossignol,R. (2005). Gradual Alteration of Mitochondrial Structure and Function by beta-Amyloids: Importance of Membrane Viscosity Changes, Energy Deprivation, Reactive Oxygen Species Production, and Cytochrome c Release. *J.Bioenerg.Biomembr.* 37, 207-225.
- 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., 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.
- Anderson,S., Bankier,A.T., Barrell,B.G., de Bruijn,M.H., Coulson,A.R., Drouin,J., Eperon,I.C., Nierlich,D.P., Roe,B.A., Sanger,F., Schreier,P.H., Smith,A.J., Staden,R., Young,I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., Lenaz, G. (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* (1606): 137-146.
- Bard,F., Cannon,C., Barbour,R., Burke,R.L., Games,D., Grajeda,H., Guido,T., Hu,K., Huang,J., Johnson-Wood,K., Khan,K., Kholodenko,D., Lee,M., Lieberburg,I., Motter,R., Nguyen,M., Soriano,F., Vasquez,N., Weiss,K., Welch,B., Seubert,P., Schenk,D., Yednock,T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat.Med.* 6, 916-919.
- Barrientos,A., Moraes,C.T. (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J.Biol.Chem.* 274, 16188-16197.

- Bastianetto,S., Ramassamy,C., Dore,S., Christen,Y., Poirier,J., Quirion,R. (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur.J.Neurosci.* 12, 1882-1890.
- Beckman,K.B., Ames,B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78, 547-581.
- Bentue-Ferrer,D., Philouze,V., Pape,D., Reymann,J.M., Allain,H., 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., Marzatico,F., Villa,R.F., Dagani,F., Curti,D. (1992). The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol.Aging* 13, 361-368.
- Benzi,G., Pastoris,O., Villa,R.F., Giuffrida,A.M. (1985). Influence of aging and exogenous substances on cerebral energy metabolism in posthypoglycemic recovery. *Biochem.Pharmacol.* 34, 1477-1483.
- Bermejo,G., Palacin,J.C., Lazaro,J., Martinez,M.A., Ruiz,I. (1991). [Record cards of prolonged treatment]. *Aten.Primaria* 8, 441-442.
- Bernardi,P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79, 1127-1155.
- Bertoni-Freddari,C., Fattoretti,P., Caselli,U., Paoloni,R., 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.
- Beyreuther,K., Pollwein,P., Multhaup,G., Monning,U., Konig,G., Dyrks,T., Schubert,W., Masters,C.L. (1993). Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695, 91-102.
- Bhat,R.V., Budd Haeberlein,S.L., Avila,J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J.Neurochem.* 89, 1313-1317.
- Bickel,C., Pantel,J., Eysenbach,K., Schroder,J. (2000). Syntactic comprehension deficits in Alzheimer's disease. *Brain Lang* 71, 432-448.
- Bickel,H. (2001). [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z.Gerontol.Geriatri.* 34, 108-115.
- Biernat,J., 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.
- Bigl,M., Eschrich,K. (1995). Interaction of rat brain phosphofructokinase with Alzheimer's beta A4-amyloid2. *Neurochem.Int.* 26, 69-75.
- Binder,L.I., Frankfurter,A., Rebhun,L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J.Cell Biol.* 101, 1371-1378.
- 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., Pradier,L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A beta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology* 184, 247-263.
- Blass,J.P. (2003). Cerebro-metabolic abnormalities in Alzheimer's disease. *Neurol.Res.* 25, 556-566.

- Blass, J.P., Gibson, G.E., 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 1. *J. Cell Mol. Med.* 4, 304-305.
- Bonnes-Taourel, D., Guerin, M.C., Torreilles, J., Ceballos-Picot, I., de Paulet, A.C. (1993). 4-Hydroxynonenal content lower in brains of 25 month old transgenic mice carrying the human CuZn superoxide dismutase gene than in brains of their non-transgenic littermates. *J. Lipid Mediat.* 8, 111-120.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I., Solaini, G. (2002). Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 371-376.
- Bowling, A.C., Mutisya, E.M., Walker, L.C., Price, D.L., Cork, L.C., Beal, M.F. (1993). Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J. Neurochem.* 60, 1964-1967.
- Boyer, P.D. (1989). A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* 3, 2164-2178.
- Boyer, P.D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 215-250.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749.
- Boyer, P.D., Cross, R.L., Momsen, W. (1973). A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2837-2839.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction 6. *Eur. Neurol.* 33, 403-408.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease 7. *Neurosci. Lett.* 210, 87-90.
- Brandon, M.C., Lott, M.T., Nguyen, K.C., Spolim, S., Navathe, S.B., Baldi, P., Wallace, D.C. (2005). MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update 37. *Nucleic Acids Res.* 33, D611-D613.
- Brandt, R. (1996). The tau proteins in neuronal growth and development. *Front Biosci.* 1, d118-d130.
- Brenner, S. (2002). Antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 288, 2265-2266.
- Bridi, R., Crossetti, F.P., Steffen, V.M., Henriques, A.T. (2001). The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. *Phytother. Res.* 15, 449-451.
- Brookes, P.S., Zhang, J., Dai, L., Zhou, F., Parks, D.A., Darley-Usmar, V.M., Anderson, P.G. (2001). Increased sensitivity of mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 69-82.
- Brown, G.C., Bal-Price, A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol. Neurobiol.* 27, 325-355.

- Brown,G.C., Borutaite,V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim.Biophys.Acta* 1658, 44-49.
- Buchet,R., Pikula,S. (2000). Alzheimer's disease: its origin at the membrane, evidence and questions. *Acta Biochim.Pol.* 47, 725-733.
- Burns,A., Rossor,M., Hecker,J., Gauthier,S., Petit,H., Moller,H.J., Rogers,S.L., Friedhoff,L.T. (1999). The effects of donepezil in Alzheimer's disease - results from a multinational trial. *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* 10, 237-244.
- Busciglio,J., Lorenzo,A., Yeh,J., Yankner,B.A. (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-888.
- Buxbaum,J.D., Thinakaran,G., Koliatsos,V., O'Callahan,J., Slunt,H.H., Price,D.L., Sisodia,S.S. (1998). Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J.Neurosci.* 18, 9629-9637.
- Cadenas,E., Boveris,A., Ragan,C.I., 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.
- Canevari,L., Clark,J.B., Bates,T.E. (1999). beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* 457, 131-134.
- Cao,X., 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., Malatesta,F., 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., Oliveira,C.R. (2004a). Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol.Aging* 25, 105-110.
- Cardoso,S.M., Santana,I., Swerdlow,R.H., Oliveira,C.R. (2004b). Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J.Neurochem.* 89, 1417-1426.
- Casley,C.S., Canevari,L., Land,J.M., Clark,J.B., Sharpe,M.A. (2002). Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J.Neurochem.* 80, 91-100.
- Caspersen,C., Wang,N., Yao,J., Sosunov,A., Chen,X., Lustbader,J.W., Xu,H.W., Stern,D., McKhann,G., Yan,S.D. (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 19, 2040-2041.
- Cassina,A., Radi,R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch.Biochem.Biophys.* 328, 309-316.
- Cecchini,G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu.Rev.Biochem.* 72, 77-109.
- Chagnon,P., Betard,C., Robitaille,Y., Cholette,A., Gauvreau,D. (1995). Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases. *Neuroreport* 6, 711-715.
- Chance,B., Sies,H., Boveris,A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59, 527-605.
- Chance,B., WILLIAMS,G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation 8. *Adv.Enzymol.Relat Subj.Biochem.* 17, 65-134.

- Chirino,R., Lopez,A., Navarro,D., Cabrera,J.J., Rivero,J.F., Diaz-Chico,B.N. (1989). Steroid induction of low-affinity glucocorticoid binding sites in rat liver microsomes. *J.Steroid Biochem.* 34, 97-105.
- Chui,D.H., Tanahashi,H., Ozawa,K., Ikeda,S., Checler,F., Ueda,O., Suzuki,H., Araki,W., Inoue,H., Shirotani,K., Takahashi,K., Gallyas,F., Tabira,T. (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat.Med.* 5, 560-564.
- Citron,M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 5, 677-685.
- Cleary,J.P., Walsh,D.M., Hofmeister,J.J., Shankar,G.M., Kuskowski,M.A., Selkoe,D.J., Ashe,K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-protein specifically disrupt cognitive function. *Nature neuroscience* 8, 79-84.
- Cohen,S.A., Muller,W.E. (1993). Effects of Piracetam on N-Methyl-D-Aspartate Receptor Properties in the Aged Mouse-Brain. *Pharmacology* 47, 217-222.
- 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. (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., 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.
- Cottrell,D.A., Borthwick,G.M., Johnson,M.A., Ince,P.G., Turnbull,D.M. (2002). The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 28, 390-396.
- Croisile,B., Trillet,M., Fondarai,J., Laurent,B., Mauguier,F., Billardon,M. (1993). Long-Term and High-Dose Piracetam Treatment of Alzheimers-Disease. *Neurology* 43, 301-305.
- Cruts,M., Backhovens,H., Wang,S.Y., Van Gassen,G., Theuns,J., De Jonghe,C.D., Wehnert,A., De Voecht,J., De Winter,G., Cras,P., . (1995). Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum.Mol.Genet.* 4, 2363-2371.
- Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, Huang X, Farrag YW, Perry G, Bush AI. (2000) Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J Biol Chem.* 275(26),19439-42.
- Cummings,J.L., Cole,G. (2002). Alzheimer disease. *JAMA* 287, 2335-2338.
- D'Andrea,M.R., Nagele,R.G., Wang,H.Y., Peterson,P.A., Lee,D.H. (2001). Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 38, 120-134.
- David,D.C., Hauptmann,S., Scherping,I., Schuessel,K., Keil,U., Rizzu,P., Ravid,R., Drose,S., Brandt,U., Muller,W.E., Eckert,A., Gotz,J. (2005). Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L Tau transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 280, 23802-23814.
- Davies,P., Maloney,A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.

- de la Torre, J.C. (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics 70. *Lancet Neurol.* 3, 184-190.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex 10. *Neuron* 38, 9-12.
- De Strooper, B., Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1857-1870.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein 5. *Nature* 391, 387-390.
- Dedeyn, P.P., DeReuck, J., Orgogozo, J.M., Deberdt, W. (1996). The piracetam in acute stroke study (PASS). *Stroke* 27, 165.
- DeFeudis, F.V., Drieu, K. (2000). Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr. Drug Targets.* 1, 25-58.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., Glabe, C.G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280, 17294-17300.
- Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., Paul, S.M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5, 452-457.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption 1. *Cell* 89, 297-308.
- Drubin, D.G., Kirschner, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103, 2739-2746.
- Du, G., Willet, K., Mouithys-Mickalad, A., Sluse-Goffart, C.M., Droy-Lefaix, M.T., Sluse, F.E. (1999). EGb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 596-604.
- Ebner, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 143, 777-794.
- Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Dowd, E., Janne, J., Grant, S.M., Szyf, M., Wandosell, F., Avila, J., Grimm, H., Dunnett, S.B., Hartmann, T., Alhonen, L., Cuervo, A.C. (2004). Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience* 129, 583-592.
- Eckert, A., Keil, U., Kressmann, S., Schindowski, K., Leutner, S., Leutz, S., Müller, W.E. (2003). Effects of EGb 761 (R) Ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry* 36, S15-S23.
- Eckert, A., Keil, U., Scherping, I., Hauptmann, S., Müller, W.E. (2005). Stabilization of mitochondrial membrane potential and improvement of neuronal energy metabolism by Ginkgo biloba extract EGb 761. *Natural Products and Molecular Therapy* 1056, 474-485.

- Eckert,A., Steiner,B., Marques,C., Leutz,S., Romig,H., Haass,C., Muller,W.E. (2001). Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J.Neurosci.Res.* 64, 183-192.
- Eckert,G.P., Cairns,N.J., Muller,W.E. (1999a). 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., 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., Deberdt,W. (1994). Effect of Piracetam on Recovery and Rehabilitation After Stroke - A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Clinical Neuropharmacology* 17, 320-331.
- Engelbrecht,S., Junge,W. (1997). ATP synthase: a tentative structural model. *FEBS Lett.* 414, 485-491.
- Ernst,E. (1999). Herbal medications for common ailments in the elderly. *Drugs Aging* 15, 423-428.
- Esch,F.S., Keim,P.S., Beattie,E.C., Blacher,R.W., Culwell,A.R., Oltersdorf,T., McClure,D., Ward,P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol.* 143(1),217-24.
- 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., 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., 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.
- Fath,T., Eidenmuller,J., Brandt,R. (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 22, 9733-9741.
- Fernandez-Vizarra,P., Fernandez,A.P., Castro-Blanco,S., Serrano,J., Bentura,M.L., Martinez-Murillo,R., Martinez,A., Rodrigo,J. (2004). Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol.Histopathol.* 19, 823-844.
- Fillit,H., Hill,J.W., Futterman,R. (2002). Health care utilization and costs of Alzheimer's disease: the role of co-morbid conditions, disease stage, and pharmacotherapy. *Fam.Med.* 34, 528-535.
- Flicker,L., Grimley,E.G. (2001). Piracetam for dementia or cognitive impairment. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD001011.
- Frey,T.G., Mannella,C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem.Sci.* 25, 319-324.
- Furukawa,K., Sopher,B.L., Rydel,R.E., Begley,J.G., Pham,D.G., Martin,G.M., Fox,M., 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.

- Gabryel,B., Adamek,M., Pudelko,A., Malecki,A., 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.
- Gibson,G.E., Zhang,H., Sheu,K.F., Bogdanovich,N., Lindsay,J.G., Lannfelt,L., Vestling,M., Cowburn,R.F. (1998). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Ann.Neurol.* 44, 676-681.
- Giurgea,C.E. (1982). The Nootropic Concept and Its Prospective Implications. *Drug Development Research* 2, 441-446.
- Glenner,G.G., Wong,C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 120, 885-890.
- Goate,A., Chartier-Harlin,M.C., Mullan,M., Brown,J., Crawford,F., Fidani,L., Giuffra,L., Haynes,A., Irving,N., James,L., . (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Goedert,M., Spillantini,M.G., Jakes,R., Rutherford,D., Crowther,R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
- Gohil,K. (2002). Genomic responses to herbal extracts: lessons from in vitro and in vivo studies with an extract of Ginkgo biloba. *Biochem.Pharmacol.* 64, 913-917.
- Gohil,K., Packer,L. (2002). Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of Ginkgo biloba extract, EGb 761. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 48, 625-631.
- Gong,C.X., Singh,T.J., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J.Neurochem.* 61, 921-927.
- Gotz,J. (2001). Tau and transgenic animal models. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 35, 266-286.
- Gotz,J., Chen,F., Barmettler,R., Nitsch,R.M. (2001a). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J.Biol.Chem.* 276, 529-534.
- Gotz,J., Chen,F., van Dorpe,J., Nitsch,R.M. (2001b). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491-1495.
- Graves,A.B., van Duijn,C.M., Chandra,V., Fratiglioni,L., Heyman,A., Jorm,A.F., Kokmen,E., Kondo,K., Mortimer,J.A., Rocca,W.A., . (1991). Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group 3. *Int.J.Epidemiol.* 20 Suppl 2, S48-S57.
- Gray,M.W., Burger,G., Lang,B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Green,D.R., Reed,J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Greenberg,S.M. (2000). Donepezil in the treatment of alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 57, 1380.
- Greenberg,S.M., Qiu,W.Q., Selkoe,D.J., Benitezhak,A., Kosik,K.S. (1995). Amino-Terminal Region of the Beta-Amyloid Precursor Protein Activates Mitogen-Activated Protein-Kinase. *Neuroscience Letters* 198, 52-56.
- Greenberg,S.M., Tennis,M.K., Brown,L.B., Gomez-Isla,T., Hayden,D.L., Schoenfeld,D.A., Walsh,K.L., Corwin,C., Daffner,K.R., Friedman,P., Meadows,M.E., Sperling,R.A.,

- Growdon, J.H. (2000). Donepezil therapy in clinical practice: a randomized crossover study. *Arch.Neurol.* 57, 94-99.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides 75. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 742-747.
 - Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Oltersdorf, T., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1993). Normal Cellular Processing of the Beta-Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid-Beta Peptide and Related Molecules. *Alzheimers Disease: Amyloid Precursor Proteins, Signal Transduction, and Neuronal Transplantation* 695, 109-116.
 - Haass, C., Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases 1. *Trends Cell Biol.* 12, 556-562.
 - Han, X., Cheng, H., Fryer, J.D., Fagan, A.M., Holtzman, D.M. (2003). Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. Modulation of sulfatide content. *J.Biol.Chem.* 278, 8043-8051.
 - Hardy, J. (2006). Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr.Alzheimer Res.* 3, 71-73.
 - Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
 - Harper, J.D., Lansbury, P.T., Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 66, 385-407.
 - Harper, J.D., Lieber, C.M., Lansbury, P.T., Jr. (1997a). Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem.Biol.* 4, 951-959.
 - Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M., Lansbury, P.T. (1997b). Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem.Biol.* 4, 119-125.
 - Harris, F.M., Tesseur, I., Brecht, W.J., Xu, Q., Mullendorff, K., Chang, S., Wyss-Coray, T., Mahley, R.W., Huang, Y. (2004). Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease 8. *J.Biol.Chem.* 279, 3862-3868.
 - 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., Dingwall, C. (2003). BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol.Cell Neurosci.* 24, 646-655.
 - Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J.Neurosci.* 19, 8876-8884.
 - 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., Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat.Med.* 3, 1016-1020.
 - Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu.Rev.Biochem.* 54, 1015-1069.

- Hauptmann,S., Keil,U., Scherping,I., Bonert,A., Eckert,A., Muller,W.E. (2006). Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 41, 668-673.
- Heiss, W.D., Hebold, I., Klinkhammer, P., Ziffling, P., Szelies, B., Pawlik, G., 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.
- Herms,J., Anliker,B., Heber,S., Ring,S., Fuhrmann,M., Kretschmar,H., Sisodia,S., Muller,U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106-4115.
- Herreman,A., Serneels,L., Annaert,W., Collen,D., Schoonjans,L., De Strooper,B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells 1. *Nat.Cell Biol.* 2, 461-462.
- 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., Smith,M.A. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 21, 3017-3023.
- Ho,L., Fukuchi,K., Younkin,S.G. (1996). The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *J.Biol.Chem.* 271, 30929-30934.
- 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., 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., 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., Tang,J. (2000). Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* 290, 150-153.
- Horvath,B., Marton,Z., Halmosi,R., Alexy,T., Szapary,T., Vekasi,T., Biro,Z., Habon,T., Kesmarky,G., Toth,K. (2002). In vitro antioxidant properties of pentoxifylline, piracetam, and vinpocetine. *Clinical Neuropharmacology* 25, 37-42.
- Howlett,D.R., Jennings,K.H., Lee,D.C., Clark,M.S., Brown,F., Wetzel,R., Wood,S.J., Camilleri,P., Roberts,G.W. (1995). Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration.* 4, 23-32.
- Hoyer,S. (2000). Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp.Gerontol.* 35, 1363-1372.
- Hussain,I., Powell,D., Howlett,D.R., Tew,D.G., Meek,T.D., Chapman,C., Gloger,I.S., Murphy,K.E., Southan,C.D., Ryan,D.M., Smith,T.S., Simmons,D.L., Walsh,F.S., Dingwall,C., Christie,G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol.Cell Neurosci.* 14, 419-427.
- Irie,K., Murakami,K., Masuda,Y., Morimoto,A., Ohigashi,H., Ohashi,R., Takegoshi,K., Nagao,M., Shimizu,T., Shirasawa,T. (2005). Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J.Biosci.Bioeng.* 99, 437-447.

- Jacobus,W.E., Moreadith,R.W., Vandegaer,K.M. (1982). Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J.Biol.Chem.* 257, 2397-2402.
- Jameson,L., Frey,T., Zeeberg,B., Dalldorf,F., Caplow,M. (1980). Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins 2. *Biochemistry* 19, 2472-2479.
- Janssens,D., Remacle,J., Drieu,K., 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., Westaway,D. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979-982.
- Jarrett,J.T., Berger,E.P., Lansbury,P.T., Jr. (1993a). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695, 144-148.
- Jarrett,J.T., Berger,E.P., Lansbury,P.T., Jr. (1993b). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease 18. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
- Jelic,V., Kivipelto,M., Winblad,B. (2006). Clinical trials in mild cognitive impairment: lessons for the future. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 77, 429-438.
- Jenkins,S.M., Johnson,G.V. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67-71.
- Jicha,G.A., Weaver,C., Lane,E., Vianna,C., Kress,Y., Rockwood,J., Davies,P. (1999). cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 19, 7486-7494.
- Jick,H., Zornberg,G.L., Jick,S.S., Seshadri,S., Drachman,D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631.
- Jin,L.W., Ninomiya,H., Roch,J.M., Schubert,D., Masliah,E., Otero,D.A., Saitoh,T. (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J.Neurosci.* 14, 5461-5470.
- Johnson,R.J., Xiao,G., Shanmugaratnam,J., Fine,R.E. (2001). Calreticulin functions as a molecular chaperone for the beta-amyloid precursor protein. *Neurobiol.Aging* 22, 387-395.
- Kacser,H., Burns,J.A. (1979). MOlecular democracy: who shares the controls? *Biochem.Soc.Trans.* 7, 1149-1160.
- Kamal,A., Stokin,G.B., Yang,Z., Xia,C.H., 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., Malinow,R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kampkotter,A., Pielarski,T., Rohrig,R., Timpel,C., Chovolou,Y., Watjen,W., Kahl,R. (2007). The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol.Res.* 55, 139-147.

- Kang,J., Lemaire,H.G., Unterbeck,A., Salbaum,J.M., Masters,C.L., Grzeschik,K.H., Multhaup,G., Beyreuther,K., Muller-Hill,B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kanowski,S., Herrmann,W.M., Stephan,K., Wierich,W., 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 1. *Pharmacopsychiatry* 29, 47-56.
- Keil,U., Bonert,A., Marques,C.A., Scherping,I., Weyermann,J.R., Strosznajder,J.B., Muller-Spahn,F., Haass,C., Czech,C., Pradier,L., Muller,W.E., Eckert,A. (2004). Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 50310-50320.
- Keil,U., Hauptmann,S., Bonert,A., Scherping,I., Eckert,A., Muller,W.E. (2006a). Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant A beta PP and tau protein mutations. *Journal of Alzheimers Disease* 9, 139-146.
- Keil,U., Scherping,I., Hauptmann,S., Eckert,A., Muller,W.E. (2005). Stabilization of mitochondrial function by piracetam. *Pharmacopsychiatry* 38, 253.
- Keil,U., Scherping,I., Hauptmann,S., Schuessel,K., Eckert,A., Muller,W.E. (2006b). Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *Br.J.Pharmacol.* 147, 199-208.
- 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., Bennett,J.P., Jr. (2000). Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann.Neurol.* 48, 148-155.
- Kimberly,W.T., Wolfe,M.S. (2003). Identity and function of gamma-secretase. *J.Neurosci.Res.* 74, 353-360.
- Kish,S.J., Bergeron,C., Rajput,A., Dozic,S., Mastrogiacomo,F., Chang,L.J., Wilson,J.M., DiStefano,L.M., 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., 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.
- Kleijnen,J., Knipschild,P. (1992a). Ginkgo biloba. *Lancet* 340, 1136-1139.
- Kleijnen,J., Knipschild,P. (1992b). Ginkgo biloba for cerebral insufficiency. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 34, 352-358.
- Klein,W.L., Krafft,G.A., Finch,C.E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? 4. *Trends Neurosci.* 24, 219-224.
- Koike,H., Tomioka,S., Sorimachi,H., Saido,T.C., Maruyama,K., Okuyama,A., Fujisawa-Sehara,A., Ohno,S., Suzuki,K., Ishiura,S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem.J.* 343 Pt 2, 371-375.
- Kojro,E., Gimpl,G., Lammich,S., Marz,W., 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.

- Kumaran,S., Subathra,M., Balu,M., Panneerselvam,C. (2005). Supplementation of L-carnitine improves mitochondrial enzymes in heart and skeletal muscle of aged rats. *Exp.Aging Res.* 31, 55-67.
- Kurt,M.A., Davies,D.C., Kidd,M., Duff,K., Howlett,D.R. (2003). Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol.Dis.* 14, 89-97.
- LaFerla,F.M., Oddo,S. (2005). Alzheimer's disease: Aβeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol.Med.* 11, 170-176.
- LaFrance,R., Brustovetsky,N., Sherburne,C., DeLong,D., Dubinsky,J.M. (2005). Age-related changes in regional brain mitochondria from Fischer 344 rats 2. *Aging Cell* 4, 139-145.
- Lammich,S., Kojro,E., Postina,R., Gilbert,S., Pfeiffer,R., Jasionowski,M., Haass,C., 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., Einarson,T.R. (2003). Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ.* 169, 557-564.
- Le Bars,P.L., Katz,M.M., Berman,N., Itil,T.M., Freedman,A.M., 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., Itil,K. (2000). A 26-week analysis of a double-blind, placebo-controlled trial of the Ginkgo biloba extract EGb 761 (R) in dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 11, 230-237.
- Le Bars,P.L., Velasco,F.M., Ferguson,J.M., Dessain,E.C., Kieser,M., Hoerr,R. (2002). Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the Ginkgo biloba extract EGb 761((R)) in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 45, 19-26.
- Ledesma,M.D., Bonay,P., Colaco,C., Avila,J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J.Biol.Chem.* 269, 21614-21619.
- Lee,V.M., Otvos,L., Jr., Carden,M.J., Hollosi,M., Dietzschold,B., Lazzarini,R.A. (1988). Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 1998-2002.
- Lemere,C.A., Lopera,F., Kosik,K.S., Lendon,C.L., Ossa,J., Saido,T.C., Yamaguchi,H., Ruiz,A., Martinez,A., Madrigal,L., Hincapie,L., Arango,J.C.L., Anthony,D.C., Koo,E.H., Goate,A.M., Selkoe,D.J., Arango,J.C.V. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased Aβeta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature Medicine* 2, 1146-1150.
- Lenaz,G., Baracca,A., Fato,R., Genova,M.L., Solaini,G. (2006). Mitochondrial Complex I: structure, function, and implications in neurodegeneration. *Ital.J.Biochem.* 55, 232-253.
- Lenaz,G., Bovina,C., Castelluccio,C., Fato,R., Formiggini,G., Genova,M.L., Marchetti,M., Pich,M.M., Pallotti,F., Parenti,C.G., Biagini,G. (1997). Mitochondrial complex I defects in aging. *Mol.Cell Biochem.* 174, 329-333.
- Leutz,S., Steiner,B., Marques,C.A., Haass,C., Muller,W.E., 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.

- Levy-Lahad,E., Wasco,W., Poorkaj,P., Romano,D.M., Oshima,J., Pettingell,W.H., Yu,C.E., Jondro,P.D., Schmidt,S.D., Wang,K., . (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Lewis,J., Dickson,D.W., Lin,W.L., Chisholm,L., Corral,A., Jones,G., Yen,S.H., Sahara,N., Skipper,L., Yager,D., Eckman,C., Hardy,J., Hutton,M., McGowan,E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.
- Lill,R., Kispal,G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem.Sci.* 25, 352-356.
- Lin,D.T., Wu,J., Holstein,D., Upadhyay,G., Rourk,W., Muller,E., Lechleiter,J.D. (2007). Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol.Aging* 28, 99-111.
- Liu,F., Iqbal,K., Grundke-Iqbal,I., 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., Serrano,S. (1998). Biology and pathology of the mitochondrion. *Ultrastruct.Pathol.* 22, 357-367.
- Logan,D.C. (2007). The mitochondrial compartment. *J.Exp.Bot.* 58, 1225-1243.
- Lorenzo,A., 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.
- Lue,L.F., Kuo,Y.M., Roher,A.E., Brachova,L., Shen,Y., Sue,L., Beach,T., Kurth,J.H., Rydel,R.E., Rogers,J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am.J.Pathol.* 155, 853-862.
- 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., Wu,H. (2004). AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease 3. *Science* 304, 448-452.
- Mahley,R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.
- Mancuso,C., Scapagini,G., Curro,D., Giuffrida Stella,A.M., De Marco,C., Butterfield,D.A., Calabrese,V. (2007). Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci.* 12, 1107-1123.
- Mancuso,M., Filosto,M., Bosetti,F., Ceravolo,R., Rocchi,A., Tognoni,G., Manca,M.L., Solaini,G., Siciliano,G., 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.
- Manczak,M., Jung,Y., Park,B.S., Partovi,D., Reddy,P.H. (2005). Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J.Neurochem.* 92, 494-504.
- Mandelkow,E.M., Mandelkow,E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 425-427.
- Mandelkow,E.M., Stamer,K., Vogel,R., Thies,E., Mandelkow,E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol.Aging* 24, 1079-1085.

- Mann,D.M. (1989a). Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. *Neurobiol.Aging* 10, 397-399.
- Mann,D.M. (1989b). Neuropathology of Alzheimer's disease: towards an understanding of the pathogenesis. *Biochem.Soc.Trans.* 17, 73-75.
- Marques,C.A., Keil,U., Bonert,A., Steiner,B., Haass,C., Muller,W.E., 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.
- Martinez,M., Ferrandiz,M.L., De Juan,E., Miquel,J. (1994). Age-related changes in glutathione and lipid peroxide content in mouse synaptic mitochondria: relationship to cytochrome c oxidase decline. *Neurosci.Lett.* 170, 121-124.
- Martinou,J.C., Desagher,S., Antonsson,B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat.Cell Biol.* 2, E41-E43.
- Mason,R.P., Shoemaker,W.J., Shajenko,L., Chambers,T.E., Herbette,L.G. (1992). Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol.Aging* 13, 413-419.
- Masters,C.L., Simms,G., Weinman,N.A., Multhaup,G., McDonald,B.L., Beyreuther,K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 4245-4249.
- Matsuo,E.S., Shin,R.W., Billingsley,M.L., Van deVoorde,A., O'Connor,M., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13, 989-1002.
- Mattson,M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews* 77, 1081-1132.
- Maurer,I., Zierz,S., Moller,H.J. (2000). A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol.Aging* 21, 455-462.
- Maurer,K., Ihl,R., Dierks,T., Frolich,L. (1997). Clinical efficacy of Ginkgo biloba special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. *J.Psychiatr.Res.* 31, 645-655.
- Mayeux,R., Honig,L.S., Tang,M.X., Manly,J., Stern,Y., Schupf,N., Mehta,P.D. (2003). Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61, 1185-1190.
- McLean,C.A., Cherny,R.A., Fraser,F.W., Fuller,S.J., Smith,M.J., Beyreuther,K., Bush,A.I., 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.
- Merriwether,D.A., Clark,A.G., Ballinger,S.W., Schurr,T.G., Soodyall,H., Jenkins,T., Sherry,S.T., Wallace,D.C. (1991). The structure of human mitochondrial DNA variation 1. *J.Mol.Evol.* 33, 543-555.
- Michikawa,Y., Mazzucchelli,F., Bresolin,N., Scarlato,G., Attardi,G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286, 774-779.
- Migheli,A., Butler,M., Brown,K., Shelanski,M.L. (1988). Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J.Neurosci.* 8, 1846-1851.

- Mingeot-Leclercq,M.P., Lins,L., Bensliman,M., Thomas,A., Van Bambeke,F., Peuvot,J., Schanck,A., Bresseur,R. (2003). Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide A beta C-terminal fragment. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1609, 28-38.
- 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., 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., Eckert,A. (1999). Piracetam: Novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry* 32, 2-9.
- Muller,W.E., Keil,U., Scherping,I., Eckert,A. (2004). Piracetam stabilizes mitochondrial function in vitro and in vivo. *Neuropsychopharmacology* 29, S129.
- Muller,W.E., Koch,S., Scheuer,K., Rostock,A., Bartsch,R. (1997). Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochemical Pharmacology* 53, 135-140.
- Naftalin,R.J., Cunningham,P., Afzal-Ahmed,I. (2004). Piracetam and TRH analogues antagonise inhibition by barbiturates, diazepam, melatonin and galanin of human erythrocyte D-glucose transport. *British Journal of Pharmacology* 142, 594-608.
- Nakahara,H., Kanno,T., Inai,Y., Utsumi,K., Hiramatsu,M., Mori,A., Packer,L. (1998). Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic.Biol.Med.* 24, 85-92.
- Navarro,A. (2004). Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol.Aspects Med.* 25, 37-48.
- Navarro,A., Boveris,A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 287, R1244-R1249.
- Navarro,A., Boveris,A. (2007a). Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. *Front Biosci.* 12, 1154-1163.
- Navarro,A., Boveris,A. (2007b). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 292, C670-C686.
- Navarro,A., Gomez,C., Lopez-Cepero,J.M., Boveris,A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286, R505-R511.
- Navarro,A., Lopez-Cepero,J.M., Sanchez Del Pino,M.J. (2001). Skeletal muscle and aging. *Front Biosci.* 6, D26-D44.
- Navarro,A., Sanchez Del Pino,M.J., Gomez,C., Peralta,J.L., Boveris,A. (2002). Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 282, R985-R992.
- Nishimoto,I., Okamoto,T., Matsuura,Y., Takahashi,S., Okamoto,T., Murayama,Y., Ogata,E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362, 75-79.
- 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., Duff,K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555-565.
- Nordstedt,C., Caporaso,G.L., Thyberg,J., Gandy,S.E., Greengard,P. (1993). Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 268, 608-612.
 - Novikov,V.E., 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., Smith,M.A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60, 759-767.
 - Oda,T., Pasinetti,G.M., Osterburg,H.H., Anderson,C., Johnson,S.A., Finch,C.E. (1994). Purification and characterization of brain clusterin 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 204, 1131-1136.
 - Oda,T., Wals,P., Osterburg,H.H., Johnson,S.A., Pasinetti,G.M., Morgan,T.E., Rozovsky,I., Stine,W.B., Snyder,S.W., Holzman,T.F., . (1995). Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress 1. *Exp.Neurol.* 136, 22-31.
 - Oddo,S., Caccamo,A., Kitazawa,M., Tseng,B.P., LaFerla,F.M. (2003a). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* 24, 1063-1070.
 - Oddo,S., Caccamo,A., Shepherd,J.D., Murphy,M.P., Golde,T.E., Kaye,R., Metherate,R., Mattson,M.P., Akbari,Y., LaFerla,F.M. (2003b). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A beta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
 - Ojaimi,J., Byrne,E. (2001). Mitochondrial function and alzheimer's disease. *Biol.Signals Recept.* 10, 254-262.
 - Oliver,C., Holland,A.J. (1986). Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review. *Psychol.Med.* 16, 307-322.
 - Orgogozo,J.M. (1999). Piracetam in the treatment of acute stroke. *Pharmacopsychiatry* 32 *Suppl* 1, 25-32.
 - Oshino,N., 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.
 - Ott,A., Slioter,A.J., Hofman,A., van Harskamp,F., Witteman,J.C., Van Broeckhoven,C., van Duijn,C.M., Breteler,M.M. (1998). Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* 351, 1840-1843.
 - Otth,C., Concha,I.I., Arendt,T., Stieler,J., Schliebs,R., Gonzalez-Billault,C., Maccioni,R.B. (2002). AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J.Alzheimers.Dis.* 4, 417-430.
 - Oyama,Y., Fuchs,P.A., Katayama,N., 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.

- Papa,S., Skulachev,V.P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol.Cell Biochem.* 174, 305-319.
- Pappolla,M.A., Smith,M.A., Bryant-Thomas,T., Bazan,N., Petanceska,S., Perry,G., Thal,L.J., Sano,M., Refolo,L.M. (2002). Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis. *Free Radic.Biol.Med.* 33, 173-181.
- Parker,W.D., Jr. (1991). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 640, 59-64.
- Parker,W.D., Jr., Filley,C.M., 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., 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., Kleinschmidt-DeMasters,B.K. (1994b). Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44, 1090-1096.
- Parks,J.K., Smith,T.S., Trimmer,P.A., Bennett,J.P., Jr., Parker,W.D., Jr. (2001). Neurotoxic A β 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.
- Patrick,G.N., Zukerberg,L., Nikolic,M., de la,M.S., Dikkes,P., Tsai,L.H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.
- Pedersen,P.A., Rasmussen,J.H., Jorgensen,P.L. (1996). Consequences of mutations to the phosphorylation site of the alpha-subunit of Na, K-ATPase for ATP binding and E1-E2 conformational equilibrium. *Biochemistry* 35, 16085-16093.
- Petanceska,S.S., DeRosa,S., Olm,V., Diaz,N., Sharma,A., Thomas-Bryant,T., Duff,K., Pappolla,M., Refolo,L.M. (2002). Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? *J.Mol.Neurosci.* 19, 155-161.
- Peuvot,J., Schanck,A., Deleers,M., Brasseur,R. (1995). Piracetam-Induced Changes to Membrane Physical-Properties - A Combined Approach by P-31 Nuclear-Magnetic-Resonance and Conformational-Analysis. *Biochemical Pharmacology* 50, 1129-1134.
- Pietrzik,C., Behl,C. (2005). Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application 4. *Int.J.Exp.Pathol.* 86, 173-185.
- Pilch,H., Muller,W.E. (1988). Chronic treatment with piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged mice. *Pharmacopsychiatry* 21, 324-325.
- Pitas,R.E., Boyles,J.K., Lee,S.H., Hui,D., Weisgraber,K.H. (1987). Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J.Biol.Chem.* 262, 14352-14360.
- Plant,L.D., Boyle,J.P., Smith,I.F., Peers,C., Pearson,H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J.Neurosci.* 23, 5531-5535.
- 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., 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.

- Pratico,D. (2005). Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. *Neurobiol.Aging* 26, 581-583.
- Pratico,D., Delanty,N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am.J.Med.* 109, 577-585.
- Prencipe,M., Casini,A.R., Ferretti,C., Lattanzio,M.T., Fiorelli,M., Culasso,F. (1996). Prevalence of dementia in an elderly rural population: effects of age, sex, and education. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 60, 628-633.
- Price,D.L., Sisodia,S.S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu.Rev.Neurosci.* 21, 479-505.
- Radi,R., Cassina,A., Hodara,R. (2002a). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol.Chem.* 383, 401-409.
- Radi,R., Cassina,A., Hodara,R., Quijano,C., Castro,L. (2002b). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic.Biol.Med.* 33, 1451-1464.
- Radi,R., Rodriguez,M., Castro,L., Telleri,R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch.Biochem.Biophys.* 308, 89-95.
- Ramsden,M., Henderson,Z., Pearson,H.A. (2002). Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility State
- 5. *Brain Res.* 956, 254-261.
- Ramsden,M., Plant,L.D., Webster,N.J., Vaughan,P.F., Henderson,Z., Pearson,H.A. (2001). Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J.Neurochem.* 79, 699-712.
- Rank,K.B., Pauley,A.M., Bhattacharya,K., Wang,Z., Evans,D.B., Fleck,T.J., Johnston,J.A., Sharma,S.K. (2002). Direct interaction of soluble human recombinant tau protein with Abeta 1-42 results in tau aggregation and hyperphosphorylation by tau protein kinase II. *FEBS Lett.* 514, 263-268.
- Rapoport,M., Dawson,H.N., Binder,L.I., Vitek,M.P., Ferreira,A. (2002). Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 6364-6369.
- Raskind,M.A., Peskind,E.R., Wessel,T., Yuan,W. (2000). Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group 4. *Neurology* 54, 2261-2268.
- Rasmussen, U.F. and Rasmussen, H.N. (2000). Human quadriceps muscle mitochondria: a functional characterization. *Mol. Cell. Biochem.* (208): 37-44.
- Reddy,P.H., Beal,M.F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res.Brain Res.Rev.* 49, 618-632.
- Reinhard,C., Hebert,S.S., De Strooper,B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996-4006.
- Reisberg,B., Doody,R., Stoffler,A., Schmitt,F., Ferris,S., Mobius,H.J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N.Engl.J.Med.* 348, 1333-1341.
- Riedel-Heller,S.G., Busse,A., Aurich,C., Matschinger,H., Angermeyer,M.C. (2001). Prevalence of dementia according to DSM-III-R and ICD-10: results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) Part 14. *Br.J.Psychiatry* 179, 250-254.

- Rimbach,G., Wolfram,S., Watanabe,C., Packer,L., Gohil,K. (2003). Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on differential gene expression. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 1, S95-S99.
- Robak,J., 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., 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.
- Rogaev,E.I., Sherrington,R., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Liang,Y., Chi,H., Lin,C., Holman,K., Tsuda,T., . (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
- Rogaeva,E. (2002). The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular.Med.* 2, 1-10.
- Rogers,S.L., Doody,R.S., Mohs,R.C., Friedhoff,L.T. (1998). Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Arch.Intern.Med.* 158, 1021-1031.
- Rogers,S.L., Friedhoff,L.T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group 1. *Dementia* 7, 293-303.
- Rondi-Reig,L., Libbey,M., Eichenbaum,H., Tonegawa,S. (2001). CA1-specific N-methyl-D-aspartate receptor knockout mice are deficient in solving a nonspatial transverse patterning task. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 3543-3548.
- Rong,Y., Geng,Z., Lau,B.H. (1996). Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 20, 121-127.
- Rosler,M., Anand,R., Cicin-Sain,A., Gauthier,S., Agid,Y., Dal Bianco,P., Stahelin,H.B., Hartman,R., Gharabawi,M. (1999). Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* 318, 633-638.
- Saija,A., Scalese,M., Lanza,M., Marzullo,D., Bonina,F., Castelli,F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic.Biol.Med.* 19, 481-486.
- Salomon,A.R., Marcinowski,K.J., Friedland,R.P., Zagorski,M.G. (1996). Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide. *Biochemistry* 35, 13568-13578.
- Sasaki,K., Hatta,S., Wada,K., Ueda,N., Yoshimura,T., Endo,T., Sakata,M., Tanaka,T., 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.
- Sastre,J., Lloret,A., Borrás,C., Pereda,J., Garcia-Sala,D., Droy-Lefaix,M.T., Pallardo,F.V., Vina,J. (2002). Ginkgo biloba extract EGb 761 protects against mitochondrial aging in the brain and in the liver. *Cellular and Molecular Biology* 48, 685-692.
- Sastre,J., Millan,A., delaAsuncion,J.G., Pla,R., Juan,G., Pallardo,F.V., OConnor,E., Martin,J.A., DroyLefaix,M.T., Vina,J. (1998). A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents

mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 298-304.

- Sastre,M., Steiner,H., Fuchs,K., Capell,A., Multhaup,G., Condrón,M.M., Teplow,D.B., Haass,C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835-841.
- Saunders,A.M., Roses,A.D. (1993). Apolipoprotein E4 allele frequency, ischemic cerebrovascular disease, and Alzheimer's disease. *Stroke* 24, 1416-1417.
- Saunders,A.M., Schmechel,K., Breitner,J.C., Benson,M.D., Brown,W.T., Goldfarb,L., Goldgaber,D., Manwaring,M.G., Szymanski,M.H., McCown,N., . (1993a). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342, 710-711.
- 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., . (1993b). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472.
- Schagger,H. (1996). Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues. *Methods Enzymol.* 264, 555-566.
- Schagger,H., Cramer,W.A., von Jagow,G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis 64. *Anal.Biochem.* 217, 220-230.
- Schenk,D., Barbour,R., Dunn,W., Gordon,G., Grajeda,H., Guido,T., Hu,K., Huang,J., Johnson-Wood,K., Khan,K., Kholodenko,D., Lee,M., Liao,Z., Lieberburg,I., Motter,R., Mutter,L., Soriano,F., Shopp,G., Vasquez,N., Vandeventer,C., Walker,S., Wogulis,M., Yednock,T., Games,D., 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., Müller,W.E. (1999). 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., 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. *Nature Medicine* 2, 864-870.
- Schindowski,K., Leutner,S., Kressmann,S., Eckert,A., Müller,W.E. (2001). Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice - Prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761). *Journal of Neural Transmission* 108, 969-978.
- Schlöndorff,J., Blobel,C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding 5. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 21), 3603-3617.
- Schmechel,D.E., Saunders,A.M., Strittmatter,W.J., Crain,B.J., Hulette,C.M., Joo,S.H., Pericak-Vance,M.A., Goldgaber,D., 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., Schimke,I. (1997). Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chem.Biol.Interact.* 106, 183-190.
- Schulz,V. (2003). Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine.* 10 Suppl 4, 74-79.
- Schussel,K., Leutner,S., Cairns,N.J., Czech,C., Pradier,L., Muller,W.E., Eckert,A. (2003). Antioxidative defence capacity in sporadic Alzheimer's disease and in transgenic mice overexpressing amyloid-beta. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 367, R87.
- Schussel,K., Leutner,S., Cairns,N.J., Czech,C., Pradier,L., Muller,W.E., Eckert,A. (2004). Impact of gender on oxidative stress parameters in Alzheimer's disease. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 369, R84.
- Selkoe,D.J. (1993). Physiological Production of the Beta-Amyloid Protein and the Mechanism of Alzheimers-Disease. *Trends in Neurosciences* 16, 403-409.
- Selkoe,D.J. (1996). Cell biology of the beta-amyloid precursor protein and the genetics of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 61, 587-596.
- Selkoe,D.J. (1997). Trafficking and processing of beta-amyloid precursor protein and the mechanism of familial Alzheimer's disease. *Molecular Biology of the Cell* 8, 713.
- Selkoe,D.J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology* 8, 447-453.
- Selkoe,D.J. (2001a). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11039-11041.
- Selkoe,D.J. (2001b). Presenilins, beta-amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience Research* 1, 91-103.
- Selkoe,D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791.
- Selkoe,D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology* 6, 1054-1061.
- Selkoe,D.J., Schenk,D. (2003). Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 545-584.
- Sergeant,N., Watez,A., Galvan-valencia,M., Ghestem,A., David,J.P., Lemoine,J., Sautiere,P.E., Dachary,J., Mazat,J.P., Michalski,J.C., Velours,J., Mena-Lopez,R., Delacourte,A. (2003). Association of ATP synthase alpha-chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease
31. Neuroscience 117, 293-303.
- Seubert,P., Vigo-Pelfrey,C., Esch,F., Lee,M., Dovey,H., Davis,D., Sinha,S., Schlossmacher,M., Whaley,J., Swindlehurst,C., . (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.
- Sherrington,R., Froelich,S., Sorbi,S., Campion,D., Chi,H., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Rogaev,E.I., Lin,C., Liang,Y., Ikeda,M., Mar,L., Brice,A., Agid,Y., Percy,M.E., Clerget-Darpoux,F., Piacentini,S., Marcon,G., Nacmias,B., Amaducci,L., Frebourg,T., Lannfelt,L., Rommens,J.M., George-Hyslop,P.H. (1996). Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum.Mol.Genet.* 5, 985-988.

- Sherrington,R., Rogaev,E.I., Liang,Y., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Chi,H., Lin,C., Li,G., Holman,K., . (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Siemers,E., Skinner,M., Dean,R.A., Gonzales,C., Satterwhite,J., Farlow,M., Ness,D., May,P.C. (2005). Safety, Tolerability, and Changes in Amyloid beta Concentrations After Administration of a gamma-Secretase Inhibitor in Volunteers. *Clin.Neuropharmacol.* 28, 126-132.
- Siesjo,B.K., Elmer,E., Janelidze,S., Keep,M., Kristian,T., Ouyang,Y.B., Uchino,H. (1999). Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir.Suppl* 73, 7-13.
- Simons,M., Keller,P., De Strooper,B., Beyreuther,K., Dotti,C.G., Simons,K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6460-6464.
- Simons,M., Schwarzler,F., Lutjohann,D., von Bergmann,K., Beyreuther,K., Dichgans,J., Wormstall,H., Hartmann,T., Schulz,J.B. (2002). Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial 46. *Ann.Neurol.* 52, 346-350.
- Sims,N.R., Finegan,J.M., Blass,J.P., Bowen,D.M., Neary,D. (1987). Mitochondrial function in brain tissue in primary degenerative dementia. *Brain Res.* 436, 30-38.
- Sinha,S., Lieberburg,I. (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 11049-11053.
- Slunt,H.H., Thinakaran,G., Von Koch,C., Lo,A.C., Tanzi,R.E., Sisodia,S.S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP) 2. *J.Biol.Chem.* 269, 2637-2644.
- Small,D.H., Nurcombe,V., Reed,G., Clarris,H., Moir,R., Beyreuther,K., 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.
- Small,D.H., Williamson,T., Reed,G., Clarris,H., Beyreuther,K., Masters,C.L., Nurcombe,V. (1996). The role of heparan sulfate proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 777, 316-321.
- Smith,J.V., Burdick,A.J., Golik,P., Khan,I., Wallace,D., 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., 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,J.V., Luo,Y. (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 64, 465-472.
- Smith,M.A., Nunomura,A., Lee,H.G., Zhu,X., Moreira,P.I., Avila,J., Perry,G. (2005). Chronological primacy of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurobiol.Aging* 26, 579-580.
- Soba,P., Eggert,S., Wagner,K., Zentgraf,H., Siehl,K., Kreger,S., Lower,A., Langer,A., Merdes,G., Paro,R., Masters,C.L., Muller,U., Kins,S., Beyreuther,K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624-3634.

- Sobue,K., Agarwal-Mawal,A., Li,W., Sun,W., Miura,Y., Paudel,H.K. (2000). Interaction of neuronal Cdc2-like protein kinase with microtubule-associated protein tau. *J.Biol.Chem.* 275, 16673-16680.
- Sontag,E., Nunbhakdi-Craig,V., Lee,G., Bloom,G.S., Mumby,M.C. (1996). Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 17, 1201-1207.
- Spillantini,M.G., Bird,T.D., Ghetti,B. (1998). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol.* 8, 387-402.
- Strittmatter,W.J., Roses,A.D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu.Rev.Neurosci.* 19, 53-77.
- Sun,W., Qureshi,H.Y., Cafferty,P.W., Sobue,K., Agarwal-Mawal,A., Neufeld,K.D., Paudel,H.K. (2002). Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J.Biol.Chem.* 277, 11933-11940.
- Svennerholm,L., Gottfries,C.G. (1994). Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J.Neurochem.* 62, 1039-1047.
- Takahashi,H., Mercken,M., Honda,T., Saito,Y., Murayama,M., Song,S., Takashima,A. (1999). Impaired proteolytic processing of presenilin-1 in chromosome 14-linked familial Alzheimer's disease patient lymphocytes. *Neurosci.Lett.* 260, 121-124.
- Takahashi,R.H., Milner,T.A., Li,F., Nam,E.E., Edgar,M.A., Yamaguchi,H., Beal,M.F., Xu,H., Greengard,P., Gouras,G.K. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am.J.Pathol.* 161, 1869-1879.
- Takashima,A., Murayama,M., Murayama,O., Kohno,T., Honda,T., Yasutake,K., Nihonmatsu,N., Mercken,M., Yamaguchi,H., Sugihara,S., Wolozin,B. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 9637-9641.
- 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.
- Tanzi,R.E., Gusella,J.F., Watkins,P.C., Bruns,G.A., George-Hyslop,P., Van Keuren,M.L., Patterson,D., Pagan,S., Kurnit,D.M., Neve,R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Tappel,A.L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed.Proc.* 32, 1870-1874.
- Tariot,P.N., Solomon,P.R., Morris,J.C., Kershaw,P., Liliensfeld,S., Ding,C. (2000). A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54, 2269-2276.
- Tendi,E.A., Bosetti,F., Dasgupta,S.F., Stella,A.M., Drieu,K., 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.
- Therot,J., Orgogozo,J.M. (2000). Piracetam in the treatment of acute stroke - PASS II. *Stroke* 31, 2892.
- Tien,M., Svingen,B.A., Aust,S.D. (1981). Superoxide dependent lipid peroxidation. *Fed.Proc.* 40, 179-182.

- Tomidokoro,Y., Harigaya,Y., Matsubara,E., Ikeda,M., Kawarabayashi,T., Shirao,T., Ishiguro,K., Okamoto,K., Younkin,S.G., Shoji,M. (2001a). Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J.Pathol.* 194, 500-506.
- Tomidokoro,Y., Ishiguro,K., Harigaya,Y., Matsubara,E., Ikeda,M., Park,J.M., Yasutake,K., Kawarabayashi,T., Okamoto,K., Shoji,M. (2001b). Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice 2. *Neurosci.Lett.* 299, 169-172.
- Trimmer,P.A., Keeney,P.M., Borland,M.K., Simon,F.A., Almeida,J., Swerdlow,R.H., Parks,J.P., Parker,W.D., Jr., 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.
- Trumbeckaite,S., Bernatoniene,J., Majiene,D., Jakstas,V., Savickas,A., Toleikis,A. (2006). Effect of Ginkgo biloba extract on the rat heart mitochondrial function. *J.Ethnopharmacol.*
- Tsai, L.H., Lee, M.S., Cruz, J. (2004). Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 11;1697(1-2):137-42.
- Tsolaki,M., Pantazi,T., Kazis,A. (2001). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors versus nootropics in Alzheimer's disease: a retrospective, longitudinal study. *Journal of International Medical Research* 29, 28-36.
- Turrens,J.F., Boveris,A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem.J.* 191, 421-427.
- van Duijn,C.M., Havekes,L.M., Van Broeckhoven,C., de Knijff,P., Hofman,A. (1995). Apolipoprotein E genotype and association between smoking and early onset Alzheimer's disease. *BMJ* 310, 627-631.
- Vassar,R., Bennett,B.D., Babu-Khan,S., Kahn,S., Mendiaz,E.A., Denis,P., Teplow,D.B., Ross,S., Amarante,P., Loeloff,R., Luo,Y., Fisher,S., Fuller,J., Edenson,S., Lile,J., Jarosinski,M.A., Biere,A.L., Curran,E., Burgess,T., Louis,J.C., Collins,F., Treanor,J., Rogers,G., Citron,M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Vatassery,G.T., Angerhofer,C.K., Knox,C.A. (1984). Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J.Neurochem.* 43, 409-412.
- Waegemans,T., Wilsher,C.R., Danniau,A., Ferris,S.H., Kurz,A., Winblad,B. (2002). Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: A meta-analysis. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 13, 217-224.
- Wallace,D.C., Ye,J.H., Neckelmann,S.N., Singh,G., Webster,K.A., Greenberg,B.D. (1987). Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations 1. *Curr.Genet.* 12, 81-90.
- Walsh,D.M., Hartley,D.M., Condrón,M.M., Selkoe,D.J., Teplow,D.B. (2001). In vitro studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala(692) -> Gly) Alzheimer's disease. *Biochemical Journal* 355, 869-877.
- Walsh,D.M., Hartley,D.M., Kusumoto,Y., Fezoui,Y., Condrón,M.M., Lomakin,A., Benedek,G.B., Selkoe,D.J., Teplow,D.B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis - Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 274, 25945-25952.

- Walsh,D.M., Klyubin,I., Fadeeva,J.V., Cullen,W.K., Anwyl,R., Wolfe,M.S., Rowan,M.J., Selkoe,D.J. (2002a). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- Walsh,D.M., Klyubin,I., Fadeeva,J.V., Rowan,M.J., Selkoe,D.J. (2002b). Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society transactions* 30, 552-557.
- Walsh,D.M., Selkoe,D.J. (2004). Oligomers in the brain: The emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and Peptide Letters* 11, 213-228.
- Walsh,D.M., Tseng,B.P., Rydel,R.E., Podlisny,M.B., Selkoe,D.J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831-10839.
- Wang,Y., Ha,Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol.Cell* 15, 343-353.
- Wasco,W., Bupp,K., Magendantz,M., Gusella,J.F., Tanzi,R.E., Solomon,F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 10758-10762.
- Weber,J., Senior,A.E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase 1. *FEBS Lett.* 545, 61-70.
- Wei,T., Ni,Y., Hou,J., Chen,C., Zhao,B., Xin,W. (2000). Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by Ginkgo biloba extract 3. *Pharmacol.Res.* 41, 427-433.
- Weingarten,M.D., Lockwood,A.H., Hwo,S.Y., Kirschner,M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72, 1858-1862.
- Wilcock,G.K., Lilienfeld,S., Gaens,E. (2000). Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *Galantamine International-1 Study Group 2. BMJ* 321, 1445-1449.
- Wilson,C.A., Doms,R.W., Lee,V.M. (1999). Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58, 787-794.
- Winblad,B., Engedal,K., Soininen,H., Verhey,F., Waldemar,G., Wimo,A., Wetterholm,A.L., Zhang,R., Haglund,A., Subbiah,P. (2001). A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD 7. *Neurology* 57, 489-495.
- Wolfe,M.S., Xia,W.M., Ostaszewski,B.L., Diehl,T.S., Kimberly,W.T., Selkoe,D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wolozin,B., Kellman,W., Ruosseau,P., Celesia,G.G., Siegel,G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch.Neurol.* 57, 1439-1443.
- Wu,Z., Smith,J.V., Paramasivam,V., Butko,P., Khan,I., Cypser,J.R., Luo,Y. (2002). Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 48, 725-731.
- Yan,R., Munzner,J.B., Shuck,M.E., Bienkowski,M.J. (2001). BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J.Biol.Chem.* 276, 34019-34027.

- Ye,C.P., Walsh,D.M., Selkoe,D.J., Hartley,D.M. (2004). Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neuroscience Letters* 366, 320-325.
- 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., Stevens,K.A., Slunt,H.H., Sisoda,S.S., Chen,H.Y., Van der Ploeg,L.H. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- Zhou,L.J., Zhu,X.Z. (2000). Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 293, 982-988.
- Zhu,X., Raina,A.K., Lee,H.G., Casadesus,G., Smith,M.A., Perry,G. (2004a). Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease 9. *Brain Res.* 1000, 32-39.
- Zhu,X., Smith,M.A., Honda,K., Aliev,G., Moreira,P.I., Nunomura,A., Casadesus,G., Harris,P.L., Siedlak,S.L., Perry,G. (2007). Vascular oxidative stress in Alzheimer disease 8. *J.Neurol.Sci.*
- Zhu,X., Smith,M.A., Perry,G., Aliev,G. (2004b). Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am.J.Alzheimers.Dis.Other Demen.* 19, 345-352.
- Zimmermann,M., Colciaghi,F., Cattabeni,F., Di Luca,M. (2002). Ginkgo biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 48, 613-623.
- Zucker,R.S. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr.Opin.Neurobiol.* 9, 305-313.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

ABBILDUNG 1-1: DAS PRINZIP DER OXIDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG IN DEN MITOCHONDRIEN	15
ABBILDUNG 1-2: ATP-SYNTASE (KOMPLEX V DER ATMUNGSKETTE) (DIMROTH ET AL., 2006)	17
ABBILDUNG 1-3: DOKUMENTATION DER NEUROFIBRILLÄREN PATHOLOGIE NACH ALOIS ALZHEIMER	23
ABBILDUNG 1-4: EXTRAZELLULÄRE PLAQUE, ZUM GROßTEIL BESTEHEND AUS A β	25
ABBILDUNG 1-5 PROZESSIERUNG VON APP.	27
ABBILDUNG 1-6: INTRAZELLULÄRE NEUROFIBRILLÄRE BÜNDEL, BESTEHEND AUS HYPERPHOSPHORYLIERTEM TAU	31
ABBILDUNG 1-7: SCHNITTSTELLEN DER α -, β - UND γ -SEKRETASE IM APP-GEN UND BEKANNTE APP-MUTATIONEN	38
ABBILDUNG 1-8: STRUKTURFORMELN DER INHALTSSTOFFE VON GINKGO-BILOBA-EXTRAKT, FLAVONOIDE, GINKGOLIDE UND BILOBALID.....	44
ABBILDUNG 1-9: STRUKTURFORMEL VON PIRACETAM (2-OXO-1-PYRROLIDINEACETAMID)	46
ABBILDUNG 2-1: BEISPIEL EINER GELELEKTROPHORESE ZUR GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE.....	61
ABBILDUNG 2-2: REDUKTION VON MTT ZU FORMAZAN	66
ABBILDUNG 2-3: VIABILITÄTSBESTIMMUNG VON ISOLIERTEN MITOCHONDRIEN	66
ABBILDUNG 2-4: STRUKTURFORMELN VON R123.....	68
ABBILDUNG 2-5: VIABILITÄTSBESTIMMUNG VON ISOLIERTEN MITOCHONDRIEN	68
ABBILDUNG 2-6: DARSTELLUNG DES OROBOROS OXYGRAPHEN.....	69
ABBILDUNG 2-7: FORMEL ZUR BERECHNUNG DER COX-AKTIVITÄT	73
ABBILDUNG 3-1: VERMINDERTES MITOCHONDRIALES TRANSMEMBRANPOTENTIAL THY-1 APP TRANSGENER MÄUSE	78
ABBILDUNG 3-2: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN VON NON-TG UND THY-1 APP TRANSGENEN TIEREN NACH SEKUNDÄREM INSULT MIT H ₂ O ₂ , SNP UND A β ₁₋₄₂	80
ABBILDUNG 3-3: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN TRANSMEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN VON 6-8 MONATE ALTEN NON-TG UND THY-1 APP TRANSGENEN MÄUSEN NACH 1-STÜNDIGER STIMULATION MIT SPEZIFISCHEN KOMPLEXINHIBITOREN.....	82
ABBILDUNG 3-4: IDENTIFIZIERUNG DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG DER MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTEN-KOMPLEXE NACH 2D-BN/SDS-GELELEKTROPHORESE	84
ABBILDUNG 3-5: REDUZIERTER COX-AKTIVITÄT THY-1 APP TRANSGENER TIERE	86
ABBILDUNG 3-6: REDUZIERTER SAUERSTOFFVERBRAUCH ISOLIERTER MITOCHONDRIEN NACH EINER A β ₁₋₄₂ -BEHANDLUNG.	88
ABBILDUNG 3-7: REDUZIERTER SAUERSTOFFVERBRAUCH THY-1 APP TRANSGENER MITOCHONDRIEN IM ALTER.	91
ABBILDUNG 3-8: VERMINDERTES MITOCHONDRIALES TRANSMEMBRANPOTENTIAL 3 MONATE ALTER THY-1 APP TRANSGENER MÄUSE UNTER BASALEN BEDINGUNGEN.....	92
ABBILDUNG 3-9: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN VON 3 MONATE ALTEN NON-TG UND THY-1 APP TRANSGENEN TIEREN NACH SEKUNDÄREM INSULT MIT H ₂ O ₂ , SNP UND A β ₁₋₄₂	94
ABBILDUNG 3-10: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN VON WT- UND P301L-MITOCHONDRIEN.	96
ABBILDUNG 3-11: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN TRANSMEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN 15 MONATE ALTER WT- UND P301L-MÄUSEN NACH 1-STÜNDIGER STIMULATION MIT SPEZIFISCHEN KOMPLEXINHIBITOREN.....	97
ABBILDUNG 3-12: REDUZIERTER NADH:DBQ-AKTIVITÄT P301L TRANSGENER MÄUSE.....	99

ABBILDUNG 3-13: REDUZIERTER SAUERSTOFFVERBRAUCH P301L- MITOCHONDRIEN IM ALTER.....	102
ABBILDUNG 3-14: ERHÖHTE EMPFINDLICHKEIT ISOLIERTER MITOCHONDRIEN 15 MONATE ALTER P301L-MÄUSE GEGENÜBER Aβ ₁₋₄₂	104
ABBILDUNG 3-15: ERHÖHTE EMPFINDLICHKEIT ISOLIERTER MITOCHONDRIEN 21 MONATE ALTER P301L-MÄUSE GEGENÜBER Aβ ₁₋₄₂	105
ABBILDUNG 3-16: VERMINDERTES MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL IM ALTER.....	107
ABBILDUNG 3-17: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN NACH SEKUNDÄREM INSULT MIT H ₂ O ₂ , SNP UND Aβ ₁₋₄₂	109
ABBILDUNG 3-18: BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALES TRANSMEMBRANPOTENTIALS ISOLIERTER MITOCHONDRIEN VON NMRI- MÄUSEN NACH 1-STÜNDIGER STIMULATION MIT KOMPLEXINHIBITOREN.....	111
ABBILDUNG 3-19: REDUZIERTE AKTIVITÄT DER NADH:DBQ-AKTIVITÄT MIT DEM ALTER.....	113
ABBILDUNG 3-20: SAUERSTOFFVERBRAUCHSMESSUNG VON FRISCH ISOLIERTEN ZEREBRALEN MITOCHONDRIEN VON 3-4, 12-13 BZW. 21-24 MONATE ALTEN NMRI-MÄUSEN.....	115
ABBILDUNG 3-21: UNVERÄNDERTES MITOCHONDRIALES TRANSMEMBRANPOTENTIALS NACH EINER EGb761-BEHANDLUNG... ..	117
ABBILDUNG 3-22: PROTEKTIVER EFFEKT VON EGb761 AUF DIE WASSERSTOFFPEROXID-INDUZIERTE MITOCHONDRIALE FEHLFUNKTION.....	118
ABBILDUNG 3-23: PROTEKTIVER EFFEKT VON EGb761 AUF DIE SNP-INDUZIERTE MITOCHONDRIALE FEHLFUNKTION.....	119
ABBILDUNG 3-24: PROTEKTIVER EFFEKT VON EGb761 AUF DIE MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTEN-KOMPLEXE.....	121
ABBILDUNG 3-25: UNVERÄNDERTES MITOCHONDRIALES TRANSMEMBRANPOTENTIALS NACH EINER 2-WÖCHIGEN PIRACETAM- BEHANDLUNG.....	123
ABBILDUNG 3-26: PROTEKTIVER EFFEKT VON PIRACETAM AUF DIE H ₂ O ₂ -INDUZIERTE MITOCHONDRIALE FEHLFUNKTION.....	124
ABBILDUNG 3-27: PROTEKTIVER EFFEKT VON PIRACETAM AUF DIE SNP-INDUZIERTE MITOCHONDRIALE FEHLFUNKTION.....	125
ABBILDUNG 3-28: PROTEKTIVER EFFEKT VON PIRACETAM AUF DIE MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTEN-KOMPLEXE.....	126
ABBILDUNG 4-1: DEMOGRAPHISCHE ENTWICKLUNG DER BRD.....	128
ABBILDUNG 4-2: SYNERGISTISCHER EFFEKT DES ALTERS UND Aβ ₈ AUF DIE MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION.....	139
ABBILDUNG 4-3: SYNERGISTISCHER EFFEKT DES ALTERS UND TAU AUF DIE MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION.....	146
ABBILDUNG 4-4: EINFLUSS DES ALTERS AUF DIE MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION.....	157
ABBILDUNG 4-5: DIE AD ALS EINE KOMPLEXE UND MULTIFAKTORIELL BEDINGTE ERKRANKUNG.....	159
ABBILDUNG 4-6: PROTEKTIVE EFFEKTE VON GINKGO BILOBA EXTRAKT AUFGRUND SEINER RADIKALFÄNGER-EIGENSCHAFTEN UND STABILISATION DER MITOCHONDRIENFUNKTION.....	167
ABBILDUNG 4-7: PROTEKTIVE EFFEKTE VON PIRACETAM AUF DIE MITOCHONDRIAL FUNKTION.....	172

Tabellen:

TABELLE 1.1: DIE FÜNF MULTIENZYMKOMPLEXE DER MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTE.....	13
TABELLE 1.2: DEFINITION DER FUNKTIONSZUSTÄNDE VON ISOLIERTEN MITOCHONDRIEN NACH CHANCE UND WILLIAMS.....	19
TABELLE 2.1 PIPETTIERSCHEMA GRADIENTENGEL.....	63
TABELLE 2.2: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER EINGESETZTEN KONZENTRATIONEN.....	71
TABELLE 2.3: REAKTIONSSCHEMATA DER CYTOCHROM-C-OXIDASE BESTIMMUNG.....	73
TABELLE 3.1: ABFALL DES MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIALS THY-1 APP TRANSGENER MITOCHONDRIEN NACH STIMULATION MIT KOMPLEXINHIBITOREN IN BEZUG ZU DEM VON NON-TG MITOCHONDRIEN.....	83

TABELLE 3.2: ABFALL DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS NACH STIMULATION MIT ATMUNGSKETTENINHIBITOREN IM VERGLEICH ZU WT-MITOCHONDRIEN	98
TABELLE 3.3: ABFALL DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS NACH STIMULATION MIT SPEZIFISCHEN KOMPLEXINHIBITOREN VERGlichen MIT DER SCHÄDIGUNG 3 MONATE ALTER NMRI-MITOCHONDRIEN.	112
TABELLE 3.4: PROTEKTIVE EFFEKTE VON GINKGO BILOBA EXTRAKT AUF DIE MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTEN-KOMPLEXE	122
TABELLE 3.5: PROTEKTIVE EFFEKTE VON PIRACETAM AUF DIE MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTEN-KOMPLEXE	127

8 Publikationen

Originalarbeiten und Reviews:

- David DC, **Hauptmann S**, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, Drose S, Brandt U, Muller WE, Eckert A, Gotz J. (2005) Proteomic and functional analysis reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem.* 280(25):23802-14.
- Keil U., Scherping I., **Hauptmann S.**, Eckert A., and W. E. Müller. (2006) Piracetam improves mitochondrial function following oxidative stress in vitro and in vivo. *British J Pharmacol.* 147(2):199-208.
- Eckert, U. Keil, I. Scherping, **Hauptmann S.**, and W. E. Müller. (2005) Stabilization of mitochondrial membrane potential and improvement of neuronal energy metabolism by ginkgo biloba extract EGb 761 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056:474-85.
- **Hauptmann, S.**, Keil, U., Scherping, I., Bonert, A., Eckert, A., Muller, W.E. (2006) Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 41:668-673.
- Keil, U., **Hauptmann, S.**, Bonert, A., Scherping, I., Eckert, A., Muller, W.E. (2006). Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant Abeta PP and tau protein mutations. *Journal of Alzheimers Disease* 9:139-146.
- Leuner K, **Hauptmann S**, Abdel-Kader R, Scherping I, Keil U, Strosznajder JB, Eckert A, Muller WE. (2007) Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? *Antioxid Redox Signal.* 9(10):1659-75.
- **Hauptmann S.**, Scherping I., Dröse S., Brandt U., Leuner K., Eckert A. and Müller W.E. Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, submitted
- Abdel-Kader, R., **Hauptmann, S.**, Keil, U., Scherping, I., Leuner, K., Eckert, A., Müller W.E. (2007) Stabilization of mitochondrial function by Ginkgo biloba extract (EGb 761). [Epub ahead of print]

- Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakała M, **Hauptmann S**, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Muller WE, Strosznajder JB. (2007) Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A β -level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta Biochim Pol.* 2 [Epub ahead of print]

Posterpräsentationen:

- 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
- Anne Eckert, Uta Keil, **Susanne Hauptmann**, Isabel Scherping, Astrid Bonert, Franz Müller-Spahn, Joanna B. Strosznajder, Della David, Jürgen Götz, Walter E. Müller. Pivotal role of mitochondria in amyloid beta-induced cell death *Pharmacological Reports* 2005 Volume 57, 417
- U. Keil, I. Scherping, **S. Hauptmann**, A. Eckert, W.E. Müller Stabilization of mitochondrial function by piracetam Symposium der AGNP, München, 2005 *Pharmacopsychiatry* 2005 Volume 38, 253
- U. Keil, I. Scherping, **S. Hauptmann**, A. Eckert, W.E. Müller Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress and amyloid beta treatment 35th Annual Meeting Soc. Neuroscience, Washington, USA, 2005. *Soc. Neurosci.*, Abstracts 31, 209, 2005
- **S. Hauptmann**, I. Scherping, U. Keil, D.C. David, S. Dröse, U. Brandt, J. Götz, W.E. Müller, A. Eckert. P301L tau transgenic mice exhibit mitochondrial respiratory defects. 35th Annual Meeting Soc. Neuroscience, Washington, USA, 2005. *Soc. Neurosci.*, Abstracts 31, 208, 2005

Vorträge:

- **Susanne Hauptmann**
“Mitochondrial Dysfunction in APP transgenic mice”
Vortrag im Rahmen der 4th Conference on MiP2005

9 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Walter E. Müller recht herzlich für das Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Anregungen und Ideen, ohne welche, die Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre, immer wieder vorangetrieben. Weiterhin danke ich Ihm für die zahlreichen Gelegenheiten meine eigenen Vorstellungen umzusetzen und diese auch auf diversen Tagungen zu präsentieren. Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. Klein dankbar.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle einigen Menschen meinen Dank aussprechen, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Danken möchte ich vor allem meinem Freund und jetzigem Mann Alex, der mich liebevoll unterstützt hat, in der harten Zeit des Zusammenschreibens und Lernens für die Prüfung. Es wurden so manche Tränen getrocknet, Ängste diskutiert und Verspannungen weggestreichelt. Danke, dass Du an mich geglaubt hast! Und entschuldige bitte, dass ich manchmal so unausstehlich war!

Weiterhin möchte ich meiner Familie recht herzlich danken. Meinen Eltern Judith und Walter Hauptmann, die mir stets eine schöne Kindheit beschert haben und keinen Aufwand gescheut haben, um mir die schulische/akademische Bildung zu ermöglichen und zu fördern, die ich genossen habe. Vor allem danke ich meinen Eltern für ihr Verständnis (Stichwort. Hausaufgaben vergessen und Hefte vertauscht; „Ich bin nicht die MAMA“) und für die teils bis spät in die Nacht hineinreichenden Gespräche, in denen sie mir immer ein offenes Ohr geschenkt haben, mich teilweise aber auch auf den Boden der Tatsachen zurück geholt haben.

Meinen beiden Brüdern Bernd und Max möchte ich danken, dass Sie immer für mich da waren. So unterschiedlich beide auch sind, haben beide dazu beigetragen, dass ich in manchen Situationen nicht das Handtuch geworfen habe

und gemerkt habe, wie wichtig es ist zu wissen, dass egal was auch passiert, jemand für mich die Hand ins Feuer legt.

Ari – meine beste Freundin– man sah sich nicht so oft (jetzt allerdings wieder), aber wenn, war es so, als hätte man sich gestern das letzte Mal gesehen – Danke für Deine treue Freundschaft auch auf Distanz, das bedeutet mir sehr viel!

Isabel Scherping, Kathrin Schulz, Reham Abdel-Kader, Imke Peters und Astrid Bonert möchte ich mich besonders bedanken. Ihr ward immer eine große Stütze für mich. Danke für Lachen, Spaß, Blödsinn, offene Ohren, Tipps, Tränen, Dampf-Ablassen...Bleibt so wie Ihr seid!

Uta Lipka und Kristina Treiber möchte ich mich für ihr immer offenes Ohr bedanken, für die stetige Hilfe auch wenn sie selbst in Arbeit fast erstickten, für die lustige Kongressreise nach Washington und für die gute Zusammenarbeit bei den Papern. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Danke.

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

Daniel, Holgi, Frank und Caro– das beste „Mitnehmsel“ aus meiner Studienzeit – leider sehen wir uns ja nicht mehr so oft, aber wenn wir es mal wieder geschafft haben, ist es immer total schön mit Euch! Ich hoffe, dass wir uns nie aus den Augen verlieren!

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Alle aufzuzählen würde den Rahmen dieser Arbeit einfach sprengen. Ich freue mich, dass mich eine so erstaunlich große Anzahl von Menschen unterstützt.

Vielen Dank!

10 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Vor- und Zuname: Susanne Kirr geb. Hauptmann
Adresse: Prangerlstrasse 8
81247 München
Geburtsdatum: 28.01.1979
Geburtsort: Wasserburg am Inn
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

08/1985-07/1989 Graslitzer Grundschule Waldkraiburg
08/1989-07/1995 Ruperti-Gymnasium, Waldkraiburg am Inn
08/1995-07/1998 Ruperti-Gymnasium, Mühldorf am Inn (Bayern)
Abitur
10/1998-09/2003 Biologie-Studium an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main (Diplom)
Thema der Diplomarbeit im Hauptfach Genetik:
„Identifizierung von Aktivator-Coaktivator-Interaktionen in
Saccharomyces cerevisiae“
11/2003-04/2007 Promotion am Pharmakologischen Institut für
Naturwissenschaftler der Johann-Wolfgang-Goethe
Universität, Frankfurt am Main, unter Prof. W. E. Müller
Thema der Doktorarbeit:
„Mitochondriale Funktion im Alter und bei der Alzheimer
Demenz“
08/2007-dato Mitarbeiter der Firma Innovex
Monitor im Auftrag von Janssen & Cilag