



**Funktionelle und strukturelle Veränderungen der
mitochondrialen Funktion bei Tauopathien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt im

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von Diplom-Biologin

Kathrin Lydia Schulz

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2010

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. W.E. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Eckert

Datum der Disputation: 04.05.2010

„Sei die Veränderung, die Du Dir für diese Welt wünschst.“

Mahatma Gandhi

Gewidmet meiner Mutter, Jan & Daniel
sowie in Erinnerung an meinen Vater

1. Einleitung	1
1.1 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau.....	1
1.1.1 Struktur von Tau	1
1.1.2 Physiologische Funktion von Tau.....	3
1.1.3 Die Phosphorylierung von Tau.....	5
1.1.4 Bildung von neurofibrillären Bündeln.....	7
1.2 Tauopathien	8
1.2.1 Morbus Alzheimer	10
1.2.2 Kortikobasale Degeneration (CBD)	14
1.2.3 Progressive supranukleäre Paralyse (PSP).....	15
1.2.4 Morbus Pick	16
1.2.5 FTDP-17	17
1.3 Mitochondrien	20
1.3.1 Aufbau der Mitochondrien.....	21
1.3.2 Funktion der Mitochondrien	22
1.3.3 Mitochondriales Genom.....	25
1.3.4 Mitochondrien sind dynamische Organellen.....	27
1.3.4.1 <i>Fusion</i> von Mitochondrien.....	29
1.3.4.2 <i>Fission</i> von Mitochondrien	31
1.3.5 Mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	33
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	38
2. Material & Methoden.....	40
2.1 Material	40
2.1.1 Geräte und Materialien.....	40
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	41
2.1.3 Kits.....	44
2.1.4 Primer.....	44
2.1.5 Antikörper	45
2.1.5.1 Primärantikörper	45
2.1.5.2 Sekundärantikörper	45
2.1.6 Puffer	45

2.1.7 Lösungen	47
2.1.7.1 Lösungen für die Western Blot Analyse	47
2.1.7.2 Lösungen für den MTT-Assay	48
2.1.7.3 Lösungen für mikroskopische Aufnahmen	48
2.1.8 Verwendete Zellen	49
2.2 Methoden	52
2.2.1 Zellkultur	52
2.2.1.1 Auftauen	52
2.2.1.2 Passagieren	53
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	53
2.2.1.4 Einfrieren	54
2.2.2 Inkubationsprotokolle	54
2.2.2.1 Inhibitoren der Atmungskette	54
2.2.2.2 Oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	55
2.2.2.3 Nitrosativer Stress in Form von Natriumnitroprussid (SNP)	55
2.2.2.4 Amyloid-beta Peptide	56
2.2.3 Zell-Viabilität Assays	57
2.2.3.1 Bestimmung der ATP-Spiegel	57
2.2.3.2 MTT-Assay	58
2.2.3.3 ToxiLight-Assay	60
2.2.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials	61
2.2.5 Bestimmung der Lactat-Spiegel	62
2.2.6 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	62
2.2.6.1 Bestimmung der intrazellulären NO-Spiegel	62
2.2.6.2 Messung von Superoxidanion-Radikalspiegeln	63
2.2.6.3 Messung von Hydroxyl-Radikalspiegeln	64
2.2.7 Morphologische Studien	65
2.2.7.1 Bestimmung der Zellhöhe	65
2.2.7.2 Bestimmung der Masse	66
2.2.7.3 Morphologie der Mitochondrien an fixierten Zellen	66
2.2.8 Live cell imaging (CLSM)	67
2.2.8.1 Färbung der Mitochondrien	67
2.2.8.2 Bestimmung der mitochondrialen Beweglichkeit	68
2.2.8.3 Vervielfältigung und Transfektion von pA-GFP	68

2.2.8.4 Messung von <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> der Mitochondrien über FRAP.....	69
2.2.9 Elektronenmikroskopie	70
2.2.10 PCR.....	71
2.2.10.1 Aufreinigung und Isolierung genomischer DNA.....	71
2.2.10.3 RNA-Isolierung	72
2.2.10.4 cDNA-Synthese	73
2.2.10.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	74
2.2.10.6 <i>Real-time</i> quantitative PCR	78
2.2.10.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	78
2.2.11 Proteinbestimmung mit Hilfe der BCA-Reaktion	79
2.2.12 Proteinbestimmung nach Lowry	80
2.2.13 Western Blot-Analyse	80
2.2.13.1 Präparation von Zellhomogenat	80
2.2.13.2 Probenvorbereitung	81
2.2.13.3 Gelelektrophorese und Transfer	81
2.2.13.4 Blot-Entwicklung.....	81
2.2.14 Bestimmung der Komplex-Aktivitäten.....	82
2.2.14.1 Isolierung von Mitochondrien.....	82
2.2.14.2 Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität (CS-Aktivität)	83
2.2.14.3 Messung der Komplex I-Aktivität	83
2.2.14.4 Messung der Komplex II-Aktivität.....	84
2.2.14.5 Messung der Komplex III-Aktivität.....	84
2.2.14.6 Messung der Komplex IV-Aktivität	85
2.2.15 Detektion von sekretiertem A β ₁₋₄₀	85
3. Ergebnisse.....	87
3.1 Auswirkungen von Tau und der Mutation P301L auf die Mitochondrien	87
3.1.1 Veränderungen in der Morphologie	87
3.1.2 Die drei Zelltypen weisen keinen Unterschied in der mitochondrialen Masse auf	89
3.1.3 Beweglichkeit der Mitochondrien.....	91
3.1.4 Ist <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> der Mitochondrien beeinträchtigt?	93
3.1.4.1 Untersuchung von <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> mit photoaktivierbarem mitoGFP	93

3.1.4.2 Gibt es auf Transkriptionsebene Unterschiede bei den an <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> beteiligten Faktoren?.....	96
3.1.5 In wie weit variieren neben der veränderten Morphologie auch funktionelle Parameter in den Zellen?.....	98
3.1.5.1 Einfluss von Tau und der Mutation P301L auf den Energiestatus der Zelle....	99
3.1.5.2 Einfluss auf die metabolische Aktivität und Zytotoxizität.....	101
3.1.5.3 Veränderte ROS-Spiegel in den SY5Y-Zellen.....	102
3.1.5.4 Erhöhte oxidative mtDNA-Schäden in den TauP301L-Zellen.....	104
3.1.6 Die Ultrastruktur der Mitochondrien der SY5Y-Zellen.....	105
3.1.7 Effekte des Entkopplers FCCP auf die mitochondriale Funktion.....	107
3.1.7.1 FCCP führt zeitabhängig zu einer Schädigung der mitochondrialen Funktion.....	107
3.1.7.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP	112
3.1.7.3 Die Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette führt zu einer Erhöhung der Glykolyserate	117
3.1.7.4 Zytotoxische Wirkung von FCCP	118
3.2 Untersuchung der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette.....	119
3.2.1 Hemmung der Komplexe führt nur teilweise zur Steigerung der Glykolyserate	120
3.2.2 Zytotoxische Wirkung von Komplexinhibitoren.....	122
3.2.3 Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase).....	124
3.2.3.1 Hemmung von Komplex I durch Rotenon.....	125
3.2.3.2 Expression der 20 kDa-Untereinheit.....	128
3.2.3.3 Veränderte Komplex I-Aktivität	129
3.2.4 Komplex II (Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase)	133
3.2.4.1 Inhibition durch TTFA.....	133
3.2.4.2 Expression 30 kDa-Untereinheit.....	136
3.2.4.3 Veränderte Komplex II-Aktivität	137
3.2.5 Komplex III (Cytochrom C Reduktase; Cytochrom b-c ₁ -Komplex).....	138
3.2.5.1 Inhibition durch Antimycin	138
3.2.5.2 Expression der Untereinheit Core II	141

3.2.5.3	Veränderte Komplex III-Aktivität.....	142
3.2.6	Komplex IV (Cytochrom C Oxidase).....	143
3.2.6.1	Inhibierung von Komplex IV durch Natriumazid (NaN ₃).....	143
3.2.6.2	Expression der Untereinheit COX II.....	145
3.2.6.3	Die Aktivität von Komplex IV ist nicht verändert.....	146
3.2.7	Komplex V (F ₀ F ₁ -ATP-Synthase)	147
3.2.7.1	Inhibition durch Oligomycin	148
3.2.7.2	Expression der Untereinheit F1α.....	151
3.3	Auswirkungen sekundärer Insulte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen	152
3.3.1	Die Stressoren führen nicht zu einer signifikant erhöhten Glykolyserate. 153	
3.3.2	Wie zytotoxisch ist zusätzlicher oxidativer und nitrosativer Stress sowie Aβ ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen für die SY5Y-Zellen?	155
3.3.3	Oxidativer Stress durch H ₂ O ₂	157
3.3.3.1	ROS-Bildung nach zusätzlichem oxidativem Stress.....	158
3.3.3.2	Oxidativer Stress führt zum Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel sowie des MMPs und hat nur geringe Auswirkungen auf die Glykolyserate	159
3.3.4	Nitrosativer Stress durch SNP	161
3.3.4.1	Akute Änderung der NO- und ATP-Spiegel durch SNP	162
3.3.4.2	Langfristiger nitrosativer Stress führt zu geringen Veränderungen der ATP-Spiegel sowie des MMPs der TauP301L-Zellen und hat kaum Auswirkungen auf die Glykolyserate	163
3.3.4.3	Auswirkungen von nitrosativem Stress auf die Viabilität und die Zytotoxizität.....	165
3.3.5	Auswirkungen verschiedener Aggregationsformen von Aβ ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Funktion.....	166
3.3.5.1	Aβ-Spiegel der SH-SY5Y Zellen	167
3.3.5.2	Aβ ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen haben nur geringe Effekte auf die ATP-Spiegel.....	168
3.3.5.3	Aβ ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen führen nicht zu einer erhöhten Glykolyserate	172

3.3.5.4 A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen führen zu geringfügigen Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials.....	173
3.3.5.5 Einfluss von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen auf die metabolische Aktivität.....	177
3.3.5.6 Zytotoxizität von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen	178
4. Diskussion	181
4.1 Die veränderte mitochondriale Morphologie der hTau40 und TauP301L-Zellen spiegelt die jeweilige metabolische Situation der Zellen wieder.....	181
4.1.1 Auswirkungen durch die Überexpression von hTau40 auf die mitochondriale Funktion und Morphologie	183
4.1.1.1 Morphologie und mitochondriale Dynamik in den hTau40-Zellen	183
4.1.1.2 Metabolische Veränderungen in den hTau40-Zellen.....	185
4.1.2 Effekte durch die Überexpression von der Tau-Mutation P301L auf die Funktion und Morphologie der Mitochondrien.....	189
4.1.2.1 Morphologie und mitochondriale Dynamik in den TauP301L-Zellen.....	189
4.1.2.2 Metabolische Veränderungen in den TauP301L-Zellen	191
4.1.3 Zusammenfassung der Effekte von hTau40 und TauP301L auf die Funktion und Morphologie der Mitochondrien	198
4.1.3.1 Tau hat einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der SH-SY5Y Zellen.....	198
4.1.3.2 Die verschiedenen Effekte von hTau40 und TauP301L auf Komplex I bedingen die funktionellen Unterschiede	202
4.1.3.3 Die unterschiedlichen Komplex I-Aktivitäten beeinflussen Morphologie, Dynamik sowie die Ultrastruktur der Mitochondrien.....	206
4.1.3.4 Die Mutation spiegelt den Alterungsprozess auf funktioneller, wie struktureller Ebene wieder.....	207
4.2 Vulnerabilität der SH-SY5Y Zellen gegenüber diversen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette	208
4.2.1 Die Entkopplung der Atmung von der oxidativen Phosphorylierung führt zur Schädigung der mitochondrialen Funktion	210
4.2.2 Auswirkungen diverser Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen	212
4.2.2.1 Hemmung von Komplex I durch Rotenon	212
4.2.2.2 Inhibierung von Komplex II durch TTFA.....	213
4.2.2.3 Antimycin-Hemmung von Komplex III.....	215

4.2.2.4 Hemmung von Komplex IV durch Natriumazid	217
4.2.2.5 NO-induzierte Hemmung von Komplex IV.....	218
4.2.2.6 Inhibierung von Komplex V durch Oligomycin.....	220
4.2.3 Vergleich der Effekte von diversen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette und ihrer Auswirkung auf die mitochondriale Funktion.....	222
4.3 Die Auswirkungen von oxidativem Stress und amyloiden Spezies auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen	223
4.3.1 Oxidativer Stress hat deutliche Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen	224
4.3.2 Einfluss von A β ₁₋₄₂ -Aggregationsformen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen.....	226
5. Zusammenfassung	231
6. Literaturverzeichnis	233
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	263
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	263
7.2 Tabellenverzeichnis.....	267
8. Abkürzungen	268
9. Publikationen	271
9.1 Publikationen.....	271
9.2 Poster.....	272
10. Lebenslauf.....	273

1. Einleitung

1.1 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

Gegen Ende der 1980-er Jahre wurde Tau als das Protein identifiziert, das den Hauptbestandteil der gepaarten helikalen Filamente (PHFs = *paired helical filaments*) darstellt, die sich wiederum zu neurofibrillären Bündeln (NFTs = *neurofibrillary tangles*) zusammenlagern und bei Tauopathien - zu denen auch die Alzheimer Demenz zählt - ein pathologisches Hauptmerkmal darstellen (Goedert et al., 1988). Zum einen korreliert interessanterweise die Verteilung der Neurofibrillenbündel mit den Gebieten der Neurodegeneration und zum anderen stimmt das Ausmaß der Degeneration mit der Schwere der Demenz überein (Braak et al., 1991). Bei Alzheimer-Patienten ist die Konzentration von Tau in der Cerebrospinalflüssigkeit erhöht, was einen potentiellen Möglichkeit für eine frühe Diagnose darstellt (Vigo-Pelfrey et al., 1995).

1.1.1 Struktur von Tau

Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) dessen Gen auf Chromosom 17 lokalisiert ist. Es besteht aus 16 Exons, wobei durch alternatives Spleißen von Exon 2, 3 und 10 sechs Isoformen mit 352-441 AS und einem molekularen Gewicht von 50- 70 kDa im ZNS exprimiert werden (Friedhoff et al., 2000). Dabei kodieren die drei Segmente für zwei N-terminale Inserts (Exon 2 und 3) und eine C-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne (Exon 10) (Abb.: 1-1 Seite 2). Die Expression der spezifischen Tau-Isoformen wird entwicklungspezifisch reguliert und ist zudem abhängig von der topographischen Lage der Nervenzellen im ZNS (Brandt, 1996). Da drei weitere Mikrotubuli-Bindungsdomänen in allen Isoformen zu finden sind, kann man aufgrund der Anzahl der Mikrotubuli-Bindungsdomänen die Tau-Proteine in zwei Gruppen einteilen: 3R-Tau (Isoformen ohne Exon 10) und 4R-Tau (Isoformen mit Exon 10). Im adulten humanen Gehirn entspricht das Verhältnis der 3R- (- Exon

10) zu 4R- (+Exon 10) Isoformen etwa 1, aber die 1N, 0N und 2N-Isoformen kommen entsprechend zu 54%, 37% und 9% vor (Goedert et al., 1990; Hong et al., 1998a). Während alle sechs Isoformen im adulten Gehirn exprimiert werden, ist nur die kürzeste Isoform (ohne Exon 2, 3 und 10) im fetalen Gehirn zu finden. Der Ein- bzw. Ausschluss von Exon 10 im Tau-Protein ermöglicht eine Regulation der Affinität von Tau an Mikrotubuli, die sich etwa um das 40-fache unterscheidet (Panda et al., 1995).

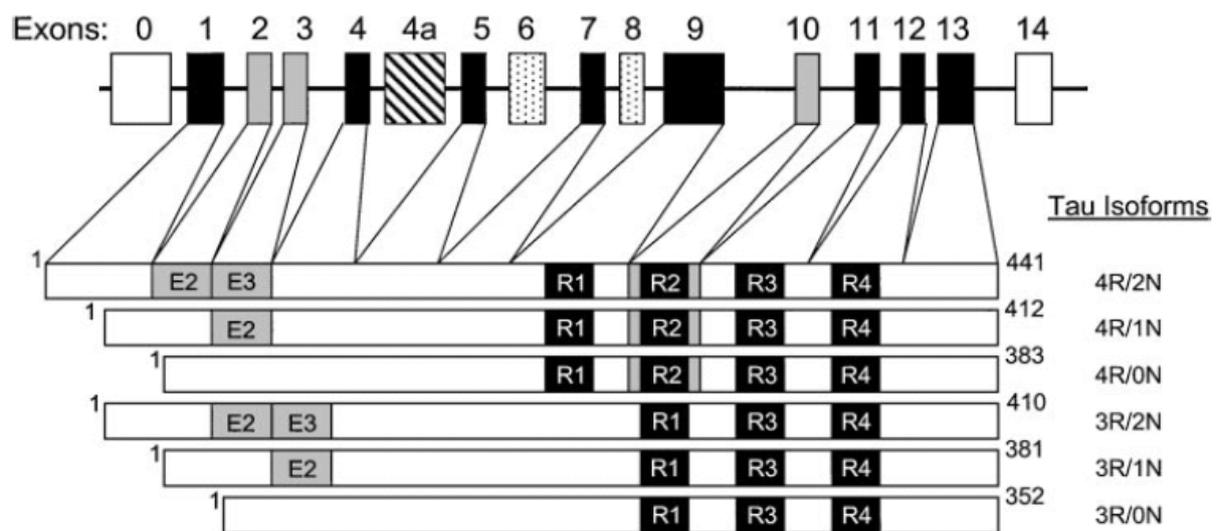


Abb.: 1- 1 Schematische Darstellung des humanen Tau-Gens und die durch alternatives Spleißen im ZNS exprimierten Isoformen

Das humane Tau Gen besteht aus 16 verschiedenen Exons, wobei Exon (E)0 Teil des Promoters ist. Durch alternatives Spleißen von E2, E3 und E10 (grau) entstehen 6 Tau-Isoformen. E6 und E8 (gepunktet) werden nicht im humanen ZNS transkribiert. E4a (gestreift) wird ebenfalls nicht im humanen ZNS transkribiert, sondern nur im peripheren Nervensystem wodurch eine größere Tau-Isoform (*big Tau*) entsteht (Goedert et al., 1992c). R1-R4 stellen die hochkonservierte Sequenz von je 31-32 Aminosäuren dar, die jeweils einer Mikrotubuli-Bindungsdomäne entspricht (Friedhoff et al., 2000) (Abbildung aus (Lee et al., 2001a)).

Die Repeat-Domänen der 4 Mikrotubuli-Bindungsdomänen werden N-terminal durch eine basische, Prolin-reiche Region und C-terminal durch eine weitere basische Region mit einigen Prolinen flankiert. Das häufig vorkommende Motiv Ser-Pro oder Thr-Pro wird zur Diagnose von AD herangezogen, da es in phosphoryliertem Zustand ein Anzeichen der Krankheit darstellt. Der Überschuss an basischen Aminosäuren in der Mikrotubulus-Bindungsdomäne trägt zur Interaktion mit dem sauren C-Terminus der Mikrotubuli bei (Littauer et al., 1986). Auch die *Repeat-Region*

flankierenden Bereiche sind maßgeblich an der Funktion der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt (Butner et al., 1991; Trinczek et al., 1995). Die C-terminale Hälfte von Tau wird daher auch als Assemblierungsdomäne bezeichnet. Die saure N-terminale Domäne wird als Projektionsdomäne bezeichnet und dient wahrscheinlich als Abstandshalter zwischen den einzelnen Mikrotubuli (Chen et al., 1992; Zingsheim et al., 1979).

Untersuchungen über die Struktur des Proteins ergaben, dass es nativ eine ungefaltene Konformation mit *random-coil* Struktur und wenige α -Helixes und β -Strukturen aufweist (Schweers et al., 1994). Dabei ist diese lockere, offene Struktur vielleicht dafür verantwortlich, dass Tau resistent gegenüber Hitze, Denaturierungs-Reagenzien oder Säure ist und dabei seine biologische Funktion (Bindung an Mikrotubuli und Stimulierung ihrer Assemblierung) nicht verliert. Im Elektronenmikroskop hat sich bestätigt, dass Tau ein größtenteils ungefaltetes, filamentöses Protein ist und konnte mit einer Länge von ca. 35 nm als flexibles Molekül dargestellt werden (Wille et al., 1992). An Mikrotubuli gebundenes Tau hat eine Länge von ca. 20 nm und weist mit der Projektions-Domäne vom Mikrotubulus weg (Hirokawa et al., 1988). Bei der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese weist das Tau-Protein ein scheinbares Molekulargewicht von 50-70 kDa auf, wobei das tatsächliche Molekulargewicht von Tau zwischen 36-46 kDa liegt.

1.1.2 Physiologische Funktion von Tau

Zum ersten Mal wurde das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau 1975 beschrieben als ein Protein, dass an Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert (Weingarten et al., 1975). Es zeichnet sich durch seine Hitzestabilität aus und wurde weiterhin als Protein-Faktor beschrieben, der die spontane Polymerisation von α - und β - Tubulin zu Mikrotubuli fördert (Cleveland et al., 1977; Garcia et al., 2001; Witman et al., 1976). Es wird vorwiegend in Nervenzellen, aber auch in geringerem Maße in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert (Migheli et al., 1988).

Neben seiner Hauptaufgabe Mikrotubuli zu binden und deren Assemblierung zu stimulieren, besitzt Tau noch weitere physiologische Funktionen. Durch die Stabilisierung von axonalen Mikrotubuli (Drubin et al., 1986) kann es regulierend auf den intrazellulären Organell- und Vesikeltransport wirken (Ebner et al., 1998). Abgesehen davon kann es durch seine N-terminale Projektionsdomäne mit Komponenten der neuronalen Plasmamembran interagieren (Brandt et al., 1995; Lee et al., 1998). Es wird angenommen, dass Tau eine Vermittlerrolle zwischen der Plasmamembran und den Mikrotubuli zukommt. Zudem besitzt Tau auch die Fähigkeit, an Aktinfilamente zu binden und diese zu bündeln (Cunningham et al., 1997; Selden et al., 1983). Allerdings wird eine „Crosslinker“-Funktion von Tau zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli ausgeschlossen, da die Bindung an Aktin auch durch die Mikrotubuli-Bindungsdomänen erfolgt (Correas et al., 1990). Vielmehr könnte durch eine Bindung von Tau an Aktin die Bindung von Tau an Mikrotubuli verhindert werden, und umgekehrt (Farias et al., 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Tau mit Dynactin (Dynein-Aktivator-Komplex) interagiert und die Bindung des Dynactin/Dynein-Komplex an die Mikrotubuli verstärkt (Magnani et al., 2007). Dynactin stabilisiert wiederum die Interaktion von Dynein mit den Mikrotubuli und vermittelt so dessen Bindung an Vesikel und an membrangebundene Aktinfilamente. Somit hat Tau einen Einfluss auf den anterograden sowie retrograden Transport von Mikrotubuli und Vesikeln. Außerdem wurde auch eine Bindung von Tau an Neurofilamente beschrieben und interessanterweise kommen Neurofilamente in NFTs in späteren Stadien von AD vor (Miyata et al., 1986).

Neben der Interaktion mit Strukturproteinen spielt Tau eine Rolle bei der Signaltransduktion (Flanagan et al., 1997; Jenkins et al., 1998), indem es mit Enzymen, wie Kinasen und Phosphatasen, interagiert (Liao et al., 1998; Morishima-Kawashima et al., 1996). So konnten verschiedene Interaktionspartner von Tau identifiziert werden, wie z.B. die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) (Drewes et al., 1992), die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) (Goedert et al., 1992a), die Cyclin-abhängige Proteinkinase (Cdk2) (Baumann et al., 1993), Cdk5 (Kobayashi et

al., 1993), die src-Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Fyn (Shirazi et al., 1993), Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII) (Baudier et al., 1987) und diverse Phosphatasen wie PP1, PP2A, PP2B und PP2C (reviewed in (Billingsley et al., 1997; Buee et al., 2000)) die alle Komponenten wichtiger Signaltransduktionswege sind.

1.1.3 Die Phosphorylierung von Tau

Der wichtigste Mechanismus um die Funktion von Proteinen und die Aktivität von Enzymen zu regulieren erfolgt über Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Aminosäurereste. Tau ist ein Phosphoprotein und seine Funktionen werden ebenfalls durch die Phosphorylierung beeinflusst. Die Bindung an verschiedene Interaktionspartner kann durch Phosphorylierung an spezifischen Stellen im Tau-Protein differentiell reguliert werden. So verhindert z.B. die Phosphorylierung von Serin 262, das in der ersten „Repeat“-Domäne lokalisiert ist, die Bindung an Mikrotubuli (Drewes et al., 1995). Eine ähnliche Rolle wird der Phosphorylierung von Serin 396 zugeschrieben, welches sich am carboxyterminalen Ende des vierten *Repeats* befindet (Bramblett et al., 1993). Auf der anderen Seite gibt es Daten die zeigen, dass die Phosphorylierung keiner dieser Serin-Reste ausreicht um die Bindung von Tau an Mikrotubuli zu unterbinden (Seubert et al., 1995). Interessanterweise wird die Tubulin-Polymerisation durch unphosphoryliertes Tau stärker gefördert als durch phosphoryliertes Tau (Biernat et al., 1993; Lindwall et al., 1984). In der Nervenzelle ist Tau im somatodendritischen Bereich stärker phosphoryliert als im Axon (Mandell et al., 1996). Dies könnte mit einer kompartimentspezifischen Bindung an Mikrotubuli im Zusammenhang stehen. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei zytosolischem und Plasmamembran-assoziiertem Tau um unterschiedliche Phosphoisoformen handelt, wobei zytosolisches Tau stärker phosphoryliert ist (Maas et al., 2000). Normalerweise ist Tau ein gut lösliches Protein und im Zytosol gelöstes Tau steht mit dem an Mikrotubuli gebundenem Tau im dynamischen Gleichgewicht. Im Gehirn von AD-Patienten liegt Tau hyperphosphoryliert (Jameson et al., 1980) und stark glykosyliert (Ledesma et al., 1996) vor, wodurch die Bindung an die Mikrotubuli gestört wird.

Zudem wird die Phosphorylierung von Tau entwicklungspezifisch reguliert. Generell ist Tau im fötalen Gehirn stärker phosphoryliert als im adulten ZNS (Bramblett et al., 1993; Soulie et al., 1996). Dies lässt sich eventuell darauf zurückführen, dass bei der neuronalen Entwicklung eine dynamischere Tubulin-Population benötigt wird. Es wird angenommen, dass dynamische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse an dem ständigen Umbau des neuronalen Zytoskeletts beteiligt sind. Zudem nimmt der Grad der Phosphorylierung von allen 6 Tau-Isoformen mit Zunahme des Alters ab, vielleicht aufgrund der Aktivierung von Phosphatasen (Mawal-Dewan et al., 1994). Die Phosphorylierung kann in verschiedenen Regionen des Tau-Proteins erfolgen, jedoch ist ein Großteil der Phosphorylierungsstellen in der „Repeat“-Domäne und den flankierenden Bereichen lokalisiert. Die Phosphorylierung erfolgt hauptsächlich an Serin oder Threonin-Resten. Zudem wurde auch die Phosphorylierung von Tyrosin durch die src-Nicht-Rezeptor-Tyrosine-Kinase Fyn gezeigt (Lee et al., 1998; Lee et al., 2004a).

Im engen Zusammenhang mit der Tau-Phosphorylierung steht eine weitere posttranslationale Modifikation, die O-Glykosylierung. Proteine des Zytoskeletts, wie Neurofilamente (Dong et al., 1993), Synapsine (Luthi et al., 1991), Zytokeratine (Chou et al., 1992) und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) (Ding et al., 1996) werden durch O-Glykosylierung (O-GlcNAc) modifiziert. Dies ist eine dynamische Glykosylierung, bei der ein einzelnes Monosaccharid, N-Acetylglukosamin, an die Seitenkette von Serin- oder Threoninresten angehängt wird (Torres et al., 1984). Diese zytosolische Anhängung von N-Acetylglukosamin konnte auch in Tau nachgewiesen werden (Arnold et al., 1996). Häufig wird die O-Glykosylierung eines Proteins invers zu seiner Phosphorylierung reguliert, da oft dieselben Aminosäure-Reste entweder durch O-Glykosylierung oder durch Phosphorylierung modifiziert werden (zur Übersicht siehe (Comer et al., 1999)). Somit könnte die O-Glykosylierung von Tau, ähnlich wie die Phosphorylierung, die Bindung verschiedener Interaktionspartner beeinflussen und eventuell dadurch seine Funktionen, wie z.B. die Förderung der Mikrotubulipolymerisation, verändern.

1.1.4 Bildung von neurofibrillären Bündeln

Es ist bekannt, dass Tau in NFTs hyperphosphoryliert ist. Mittlerweile konnten *post mortem* im Gehirn von Alzheimer Patienten mehr als 20 Phosphorylierungsstellen in NFTs identifiziert werden (Hanger et al., 1998; Morishima-Kawashima et al., 1995). Dabei befinden sich die meisten Phosphorylierungsstellen in der Region, die die Mikrotubuli-Bindungsdomänen umgibt, und das Ausmaß der Phosphorylierung sowie die Anzahl der Phosphorylierungsstellen unterscheiden sich sehr stark von Tau aus gesunden Gehirnen. Phosphoryliertes Tau dissoziiert von seinem natürlichen Bindungspartner, den Mikrotubuli (Biernat et al., 1993; Brandt et al., 1994). Dadurch wird die Menge an löslichem Tau in der Zelle erhöht, was einen entscheidenden ersten Schritt bei der Bildung von gepaarten, helikalen Filamenten (PHFs) darstellen könnte, wobei die Zusammenlagerung an sich aber von anderen Faktoren abhängig zu sein scheint. Die Bildung von PHFs und den daraus entstehenden NFTs sind das gemeinsame pathologische Merkmal von Tauopathien.

Alle sechs Isoformen können sich zu hoch geordneten Strukturen, den PHFs, zusammenlagern und alle wurden bereits in AD-Gehirnen nachgewiesen (Goedert et al., 1992b). Zwei Protofibrillen winden sich umeinander, so dass sie sich in einer Länge von ~ 80 nm überlagern. Der Kern der PHFs wird hauptsächlich aus den Repeat-Domänen von Tau gebildet (Wischik et al., 1988). Die Zusammenlagerung wird durch kovalente Dimerisierung über den Cystein-Rest 322 verstärkt (durch Oxidation von Thiol-Gruppen) (Schweers et al., 1995), aber auch durch Polyanionen, wie Heparin oder andere sulfatierte Glykosaminoglykane (Goedert et al., 1996; Perez et al., 1996), RNA (Kampers et al., 1996) oder Polyglutamat (Friedhoff et al., 1998a). Diese *in vitro*-Beobachtungen konnten durch Befunde bestätigt werden, dass sulfatierte Glykosaminoglykane (Perry et al., 1991; Snow et al., 1989) und RNA (Ginsberg et al., 1997) mit neurofibrillären Bündeln assoziiert sind. Der Prozess der PHF-Bildung kann als Nukleations-Kondensations Mechanismus angesehen werden. Der erste Schritt bei der Formierung von PHFs besteht in der Dimerisierung von Tau-Monomeren – *in vitro* erfolgt er unter oxidativen Bedingungen. Anschließend

kommt es zu einem Nukleationsprozess, woraufhin der Elongationsprozess beginnt. Die gebildeten PHFs können sich schließlich zu den intrazellulären Tau-Einschlüssen zusammenlagern, welche als neurofibrilläre Bündel (NFTs) bekannt sind (Friedhoff et al., 1998b).

Obwohl der Aggregationsprozess des eigentlich so gut löslichen Tau-Proteins noch nicht vollständig erforscht ist, konnte vor einiger Zeit ein Hexapeptid-Motiv (306VQIVYK311) in der dritten Repeat-Domäne identifiziert werden, das die PHF-Formierung über Selbstaggregation durch Ausbildung von β -Strukturen induziert (von Bergen et al., 2000).

1.2 Tauopathien

Der Begriff Tauopathien beschreibt eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, deren gemeinsames pathologisches Merkmal die intrazelluläre Ablagerung des Tau-Proteins im Gehirn ist. Tau verliert seine physiologische Funktion an Mikrotubuli zu binden und es kommt zur Bildung von Fibrillen, die aus Aggregaten von hyperphosphoryliertem und ubiquitiniertem Tau bestehen. Diese Ablagerungen findet man vorwiegend in Neuronen, aber sie treten auch in Gliazellen auf. Manche Tauopathien sind durch Parkinsonismus charakterisiert und Erkrankte sprechen teilweise auf eine Behandlung mit Levodopa an; wohingegen andere Krankheitsformen sich wiederum durch eine Demenz auszeichnen und wieder andere durch das Auftreten von motorische Störungen gekennzeichnet sind (Ludolph et al., 2009).

In der folgenden Abbildung sind mögliche pathophysiologische Prozesse zusammengefasst, die als Krankheitsursache der Tauopathien angesehen werden (Abb.: 1-2 Seite 9):

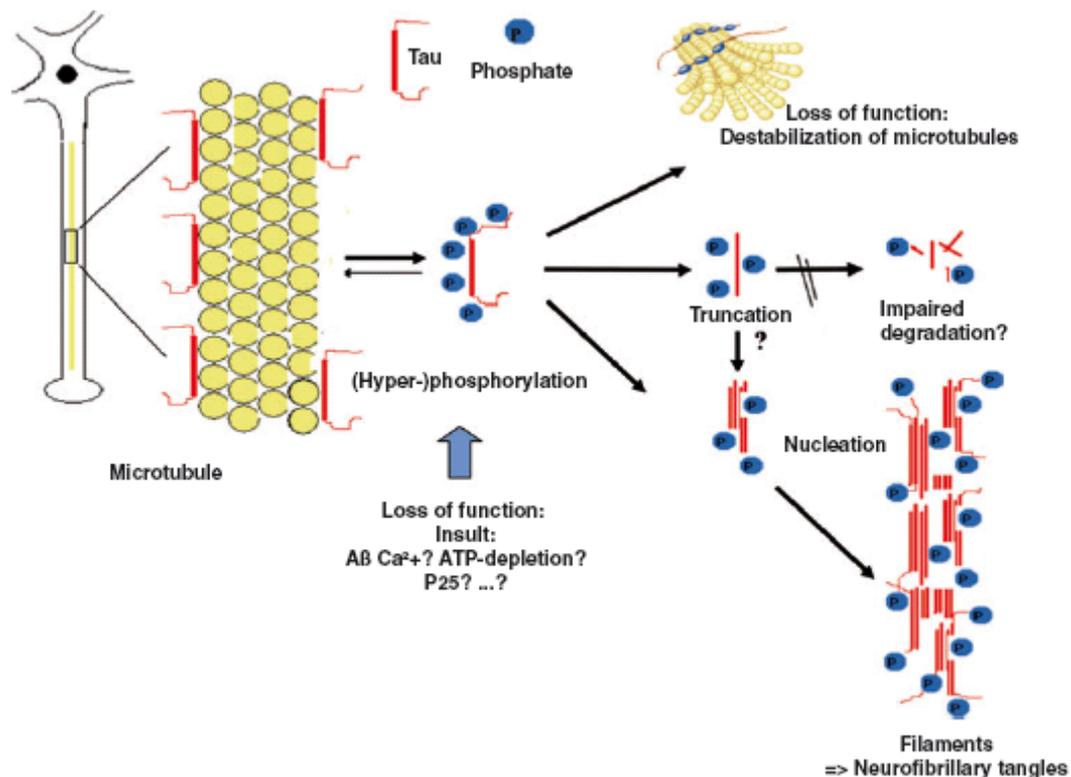


Abb.: 1- 2 Konzept der pathophysiologischen Prozesse der Tauopathien

Die physiologische Funktion von Tau besteht in der Stabilisierung von neuronalen Mikrotubuli, wobei die Bindung an diese durch diverse Insulte zerstört werden kann (gestiegene intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel, geringere ATP-Spiegel, A β , etc.). Hierdurch kommt es zur Hyperphosphorylierung, wodurch Tau nicht mehr seine physiologische Funktion ausüben kann und es zu einer Destabilisierung der mikrotubulären Dynamik kommt (z.B. Zerstörung der Mikrotubuli/Motorprotein-Interaktion (Dynactin-Dynein-Komplex, Kinesin-Komplex)). Diese Dysfunktion führt vermutlich zu einer Umverteilung von Mikrotubuli-assoziierten Zell-Komponenten wie den Mitochondrien. Zusätzlich bilden sich durch proteolytische Prozesse verkürzte Tau-Spezies, die vermutlich zum einen nicht mehr so gut abgebaut werden können und zum anderen die Aggregation zu neurofibrillären Bündeln fördern (aus (Ludolph et al., 2009)).

Interessanterweise haben Analysen der stark unlöslichen Tau-Aggregate, die die Hauptbestandteil der typischen Ablagerungen verschiedener Tauopathien sind, ergeben, dass diese ein unterschiedliches krankheitsspezifisches biochemisches Profil aufweisen (Abb.: 1-3 Seite 10). So lässt sich beispielsweise der Alzheimer Demenz (AD) (Greenberg et al., 1990; Lee et al., 1991), der Kortikobasalen Degeneration (CBD) (Buee, V et al., 1996; Ksiazak-Reding et al., 1994) und der Progressiven supranukleären Blickparese (PSP) (Flament et al., 1991; Vermersch et al., 1994), sowie

der Pick'schen Erkrankung (PiD) (Buee, V et al., 1996; Delacourte et al., 1996) ein bestimmtes elektrophoretisches Bandenmuster zuweisen.

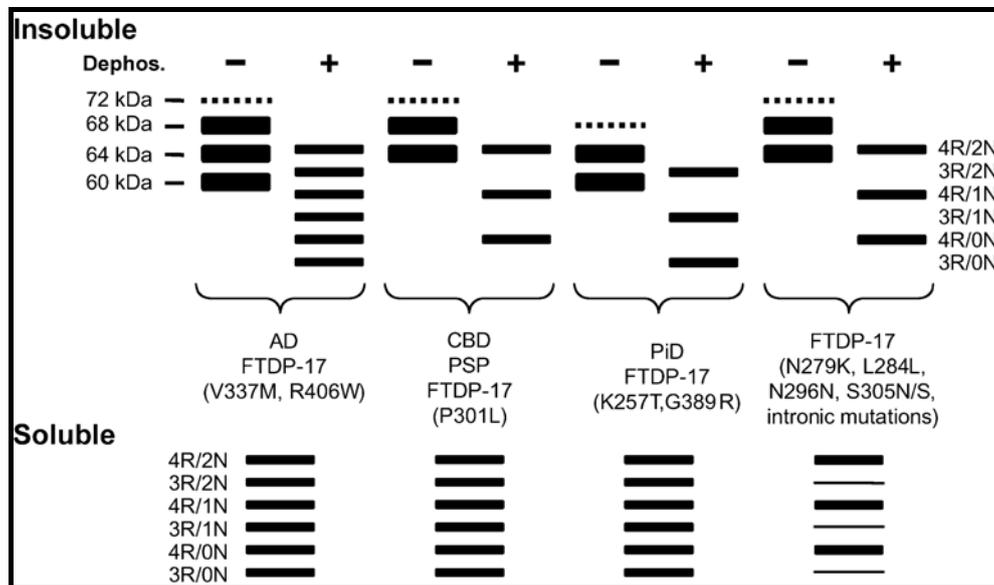


Abb.: 1-3 Schematische Darstellung des Westernblot-Bandenmusters von löslichem und unlöslichem Tau-Protein bei verschiedenen Tauopathien

In Tauopathien variieren die Bandenmuster von unlöslichem (vor und nach Dephosphorylierung) und löslichem Tau-Protein im Westernblot aus dem Gehirn von Patienten (SDS-Page und Immunoblotting mit phosphorylierungsunabhängigen Tau-Antikörpern). Charakteristische Bandenmuster finden sich für unlösliches und dephosphoryliertes Tau bei AD (Triplet aus 68, 64, 60 kDa, sowie eine unwesentlichere, variable Bande bei 72 kDa), CBD und PSP (Duplett aus 68 und 64 kDa und ebenfalls eine unwesentlichere, variable Bande bei 72 kDa) und PiD (64 und 60 kDa Banden dominieren). Für FTDP-17 finden sich je nach Mutation unterschiedliche Varianten. Nach Dephosphorylierung findet man bei AD 6 Banden, die dem löslichen Tau entsprechen, bei CBD und PSP 3 Banden, die mit 4R-Tau übereinstimmen und bei PiD ebenfalls 3 Banden, die wiederum der 3R-Tau Form entsprechen. Die hauptsächlichen Tau-Formen sind durch einen durchgängigen Strich dargestellt und die Dicke der Striche korreliert mit dem relativen Vorhandensein der spezifischen Tau-Isoform. Die variablen Tau-Isoformen (72- und 68-kDa) sind gepunktet dargestellt (nach (Lee et al., 2001a)).

1.2.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Krankheit ist ein sehr langsamer neurodegenerativer Prozess, der sich über mehrere Jahrzehnte hinzieht (Braak, H. and Braak, E., 1991) und die am

weitesten verbreitete Form der Demenzen darstellt sowie die wohl bekannteste Tauopathie ist (Rocca et al., 1991). Meist wird die Krankheit erst in einem späteren Stadium diagnostiziert und die durchschnittliche Lebenserwartung liegt dann noch zwischen drei und acht Jahren (Bracco et al., 1994; McGonigal et al., 1992). Erste klinische Symptome zeigen sich durch eine schlechtere Speicherung von neuen Informationen im Gedächtnis. Dazu gehört neben Vergesslichkeit auch das Problem, Gegenstände wieder zu finden. Im weiteren Verlauf der Krankheit verschlimmern sich die kognitiven Defizite und es können auch Wesensveränderungen, wie Aggressivität oder Passivität, auftreten. Im Endstadium dieser Demenzform ist auch das Langzeitgedächtnis betroffen, weshalb die Patienten meist an vollkommener Desorientierung leiden, an das Bett gefesselt sind und hauptsächlich durch Sekundärerkrankungen wie Pneumonie sterben (Wada et al., 2001). Bei Alzheimer-Patienten kommt es zu Atrophie (örtlicher Schwund von Organen, Geweben, Zellen, wobei die Gewebsstrukturen erhalten bleiben) aufgrund von Neurodegeneration, die im medialen Schläfenlappen, aber auch im Hippokampus sowie im frontotemporalen und parietookzipitalen Kortex stattfindet. Daher können Gehirne von AD-Patienten bis zu 20% an Gewicht verlieren und es kommt zur kompensatorischen Erweiterung der Liquorräume. Außerdem ist der Glucoseumsatz im Temporallappen von AD-Patienten zusätzlich herabgesetzt, was über 18F-2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG) Positron Emissions Tomographie (PET) gezeigt werden kann (Herholz, 2003).

Die histopathologischen Hauptmerkmale sind zum einen die erhöhte Anzahl seniler Plaques extrazellulärer Aggregate (5-200 μm), die aus dem unlöslichen β -Amyloid-Peptid ($\text{A}\beta$) bestehen (Glennner et al., 1984) und von dystrophen Neuriten umgeben sind. Das andere Kennzeichen dieser Krankheit sind die intrazellulär akkumulierenden neurofibrillären Bündel (NFTs), die im Kern aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (Bramblett et al., 1993). Weitere Bestandteile der senilen Plaques sind unter anderem Apolipoprotein E (APO E) und lysosomale Proteasen. Die Hauptkomponente der Plaques besteht aus $\text{A}\beta$ -Peptiden mit unterschiedlicher Aminosäurelänge (40-42). Während $\text{A}\beta_{40}$ auch im gesunden Gehirn gebildet wird, ist die übermäßige Ablagerung des neurotoxischen, stark zu

Aggregation neigenden $A\beta_{42}$ ein hochgradig pathologischer Vorgang. Sowohl $A\beta_{40}$ als auch $A\beta_{42}$ entstehen durch zwei aufeinander folgende proteolytische Spaltungen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP), vermittelt durch die β -Sekretase (BACE: *β -site cleaving enzyme*) (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999) und γ -Sekretase (Multienzymkomplex aus Präsenilin1 und 2, Nicastrin, APH-1, PEN-2) (zusammengefasst in (Steiner et al., 2000)). Die pathologischen Ablagerungen finden sich überwiegend in entorhinaler Rinde, Hippokampus, Großhirnrinde, später auch in Stammganglien, Kleinhirn und subkortikalen Strukturen. Ihre Lokalisation ist nur bedingt mit der der Tau-Ablagerungen vergleichbar.

Die intrazellulären Tau-Ablagerungen (NFTs und Neuropilfäden) finden sich in unterschiedlichen Regionen, häufig mit präfrontaler Dominanz. Sie sind neuronenspezifisch und bestehen hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem bzw. abnorm phosphoryliertem Tau-Protein, das sich zu paarig helikalen Filamenten (PHF) mit einem Durchmesser von 10-22nm und einer Periodizität von 80nm zusammenlagert. Daneben finden sich glatte Filamente (*straight filaments*: SF) mit einem Durchmesser von 20-24nm. Biochemisch können die NFTs (PHF und/oder SF) durch Westernblot charakterisiert werden. Es existieren vier Hauptbanden (55, 64, 69- und 72 kDa), die aus allen sechs hirnspezifischen Isoformen in einem abnorm phosphorylierten Zustand bestehen (Abb.: 1-3 Seite 10).

Die Anzahl der amyloiden Plaques korreliert nicht mit der Schwere der Krankheit, aber die Konzentration von löslichem $A\beta$ korreliert damit. Interessanterweise stimmt die Verteilung der Neurofibrillenbündel zum einen mit den Gebieten der Neurodegeneration und zum anderen stimmt das Ausmaß der Degeneration mit der Schwere der Demenz überein (Morishima-Kawashima et al., 2002). Die ersten neurofibrillären Veränderungen entstehen in der transentorhinalen und entorhinalen Region des Kortex und breiten sich von dort systematisch aus. Braak und Braak haben darauf beruhend ein Klassifikations-System vorgeschlagen, bei dem der Verlauf des neurodegenerativen Prozesses in verschiedene Krankheitsstadien eingeteilt werden kann (Braak et al., 1991). In Stadium I und II sind nur entorhinale Strukturen beteiligt, ohne dass der Patient kognitiv beeinträchtigt ist. Dagegen sind

Patienten des Stadiums III und IV in ihren kognitiven Eigenschaften etwas eingeschränkt, da nun auch Strukturen des Hippokampus betroffen sind. In Stadium V und VI sind schließlich auch kortikale Gebiete von der Neurodegeneration betroffen, was das vollständige klinische Bild der Alzheimer Demenz widerspiegelt.

Der Hauptanteil der Alzheimer Erkrankungen (etwa 90-95%) ist sporadischen Ursprungs. Nur ein sehr geringer Prozentsatz (etwa 5-10%) ist genetisch bedingt. In diesen Fällen spricht man von familiärer Alzheimer-Krankheit (FAD). Beide Formen der Erkrankung zeigen die gleichen klinischen Symptome und pathologischen Merkmale. Für die sporadische Form wurden mehrere Risikofaktoren, die die Entwicklung der Krankheit fördern, gefunden, die aber im Gegensatz zu den FAD-Mutationen nicht unwillkürlich zum Ausbruch der Krankheit führen. Der Hauptrisikofaktor für die sporadische Form ist das Alter und hierbei spielt das Apolipoprotein E Allel (APO E) auf Chromosom 19 eine entscheidende Rolle für den altersbedingten Ausbruch der Erkrankung. APO E ist ein Transportprotein und fungiert als Transporter für Cholesterin. Es kommt in drei verschiedenen Variationen vor (APO E 2, 3 oder 4) und Träger des Apolipoprotein E 4 Allels haben ein größeres Risiko früher an Alzheimer zu erkranken (Corder et al., 1993; Poirier et al., 1993; Saunders et al., 1993). Im Gegensatz zu APO E 4 scheint das APO E 2 Allel einen protektiven Effekt und dessen Träger ein vermindertes Risiko für die Erkrankung zu haben (Corder et al., 1994). Als Auslöser für die FAD wurden drei Gene gefunden, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und im Zusammenhang mit der Produktion des toxischen β -Amyloid-Peptides stehen. Dazu zählt das Amyloid Vorläufer Protein (APP) auf Chromosom 21 und die Präseniline (PS1 und PS2) auf Chromosom 14 und 1, deren Mutationen immer zu einem frühen Ausbruch der Krankheit führen. Für das APP-Gen wurden bisher mehrere (31) Punktmutationen gefunden, die alle zu einer verstärkten Prozessierung des $A\beta_{42}$ führen. Für das PS1-Gen wurden bisher 175 Mutationen beschrieben, doch für das PS2-Gen sind nur 14 Mutationen bekannt. Mutationen in den Präsenilin-Genen treten damit viel häufiger auf und sind somit für die meisten *early-onset* Formen der FAD verantwortlich (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=6&Page=StatPerGene>). Doch sie verursachen gleichzeitig auch die aggressivsten Formen der FAD,

bei denen erste klinische Symptome schon in einem Alter von unter 30 Jahren auftreten können (Steiner et al., 1999).

Alle bisher entdeckten FAD-Mutationen im APP- und den Präsenilin-Genen führen, wie eben erwähnt, zu einer vermehrten A β ₁₋₄₂-Bildung. Auf dieser Erkenntnis beruht die Amyloid- β -Hypothese, welche die Akkumulation von A β als kausales Ereignis für die Erkrankung ansieht und die Bildung von Neurofibrillenbündeln als Konsequenz dessen (Hardy et al., 2002; Hardy et al., 1992). Da aber verschiedene transgene Mauslinien trotz zahlreicher seniler Plaques nur wenig neuronalen Zellverlust zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass die Ablagerung von A β alleine keine ausreichende Erklärung für den Verlust von Neuronen liefert (Irizarry et al., 1997). Andererseits konnte in transgenen Mausmodellen eine zunehmende Neurodegeneration in Verbindung mit Tau-NFTs nachgewiesen werden (Lee et al., 2001b). Zudem lässt die Tatsache, dass verschiedene Amyloid-Plaques auch in kognitiv unbeeinträchtigten Individuen auftreten, vermuten, dass die neurofibrillären Ablagerungen mit dem Krankheitsbild der Demenz in einem engen Zusammenhang stehen (Arriagada et al., 1992; Neve et al., 1998). Interessanterweise führen bei der neurodegenerativen Erkrankung FTDP-17 (Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus) Mutationen im Tau-Gen zur NFT-Bildung und zum Absterben von Zellen, die wie bei AD aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (zusammengefasst in (Goedert, 1998)). Dies deutet darauf hin, dass eine Tau-Pathologie, wie sie in AD vorkommt, für eine Neurodegeneration hinreichend ist.

1.2.2 Kortikobasale Degeneration (CBD)

Die kortikobasale Degeneration (CBD) wird auch als atypisches Parkinson-Syndrom bezeichnet und ist eine seltene, sporadisch auftretende Tauopathie, deren Krankheitsverlauf sehr langsam voranschreitet. Sie ist durch eine asymmetrische kortikale Atrophie im Bereich des Parietallappens und Depigmentierung der Substantia nigra gekennzeichnet. Hauptsymptome sind extrapyramidal-motorische Dysfunktionen (Rebeiz et al., 1968) und ein Nachlassen der kognitiven Eigenschaften

(Sprachverlust (Aphasie), willkürliche Bewegungen (Apraxie)), wobei eine moderate Demenz erst relativ spät auftritt (Rinne et al., 1994). Histopathologisch findet man Neuronenverlust mit Spongiose (interzelluläre Ödembildung) und Gliosis (starke Proliferation von Astrozyten) in den betroffenen Regionen, sowie eine deutliche, intrazytoplasmatisch filamentöse Tau-Pathologie in Neuronen und Gliazellen (Iwatsubo et al., 1994; Mori et al., 1994). Neben neuronalen Tau-Ablagerungen (Neuropilfäden, Tau-Filamente und *looped coiled*-Einschlüsse in grauer und weißer Substanz, Kortex, Hirnstamm und subkortikalen Strukturen) lassen sich auch zahlreiche Ablagerungen in Gliazellen (astrozytische Plaques, dornenförmige Astrozyten, *coiled bodies* in Oligodendrozyten) nachweisen (Feany et al., 1995; Komori et al., 1998; Komori, 1999). Dabei bestehen die Tau-Filamente in CBD aus PHF-gleichen Filamenten sowie geraden Tubuli. Biochemisch sind die unlöslichen Tau-Aggregate durch zwei starke Banden bei 64 kDa und 68 kDa sowie einer variablen Bande bei 72 kDa im Westernblot charakterisiert, das nach Dephosphorylierung nur 4R Isoformen enthält, während in der löslichen Fraktion alle sechs Isoformen detektiert werden können (Abb.: 1-3 Seite 10) (Buee, V et al., 1996; Ksiezak-Reding et al., 1994).

1.2.3 Progressive supranukleäre Paralyse (PSP)

Bei der progressiven supranukleären Paralyse (PSP) (Synonym: Steele-Richardson-Olszewski Syndrom) handelt es sich um eine subkortikale Demenz des Alters die ca. ab dem 60. Lebensjahr auftritt (Steele et al., 1964). Charakteristisch ist das namensgebende Symptom der vertikalen Blickparese bis hin zu einer völligen Augenmuskellähmung. Eine Demenz entwickelt sich progressiv und ist ein wesentliches Merkmal späterer Stadien (Litvan et al., 1997). Neuropathologisch kommt es zur Atrophie der Basalganglien, des Subthalamus und des Hirnstamms und ist gekennzeichnet durch Neuronenverlust mit Spongiose und Gliosis. In den betroffenen Gehirnregionen findet man eine hohe Dichte an fibrillärem Tau sowohl in Gliazellen (dornenförmige und büschelförmige Astrozyten, *coiled bodies* in Oligodendrozyten, interfazikuläre Fäden) (Hauw et al., 1990; Komori et al., 1998)

und Neuronen (Neuropilfäden, runde oder globuläre NFTs) (Hauw et al., 1994; Pollock et al., 1986). Die Ultrastruktur dieser neurofibrillären Läsionen unterscheidet sich zu AD, da hier 15-18 nm lange, gerade Filamente und Filamente mit einer langen Periodizität gefunden werden (Roy et al., 1974; Tellez-Nagel et al., 1973). Durch biochemische Analysen des unlöslichen hyperphosphoryliertem Tau aus den betroffenen Gehirnregionen konnten zwei hochmolekulare Banden (68 und 64 kDa) und eine variable Bande bei 72 kDa identifiziert werden (Abb.: 1-3 Seite 10) (Flament et al., 1991). Ebenso wie bei der CBD finden sich auch bei der PSP nur 4R-Tau Isoformen in den hyperphosphorylierten Aggregaten (Sergeant et al., 1999; Spillantini et al., 1997). Diese weisen dasselbe Phosphorylierungs-abhängige Profil der Tau Epitope auf, wie man sie in den PHFs bei AD findet (Schmidt et al., 1996). Zudem konnte der Überschuss der 4R-Tau Isoformen bereits auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Chambers et al., 1999).

Eine Überlappung des biochemischen und genetischen Profils von PSP und CBD legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um unterschiedliche Manifestationen des gleichen Krankheitsmechanismus handelt. Diese Annahme wird gestützt durch klinische (Hauw et al., 1994) und pathologische Übereinstimmungen (Feany et al., 1996).

1.2.4 Morbus Pick

Diese seltene Variante der frontotemporalen Demenz wurde erstmals von Arnold Pick beschrieben und zeichnet sich durch einen distinkt fortschreitenden Demenzprozess mit schleichendem Beginn aus, der mit frontotemporaler lobär und limbischer Atrophie einhergeht (Pick, 1892). Hauptsymptome sind Affektstörungen, Veränderungen der Persönlichkeit und zunehmende Sprachverarmung bis hin zur absichtlichen oder psychisch bedingten Stummheit (Mutismus). Räumliche Orientierung und praktische Fähigkeiten bleiben lange erhalten. Histopathologisch zeichnet sich die Picksche Erkrankung durch aufgeblähte Nervenzellen (Pickzellen), Tau-Pathologie in Glia-Zellen (büschelförmige Astrozyten und OMMs:

oligodendrogliale und mikrotubuläre Masse) und Neuronen (Pick-Körperchen) aus. Die Pick-Körperchen zeichnen sich ultrastrukturell durch eine Mischung aus weiten, geraden sowie weiten, langperiodischen gewundenen Filamenten aus (Munoz-Garcia et al., 1984; Murayama et al., 1990). Im Gegensatz zu PSP und CBD findet sich in Aggregatpräparationen ein charakteristisches Duplett von 60 und 64 kD, sowie einer variablen Bande bei 68 kDa, in dem nur 3R-Tau-Isoformen enthalten sind (Abb.: 1-3 Seite 10) (Buee, V et al., 1996; Delacourte et al., 1998; Ksiezak-Reding et al., 1994). Pick Körperchen finden sich gehäuft in den granulären Neuronen des Gyrus dentatus und in den Schichten II und IV des Neokortex, der keine 4R-Tau- Isoformen exprimiert (Iwatsubo et al., 1994; Probst et al., 1996).

1.2.5 FTDP-17

Eine weitere Form der Tauopathien bildet eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die als frontotemporale Demenz und Parkinsonismus verbunden mit Chromosom 17 (FTDP-17) bezeichnet werden (Wilhelmsen et al., 1994). Diese Erkrankung tritt nicht wie die bisher genannten Tauopathien sporadisch auf, sondern vererbt sich autosomal-dominant mit Mutationen im Tau-Gen und zeichnet sich durch überlappende klinische und neuropathologische Eigenschaften, wie Verhaltensstörungen und Parkinsonismus, aus (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998b). Charakteristisch für diese Störungen ist eine Atrophie des frontalen und temporalen Kortex, häufig verbunden mit degenerativen Veränderungen in subkortikalen Bereichen und die Hauptsymptome entsprechen denen einer frontalen Demenz. Die Neuropathologie bei FTDP-17 ist durch deutlichen neuronalen Verlust in den betroffenen Gehirnregionen gekennzeichnet und es kommt sowohl in Neuronen als auch Gliazellen zu intrazellulären Ansammlungen von hyperphosphoryliertem Tau (AD-ähnliche bzw. PSP-ähnliche Tau-Pathologie, Pick Körperchen). Andere krankheitsspezifische Veränderungen oder β -Amyloid-Ablagerungen sind nicht feststellbar (Lippa et al., 2000; Murrell et al., 1999; Rizzini et al., 2000; Spillantini et al., 2000).

Es sind mittlerweile über 34 pathogene Mutationen in den Exons und Introns des Tau-Gens bekannt (D'Souza et al., 2005) und die meisten befinden sich innerhalb der Mikrotubuli-bindenden Domäne (Abb.: 1-4 Seite 19). Diese Mutationen kann man anhand ihres unterschiedlichen Mechanismus, der zu Tau-Funktionsstörungen und so vermutlich zur Neurodegeneration führt, in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe umfasst Mutationen, die das alternative Spleißmuster von Tau verändern. Diese Mutationen sind in Exon 10 sowie den umgebenden Introns lokalisiert und beeinflussen wahrscheinlich regulatorische Elemente auf prä-mRNA Ebene. In Folge dieser Mutationen konnte eine relative Zunahme von Exon 10 enthaltender mRNA festgestellt werden, wodurch das relative Verhältnis zwischen 4R-Tau und 3R-Tau verschoben wird. Im Gegensatz dazu führen Mutationen der zweiten Gruppe von missense-Mutationen zu einer direkten Veränderung der Mikrotubuli-Bindungseigenschaften, indem die Bindungsfähigkeit von Tau an die Mikrotubuli vermindert wird und es so zu einer Reduktion der durch Tau vermittelten Stabilität und Bildung der Mikrotubuli kommt (D'Souza et al., 1999; Delisle et al., 1999; Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 2000; Yasuda et al., 1999; Yasuda et al., 2000). Biochemisch zeigt sich im Westerblot vorwiegend die 4R-Tau Isoform, wenn das unlösliche Tau-Protein *post mortem* aus den Gehirnen von FTDP-17-Patienten extrahiert wurde (Abb.: 1-3 Seite 10) (Clark et al., 1998). Zudem sind die Protein-Spiegel von 4R-Tau sowohl in betroffenen wie auch in nicht betroffenen Gehirnregionen erhöht (Goedert et al., 1999; Hong et al., 1998a; Spillantini et al., 1998b; Yasuda et al., 2000).

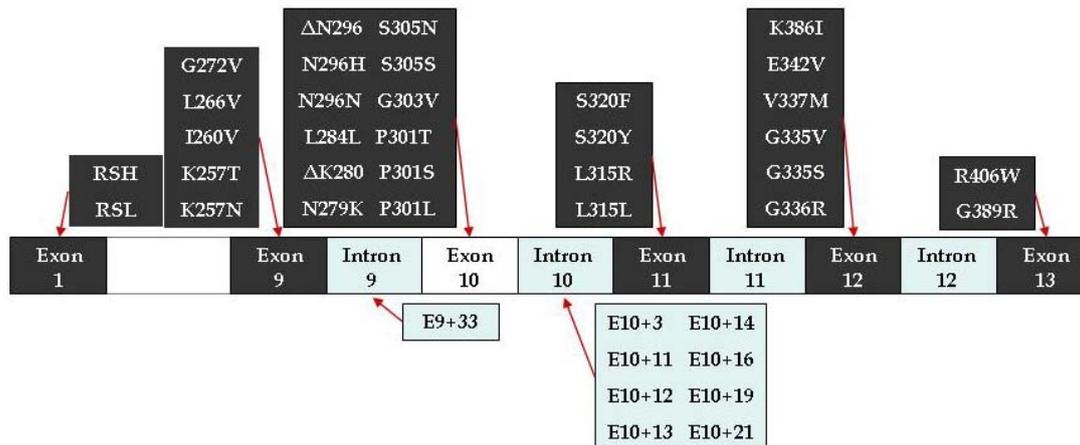


Abb.: 1- 4 Schematische Darstellung aller bisher bekannten pathogenen Mutationen im Tau-Gen

Die Mutationen treten gehäuft in und um das alternativ gespleißte Exon 10 auf. Graue Boxen stellen Exons bzw. die darin liegenden Mutationen dar, blaue Boxen Introns, weiße Box alternatives Exon 10 (modifiziert nach (Gendron et al., 2009) und <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=6&Page=StatPerGene>).

In den Gehirnen von Patienten mit einer sehr aggressiven Mutation (P301L), konnte das mutierte Protein nur in unlöslicher, also aggregierter, Form nachgewiesen werden, obwohl die mRNA-Spiegel nicht beeinträchtigt sind (Miyasaka et al., 2001). Außerdem reduziert diese Mutation, im Gegensatz zu Wildtyp Tau, enorm die Fähigkeit von Tau, die Mikrotubuli-Assemblierung zu fördern (Hasegawa et al., 1998). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass P301L zu einer erhöhten Bildung von Tau-Isoformen mit vier Repeat-Domänen (4R) führt (Grover et al., 1999). Dadurch ist eine verstärkte Tendenz zur PHF-Bildung vorhanden, die mit der starken Neigung, β -Strukturen um ein Hexapeptid-Motiv zu bilden, korreliert (von Bergen et al., 2001).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellmodell (SH-SY5Y-Zellen stabil transfiziert mit hTau40 bzw. TauP301L) stellt Aspekte von Tauopathien wie AD sowie auf der anderen Seite aufgrund der Mutation die Erkrankung FTDP-17 nach. Im Westernblot weisen die transfizierten Zellen (hTau40 und TauP301L) vergleichbare Spiegel an 4R-Tau auf, die im Vergleich zu den vct-Zellen mehr als 10-fach erhöht sind (Ferrari et al., 2003). Nach 5-tägiger Exposition mit $A\beta_{1-42}$ kommt es zu einem deutlichen Anstieg der unlöslichen Fraktion von Tau sowie zur

Ausbildung von PHFs (Ferrari et al., 2003). Diese gleichen PHFs, die von NFTs bei humanen neurodegenerativen Erkrankungen extrahiert wurden und als *narrow twisted ribbons* beschrieben werden (Spillantini et al., 1998a). Dieses Zellmodell ermöglicht mit Hilfe der im vorigen Absatz genannten Eigenschaften der P301L-Mutation, deren Einfluss und die zugrunde liegenden Prozesse auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen untersuchen zu können. Dabei dient der Tau überexprimierende Zelltyp dazu, um zwischen den Effekten von der längsten Tau-Isoform hTau40 und der Mutation P301L unterscheiden zu können.

1.3 Mitochondrien

Vor über 1,5 Milliarden Jahren kam es durch Symbiose von aeroben Protobakterien mit ursprünglichen eukaryotischen Zellen zur Entstehung von Mitochondrien (Wallace, 2005). Es kam zur Bildung von hoch spezialisierten Organellen, die für eine ganze Reihe von zellulären Aufgaben eine bedeutende Funktion übernehmen. Die Menge an Mitochondrien pro Zelle variiert von Null in Erythrozyten bis hin zu zehntausenden in gestreiften Muskelzellen. Unter aeroben Bedingungen stellt die mitochondriale Atmungskette der Zelle einen Großteil der benötigten Energie zur Verfügung. Indem die Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk in der Zelle ausbilden, erfolgt die Bereitstellung von ATP jeweils angepasst an den entsprechenden Bedarf. Zudem erfolgen in den Mitochondrien auch weitere Biosynthesewege. Außerdem dienen sie als Calcium-Speicher und sind in eine Reihe von Signaltransduktionswegen involviert, nicht zuletzt der Zelltodkaskade, wodurch sie auf verschiedenen Ebenen an der Zell-Homeostase beteiligt sind (McBride et al., 2006). Von daher ist es nicht verwunderlich, dass mitochondriale Dysfunktion dramatische Auswirkungen für die Funktion der Zelle hat und im Alter und bei neurologischen Erkrankungen zum Absterben von Zellen führt (Lin et al., 2006).

1.3.1 Aufbau der Mitochondrien

Weil die Mitochondrien endosymbiontisch in eine eukaryotische Zelle aufgenommen wurden, verfügen sie über die Besonderheit von zwei hoch spezialisierten Membranen, der inneren und der äußeren Membran, umgeben zu sein. Dadurch entstehen innerhalb der Mitochondrien zwei getrennte Kompartimente: die innere Matrix und ein viel schmalerer Intermembranraum (Abb.: 1-5).

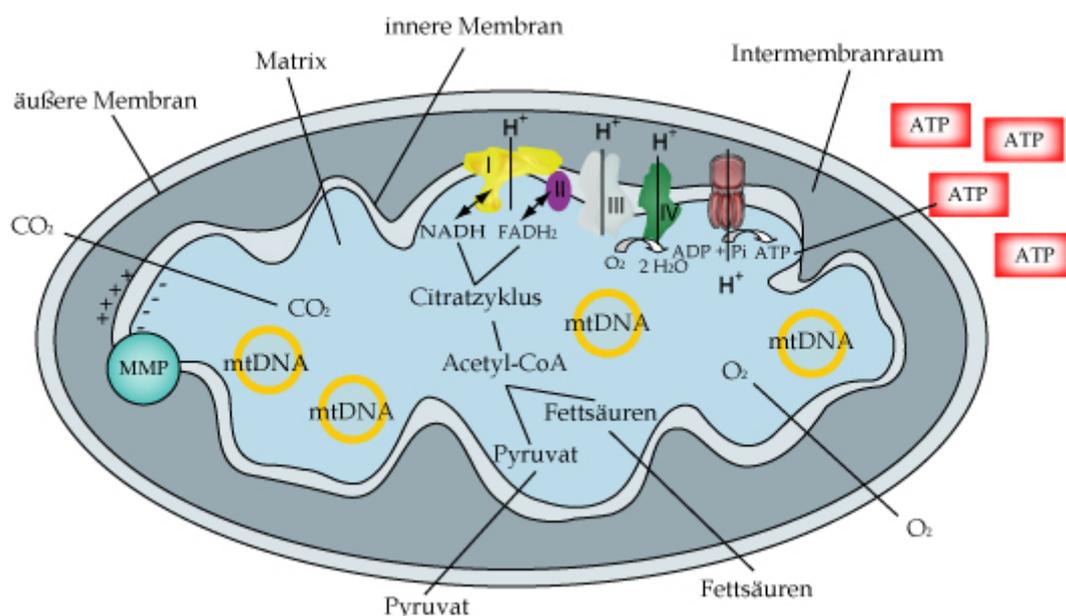


Abb.: 1- 5 Schematischer Aufbau eines Mitochondriums und seine Grundfunktionen

Ein Mitochondrium ist von zwei Membranen – der inneren und der äußeren – umgeben, wodurch zwei Kompartimente entstehen. Zwischen der inneren und der äußeren Membran befindet sich der Intermembranraum und im inneren die Matrix. Hier findet neben anderen Stoffwechselprozessen der Citratzyklus statt, der über NADH und FADH₂ Elektronen in Atmungskette (Komplex I gelb, Komplex II violett, Komplex III grau, Komplex IV grün und Komplex V rot) einschleust. Diese befindet sich in der inneren mitochondrialen Membran, wobei die Elektronen durch Komplex IV auf Sauerstoff (O₂) übertragen werden und H₂O entsteht. Durch den Protonentransport entlang der Atmungskette entsteht ein elektrochemischer Gradient, der wiederum die ATPase (rot) antreibt, um Energie in Form von ATP zu generieren.

Im Matrixraum, der durch die innere Membran begrenzt wird, enthält eine hochkonzentrierte Mischung hunderter Enzyme, wie z.B. Enzyme des Citratzyklus und für die Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren. Ebenso befinden sich das mitochondriale Genom, spezielle mitochondriale Ribosomen, transferRNAs und

diverse Enzyme, die für die Expression der mitochondrialen Gene notwendig sind, in der mitochondrialen Matrix. Diese wird vom Intermembranraum durch die innere Membran abgegrenzt, die zur Oberflächenvergrößerung in zahlreiche Cristae gefaltet ist. Aufgrund der röhren- bzw. lamellenförmigen Cristae wird der Intermembranraum noch einmal physiologisch in unterschiedliche Kompartimente unterteilt (Frey et al., 2000; Logan, 2007). Eine weitere Besonderheit stellt die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht der inneren mitochondrialen Membran dar. Sie enthält Cardiolipin, weshalb die Membran für Ionen besonders undurchlässig ist (Capaldi, 1982). Aufgrund von speziellen Transportern kann aber ein gezielter Austausch bestimmter Moleküle zwischen Matrixraum und Zytosol erfolgen. Zudem findet die oxidative Phosphorylierung an der inneren Membran statt, da hier die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette lokalisiert sind. Die äußere Membran grenzt das Mitochondrium gegenüber dem Zytosol der Zelle ab. Diese enthält das Transportprotein Porin, wodurch große wasserhaltige Kanäle in der Lipiddoppelschicht entstehen (Lloreta-Trull et al., 1998). Durch diese Poren kann ein Austausch von Ionen und Molekülen mit einer Größe bis zu 5000 Dalton zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol stattfinden.

1.3.2 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind an vielen verschiedenen Funktionen der Zelle beteiligt, unter anderem am reguliertem Zelltod (Apoptose), der Erzeugung von Hitze durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung sowie der Transkription und Translation von mitochondrialen Genen (Leonard et al., 2000). Des Weiteren finden viele metabolische Prozesse in den Mitochondrien statt, wie der Citratzyklus, die β -Oxidation, der Abbau von Aminosäuren, die Biosynthese von Häm, der Steroid-Metabolismus, und der Harnsäurezyklus.

Allerdings ist die Energiegewinnung wohl der bedeutendste Prozess, der in den Mitochondrien stattfindet (siehe Abb.: 1-5 Seite 21). Hierfür wird im Zytosol von Neuronen über den Stoffwechselweg der Glykolyse Glukose zu Pyruvat abgebaut.

Dieses wird ebenso wie Fettsäuren über die innere mitochondriale Membran transportiert und in der mitochondrialen Matrix zu Acetyl-CoA umgewandelt. Die Acetylgruppen werden dann im Citratzyklus oxidiert. Im Verlauf des Citratzyklus werden energiereiche Elektronen erzeugt, die von NAD^+ und FAD unter Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 übernommen werden. Die gebildeten energiereichen Elektronen werden dann auf die Atmungskette mit ihrem terminalen Akzeptor Sauerstoff übertragen. Der mitochondriale Elektronentransport und die daran gekoppelte oxidative Phosphorylierung findet an fünf Multienzymkomplexen (Komplexe I bis V) in der inneren Mitochondrienmembran statt, von denen die ersten vier Komplexe die Elektronentransportkette bilden, während der Komplex V die ATP-Synthase, die eigentliche Phosphorylierungsreaktion katalysiert. Hierdurch wird das Elektronentransportpotential des $\text{NADH}+\text{H}^+$ bzw. des FADH_2 in das Phosphorylgruppenübertragungspotential des ATP umgewandelt. Die fünf Atmungsketten-Komplexe sind: Komplex I (NADH Dehydrogenase), Komplex II (Succinat Ubichinon Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinon Cytochrom C Reduktase; Cytochrom-b-c₁-Komplex), Komplex IV (Cytochrom C Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase). Während die Elektronen entlang der Atmungskettenkomplexe transportiert werden, werden gleichzeitig Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Dieser Transport der Protonen hat zwei wichtige Folgen:

- 1) Zum einen wird ein pH-Gradient erzeugt. Dabei ist der pH-Wert in der Matrix größer als im Zytosol, wo der pH-Wert nahe 7 liegt. Der pH-Wert im Intermembranraum gleicht dem des Zytosols, weil die äußere mitochondriale Membran durchlässig für kleine Moleküle ist.
- 2) Zum anderen wird ein Spannungsgradient über der inneren mitochondrialen Membran erzeugt (Membranpotential), wodurch die Innenseite negativ und die Außenseite positiv geladen ist. Das Membranpotential beträgt ungefähr -140 mV . Zusammengenommen bilden der pH-Gradient und das Membranpotential einen elektrochemischen Protonengradienten.

Aufgrund ihrer Funktion der Energiegewinnung sind die Mitochondrien auch die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Vor Jahren wurde die Freie-Radikal-Theorie des Alterns aufgestellt, wobei die altersabhängige Akkumulation von ROS zur Schädigung von wichtigen Zellbestandteilen führt. Unter anderem sind der Zellkern, mitochondriale DNA, Membranen und zytoplasmatische Proteine betroffen. 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^-). Das Ungleichgewicht bei der Generierung von ROS und ihrer Entgiftung trägt zu vielen neurodegenerativen Erkrankungen bei. Unter physiologischen Bedingungen sind die Mitochondrien die Hauptquelle von ROS, da hier die Atmungskette lokalisiert ist. Zwei der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe sind besonders an der Bildung von ROS beteiligt: Komplex I (Turrens et al., 1980a) und Komplex III (Cadenas et al., 1977). Mittlerweile sind aber auch weitere mitochondriale Enzyme bekannt, die generell an der Generierung von ROS beteiligt sind: neben den Komplexen I, II, und III der Atmungskette, die Aconitase (ACO) und die α -Ketoglutarat Dehydrogenase (KGDH) aus dem Citratzyklus, sowie Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (GPDH), Dihydroorotat Dehydrogenase (DHODH), die Monoaminoxidasen (MAO) A und B, und Cytochrom b5 Reduktase (B5R) (Lin et al., 2006). Mitochondrien enthalten aber auch antioxidative Enzyme, z.B. die Mangan-Superoxiddismutase (SOD), die Glutathion Peroxidase (Oshino et al., 1977), die Katalase, sowie lipidlösliche Antioxidantien wie z.B. Vitamin E (Vatassery et al., 1984), Thioredoxin, Glutathion und das reduzierte Coenzym Q (Aberg et al., 1992). 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.

Als weitere Quelle für die ROS-Generierung werden erhöhte intrazelluläre Calcium-Spiegel angesehen. Gesteigerte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen führen zu einer erhöhten NO-Synthese, weil die endotheliale und neuronale NO-Synthase (eNOS und nNOS) durch Ca^{2+} aktiviert werden (Bredt, 1999). NO und

Superoxidradikalanionen können wiederum miteinander reagieren und Peroxynitrit bilden. Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Calcium-induzierten ROS-Bildung ist die mitochondriale Calcium-Pufferung. Denn hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen führen zum Öffnen der mitochondrialen Permeabilitätspore (MPTP = *mitochondrial permeability transition pore*), wodurch Calcium in den Mitochondrien abgepuffert werden kann. Dies kann zu einem drastischen Abfall des mitochondrialen Membranpotential und zur Anschwellung führen, zur Freisetzung mitochondrialer Faktoren ins Zytosol, zu einer erhöhten ROS-Formation sowie zu apoptotischen Signalen (Rego et al., 2003).

1.3.3 Mitochondriales Genom

In der Zelle gibt es neben dem Zellkern nur eine einzige weitere Organelle die über eigene DNA (mtDNA) verfügt und in der Lage ist Biosynthese zu betreiben, um RNA sowie Proteine herzustellen. Mitochondrien sind semiautonome Organellen, da ihr mitochondriales Genom nur für einen Teil der benötigten Proteine kodiert. Die meisten Proteine sind kernkodiert 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. Das mitochondriale Genom besteht aus einem zirkulären Plasmid, dass in mehreren Kopien (2-10) in jedem Mitochondrium vorhanden ist, von denen wiederum hunderte bis tausende in einer Zelle vorkommen (DiMauro et al., 2003). Bereits 1981 wurde das mitochondriale Genom von Anderson *et al.* entschlüsselt und es enthält eine 16.571 Basenpaare (bp) umfassende Sequenz (Anderson et al., 1981). Es ist ein zirkuläres, doppelsträngiges und superhelikales DNS Molekül und enthält insgesamt 37 Gene, die für 13 Proteine und 24 strukturell RNAs kodieren (Abb.: 1-6 Seite 26). Von diesen Genen werden 24 zur Translation der mtDNA (2 ribosomale RNAs (rRNA) und 22 transfer RNAs (tRNA)) benötigt. Die übrigen 13 Gene kodieren für Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette, wobei sieben Untereinheiten des Komplexes I, eine Untereinheit des Komplexes III, drei Untereinheiten des Komplexes IV und zwei Untereinheiten des Komplexes V in der mtDNA kodiert

sind (Brandon et al., 2005). Ebenso wie die fehlenden Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe werden auch weitere wichtige Proteine von nukleären Genen kodiert. Diese Proteine werden nach ihrer Synthese an den Ribosomen im Zytosol mit Hilfe einer Zielsequenz aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert.

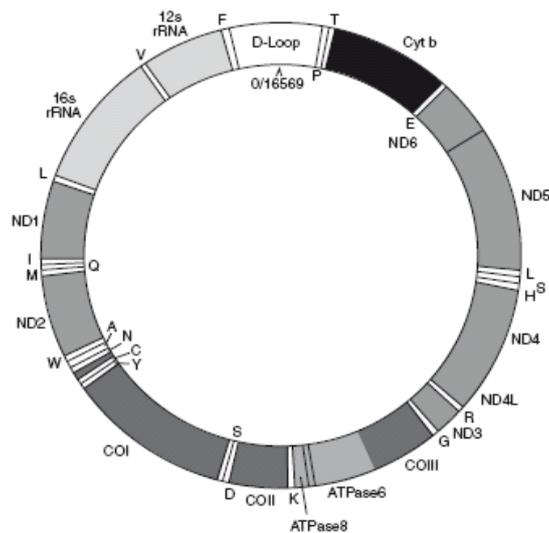


Abb.: 1- 6 Mitochondriale DNA

Gezeigt ist die mitochondriale DNA modifiziert nach MITOMAP (<http://www.mitomap.org>)

Es gibt einen bedeutenden Unterschied im Vererbungsmuster des mitochondrialen gegenüber dem nukleären Genoms. Es wird nur maternal, das heißt von der Mutter, vererbt und besitzt auch keine Allele im engeren Sinne. Somit überträgt eine Mutter, die eine Mutation in der mtDNA trägt, diese Mutation auf ihre Kinder, wobei nur die Töchter diese wiederum an ihre Nachkommen weiter vererben können. 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. Mehrere Faktoren spielen bei mitochondrialen Erkrankungen eine Rolle. 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 liegt als im Kerngenom (Merriwether et al., 1991; Wallace et al., 1987). 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.

1.3.4 Mitochondrien sind dynamische Organellen

Die mitochondriale Morphologie ist viel dynamischer, als ursprünglich angenommen. Gerade in adhärennten Zelltypen bilden Mitochondrien ein ausgedehntes tubuläres Netzwerk aus, das sich ständig teilt und wieder fusioniert und somit ein interkonnektives Netz erschafft (Abb.: 1-7).

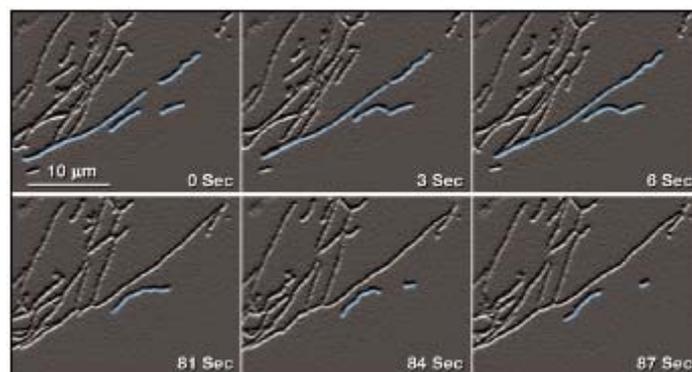


Abb.: 1- 7 Mitochondriale Fusion und Fission

Mitochondrien in embryonalen Fibroblasten der Maus wurden mit YFP gelabelt und mit Hilfe von *Live cell imaging* gefilmt. Dargestellt sind Einzelbilder des aufgenommenen Films. Einige ausgewählte Mitochondrien sind blau dargestellt. In den ersten drei Bildern treffen zwei Paare an Mitochondrien aufeinander die umgehend miteinander fusionieren. In den unteren drei Bildern teilt sich das untere fusionierte Mitochondrien-Paar wieder und ein neues „Tochter“-Mitochondrium entfernt sich (aus (Chen et al., 2003a)).

Das Fusionieren von Mitochondrien stellt einen kritischen Aspekt der mitochondrialen Funktion dar. Die Störung dieses Prozesses führt zu einem Abfall

des mitochondrialen Membranpotentials (Chen et al., 2003a). Demgegenüber spielt *Fission* von Mitochondrien bei der Einleitung des programmierten Zelltod eine entscheidende Rolle. Somit sind die Funktion und das Überleben der Zelle stark abhängig von einer kontrollierten Balance zwischen *Fusion* und *Fission*. Eine gestörte mitochondriale Dynamik wird zunehmend auch als ein entscheidender Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen angesehen (Knott et al., 2008). Kürzlich konnte eine abnormale *Fusion* und *Fission* in Fibroblasten von Alzheimer-Patienten (Wang et al., 2008a) und in einem Zellmodell nachgewiesen werden (Wang et al., 2008b). Durch Screenings in Hefe wurden viele Faktoren identifiziert, die bei *Fusion* und *Fission* eine Rolle spielen und für die meisten findet man konservierte Strukturen in Säugetieren. Als Mediatoren für *Fusion* sind Mfn 1 und 2 (Fzo1 in Hefe) sowie Opa1 (Mgm1 in Hefe) bekannt und *Fission*-Mediatoren sind Drp1 (Dnm1 in Hefe) und Fis1 (Westermann, 2008). Allerdings wurden für manche Mediatoren in Hefe keine Homologen in Säugetieren gefunden und ebenso zeigen einige Faktoren, wie Bax und das Bax-bindende Protein Endophilin B1, sowie MPT18 nur in Säugetieren einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie. Mutationen in den Mediatoren für *Fusion* und *Fission* führt zu schwerwiegenden Erkrankungen die in der folgenden Tabellen zusammengefasst sind (Tab.: 1-1 Seite 29).

<i>Erkrankung</i>	<i>Betroffenes Gen</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Mitochondriale Funktion</i>	<i>Mitochondriale Morphologie</i>
Dominant optische Atrophie	OPA1	Autosomal dominant optische Atrophie	<i>Fusion</i>	Evtl. fragmentiert
Charcot-Marie-Tooth-Syndrom IIa	MFN2	Autosomal dominant periph. Neuropathie	<i>Fusion</i>	Evtl. fragmentiert
Charcot-Marie-Tooth-Syndrom IVb	DGAP	Autosomal rezessive periph. Neuropathie	<i>Fission</i>	Evtl. fragmentiert
Lethales metabolisches Syndrom	DRP1	Neonatale Lethalität	<i>Fission</i>	verlängert

Tab.: 1-1 Wichtigsten vererbte Erkrankungen durch Veränderung der mitochondrialen Dynamik

In der Tabelle sind die wichtigsten erblichen Erkrankungen aufgelistet, denen eine Veränderung in der mitochondrialen Dynamik zugrunde liegt (modifiziert nach (de Brito et al., 2008; Detmer et al., 2007))

1.3.4.1 *Fusion* von Mitochondrien

Bisher sind drei große GTPasen aus der Dynamin-Familie bekannt (Mfn1, Mfn2 und Opa1), welche die mitochondriale *Fusion* in Säugetierzellen vermitteln. Dabei sind Mfn 1 und 2 für die *Fusion* der äußeren Membran verantwortlich und Opa1 bewerkstelligt die *Fusion* der inneren Membran (Meeusen et al., 2004; Meeusen et al., 2006) (Abb.: 1-8 Seite 30).

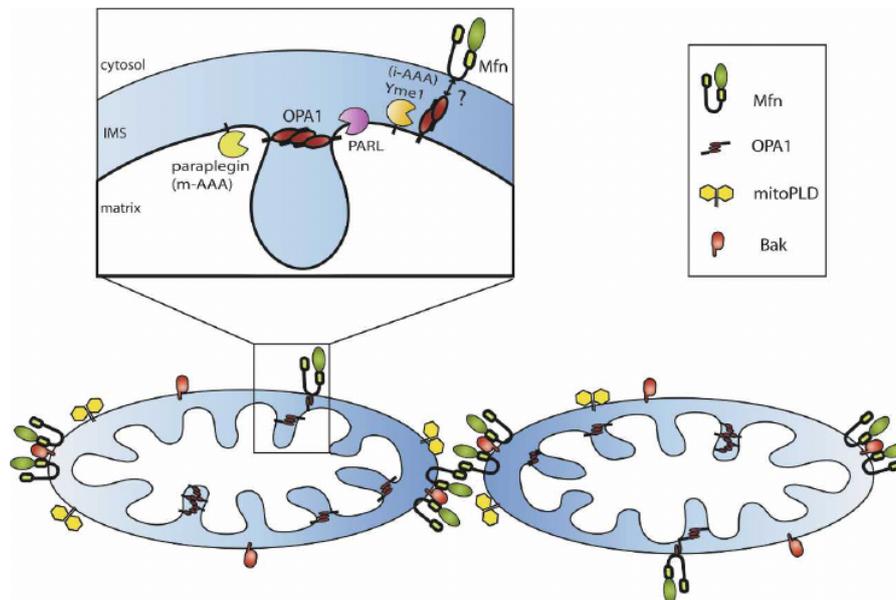


Abb.: 1- 8 Die mitochondriale Fusion-Maschinerie

Schematische Darstellung der submitochondrialen Verteilung der Proteine, die in gesunden Zellen an dem Prozess der *Fusion* beteiligt sind (Mfn1 und 2, Opa1, mitochondriale Phospholipase D (mitoPLD), und Bak). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt einige Proteasen, die an der Opa-Prozessierung beteiligt sind (aus (Suen et al., 2008)).

Opa1 ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und ragt in den Intermembranraum (Olichon et al., 2002). Es wird durch ein einziges Gen kodiert, allerdings entstehen durch alternatives Spleißen acht verschiedene Transkripte (Delettre et al., 2001), die wiederum durch verschiedene Proteasen in kurze und lange Fragmente geschnitten werden. Mittlerweile sind einige verantwortliche Proteasen identifiziert worden, unter anderem Mitglieder der Rhomboid-Familie (Cipolat et al., 2006; Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003), Paraplegin (Ishihara et al., 2006), und Yme1 (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). Wenn das mitochondriale Membranpotential abfällt kommt es zur Prozessierung von Opa1, weshalb dieser Prozess vermutlich durch den energetischen Status und die Morphologie der Mitochondrien reguliert wird (Duvezin-Caubet et al., 2006; Griparic et al., 2004; Ishihara et al., 2006; Meeusen et al., 2006).

Die Mitofusine 1 und 2 sind in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM = *outer mitochondrial membrane*) mit zwei Transmembrandomänen verankert. Dabei sind ihre N-terminale GTPase-Domäne und die C-terminale *coiled coil* Domäne dem Zytoplasma

zugewandt (Rojo et al., 2002). Außerdem ist die GTPase-Aktivität der Mitofusine eine Voraussetzung für die *Fusion* von Mitochondrien (Hales et al., 1997). Dabei bildet die C-terminale Domäne von Mfn 1 und 2 homo- und herterotypische Komplexe zwischen zwei fusionierenden Mitochondrien aus (Koshiba et al., 2004). Mittlerweile wurden einige Bindungspartner von Mfn1 und 2 identifiziert, zu denen unter anderem mehrere Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie MIB (*mitofusin-binding protein*) (Eura et al., 2006), Stoml2 (*stomatin-like protein 2*) (Hajek et al., 2007), Bax und Bak (Brooks et al., 2007a), sowie Bcl-2 und Bcl-xL, gehören (Delivani et al., 2006). Des Weiteren werden noch weitere Proteine diskutiert, die an der *Fusion* von Mitochondrien beteiligt sind. Dazu gehört die mitochondriale Phospholipase D (mitoPLD) (Choi et al., 2006). MitoPLD ist ein dimeres Enzym der OMM, dessen katalytische Domäne ins Zytosol gerichtet ist. Vermutlich interagiert die katalytische Domäne mit der OMM des angrenzenden Mitochondriums und verändert dort die Lipide im Anschluss an Mitofusin-vermittelte Anbindung der Membranen zweier Mitochondrien. Es konnte auch gezeigt werden, dass mitoPLD Cardiolipin hydrolysiert.

1.3.4.2 *Fission* von Mitochondrien

Bisher sind hauptsächlich zwei Proteine - Drp1 und hFis1 - bekannt, die für das *Fission* von Mitochondrien verantwortlich sind (Abb.: 1-9 Seite 32). Drp1 (*dynamamin-related protein*) ist eine große GTPase (zusammengefasst in (Hoppins et al., 2007)), welche die allgemeinen Mechanismen mit seinem Homolog Dynamin teilt, das wiederum an der Abspaltung von Endosomen von der Plasmamembran beteiligt ist. Der größte Anteil des löslichen Drp1 befindet sich im Zytosol und pendelt von dort ständig zu den Mitochondrien und wieder weg (Smirnova et al., 2001; Wasiak et al., 2007). Vermutlich lagert es sich an den *Fission sites* der Mitochondrien zu Spiralen zusammen um den Prozess voranzutreiben. Mutationen, die die GTPase-Aktivität von Drp1 hemmen, inhibieren die mitochondriale *Fission*. Hierdurch kommt es aufgrund verstärkter *Fusion* zu einem ausgedehnten Netzwerk von Mitochondrien (Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 2001).

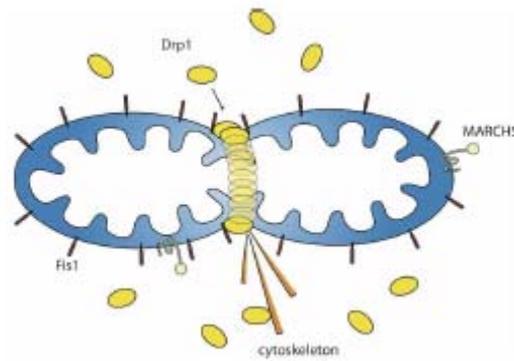


Abb.: 1- 9 Die mitochondriale *Fission*-Maschinerie

Schematische Darstellung der Lokalisierung der an der mitochondrialen *Fission* beteiligten Proteine (Drp1, Fis1, und MARCKS) (aus (Suen et al., 2008)).

Wie die Rekrutierung von Drp1 zu den Mitochondrien und die mitochondriale *Fission* im Einzelnen erfolgt ist noch nicht geklärt. In Hefe erfolgt die Anlagerung mit Hilfe von Fis1, das in der OMM verankert ist und diese quasi bedeckt (Dohm et al., 2004; Suzuki et al., 2003). Allerdings erfolgt die Rekrutierung in Hefe durch zwei Adapterproteine, wofür keine homologen Proteine in Säugetieren gefunden werden konnten und Drp1 scheint die Assemblierung auch in Abwesenheit von hFis1 vorzunehmen (Lee et al., 2004b). Dafür scheinen Mikrotubuli und Aktinfilamente bei der Rekrutierung von Drp1 in Säugetieren eine Rolle zu spielen (De Vos et al., 2005; Varadi et al., 2004). Ebenso ist die *Fission* der inneren mitochondrialen Membran (IMM) noch völlig unklar. Bisher sind nur noch weitere mögliche Proteine bekannt, die an der *Fission* der OMM beteiligt sein könnten. Hierzu zählen Endophilin B1 (auch als Bif1 bezeichnet), das im Zytosol lokalisiert ist und mit Bax interagiert (Cuddeback et al., 2001; Pierrat et al., 2001), genauso wie MTP18 (*mitochondrial protein, 18 kDa*), welches ein *downstream effector* der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) ist (Tondera et al., 2004; Tondera et al., 2005). Es wird diskutiert, dass MTP18 und GDAP1 (*ganglioside-induced differentiation associated protein 1*) an der Regulation der mitochondrialen *Fission* beteiligt sind, indem sie die Rekrutierung von Drp1 aus dem Zytosol an die OMM bewerkstelligen (Pedrola et al., 2005; Tondera et al., 2004; Tondera et al., 2005).

1.3.5 Mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen

Mitochondriale Dysfunktion ist ein sehr frühes Ereignis bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Huntington (HD = *Huntington's disease*), Parkinson (PD = *Parkinson's disease*), Alzheimer Demenz (AD = *Alzheimer's disease*), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS = *amyotrophic lateral sclerosis*), Schlaganfall, und Epilepsie (Lin et al., 2006). Zudem liefern Untersuchungen der letzten Jahren auch Hinweise für eine Fehlfunktion der Mitochondrien bei psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Bipolarer Störung und Depression (Kato, 2006; Shelton, 2007). Als Indikator für eine mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen zählen ultrastrukturelle Veränderungen, die Hemmung von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette, eine verminderte Produktion von ATP, erhöhte freie Radikalspiegel, Deletionen in der mitochondrialen DNA (mtDNA), eine gestörte Ca^{2+} -Pufferung durch die Mitochondrien, und ein vermindertes mitochondriales Membranpotential (Lin et al., 2006).

Die Forschung über Huntington hat sich in den letzten Jahren auf die gestörte Funktion der Mitochondrien fokussiert, da im Tiermodell sehr früh eine Beeinträchtigung der Atmung sowie der ATP-Produktion zu beobachten ist (Milakovic et al., 2005). Mutiertes Huntingtin (mtHtt) scheint die Aktivität von Komplex II zu stören und die Hemmung durch 3-NP (3-Nitropropionsäure – ein Inhibitor von Komplex II) induziert HD-ähnliche Symptome (Benchoua et al., 2006). Außerdem scheint das mtHtt die Ca^{2+} -Pufferung der Mitochondrien zu beeinträchtigen (Fernandes et al., 2007; Panov et al., 2002) und führt zu ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien in Lymphoblasten von HD-Patienten (Squitieri et al., 2006). Kürzlich haben Studien gezeigt, dass ein wichtigerer Regulator (PGC-1 α) der Transkription von mitochondrialen Proteinen, die an der Abwehr von oxidativem Stress und der Atmung beteiligt sind, bei HD eine verminderte Aktivität aufweist und somit zu der mitochondrialen Schädigung beitragen könnte (Cui et al., 2006; St-Pierre et al., 2006; Weydt et al., 2006).

Bei der Parkinson Erkrankung gibt es mehrere Hinweise auf einen Link zwischen mitochondrialen Dysfunktion und PD. Zum einen führt die Hemmung von Komplex I durch Rotenon oder MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) zu PD-Symptomen (Betarbet et al., 2000; Fornai et al., 2005). Zum anderen wurden einige mutierte Proteine bei PD identifiziert – α -Synuklein, LRRK2, Parkin, PINK1, und DJ-1 – die eine Rolle bei der Produktion oder Abwehr von ROS spielen und mit der mitochondrialen Membran assoziiert sind (Biskup et al., 2006; Gandhi et al., 2006; Li et al., 2007; Mouatt-Prigent et al., 2004; Zhang et al., 2005). Kürzlich wurde eine Mutation in dem intramembranärem Protein HTRA2/OMI gefunden, die familiäre PD verursacht und dessen Expression führt in kultivierten Zellen zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und zum Anschwellen von Mitochondrien (Strauss et al., 2005).

Die familiäre amyotrophe Lateralsklerose (FALS) ist durch eine gestörte Ca^{2+} -Pufferung in den Mitochondrien gekennzeichnet (Damiano et al., 2006). Bei dieser Erkrankung ist das genetisch veränderte Protein die mitochondriale Superoxid-Dismutase 1 (mtSOD1), das vermutlich Ca^{2+} -Kanäle stört. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass mtSOD1 den Proteinimport durch die äußere mitochondriale Membran behindert (Liu et al., 2004), die mitochondriale Atmungskette zerstört, zu veränderter ROS-Produktion führt (Mattiuzzi et al., 2002) und die anti-apoptotische Funktion von Bcl2 inhibiert (Pasinelli et al., 2004).

Oxidative Schäden sind ein frühes Ereignis in der Pathologie der Alzheimer Demenz (Nunomura et al., 2001). Zusätzlich inhibiert A β die Aktivität der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) und verstärkt somit die ROS-Produktion (Crouch et al., 2005; Manczak et al., 2006). Diese Beobachtungen deuten auf einen Link zwischen mitochondrialer Dysfunktion und AD hin, da oxidativer Stress, Cytochrom C und ROS mit den Mitochondrien assoziiert sind. Zusätzlich gibt es bei AD Hinweise, dass ein verminderter Glukose-Metabolismus als Indikator für eine spätere Entwicklung von AD in alters-assoziierten kognitiv-beeinträchtigten Patienten gilt (Hunt et al., 2007). Für einen graphischen Überblick über mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen siehe Abb. 1-10.

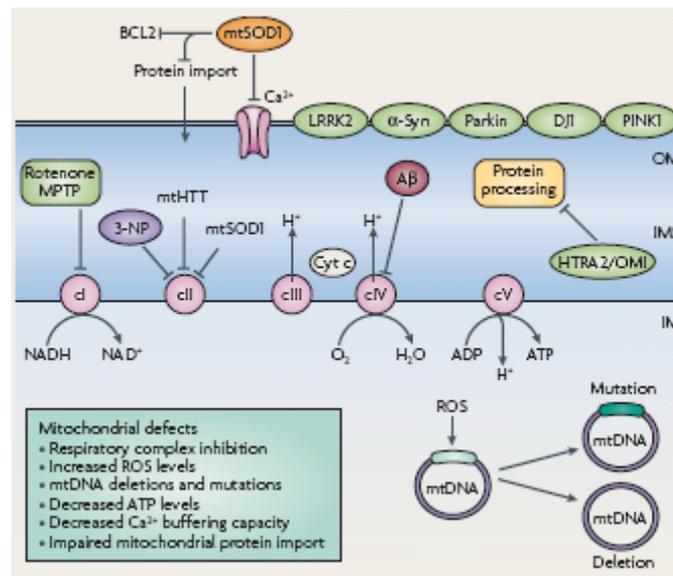


Abb.: 1- 10 Mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen

Für eine genaue Beschreibung der Abbildung siehe Text. A β (Amyloid- β), 3-NP (3-Nitropropionsäure), cI (Komplex I), cII (Komplex II), cIII (Komplex III), cIV (Komplex IV), Cyt C (Cytochrom C), IM (innere mitochondriale Membran), IMS (Intermembranraum), LRRK2 (Leucinreiche Repeat kinase 2), MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin), mtDNA (mitochondriale DNA), mtHtt (mutiertes Huntingtin), mtSOD1 (mitochondriale Superoxiddismutase), OM (äußere mitochondriale Membran), PINK1 (PTEN-induzierte Putative Kinase 1), ROS (reaktive Sauerstoffspezies), α -Syn (α -Synuclein)

Bei der Alzheimer Demenz gibt es noch weitere Hinweise auf Abnormalitäten der Mitochondrien, wie etwa eine geringere mitochondriale Masse und verminderter DNA-Gehalt, die ebenfalls sehr frühe pathologische Merkmale von AD darstellen (Hirai et al., 2001). Darüber hinaus sind die Aktivitäten von einigen mitochondrialen Schlüsselenzymen, der Pyruvat Dehydrogenase-Komplex (PDHC) (-41%), der Isocitrat Dehydrogenase (ICDH) (-27%), der α -Ketoglutarat Dehydrogenase (KGDHC) (-57%), der Succinat Dehydrogenase (SDH) (+44%) und der Malat Dehydrogenase (MDH) (+54%) bei AD verändert (Bubber et al., 2005a). Zudem führt die Überexprimierung von APP in der Zellkultur zu einer verminderten COX-Aktivität, veränderter mitochondrialer Morphologie und erniedrigtem Membranpotential (Askanas et al., 1996; Grant et al., 1999; Keil et al., 2004; Wang et al., 2008b). In Studien konnte gezeigt werden, dass A β die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und Caspase-Aktivierung nur in Zellen mit einer funktionierenden Atmungskette induziert (Cardoso et al., 2001), weshalb intakten

Mitochondrien ein enormer Anteil entweder als Ziel oder als Vermittler der A β -Toxizität zugeschrieben wird (Hauptmann et al., 2009). Die Inhibierung von Mitochondrien verstärkt die amyloidogene Prozessierung von APP, wodurch der Weg für weitere Zellschäden freigemacht wird (Gabuzda et al., 1994).

Mitochondrien stellen die Hauptquelle von ROS dar, doch auch außerhalb des Mitochondriums gebildete ROS, wie z.B. durch oxidative Desaminierung von biogenen Aminen durch Monoaminoxidasen, können Mitochondrien schädigen und somit zu Störungen der mitochondrialen Funktion führen. Dabei ist mitochondriale DNA besonders anfällig für oxidative Schäden, denn sie ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, enthält keine Introns und keine schützenden Histone (Richter et al., 1988). ROS sind außerdem potente Stimulatoren der Lipidperoxidation (Babbs et al., 1990). Die innere mitochondriale Membran enthält viele ungesättigte Fettsäuren, wobei ein Hauptbestandteil das Cardiolipin darstellt (Capaldi, 1982). Dieses mehrfach ungesättigte Lipid spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Cytochrom C Oxidase (Robinson, 1993) und durch oxidative Schäden reduziert es dessen Aktivität, wodurch es zu einem direkten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials kommt. Außerdem kann Proteinoxidation entweder direkt oder als Konsequenz von Lipidperoxidation durch ROS hervorgerufen werden (Stadtman, 1992). Diese führt zu Störungen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe, der ATPasen (Forsmark-Andree et al., 1997) des Adenin Nukleotid Translokators (Forsmark-Andree et al., 1995) und begünstigt die Öffnung der mitochondrialen Pore (Griffiths et al., 1995). Die Untersuchungen von antioxidativen Enzymen bei AD wie z.B. der Superoxiddismutase, der Glutathion Peroxidase und der Glutathion Reduktase weisen unterschiedliche Ergebnisse auf. Der überwiegende Teil der Studien zeigt jedoch eine Erhöhung der Enzymaktivitäten in AD-Gehirnen als Antwort auf erhöhten oxidativen Stress (Lovell et al., 1995; Schuessel et al., 2004).

Kürzlich hat eine Studie an P301L-Mäusen die ersten Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion bei FTDP-17 (frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus) aufgezeigt (David et al., 2005a). Die Studie zeigte auf struktureller

(Proteomics) wie funktioneller Ebene einen Einfluss auf Mitochondrien durch mutiertes Tau. Auf Proteinebene war hauptsächlich die Expression von Proteinen verändert, die einen Einfluss auf den Metabolismus haben, wie z.B. Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen, aber auch antioxidative Enzyme und synaptische Proteine waren verändert. Auf funktioneller Ebene kam es vor allem mit zunehmendem Alter zu verstärkten Effekten auf die mitochondriale Funktion der P301L-Mäuse. Dies zeigte sich in einer verminderten Komplex I-Aktivität, einer gestörten Respiration und erniedrigten ATP-Spiegeln. Zudem waren die Mitochondrien der P301L-Mäuse empfindlicher gegenüber zusätzlichem Stress durch A β , weshalb von einem synergistischen Effekt von Tau und der A β -Pathologie auf die Mitochondrien ausgegangen werden kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mitochondriale Dysfunktion spielt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer Demenz oder Parkinson, eine entscheidende Rolle. Bei einer weiteren Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, den sogenannten Tauopathien, kommt es zur Bildung von neurofibrillären Bündeln (NFTs), die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Dadurch verliert Tau seine physiologische Funktion, die Assemblierung von Mikrotubuli zu fördern und diese zu stabilisieren. Ob allerdings auch bei den Tauopathien eine mitochondriale Dysfunktion vorliegt, die zur Degeneration beiträgt, ist bisher nicht bekannt. Kürzlich hat eine Studie an transgenen P301L-Mäusen erstmals einen Zusammenhang zwischen der Tau-Pathologie und einer mitochondrialen Dysfunktion aufgedeckt (David et al., 2005a).

Im Zuge dieser Arbeit sollten diese ersten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Tau-Pathologie und mitochondrialer Dysfunktion im Detail untersucht werden. Hierfür wurde ein humanes, neuronales Zellmodell (humane Neuroblastoma-Zellen) verwendet, das die längste Tau-Isoform (hTau40) bzw. die Mutation P301L (TauP301L) überexprimiert (Ferrari et al., 2003). Diese Mutation führt bei einer vererbten Form von Tauopathien - der FTDP-17 (frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus assoziiert mit Chromosom 17) - zur Hyperphosphorylierung, wodurch es zur Bildung von toxischen Fibrillen und letztendlich zu Neurodegeneration kommt. Mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten Zellmodells sollten die Auswirkungen der Überexpression von hTau40 und TauP301L auf die mitochondriale Funktion zunächst grundlegend charakterisiert und auf eventuelle Unterschiede hin spezifischer überprüft werden. Diese Charakterisierung sollte auf verschiedenen Ebenen durchgeführt werden, sodass zum einen funktionelle Parameter, wie das mitochondriale Membranpotential, die ATP-, NO- und ROS-Spiegel, die metabolische Aktivität sowie die verschiedenen Komplex-Aktivitäten bestimmt wurden. Zum anderen sollten auch strukturelle Parameter überprüft werden, wie die mitochondriale

Morphologie und Ultrastruktur, aber auch ob auf Expressionsebene Unterschiede in den Atmungskettenkomplexen vorliegen.

Zudem ist bekannt, dass mutiertes Tau den Vesikel- und Organelltransport in der Zelle negativ beeinflusst. Des Weiteren gibt es immer mehr Hinweise, dass eine veränderte mitochondriale Dynamik bei neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Daher war ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit den Einfluss von Tau auf die mitochondriale Dynamik der SH-SY5Y Zellen mit Hilfe von *Live cell imaging* am konfokalen Mikroskop zu untersuchen sowie auf mRNA-Ebene die Expression diverser Faktoren zu überprüfen, die für die mitochondriale Dynamik verantwortlich sind.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der Effekte durch sekundäre Insulte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen. Dabei sollte untersucht werden, ob zusätzlicher oxidativer Stress, die Inhibierung der einzelnen Komplexe der Atmungskette oder die Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ zu unterschiedlichen Effekten auf die mitochondriale Funktion der hTau40- und TauP301L-Zellen führt. Dies wurde anhand der metabolischen Aktivität, des mitochondrialen Membranpotentials sowie der ATP-Spiegel untersucht.

Insgesamt sollten im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen der P301L-Mutation auf die mitochondriale Funktion und Dynamik, sowie der Einfluss von sekundären Insulten auf die Mitochondrien untersucht werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Geräte	Firma
Autoklav (Bioklav)	Schütt
Blockthermostat	Stuart Scientific
Branson Sonifier, Cell Disruptor B15	Branson Ultrasonic Corp.
Brutschrank Heraeus, Typ BB 6220	Heraeus
Brutschrank, Mini Galaxy A	Nunc
Chemidoc XRS System	Biorad
Elektrophoresekammer Novo Mini Cell, X-Cell Sure Lock™	Invitrogen
Elektrophoresekammer Perfect Blue Gelsystem Mini	PeqLab
Elektrophoresekammer Transferkammer Novo Mini Cell, X-Cell II Blot Module	Invitrogen
FACSCalibur	BD
Inversionsmikroskop, Modell TMS, Typ I04 Nikon	Nikon
Konfokales Laserscannmikroskop TCS SP5	Leica
Kühlzentrifuge Modell J2-21 mit Beckmann JA-20 und JA-20.1 Rotor	Beckmann
Laminar Flow Bank Hera safe	Heraeus Instruments
Magnetrührer, Typ Poly 15	H + P Labortechnik
Microfuge®R Centrifuge Modell GS-6R	Beckmann
Mikroskop, Modell Nikon Eclipse E 800	Nikon
Mikrowelle	Bosch
Multipette®plus 4981	Eppendorf
NanoDrop ND-1000 UV/Vis Spektrometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Merck Eurolab
pH-Meter, Modell Inolab	WTW
Photometer für Mikrotiterplatten, Digiscan	Asys Hightech
Pinzette, Modell Aesculap	BD
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000µl)	Gilson
Schüttler Modell Promax 1020	Heidolph
Schüttler Modell ST5	Zipper
SpeedVac®Plus SC21A	Savant
Thermocycler Primus 25 Advanced	PeqLab
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferpette®-8 (10 - 100µl)	Brand
Transferpette®-8 (30 - 300µl)	Brand
Ultraschallbad, Sonorex RK105H	Bandelin

Victor™ X2 Multilabel Counter	Perkin Elmer
Vortexer, Modell Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen, Modell Ab204 und AT261	Mettler
Wasserbad, Modell 1003	Merck Eurolab
Wasserbad, Modell Thermomix 1441	Braun
Wasser-Filtrationsanlage	Millipore
Zentrifuge, Modell GS-6R	Beckmann

Materialien	Firma
Bacillol®AF	Bode
Combitips (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 10ml)	Eppendorf
Cryo-S (2 ml)	Greiner bio-one
Deckgläser (24mm)	Neolab
Einweg-Pasteurpipetten (3ml)	Roth
Gel Loader Tips	Eppendorf
Glaspasteurpipetten	VWR
Helipur®	Braun
Latexhandschuhe Peha soft	Hartmann
Lysoformin®spezial Konzentrat	Lysoform
Mikrotiterplatte white walled (96 Well)	Lonza
Mikrotiterplatten (6, 48, 96 Well)	Greiner bio-one
Nitrilhandschuhe	Roth
Objektträger (76x26mm)	Menzel GmbH & CoKG
One-Shot® TOP10 Competent Cells	Invitrogen
Parafilm®M	Merck Eurolab
Pipettenspitzen (10, 200, 1000µl)	Greiner bio-one
PVDF-Transfermembran Hybond-P 0,45 µm	Amersham Biosciences
Reaktionsgefäße (1,5; 2; 15; 50ml)	Greiner bio-one
Sterillium	Bode
Tissue Culture Dish (100mm)	IWAKI

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Farbstoffe	λ Ex/Em [nm]	Hersteller/Nr
DAF-2DA (4,5-Diaminofluorescein-Diacetat)	495/515*	Calbiochem 251505
DHE (Dihydroethidium)	493/620*	Invitrogen D23107
DHR (Dihydrorhodamin 123)	505/534*	Invitrogen D23806
Ethidiumbromid	493/620	
Hoechst 33258	350/461	
Mitotracker® CMXRos	579/599	Molecular Probes M7512
Mitotracker® Deep Red 633 FM	644/665	Molecular Probes M22426

Material & Methoden

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	590	Sigma
Picogreen	502/523	Invitrogen
R123 (Rhodamin 123;)	505/534	Invitrogen R-302

*nach Hydrolyse bzw. Oxidation

Komplexinhibitoren	Firma/Produktnummer
Antimycin A(Streptomyces sp.)	Sigma 115K4035
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma S2002
Oligomycin A	Fluka 75351
Rotenon	Sigma R-8875
2-Thenoyltrifluoroaceton (TTFA)	Fluka 88300

Western Blot	Firma
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® MES SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
NuPage® Transferbuffer (20x)	Invitrogen
Precision StrepTactin-HRP conjugate	Bio-Rad
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Western Breeze Blocking Reagenz A	Invitrogen
Western Breeze Blocking Reagenz B	Invitrogen

PCR/cDNA-Synthese/ RT-PCR/Real time PCR	Firma
Agarose	Sigma
Blue Juice Gel Loading Buffer (10x)	Invitrogen
DEPC behandeltes Wasser	Invitrogen
Desoxy-Nucleotid-Triphosphate(dNTP)	Invitrogen
Dithiothreitol (DDT)	Invitrogen
DNA ladder (100bp)	Invitrogen
DNA ladder (1kp)	Invitrogen
Ethidiumbromid	Sigma
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
RNase Out	Invitrogen
RNaseH	Invitrogen
RT-Puffer (10x)	Invitrogen
Tag Polymerase (5U/μl)	PeqLab
Tag Puffer (10x)	PeqLab
Taq Enhancer (5x)	PeqLab
Trizol Reagenz	Invitrogen

Sonstiges	Firma
5,5-dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)	Merck
Acetyl-Coenzym A	Sigma
Ammoniak	Merck
Amyloid- β (1-42)	Bachem (H1368)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck
Chloroform	Merck
Complete®Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan)	Fluka
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium F12	Gibco/Invitrogen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x)	Gibco/Invitrogen
Ethanol	Merck
FCCP	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco/Invitrogen
Fetales Kälberserum, Mycoplasmen-getestet	Fluka 21855
Fugene®Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics
Gel MountIM	Sigma
Gentamycin Sulfat (G418)	Gibco/Invitrogen
Glutamat	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Glycerol	Merck
HFIP(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)	Sigma
Hydroxyethylpiperazinethansulfonat (HEPES)	Merck
Isopropanol	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
Mowiol 4-88	Merck
NaCl	Sigma
NADH	Sigma
NaPi	Sigma
Natriumdodocylsulfat (SDS)	Merck
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma
Natronlauge (NaOH)	Merck
n-Decylubichinon (DBQ)	Sigma
n-Dodecyl- β -D-Maltosit	Sigma
Oxalactetat	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Penicillin/Streptomycin-Lösung, (PenStrep)	Invitrogen
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Protein Reagenz A	Biorad
Protein Reagenz A	Biorad
Salzsäure (HCl)	Sigma
Trimethylammoniumdiphenylhexatrien	Sigma
Tris (hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma
Triton X- 100	Sigma

Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Invitrogen
Trypsin	Gibco/Invitrogen
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma/Riedel de Haen

2.1.3 Kits

Name	Hersteller/Nr
A β [1-40] Human ELISA Kit	Colorimetric Biosource (KHB 3482)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (69504)
Cytochrome C Oxidase Assay Kit	Sigma (CYTOCOX1)
EnzyChrom™ Lactate Assay Kit	Bioassaysys/Biotrend (ECLC-100)
Expand Long Template PCR System	Roche (1 681 834)
MitoProfile® Human Total OXPHOS Complexes Detection Kit	MitoScience (MS601)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (12143)
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen (P7589)
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen (11904-018)
ToxiLight®BioAssay Kit	Lonza (LT07-217)
ViaLight®Plus Kit	Lonza (LT07-221)

2.1.4 Primer

Amplifiziertes Gen	Primer Sequenz	Größe
Drp-1	5'-AACTTGATCTCATGGATGCGGG-3' sense	600 bp
	5'-ATGAACCAGTTCCACACAGCGG-3' antisense	
Fis-1	5'-CGAGCTGGTGTCTGTGGAGGACC-3' sense	300 bp
	5'-TGTCAATGAGCCGCTCCAGTTCC-3' antisense	
Mfn-1	5'-CTCCAGCAACGCCAGATAATGC-3' sense	350 bp
	5'-ACTTGTGGCACAGGCGAGC-3' antisense	
Mfn-2	5'-GGATGCTGATGTGTTTGTGCTGG-3' sense	450 bp
	5'-AGTCCATGATGAGTCGAACCGC-3' antisense	
Mito-Small	5'-CCCCACAAACCCCACTTAAACCCA-3' sense	220 bp
	5'-TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG-3' antisense	
Mito-Tall	5'-TCTAAGCCTCCTTATTCGAGCCGA-3' sense	8,9 kb
	5'-TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG-3' antisense	

Material & Methoden

mtDNA (mtB)	5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3' mtF3212 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTAA-3' mtR3319	108 bp
MTP18	5'-ATGTCAGAGCCGCAGCCG-3' sense 5'-TCAGGAGGAGCTGGGCTTCC-3' antisense	500 bp
nDNA (ASPG)	5'-GAGCTGTTGACGGAAAGGAG-3' ASPG3F 5'-CAGAAGAGAATCCCGGCTAAG-3' ASPG4R	186 bp
Opa-1	5'-GGCTCTGCAGGCTCGTCTCAAGG-3' sense 5'-TTCCGCCAGTTGAACGCGTTTACC-3' antisense	550 bp
β-actin	5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' sense 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' antisense	600 bp

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Antigen	Immunogen	Firma
C-I-20 (ND6) anti-Maus	<i>Bovine Complex I</i>	Mitoscience
C-II-30 (FeS) anti-Maus	<i>Bovine Heart Complex II</i>	Mitoscience
C-III-Core 2 anti-Maus	<i>Bovine Heart Complex II, III</i>	Mitoscience
C-IV-II anti-Maus	<i>Human Complex IV, subunit II</i>	Mitoscience
C-V-α anti-Maus	<i>Bovine Complex V</i>	Mitoscience
GAPDH anti-Maus	GAPDH	Chemicon

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Spezies	Hersteller
Anti-Maus	Chemicon

2.1.6 Puffer

- **PBS-Puffer**

Das 10-fach Konzentrat wurde mit Millipore-Wasser 1:10 verdünnt und auf einen pH Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt. Gegebenenfalls wurden 50 ml des

Puffers mit einer Tablette des Protease Inhibitor-Cocktails *Complete* (Firma Roche) versetzt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

○ **Tris-HCL Puffer**

- Puffer II Tris-HCl 5mM, pH8,5
- Puffer III Tris-HCl 5mM, pH7,4
- Puffer IV Tris-HCl 50mM, pH7,4
- Puffer I Tris-HCl 0,2 M, pH8,5

○ **TBE-Puffer (10x)**

- 178 mM TRIS Base
- 178 mM Borsäure
- 4 mM EDTA-Na₂

Die verschiedenen Chemikalien wurden in 1000 ml H₂O_{bidest} gelöst und anschließend der pH-Wert auf 8 eingestellt.

○ **Lyse-Puffer für Mitochondrienisolierung**

- 75 mM NaCl 75mM
- 1 mM NaH₂PO₄ * 2H₂O
- 8 mM NaH₂PO₄ * 12H₂O
- 250 mM Sucrose
- 1 mM Pefabloc
- 0.05% Digitonin

Die Substanzen wurden in 50 ml Millipore-Wasser gelöst und mit sechs Tablette des Protease Inhibitor-Cocktails *Complete mini* (Firma Roche) versetzt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

2.1.7 Lösungen

2.1.7.1 Lösungen für die Western Blot Analyse

- **Laufpuffer NuPage MES**
 - 50 ml SDS Puffer (20x)
 - 950 ml H₂O_{bidest}
 - 1 ml NuPage Antioxidant

- **Transferpuffer NuPage**
 - 50 ml Transfer
 - 100 ml Methanol
 - 850 ml H₂O bidest
 - 1 ml NuPage Antioxidant

- **TBST-Lösung (1x)**
 - 3 g Tris-Base
 - 80 g NaCl
 - 500 ml TBS
 - 1 ml Tween 20
 - H₂O_{bidest} ad 1Liter

- **Azid-Lösung (100x)**
 - 2% Natriumazid

- **Sekundär-Antikörper**
 - 10 ml 1x TBST
 - Sek. AK 1:10.000
 - 1 µl *Precision StrapTactin-HRP conjugate*

- **Blocker-Lösung**
 - 2 ml Blocker Diluent A

- 3 ml Blocker Diuent B
- 5 ml Millipore-Wasser

2.1.7.2 Lösungen für den MTT-Assay

MTT-Reagenz	MTT	5mg/ml PBS
Solubilisierungslösung	SDS	10% in 0,01M HCL

Das steril filtrierte (Sterilfiltrervorsatz 0,22 µm) MTT-Reagenz wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde die Lösung nicht wiederverwendet. Die Solubilisierungslösung wurde bei 4°C aufgehoben.

2.1.7.3 Lösungen für mikroskopische Aufnahmen

○ **Paraformaldehyd-Lösung**

Um eine 4%-ige PFA-Lösung zu erhalten, wurde 37%-iges Formalin in sterilem PBS verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Vor der Fixierung wurde die Lösung auf 37°C erwärmt.

○ **Moviol**

Moviol wird in der Histologie als wasserlösliches Einbettmittel zur Herstellung von Dauerpräparaten eingesetzt. Zur Herstellung werden 6g Glycerol mit 2,4g Moviol 4-88 und 6 ml H₂O_{bidest} in ein 50 ml Falcon gegeben und nach kräftigem vortexen über Nacht auf dem Schüttler (160 rpm) gemischt. Am nächsten Tag werden 12 ml Puffer I hinzugegeben und für 10 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Zur vollständigen Lösung kann das Gemisch auch im Ultraschallbad behandelt werden. Die Aliquots werden bei -20°C aufbewahrt und nach dem Auftauen nicht wiederverwendet. Vor dem Eindeckeln der Proben wird dem Moviol noch das Antibleichmittel

DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan) zugesetzt, um ein Ausbleichen der Proben zu verhindern.

- **Fixierungslösung für EM**
 - PBS (26,4 ml)
 - 3,7% Formaldehyd (3 ml)
 - 0,5% Glutaraldehyd (0,6 ml 25%-iges Glutaraldehyd)

2.1.8 Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurden stabil transfizierte humane SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen verwendet, die freundlicherweise von Jürgen Götz zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen wurden generiert, indem zunächst die längste humane 4R Tau-Isoform - hTau40 - in den pRc/RSV Expressionsvector kloniert wurde. Anschließend wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, um die Mutante P301L zu erhalten (Abb.: 2-1 Seite 50) (Sequenz des hierfür verwendeten Oligonukleotids: 5'-GGTTG-TAGACTATTTGCACACTGCCGCCTCCCTGGACGTGTTTG-3'). Das erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf Abwesenheit von willkürlichen Mutationen überprüft (Ferrari et al., 2003).

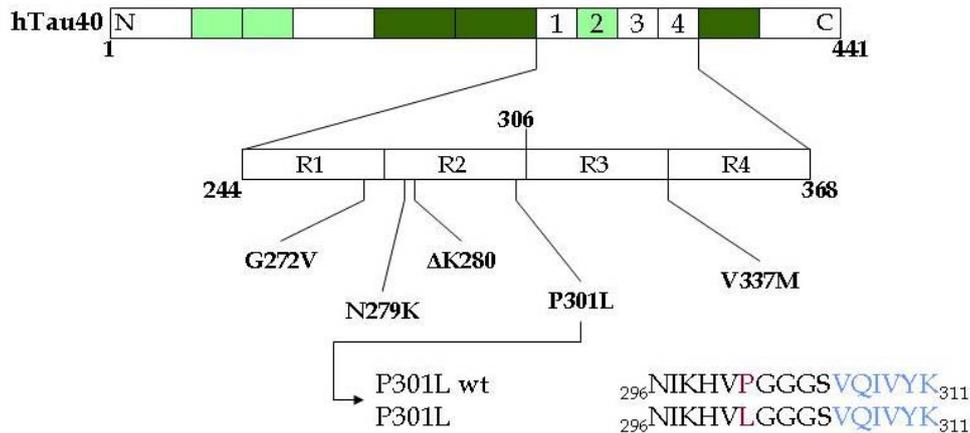


Abb.: 2- 1 Schematische Darstellung der längsten Tau-Isoform

Die längste Tau-Isoform verfügt über vier *Repeats* (1-4), welche die Mikrotubuli-Bindungsdomänen darstellen, die jeweils aus ~31 Aminosäuren bestehen. Diese *Repeats* sind N- und C-terminal von basischen und Prolin-reichen Regionen flankiert (dunkelgrün), welche die Mikrotubuli-Bindung verstärken. Zwei Inserts nahe dem N-Terminus und der 2. *Repeat* (hellgrün) sind ebenfalls in der längsten Tau-Isoform enthalten (alternativ gespleißte Elemente), wodurch sich diese (2N4R) von den anderen Isoformen unterscheidet. Die Mutation P301L befindet sich innerhalb der 2. *Repeat*-Domäne und führt zu frontotemporaler Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17).

Die humanen SH-SY5Y Zellen wurden entweder mit dem Wildtyp (hTau40) oder mutiertem Tau (TauP301L) cDNA-Konstrukt mithilfe von LipofectAMINE 2000 transfiziert und anschließend mit 125 µg/ml G418 für 30 Tage selektiert. Die Transfektion und Expressionsspiegel wurden anhand von Western Blot überprüft (Ferrari et al., 2003). Diese Zellen konnten durch Inkubation mit all-*trans* Retinsäure und BDNF ausdifferenziert und die neuronalen Eigenschaften durch die Anwesenheit von neuronalen Markern und die Abwesenheit von Glia-Markern bestätigt werden (Ferrari et al., 2003). In undifferenzierten sowie ausdifferenzierten Zellen ergab die Analyse mittels Western Blot eine vergleichbare Expression der 4R Tau-Isoformen in den Wildtyp- (hTau40) und den P301L-Zellen. Außerdem waren die Spiegel der 4R Tau-Isoformen mehr als 10-fach gegenüber den endogenen 3R Tau-Isoformen der Mock (vct) transfizierten Zellen erhöht. Weitere Analysen mit Hilfe von *Real-time* PCR haben in den P301L-Zellen zudem eine ~60-fach erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu den vct-Zellen aufgezeigt (Ferrari et al., 2003).

Für sämtliche Untersuchungen dieser Dissertation lagen drei Varianten der Zellen vor, die alle eine G418-Resistenz zur Selektion aufwiesen:

- Vct-Zellen - diese waren mit dem Leervektor (pRc/RSV) transfiziert, um mögliche Effekte durch die Transfektion auszuschließen
- hTau40-Zellen - diese Zellen überexprimieren die längste Tau-Isoform (Abb.: 2-1 Seite 50)
- TauP301L-Zellen - diese Zellen überexprimieren ebenfalls die längste Tau-Isoform, die allerdings die Mutation P301L (anstelle von Prolin enthält das Protein an dieser Stelle ein Leucin) in der Mikrotubuli-Bindungsdomäne trägt

Die verstärkte Expression von Tau in den hTau40- und TauP301L-Zellen wurde während der für diese Dissertation durchgeführten Experimente durch immunocytochemische Färbungen nachgewiesen (zur Verfügung gestellt von A. Eckert) (Abb.: 2-2).

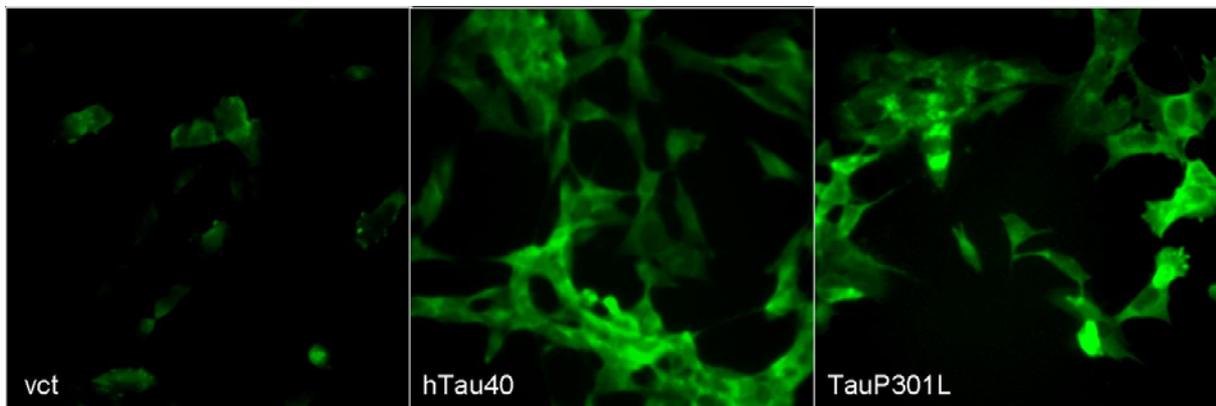


Abb.: 2- 2 Tau-Färbung mit dem HT7-Antikörper

Die fixierten Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C mit dem 1. Antikörper HT7 (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Mouse Anti-Human Tau Monoclonal Antibody, Clone HT7, Katalog-Nr.: MN1000B) in einer Verdünnung von 1:500 (in PBS mit 2% HS und 2% BSA) inkubiert. Der 2. Antikörper anti-Maus IgG₁ FITC (Sigma, Katalog-Nr.: F5262) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS mit 2% HS und 2% BSA) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Bilder zeigen eindeutig eine verstärkte Expression von Tau in den hTau40- und TauP301L-Zellen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in folgendem Medium:

<u>Dulbeccos Mem F12</u>	500 ml
zusätzlich:	
○ FCS	50 ml
○ HS	25 ml
○ Penicillin	50 µg/ml
○ Streptomycin	50 µg/ml
○ G418 (Geneticinsulfat)	125 µg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten wurden alle unter sterilen Bedingungen an einer Autoflow durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten Puffer und Lösungen mit aufgereinigtem (Millipore MilliQ-Plus) oder doppelt destilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert. Des Weiteren wurden sterile Einmalpipetten und für kleinere Volumina autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Die Inkubation und Kultivierung der Zellen erfolgte unter konventionellen Bedingungen (37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂) in einem Brutschrank. Die Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C in einem Wasserbad erwärmt. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert, um die Zellen zu vereinzeln und toxische Stoffwechselprodukte sowie verbrauchtes Medium zu entfernen.

2.2.1.1 Auftauen

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad (37°C) erwärmt und sofort nach dem Antauen in 10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen, damit das im Einfriermedium enthaltene DMSO die Zellen nicht schädigen konnte. Danach

wurden sie zweimal mit Medium gewaschen (1000 rpm, 5 min), um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das erhaltene Zell-Pellet in 1ml Medium resuspendiert und für die Kultivierung in Kulturschalen in 12ml Medium ausgesät.

2.2.1.2 Passagieren

Das Passagieren der adhärennten SH-SY5Y Zellen erfolgte bei einer konfluenten Zelldichte von ~90%. Hierfür wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen, um Serumreste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (1ml Trypsin für 1-2 Minuten bei RT) – hierdurch wird die extrazelluläre Matrix gelockert und die Zellen lösen sich vom Untergrund ab – und die Reaktion anschließend durch Zugabe an einem Überschuss frischen Mediums gestoppt. Im Anschluss konnten die Zellen leicht von der Kulturschale abgelöst und die Zellsuspension in 1:4 bis 1:6-facher Verdünnung auf neue Kulturschalen mit einem Endvolumen von 12 ml verteilt werden. Die transfizierten Zell-Linien wurden höchstens 10-12mal passagiert, um den Erhalt der Transgene zu gewährleisten.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie beim Passagieren von den Kulturschalen abgelöst und anschließend bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension zu 90 µl Trypanblau (0,4% in PBS) gegeben. Dann wurden 10 µl dieser Lösung in einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der Zelltiter wird wie folgt berechnet:

arithmetisches Mittel aus 4 Zählquadraten x Verdünnungsfaktor (1:10) = Zellen/ml

2.2.1.4 Einfrieren

Die Zellen einer fast konfluent bewachsenen Kulturschale (~ 80%) mit niedriger Passage wurden abgelöst und in einem sterilen Falcon bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium (50% FCS, 40% DMEM F12, 10% DMSO) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox über Nacht bei -80°C aufbewahrt und für die Langzeitlagerung am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2 Inkubationsprotokolle

Zusätzlich zur basalen Charakterisierung wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit die SH-SY5Y Zellen mit diversen Stressoren behandelt, um deren Auswirkungen auf die zellulären Funktionen und eventuelle Kompensationsmöglichkeiten zu untersuchen.

2.2.2.1 Inhibitoren der Atmungskette

Um einen genauen Einblick über die relative Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkette zu erhalten wurden die einzelnen Komplexe inhibiert und die Atmungskette von der Phosphorylierung entkoppelt. Die verwendeten Substanzen, sowie deren Zielstruktur und die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Die Substanzen wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst und entsprechend verdünnt, sodass je nach durchgeführtem Assay ein Zugabevolumen von 5 oder 10 µl möglich war. Die Behandlungen wurden in 2%-igem-Kulturmedium durchgeführt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Messungen vorgenommen (Komplexinhibitoren nach 1 und 24 Stunden, FCCP nach 1, 3, 6 und 24 Stunden).

Name	Zielstruktur	Konzentrationen
Rotenon	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	1 und 10 μM
TTFA	Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase	5 und 50 μM
Antimycin	Cytochrom C Reduktase	1 und 10 μM
Natriumazid	Cytochrom C Oxidase	1 und 10 mM
Oligomycin	F ₀ -Untereinheit der ATP-Synthase	1 und 10 μM
FCCP	Mitochondriale Membran	0,1; 1; 2,5; 5 und 10 μM

Tab.: 2-1 Zielstrukturen und verwendete Konzentrationen der Inhibitoren

2.2.2.2 Oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Um oxidativen Stress auszulösen wurden die Zellen mit 100, 250 und 500 μM H_2O_2 inkubiert. Dabei wurde das H_2O_2 jeweils frisch aus einer 33%-igen Stammlösung angesetzt und in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt, sodass das Zugabevolumen 5 oder 10 μl entsprach. Die Inkubationszeit wurde den entsprechenden Assays angepasst, sodass die ROS-Bildung nach 30 bzw. 45 Minuten gemessen wurde und die anderen Parameter nach 3, 6 bzw. 24 Stunden.

2.2.2.3 Nitrosativer Stress in Form von Natriumnitroprussid (SNP)

Ebenso wurden die Effekte von nitrosativem Stress auf die SH-SY5Y Zellen untersucht, indem diese mit 500 μM SNP inkubiert wurden. Dabei wurde das SNP jeweils frisch in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst, sodass das Zugabevolumen 5 oder 10 μl entsprach. Die Inkubationszeit wurde den entsprechenden Assays angepasst, sodass die RNS-Bildung nach 30 Minuten gemessen wurde und die anderen Parameter nach 3, 6 bzw. 24 Stunden.

2.2.2.4 Amyloid-beta Peptide

Die Inkubation mit Amyloid-Peptiden erfolgte für 3 oder 24 Stunden. Sowohl oligomeres als auch fibrilläres Abeta wurden in Konzentrationen von 10, 50, 100, 500 und 1000 nM eingesetzt. Alle Amyloid-Peptide wurden als lyophilisiertes Pulver bezogen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Herstellung der verschiedenen Aggregationsformen wurde nach Stine *et al.* durchgeführt (Stine, Jr. et al., 2003). Zunächst equilibrierten sich die lyophilisierten Peptide (0,5 mg) an die Raumtemperatur bevor sie in 110,8 µl HFIP (Hexafluoroisopropanol) gelöst wurden, um eine 1 mM Lösung herzustellen. Die klare Lösung der gelösten Peptide wurde à 10 µl aliquotiert und in einer SpeedVac unter Vakuum das HFIP evaporiert sowie die Peptide getrocknet und bei -20°C gelagert.

Oligomerisierung

Um oligomeres A β ₁₋₄₂ herzustellen wurde die entsprechende Anzahl von Aliquots 24 Stunden vor Beginn der geplanten Inkubation aufgetaut. Der Peptidfilm wurde in 2 µl wasserfreiem DMSO (5 mM) resuspendiert. Um eine vollständige Resuspendierung zu ermöglichen wurden die Peptide noch für 10 min auf Eis im Ultraschallbad sonifiziert. Die erhaltene Stammlösung von 5 mM A β ₁₋₄₂ in DMSO wurde dann mit eiskaltem DMEM F12 ohne Phenolrot auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und sofort für 30 sec gevortext. Dieser Ansatz wurde dann für 24 Stunden bei 4°C inkubiert (Lambert et al., 1998).

Fibrillen-Aggregation

Für die Ausbildung von fibrillären Strukturen wurden die aliquotierten Peptide ebenfalls mit 2 µl DMSO resuspendiert und im Ultraschallbad genauso wie die Oligomere sonifiziert. Anschließend wurde die 5 mM Stammlösung mit 10 mM HCl (0,1 N) auf eine 100 µM Lösung verdünnt und direkt für 30 sec gevortext. Um eine vollständige Aggregation der Peptide zu erreichen wurden die Proben für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Zell-Viabilität Assays

Die Viabilität von Zellen kann auf unterschiedliche Weise bestimmt werden. Da die Zelle für sämtliche Zellfunktionen ATP als Energieträger benötigt, spiegeln die ATP-Spiegel die Vitalität der Zellen wieder (Abschnitt 2.2.3.1). Mit Hilfe des MTT-Assays kann zusätzlich eine Aussage über die Redoxaktivität der Zellen getätigt werden. Dieser Assay spiegelt die NADH-Spiegel der Zelle wieder, welche für die Reduktion des MTT-Reagenz nötig sind, die wiederum einen Einblick über die metabolische Aktivität ermöglichen (Abschnitt 2.2.3.2). Um zusätzlich einen Eindruck über die Toxizität der verwendeten Stimuli zu erhalten, wurde der ToxiLight-Assay durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.3).

2.2.3.1 Bestimmung der ATP-Spiegel

Die ATP-Spiegel wurden mit Hilfe des ViaLight HT® Kits der Firma Cambrex bestimmt. Die Menge an ATP kann als Maßstab für die funktionale Integrität von lebenden Zellen angesehen werden, da Zellen zum Überleben und allen wichtigen Stoffwechselfunktionen ATP benötigen. Zudem führt eine Schädigung der zellulären Funktion rasch zu einem Abfall der ATP-Spiegel. Die Intensität des emittierten Lichtes ist hierbei proportional zur ATP-Konzentration (Crouch et al., 1993). Zudem kann mit Hilfe eines ATP-Standards die ATP-Konzentration bestimmt werden. Der Biolumineszenzassay stellt ein sehr sensitives Verfahren zur Bestimmung der ATP-Spiegel dar und ist selektiv für ATP. Das Testprinzip des Kits beruht auf folgender Reaktion (Abb.: 2-3):



Abb.: 2- 3 Biolumineszenzreaktion des ATP-Assays

Für die Bestimmung der ATP-Spiegel wurden die SY5Y-Zellen zunächst gezählt (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und in einer Dichte von 25.000 Zellen in 100 µl 2%-igem Medium pro Well in einer weißen 96-Well Platte am Vortag ausgesät. Über Nacht konnten die Zellen im Brutschrank anwachsen und am Versuchstag wurden diese mit den entsprechenden Stressoren inkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurde der in Medium verdünnte ATP-Standard (0,01; 0,25; 0,5; 1; 2,5 und 5 µM) auf die Platte pipettiert. Anschließend wurde der ATP-Assay laut den Angaben des Herstellers (Protokoll 1 für adhärente Zellen in einer 96-Well Platte) durchgeführt. Die Messung erfolgte am Victor® Multilabel Counter anhand der Biolumineszenzeinstellung. Mit Hilfe einer Standardgerade der verschiedenen ATP-Konzentrationen wurden die Lumineszenzwerte in ATP-Konzentrationen umgerechnet (siehe Abb.: 2-4).

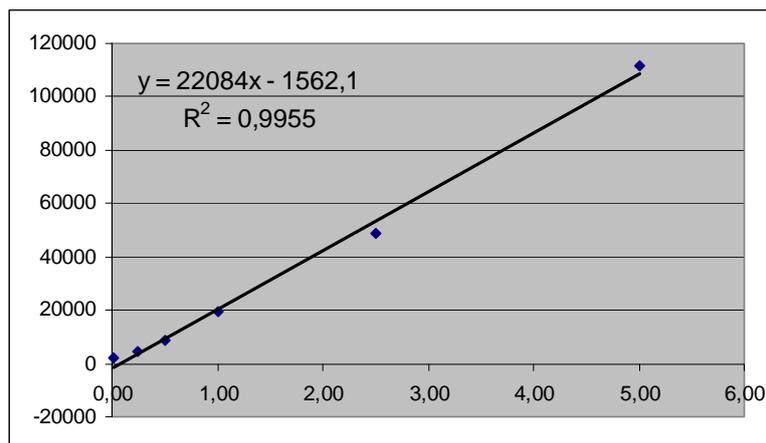


Abb.: 2- 4 Beispiel einer typischen ATP-Standardgeraden

2.2.3.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der reduktiven Spaltung des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten, wasserunlöslichem Formazansalz (siehe Abb.: 2-5 Seite 59). Der genaue Mechanismus der Reduktion ist bis heute nicht in allen Details aufgeklärt. Früher ging man davon aus, dass ausschließlich Enzyme, die am Elektronentransfer in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind (Succinat-

Dehydrogenasen), für die Formazanbildung verantwortlich sind. Inzwischen konnte jedoch eine Reihe von NADH- bzw. NADPH-abhängigen Redoxenzymen identifiziert werden, die an der MTT Reduktion beteiligt sind, sodass die Reduktion hauptsächlich auf die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und nur teilweise auf Succinat zurückzuführen ist (Berridge et al., 1993; Berridge et al., 2005). Somit stellt die Formazanbildung die metabolische Aktivität der Zellen dar und liefert einen Anhaltspunkt auf die Integrität des zellulären Energiehaushaltes. Im Zuge des Assays werden die Salzkristalle solubilisiert und die Absorption der Lösung quantifiziert. Hohe Absorptionswerte weisen demzufolge auf intakte Zellen hin.

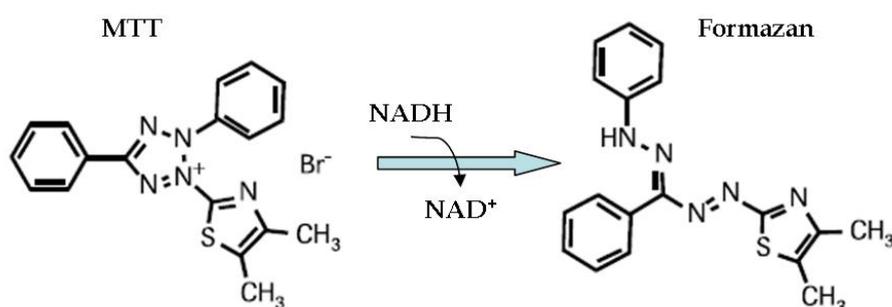


Abb.: 2- 5 Metabolisierung von MTT zum Formazansalz

Für den MTT-Assay wurden die SY5Y-Zellen am Vortag gezählt (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und mit einer Dichte von 50.000 Zellen in 100 µl 2%-igem Medium pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät. Am Versuchstag wurde mit den diversen Stressoren über die entsprechende Zeit inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde für 3 Stunden 20 µl MTT-Reagenz pro Well hinzugegeben, um die Bildung der Formazankristalle zu initiieren. Um die Salze zu lösen erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit die Zugabe von 100 µl Solubilisierungslösung. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank aufbewahrt und am nächsten Tag konnte die Absorption der Lösung photometrisch bei 620nm quantifiziert werden.

2.2.3.3 ToxiLight-Assay

Der ToxiLight-Assay beruht auf der quantitativen Bestimmung der Freisetzung der Adenylat Kinase (AK), die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Bei einer Störung der Zell-Integrität, beispielsweise nach Schädigungen durch toxische Substanzen, kann die intrazellulär lokalisierte AK aus den Zellen austreten und in das umgebende Medium gelangen. Im Zuge des Assays wird die Menge an freigesetzter AK anhand von Biolumineszenz über den folgenden Reaktionsmechanismus gemessen, wobei die emittierte Lichtintensität linear zur AK-Konzentration ist (Abb.: 2-6):

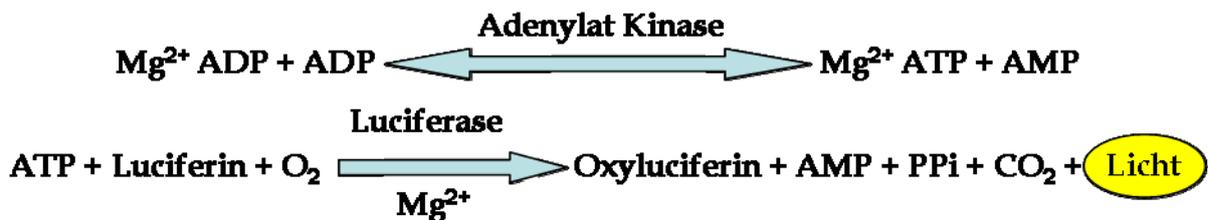


Abb.: 2- 6 Zytotoxizitätsassay

Die Reaktion startet durch die Zugabe von ADP als Substrat für die Adenylat-Kinase, die aus geschädigten Zellen ins Medium freigesetzt wird. In Anwesenheit des Enzyms entsteht ATP, das wiederum für die Biolumineszenzreaktion benötigt wird.

Für den ToxiLight-Assay wurden die Zellen am Vortag in kleinen Kulturschalen in 2%-igem Medium ausgesät und am Versuchstag mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden je 20 µl des konditionierten Mediums in eine weiße 96-Well Platte überführt und mit 100 µl AKDR (*Adenylat Kinase Detection Reagenz*) versetzt. Nach einer Standzeit von 5 Minuten erfolgte die Quantifizierung der Lumineszenz. Zur Normierung wurden die ermittelten Werte auf den Proteingehalt (siehe Abschnitt 2.2.11) des Zellhomogenats der Probe bezogen.

2.2.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Für die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurden am Tag vor der Messung die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und die Zellen in 2%-igem Medium mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well in 48-Well Platten ausgesät. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamine 123 (R123) (Baracca et al., 2003). Dies ist ein kationischer Farbstoff, der sich in Abhängigkeit vom Membranpotential selektiv in die mitochondriale Matrix einlagert (Abb.: 2-7). Je höher die Fluoreszenzintensität ist, desto stärker negativ ist das mitochondriale Membranpotential.

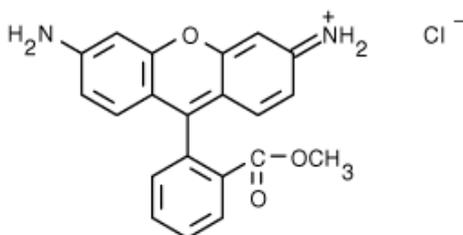


Abb.: 2-7 Strukturformel von Rhodamin 123

Die Zellen wurden am Versuchstag mit den jeweiligen Stimuli (siehe Abschnitt 2.2.2) für die entsprechende Zeit stimuliert und nach Ablauf der Inkubationszeit für 15 Minuten mit 0,4 μ M R123 bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde in jedes Well 250 μ l PBS pipettiert, um die Farbstoffkonzentration vor dem Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 1500 rpm) zu verdünnen. Nach der Zentrifugation wurde das Medium vorsichtig komplett abgesaugt und anschließend 250 μ l PBS pro Well hinzugefügt. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen wurde wieder abgesaugt und 250 μ l PBS hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Victor[®] Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

2.2.5 Bestimmung der Lactat-Spiegel

Für den Lactat-Assay wurden die Zellen am Vortag in kleinen Kulturschalen in 2%-igem Medium ausgesät und am Versuchstag mit den entsprechenden Stressoren inkubiert. Nach Ablauf der 24-stündigen Behandlungszeit wurde der Lactat-Assay laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Allerdings wurde das Probenvolumen sowie das Volumen des *Working Reagent* um die Hälfte reduziert, da dies ausreichende Absorptionswerte lieferte und so die doppelte Assay-Anzahl pro Kit durchgeführt werden konnte. Die optische Dichte wurde zum Zeitpunkt Null und nach 20 Minuten (Inkubation bei RT auf dem Schüttler) bei 565 nm bestimmt. Mit Hilfe der Standardgeraden wurde die Lactat-Konzentration [mM] der Proben bestimmt und zur Normierung auf den Proteingehalt (siehe Abschnitt 2.2.11) des Zellhomogenats der Probe bezogen.

2.2.6 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Für die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies wurden am Tag vor der Messung die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und die Zellen in 2%-igem Medium mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well in 48-Well Platten ausgesät.

2.2.6.1 Bestimmung der intrazellulären NO-Spiegel

Die intrazellulären NO-Spiegel wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA bestimmt (Kojima et al., 2001). Da DAF-2DA ein unpolares Molekül ist, kann es ungehindert die Zellmembran passieren. Esterasen spalten im Zytoplasma den Acetatrest ab, wodurch die nichtfluoreszierende Muttersubstanz DAF-2 intrazellulär freigesetzt wird (Abb.: 2-8 Seite 63). Durch die Reaktion mit NO und Sauerstoff entsteht dann das fluoreszierende DAF-2-Triazol (DAF-2T). DAF-2 reagiert nicht mit stabilen oxidierten Formen von NO wie z.B. Nitrat, Nitrit oder mit reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Superoxidationradikal, Wasserstoffperoxid oder

Peroxyinitrit. Somit ist es sensitiv für NO und kann sehr niedrige NO-Spiegel im Bereich von 2-5 nM detektieren.

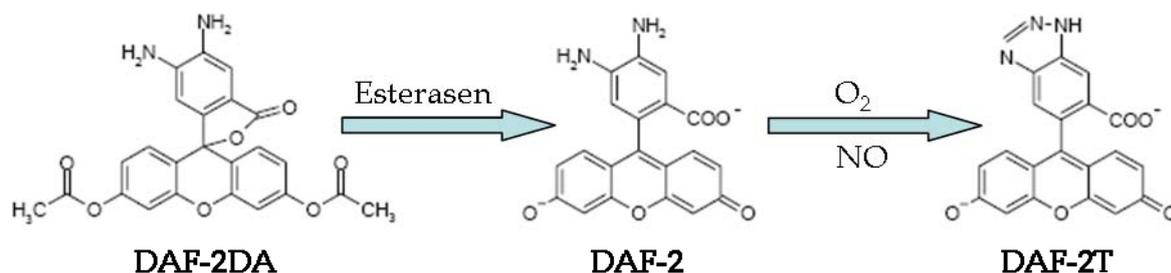


Abb.: 2- 8 Strukturformel von DAF-2DA und Reaktionsmechanismus

Die Zellen wurden am Versuchstag für 30 Minuten mit 10 μM DAF-2DA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde in jedes Well 250 μl PBS pipettiert, um die Farbstoffkonzentration vor dem Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 1500 rpm) zu verdünnen. Nach der Zentrifugation wurde das Medium vorsichtig komplett abgesaugt und anschließend 250 μl PBS pro Well hinzugefügt. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen wurde wieder abgesaugt und 250 μl PBS hinzugefügt. Die Messung erfolgte am Victor[®] Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

2.2.6.2 Messung von Superoxidanion-Radikalspiegeln

Die Detektion von Superoxidanionen erfolgte durch die Oxidation des Farbstoffes Dihydroethidium (DHE) (Rothe et al., 1990). Infolge der Oxidation interkaliert DHE mit doppelsträngiger DNA innerhalb der Zelle. Aufgrund der räumlichen Nähe kommt es zur Interaktion der π -Elektronen des Farbstoffes mit dem π -Elektronensystem der DNA-Basen, wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften von DHE ändern (Carter et al., 1994).

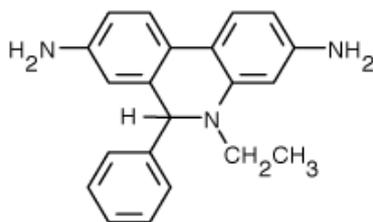


Abb.: 2- 9 Strukturformel von DHE

Die Zellen wurden am Versuchstag für 30 Minuten mit 5 μ M DHE bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Waschschr itte am Ende der Farbstoffinkubation erfolgten wie unter Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben. Die Messung erfolgte am Victor® Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm.

2.2.6.3 Messung von Hydroxyl-Radikalspiegeln

Der nicht-fluoreszierende Farbstoff Dihydrorhodamin 123 (DHR) ist die reduzierte Form von R123. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft kann er durch biologische Membranen diffundieren und innerhalb der Zelle durch verschiedene ROS zu dem positiv geladenem Farbstoff R123 oxidiert werden (Abb.: 2-10 Seite 65), welcher sich abhängig vom Membranpotential in die Mitochondrien einlagert. Obwohl verschiedene ROS für die Oxidation von DHR verantwortlich sein können (Hempel et al., 1999), scheint DHR am sensitivsten für Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalspiegel zu sein (Walrand et al., 2003). Daher kann dieser Farbstoff als Marker für die mitochondriale ROS-Produktion angesehen werden. Da das Fluoreszenzsignal von zwei verschiedenen Parametern abhängt (1. Oxidation des Farbstoffes und 2. Inkooperation in die mitochondriale Membran), wurden gleichzeitig zur Kontrolle Proben mit dem Farbstoff R123 gefärbt, um mögliche mitochondrialen Defekte ausschließen zu können.

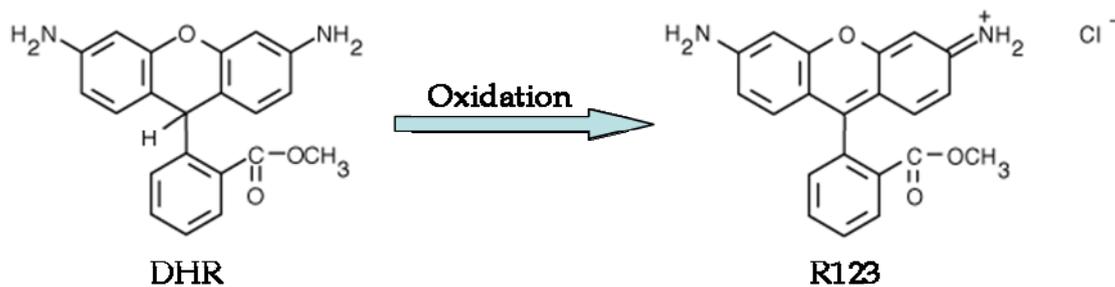


Abb.: 2- 10 Strukturformel von DHR und Reaktionsmechanismus

Die Zellen wurden am Versuchstag für 15 Minuten mit 10 μM DHR bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Waschschrirte am Ende der Farbstoffinkubation erfolgten wie unter Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben. Die Messung erfolgte am Victor® Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

2.2.7 Morphologische Studien

Da die drei verschiedenen Zelltypen im Lichtmikroskop einen unterschiedlichen Phänotyp aufwiesen, wurde zum Einen die Höhe und die Masse der Zellen näher bestimmt und zum Anderen eine Färbung der Mitochondrien und des Zellkerns vorgenommen, um eine morphologische Charakterisierung der SH-SY5Y Zellen vorzunehmen.

2.2.7.1 Bestimmung der Zellhöhe

Die Höhe der Zellen wurde am CLSM vorgenommen. Dafür wurde die Färbung der Mitochondrien für die Bewegungsmessung ausgenutzt (siehe Abschnitt 2.2.8.1 und 2), weil nach jeder Messung ein dreidimensionales Bild der gefilmten Zelle aufgenommen wurde. Hierfür wurde über die Z-Achse die Höhe der Zelle definiert, was aufgrund der mitochondrialen Verteilung in der Zelle möglich war. Anschließend wurde die Zelle in gewissen Abständen der Z-Achse entlang gescannt,

wodurch eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen möglich gewesen wäre. Allerdings gab es Probleme mit der entsprechenden Software, weshalb diese Messung umfunktioniert und die gewählte Dimension der Z-Achse zur Bestimmung der Zellhöhe verwendet wurde.

2.2.7.2 Bestimmung der Masse

Zur Bestimmung der Zellmasse wurde zunächst wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde das Zellpellet gewogen, um so das Feuchtgewicht zu bestimmen. Dieses wurde dann auf die Zellzahl bezogen, wodurch man die Zellmasse pro 1 Million Zellen erhält.

2.2.7.3 Morphologie der Mitochondrien an fixierten Zellen

Für die morphologische Charakterisierung der SH-SY5Y Zellen wurden diese wie unter Abschnitt 2.2.8 beschrieben auf beschichteten Deckgläschen ausgesät. Am Tag nach dem Aussäen mit 25 nM MitoTracker CMXRos über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Abb.: 2-11 Seite 67), um den Hintergrund zu reduzieren. Daraufhin wurden das Medium abgesaugt und die Zellen durch eine gezielte, aber vorsichtige Zugabe einer 4%-igen PFA-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin folgten 3 Waschschrte mit PBS, gefolgt von einer Permeabilisierung für 20 Minuten durch eine 0,2%-ige Triton-X-Lösung. Nach erneutem dreimaligem waschen der Proben wurde diese für 10 Minuten mit Höchst 33258 inkubiert, um den Zellkern anzufärben. Hierauf folgten wiederum Waschschrte, wobei einer davon über Nacht andauerte, um den Hintergrund der starken Höchst 33258- Färbung zu reduzieren. Zum Schluss wurden die Proben mit Moviol (+ Dabco) eingedeckelt. Die Messung erfolgte am CLSM bei einer Exzitationswellenlänge von 579 nm und einer Emissionswellenlänge von 599 nm.

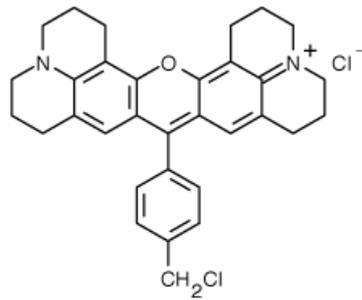


Abb.: 2- 11 Strukturformel von MitoTracker CMXRos

2.2.8 Live cell imaging (CLSM)

Für das *live cell imaging* am CLSM wurden die Zellen am Tag vor der Färbung/Transfektion ausgesät. Zunächst wurden sterilisierte Deckgläschen in 6-Well Platten gelegt und für 20 Minuten mit 1 ml FCS beschichtet. Daraufhin wurde das FCS abgesaugt und die Deckgläschen unter der Bench luftgetrocknet. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von ~150.000 Zellen pro Well in 2%-igem Kulturmedium ausgesät.

2.2.8.1 Färbung der Mitochondrien

Für die Bestimmung der mitochondrialen Beweglichkeit wurden die Zellen am Tag nach dem Aussäen mit 25 nM MitoTracker Deep Red inkubiert (Abb.: 2-12 Seite 68). Um den Hintergrund zu reduzieren, wurde die Färbung über Nacht bei 37°C im Brutschrank vorgenommen. Am Versuchstag wurde 5 mM HEPES zu den Zellen hinzugegeben, damit der unterschiedliche pH-Wert aufgrund der fehlenden CO₂-Begasung während der Messung besser kompensiert werden konnte. Die Messung erfolgte am CLSM bei einer Exzitationswellenlänge von 644 nm und einer Emissionswellenlänge von 665 nm.

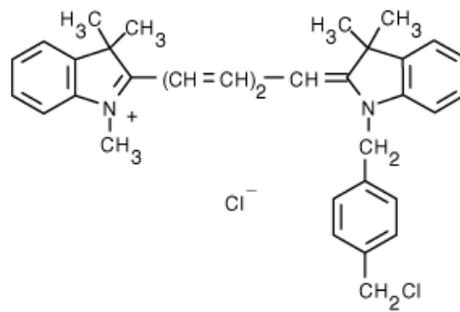


Abb.: 2- 12 Strukturformel von MitoTracker Deep Red

2.2.8.2 Bestimmung der mitochondrialen Beweglichkeit

Für die mitochondriale Beweglichkeit wurden einzelne Zellen am CLSM ausgewählt und bei gleichem Zoom (64x Ölimmersionsobjektiv) über einen Zeitraum von 2 Minuten alle 1,5 Sekunden ein Bild aufgenommen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ anhand der Grauskalierung. Hierfür wurde die maximale Intensität (Grauwerte) aller Bilder bestimmt (Max-Bild) und auf die Intensität des ersten Bildes bezogen. Eine ausgeprägtere mitochondriale Dynamik resultierte in einer erhöhten Ratio.

2.2.8.3 Vervielfältigung und Transfektion von pA-GFP

Seit einigen Jahren ermöglicht eine neue Technik die Untersuchung der Dynamik von Proteinen in Zellen in Echtzeit. Dies wird möglich, indem Zellen mit einem Plasmid transfiziert werden, das eine photoaktivierbare Variante des GFPs (grün fluoreszierendes Protein) gekoppelt an das entsprechende Protein enthält (Patterson et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit war dies ein mitochondriales Matrix-Protein (Karbowski et al., 2004) und das Plasmid eine freundliche Gabe von der Arbeitsgruppe Jendrach.

Zunächst erfolgte eine Vervielfältigung des Plasmids mittels Midi-Prep. Hierfür wurden zuerst 3 ml LB-Medium mit 10 µl bereits transformierte Bakterien (One-Shot® TOP10 *Competent Cells*) eines Glycering-Stocks angeimpft und für einige

Stunden bei 37°C unter schütteln (300 rpm) inkubiert, um ein besseres Anwachsen der Bakterien zu ermöglichen. Anschließend wurden diese 3 ml LB-Medium zu 147 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Selektion erfolgte über eine Kanamycin-Resistenz, sodass das Selektionsmedium 10 mg/ml Kanamycin enthielt. Aus dem angeimpften Medium wurde am nächsten Tag ein eigener Glycerin-Stock (800 µl der Bakterien-Kultur + 400 µl Glycerin) angelegt und bei -80°C weggefroren. Die Midi-Präp wurde dann laut Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt und die Konzentration der Ausbeute an einem NanoDrop™ ND-1000 Photospektrometer bestimmt.

Die Transfektion von pA-GFP erfolgte mit Hilfe des FuGENE HD Transfektionsreagenz. Das pA-GFP Plasmid enthält mitochondriales Matrixprotein, das an ein photoaktivierbares GFP gekoppelt ist (Patterson et al., 2002). Nach Aktivierung durch einen Laser bei 405 nm fluoresziert es im grünen Bereich. Die Zellen wurden am Tag zuvor in geringer Dichte auf FCS beschichteten Deckgläschen in 6-well Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 2 µg des Plasmids pro Ansatz verwendet und dieses zunächst für 10 Minuten bei 37°C mit 30 µl Optimum Medium inkubiert. Anschließend wurde pro Ansatz 4 µl FuGENE (8 µl bei den hTau40 Zellen) hinzugegeben und für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieses Gemisch wurde dann auf die Zellen gegeben und nach 24-48 Stunden die Messung am CLSM vorgenommen.

2.2.8.4 Messung von *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien über FRAP

Um *Fusion* und *Fission* von Mitochondrien zu untersuchen, wurde eine Methode von der Gruppe um R. Joule modifiziert (Karbowski et al., 2004). Bei einer transfizierten Zelle wurde ein Aktivierungsbereich im mitochondrialen Netzwerk ausgewählt (ROI = *region of interest*) und mit Hilfe eines 405 nm Lasers in diesem Bereich das photoaktivierbare pA-GFP aktiviert. Vor und direkt nach der Aktivierung wurden jeweils 4 Bilder aufgenommen, die später bei der Auswertung als Maß für die Aktivierung dienen. Anschließend wurde über einen Zeitraum von einer Stunde alle

5-10 Minuten ein Bild gemacht und die Ausbreitung der Fluoreszenz in der Zelle detektiert. Eine Abnahme der Fluoreszenz wird als Verhältnis der *Fusion* und *Fission* Rate angesehen, da eine Abnahme die Diffusion des GFP-gekoppelten mitochondrialen Matrix-Proteins zu einem benachbarten Mitochondrium – vermutlich durch *Fusion* – widerspiegelt.

Die Auswertung erfolgte anhand der erhaltenen Grauwerte in Excel. Die Hintergrundfluoreszenz von pA-GFP wurde als 0% und die Fluoreszenzintensität direkt nach der Aktivierung als 100% gesetzt.

2.2.9 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden drei konfluent gewachsenen Platten pro Zelltyp geerntet und bei 1200 rpm für 7 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet einmal mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen chemisch fixiert, indem das Zellpellet in 10 ml frisch angesetzter Fixierungslösung resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Daraufhin folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1200 rpm und das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden das Pellet in 1,5 ml PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Nach der Aldehyd-Fixierung wurden die Proben in 1% Osmiumsäure in 0,1 M Dimethylarsinsäure (pH 7,2) zusätzlich fixiert, in Wasser gewaschen und über Nacht mit 1%-igem Uranylacetat inkubiert. Daraufhin wurden die Proben zunächst mit 0,05 M Acetat-Puffer gewaschen, anschließend in Wasser und danach durch eine ansteigende Konzentrationsreihe von Ethanol dehydriert. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit dem Agar LV Premix Kit eingebettet und für 16 Stunden bei 65°C polymerisiert. Danach konnte mit einem Ultramikrotom dünne Schnitte der Proben angefertigt werden, die daraufhin mit Uranylacetat und Pleicitrat gefärbt und anschließend an einem Elektronenmikroskop (EM208S (FEI company)) vermessen wurden, das mit einer 1k x 1k *slow scan* CCD camera (TVIPS, Munich, Germany) ausgerüstet ist.

2.2.10 PCR

Die Methode der PCR wurde für verschiedene Fragestellungen angewendet. Zum Einen wurde die Genexpression der verschiedenen *Fusion* und *Fission* Parameter mit RT-PCR überprüft. Anhand der genomischen DNA wurde zum Anderen die oxidativen mtDNA-Schäden der SH-SY5Y Zellen bestimmt, sowie mit Hilfe von *Real-time* PCR die Anzahl der mtDNA-Kopien und dadurch die mitochondriale Masse.

2.2.10.1 Aufreinigung und Isolierung genomischer DNA

Die Aufreinigung und Isolierung von genomischer DNA wurde mithilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen durchgeführt. Zunächst wurde die Zellzahl bestimmt wie es in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben ist und anschließend 1×10^6 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt, bis die genomische DNA laut Vorgabe des Herstellers isoliert wurde (Protokoll: *Purification of Total DNA from Animal Tissues*). Die genomische DNA wurde zum Einen für die quantitative *Real-Time* PCR zur Bestimmung der Anzahl der mtDNA-Kopien und zum Anderen für die Bestimmung der oxidativen mtDNA-Schäden mittels semiquantitativer PCR verwendet.

2.2.10.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kits*. Das *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA* Reagenz ist ein ultrasensitiver fluoreszierender Nukleinsäure-Marker, der quantitativ an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die Sensitivität ermöglicht die Bestimmung von 250 pg/ml dsDNA mit einem Plattenreader, was bei 200 µl Probenvolumen 50 pg dsDNA entspricht.

Die Präparation der Standards (0-1000 ng/ml) und die Durchführung des *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kits* wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden in drei Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:100) gemessen, um die Linearität des Assays zu überprüfen. Die Mikrotiterplatten wurden am Victor® Multilabel Counter bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen.

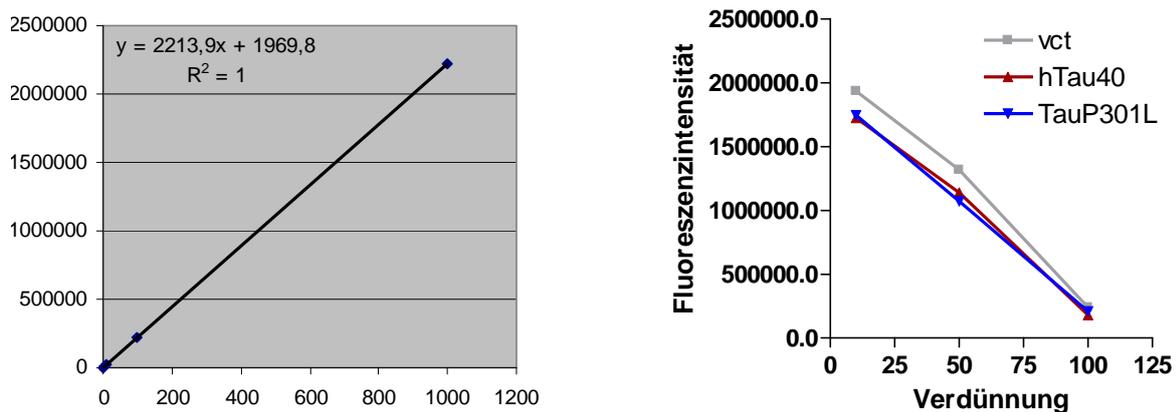


Abb.: 2- 13 Standardgerade und Verdünnungsreihe der genomischen DNA der SH-SY5Y Zellen

2.2.10.3 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des TRIzol™ Reagenz, einem einphasischen Gemisch aus Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol. Das Prinzip beruht auf einer Weiterentwicklung der *single step* Methode (Chomczynski et al., 1987). Das GTC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und inaktiviert, sogar RNasen, die durch den Zellaufschluss in großen Mengen freigesetzt werden. Durch die Zugabe von Phenol/Chloroform entfernt man die Proteine und zusätzlich wird der pH-Wert gesenkt, so dass sich sogar kleinere DNA-Fragmente im sauren Phenol lösen, die größeren sammeln sich nach Zentrifugation in der Interphase. Im wässrigen Überstand verbleibt die RNA, die man bloß noch mit Ethanol zu fällen braucht.

Das Pellet einer fast konfluent gewachsenen Platte wurde in 1 ml TRIzol™ Reagenz gelöst und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform in jedes Gefäß hinzugegeben, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend 2-3 Minuten stehen gelassen. Um die Phasentrennung hervorzurufen wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und 500 µl Isopropanol zur Präzipitation der RNA hinzugegeben. Nach 10-15 Minuten Einwirkzeit wurde die Probe für 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen, indem es erst vorsichtig gemischt, dann gevortext und anschließend für 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Das aufgereinigte Pellet wurde nun für 5-10 Minuten luftgetrocknet und im Anschluss in 150 µl autoklaviertem DEPC-Wasser gelöst. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität von Enzymen, speziell den RNasen, zerstört wird. Vor der Lagerung bei -20°C wurde noch die Konzentration an einem NanoDrop™ ND-1000 Photospektrometer bestimmt.

2.2.10.4 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen in cDNA umgeschrieben. Das Protokoll des Herstellers wurde in einigen Schritten leicht abgeändert, um die Ausbeute zu erhöhen. Diese Reaktion wird durch eine Reverse Transkriptase (RT) katalysiert. In diesem Fall wird die SuperScript™ II Reverse Transcriptase verwendet, die eine abgewandelte Form der RT aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) und damit eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit reduzierter RNase H Aktivität und verstärkter thermischer Beständigkeit ist.

Vor der cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz für jede individuelle Probe angesetzt und für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA

zu zerstören – anschließend wurden die Proben für mindestens 1 Minute auf Eis inkubiert:

- 2 µg RNA
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl Oligo(dT12-18) (0,5 µg/µl)
- 0,5 µl Random hexamers (50 ng/µl)
- mit DEPC-haltigem Wasser auf 10 µl Endvolumen auffüllen

Des Weiteren wurde folgender Master-Mix angesetzt:

- 2 µl 10x RT-Puffer
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNaseOut (Rekombinanter RNase Inhibitor, 40 U/µl)

Beide Ansätze (10 µl RNA/Primer- und 9 µl Master-Mix) wurden vermischt und für 2 Minuten auf 42°C erhitzt. Anschließend wurde zu jeder Probe 0,5 µl der SuperScript II RT (200 U/µl) zugegeben und für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein terminales Erhitzen für 15 Minuten auf 72°C beendet. Zum Schluss wurde jede Probe mit 1 µl RNase H (2 U/µl) versetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, um die restliche RNA vor der Amplifizierung abzubauen.

2.2.10.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nachdem aus der Gesamt-RNA die erwünschte cDNA synthetisiert worden ist, konnte diese als Ausgangsmaterial für eine PCR dienen. Diese kann in drei Abschnitte unterteilt werden:

1. Denaturierungsschritt: Hierbei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA bei Temperaturen um 94°C
2. Annealingschritt: Durch Senkung der Temperatur kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA

3. Elongationsschritt: Die Temperatur wird dem Arbeitsoptimum der Polymerase angepasst, somit eine optimale Zweitstrangsynthese erlaubt und am Ende des Zyklus ist die DNA-Menge nahezu verdoppelt

Um die **mRNA-Expression der *Fusion* und *Fission* Faktoren** zu überprüfen, wurden diverse Primer (100 pMol/ μ l) verwendet (siehe Abschnitt 2.1.4).

Folgender Master-Mix wurde jeweils angesetzt, wobei die Primer und die Taq-Polymerase erst anschließend zugegeben wurden:

5 μ l 10x Taq-Puffer mit Mg^{2+}
1 μ l 5x Taq enhancer
2 μ l dNTP-Mix (jedes 10 mM)
0,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
0,5 μ l Forward-Primer (100 pMol / μ l)
0,5 μ l Reverse-Primer (100 pMol / μ l)
2 μ l cDNA
38,5 μ l H_2O
<hr/>
50 μ l Endvolumen

Es wurde eine sogenannte *drop down* PCR durchgeführt, bei der nach einem initialem Denaturierungsschritt eine Zyklenfolge (26 Zyklen) mit jeweils um 0,5°C erniedrigter Annealingtemperatur anschließt. Darauf folgen noch einmal einige Zyklen (10 Zyklen) mit der zuletzt gewählten Annealingtemperatur. Die verschiedenen *drop down* PCRs der *Fusion* und *Fission* Faktoren konnten in zwei verschiedenen Programmen in einem Thermo-Cycler durchgeführt werden:

Material & Methoden

	Mfn1, Mfn2, Drp und MTP18	Fis1 und Opa1
	94°C 5 Minuten	94°C 5 Minuten
26 Zyklen	94°C 30 Sekunden	94°C 30 Sekunden
	73°C -> 60°C 45 Sekunden	78°C -> 65°C 45 Sekunden
	72°C 45 Sekunden	72°C 45 Sekunden
10 Zyklen Mfn1 15 Zyklen Fis1	94°C 30 Sekunden	94°C 30 Sekunden
	60°C 45 Sekunden	65°C 45 Sekunden
	72°C 45 Sekunden	72°C 45 Sekunden
	72°C 10 Minuten	72°C 10 Minuten

Zur Normalisierung der semiquantitativen PCR wurde β -Actin als *House keeping* Gen gewählt und mit folgendem Programm amplifiziert:

	β -Actin
26 Zyklen	94°C 5 Minuten
	94°C 30 Sekunden
	65°C 45 Sekunden
	72°C 45 Sekunden
	72°C 10 Minuten

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.9.7) und wurde mit Hilfe des Biorad-Systems ausgewertet.

Die Bestimmung der **oxidativen mtDNA-Schäden** wurde die Methode der Gruppe von Santos *et al.* modifiziert angewendet (Santos et al., 2002). Hierfür wurde aus genomischer DNA ein sehr großes (8,9 kb) mtDNA-Fragment (MitoTall) mit Hilfe des *Expand Long Template PCR System* amplifiziert. Oxidative mtDNA-Schäden führen zu einem Abbruch der Amplifikation, sodass mehr oxidative mtDNA-Schäden in einer geringeren Ausbeute des PCR-Produkts resultieren. Zur

Material & Methoden

Normalisierung auf die Anzahl der mtDNA-Kopien wurde ein kleines mitochondriales Fragment (MitoSmall) mit 220 Basenpaaren amplifiziert.

Es wurden folgende Master-Mixe angesetzt, wobei die DNA und die Taq-Polymerase erst anschließend zugegeben wurden:

MitoSmall	MitoTall
5 µl 10x Taq-Puffer mit Mg ²⁺	10 µl 5x Long Range Buffer (12,5 mM MgCl ₂)
1 µl 5x Taq enhancer	2,5 µl PCR Nucleotide Mix [500 µM] Endkonz
2 µl dNTP-Mix (jedes 10 mM)	1,5 µl DMSO
0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,7 µl Enzyme Mix (5 U/µl)
0,5 µl Forward-Primer (300 pMol / µl)	0,5 µl Forward-Primer (300 pMol / µl)
0,5 µl Reverse-Primer (300 pMol / µl)	0,5 µl Reverse-Primer (300 pMol / µl)
2 µl DNA (50 ng)	2 µl DNA (15 ng)
38,5 µl H ₂ O	32,3 µl H ₂ O
50 µl Endvolumen	50 µl Endvolumen

Daraufhin wurde die entsprechende PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

	MitoSmall	MitoTall
19 Zyklen	75°C 2 Minuten	75°C 2 Minuten
	94°C 30 Sekunden	94°C 1 Minuten
	60°C 45 Sekunden	94°C 45 Sekunden
	72°C 45 Sekunden	64°C 12 Minuten
	72°C 10 Minuten	72°C 10 Minuten
	4°C ∞	4°C ∞

2.2.10.6 *Real-time* quantitative PCR

Das Prinzip der RT Q-PCR beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, wobei aber zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich ist. Diese erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen direkt während jedes Zyklus, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR, da nur hier die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen, die eine korrekte Quantifizierung ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Anzahl der mtDNA-Kopien der SH-SY5Y Zellen zu bestimmen. Die verwendeten Primer wurden aus zwei Publikationen ausgewählt – die mtDNA Primer (mtF3212 und mtR3319) wurden der Publikation von Bai *et al.* entnommen (Bai et al., 2004a) und diejenigen für die nDNA aus Cote *et al.* (Cote et al., 2002). Der PCR-Reaktionsmix von 20 µl beinhaltete 10 µl *Power SYBR Green Master Mix*, 1 µM jedes Primers und 10 ng genomischer DNA. Die PCR wurde durch eine 10-minütige initiale Denaturierung bei 95°C gestartet, gefolgt von 40 Zyklen (Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und 60 Sekunden Annealing/Extension bei 60°C). Die Versuche wurden in 96-Well Platten an einem StepOnePlus® Real-Time PCR System von Applied Biosystems durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen *Real-time* PCR wurden als Ratio der Mittelwerte der mitochondrialen DNA zur nukleären DNA dargestellt und geben das exakte Verhältnis (mtDNA:nDNA) der jeweiligen Zellen an.

2.2.10.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung der Größe der erhaltenen PCR-Produkte wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch, d. h. nach ihrer Größe, im elektrischen Feld in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen

wandern sie zur Anode und ihre Größe kann man mit Hilfe von Größenmarkern bestimmen.

Zur Herstellung eines 1%-igen Agarosegels wird 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer gelöst und erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildet. Wenn die Lösung etwas abgekühlt ist, werden 8 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben. Dieser Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und RNA, indem er sich zwischen benachbarte Basen einlagert und somit die Nukleinsäuren unter UV Licht (254 nm Wellenlänge) sichtbar macht, wobei die Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt ist. Anschließend wird die warme Lösung auf einen vorbereiteten Gelträger gegossen, der nach dem Erstarren des Gels direkt in die Elektrophoresekammer überführt werden kann. Die Kammer wird mit 1x TBE Puffer bis zum Überschichten des Gels gefüllt, und nach dem Auftragen der Proben ein elektrisches Feld angelegt (6-8 Minuten bei 90 Volt und anschließend 75 Minuten bei 120 Volt). Für eine einfachere und bessere Auftragung der Proben wurden diese vorher mit 10x *Blue Juice™ Gel Loading Buffer* versetzt. Zudem wurde je nach erwarteter Größe der DNA-Banden ein Marker verwendet.

2.2.11 Proteinbestimmung mit Hilfe der BCA-Reaktion

Eine Möglichkeit zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen stellt die BCA-Reaktion (BCA = Bicinchoninsäure) dar (Smith et al., 1985; Stoscheck, 1990). Hier kommt es zur quantitativen Reaktion von zweiwertigen Kupferionen mit Protein, wodurch einwertige Kupferionen entstehen. Diese komplexieren dann die Bicinchoninsäure und hierdurch ergibt sich eine violette Färbung, die bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch vermessen werden kann.

Zunächst wurde die benötigte Menge der Arbeitslösung berechnet ((Standards + Proben) x 3 (Triplett) x 0,2 (Gesamtvolumen) = XY ml). Anschließend erfolgte das Mischen der Reagenzien A (Bicinchoninsäure) und B (4%-ige Kupfersulfat-Lösung) im Verhältnis 50:1. Dann wurden pro Well 25 µl Puffer/Standard/Probe vorgelegt

und danach 200 µl der Arbeitslösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 570 nm photometrisch vermessen.

2.2.12 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry *et al.* durchgeführt (LOWRY et al., 1951). Die Reaktion beruht darauf, dass sich im alkalischen Milieu zunächst ein Kupfer-Protein-Komplex bildet. Daraufhin erfolgt die stöchiometrische Reduktion eines Phosphomolybdato-Phosphowolfram-Reagenzes (Folin Ciocalteu Phenol-Reagenz), wodurch eine intensivblaue Färbung entsteht. Die Proteinbestimmung wurde in 96-well Platten mit einem Probenvolumen von 5 µl (PBS (Leerwert); Standard oder Probe) durchgeführt. Als Standard diente BSA (*Bovines Serum Albumin* – Stammlösung 1mg BSA/ml) in einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 1 mg/ml. Zunächst wurden 25 µl Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung) und direkt anschließend 200 µl Reagenz B (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) hinzugegeben. Der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln für 15 Minuten inkubiert und im Anschluss die Absorption der Lösung bei 620 nm mittels ELISA-Reader gemessen.

2.2.13 Western Blot-Analyse

2.2.13.1 Präparation von Zellhomogenat

Die Zellen einer fast konfluenten Platte wurden jeweils 2x mit sterilem 1x PBS gewaschen und anschließend in 1x PBS + Protease Inhibitor Cocktail aufgenommen. Die Suspension wurde bei -20°C gelagert und vor der weiteren Verwendung mittels Sonifier und Potter vollständig lysiert und homogenisiert.

2.2.13.2 Probenvorbereitung

Für die Analyse von Zelllysate mittels Western Blot, wurde das Zellhomogenat wie unter Abschnitt 2.2.13.1 beschrieben vorbereitet und der Proteingehalt mittels Lowry bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.11). Die Proben wurden mit *Sample Buffer* (10x) und *Reducing Agent* (4x) versetzt und 10 Minuten lang bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Es wurden 20 µg Protein pro Geltasche von dem Überstand aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.13.3 Gelelektrophorese und Transfer

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch mit einer Einlaufzeit von 8 Minuten bei 60V und der anschließenden Auftrennung bei 150V für 75 Minuten in einem XCell II™Blot Modul von Invitrogen. Dabei erfolgte der Aufbau der Apparatur laut den Angaben des Herstellers. Um die Größe der Proteine im Anschluss bestimmen zu können, wurde in eine Tasche 5 µl des Markers *Precision Plus WesternC Standards* geladen.

Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mit Hilfe des XCell II™Blot Moduls. Die Blotkammer wurde gemäß den Angaben des Herstellers zusammengesetzt und beladen. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotten aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften 5 Minuten lang in Ethanol und anschließend für weitere 5 Minuten in Transferpuffer getränkt. Der Transfer wurde für 2 Stunden bei 30V durchgeführt.

2.2.13.4 Blot-Entwicklung

Durch das Absättigen der Proteinbindungsstellen der Membran – dem sogenannten blocken – werden unspezifische Bindungen und dadurch auch Hintergrundsignale

minimiert. Hierzu wurde die Membran über Nacht bei 4°C in *Western Breeze* Blockerlösung gesättigt.

Die Inkubationszeit der Primärantikörper des *Total OXPHOS Complexes Detection Kit* betrug 2 Stunden und die für GAPDH 1 Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran 4x für 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen und hinterher für jeweils 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10.000 + 1 µl *Precision StrepTactin-HRP conjugate*) inkubiert. Daraufhin erfolgte erneut ein ausgiebiger Waschschrift, woraufhin der Blot mit dem *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (1000 µl A + 25 µl B für 5 Minuten im Dunkeln) entwickelt wurde. Die peroxidase markierten Sekundärantikörper katalysieren hierbei die Oxidation von Luminol, wodurch die zu detektierende Chemilumineszenz ausgelöst wird.

2.2.14 Bestimmung der Komplex-Aktivitäten

Die Bestimmung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe erfolgte spektrophotometrisch an einem Shimadzu Multi-Spec-1501 Spektrophotometer. Alle Komplexaktivitäten sind in nMol/min/mg angegeben und wurden auf die Aktivität der Citratsynthase derselben mitochondrialen Präparation normiert (Komplex/CS).

2.2.14.1 Isolierung von Mitochondrien

Für die Isolierung von Mitochondrien wurden alle verwendeten Materialien auf 4°C gekühlt und während der Isolierung alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde die Zellzahl bestimmt wie es in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben ist. Daraufhin wurden die Zellen in Lyse-Puffer (100 Mio Zellen/4 ml) aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Homogenisierung wurden die Zellen anschließend gepottert (10 x 400 rpm und 5 x 700 rpm) gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 800g für 10 Minuten und 4°C. Der Überstand wurde

gesammelt, das Pellet in 2 ml Lyse-Puffer aufgenommen und erneut gepottert mit anschließender Zentrifugation. Der Überstand wurde mit dem anderen vereint und bei 20.000g für 15 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem entsprechendem Volumen PBS aufgenommen und der Proteingehalt nach Lowry bestimmt.

2.2.14.2 Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität (CS-Aktivität)

Für die Bestimmung die Aktivität der Citrat-Synthase wurden 10 µg isolierte Mitochondrien bei 30°C für 5 Minuten mit dem Reaktions-Mix (0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM Acetyl-Coenzym A; 0,1 mM 5,5-dithiobis(2-Nitrobenzoic Säure); n-Dodecyl-β-D-Maltosid (20%)) inkubiert. Dabei reduziert die Citratsynthase 5,5-dithiobis(2-Nitrobenzoic Säure), gefolgt von einer gekoppelten Reaktion mit Coenzym A und Oxalacetat. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0,5 mM Oxalacetat initiiert und die Änderung der Absorption bei 412 nm (Extinktionskoeffizient von 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹) über 5 Minuten gemessen.

2.2.14.3 Messung der Komplex I-Aktivität

Zur Bestimmung der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (NADH:DBQ) und der NADH:hexaammineruthenium (III)-chlorid (NADH:HAR) Aktivität wurden die isolierten Mitochondrien (300 µg/Ansatz) in n-Dodecyl-β-D-Maltosid (20%) 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. Als Substrat zur Bestimmung der NADH:DBQ-Aktivität wurden 100 µM n-Decylubichinon (DBQ) und 100 µM NADH verwendet, wie bei Djafarzadeh *et al.* beschrieben (Djafarzadeh *et al.*, 2000). Die

Oxidationsrate von NADH wurde dann mit einem Extinktionskoeffizienten von ϵ 340–400 nm = 6,1 mM⁻¹ cm⁻¹ bestimmt.

2.2.14.4 Messung der Komplex II-Aktivität

Die Messung der Komplex II-Aktivität erfolgte über die Bestimmung der Abnahme der Absorption bei 600 nm durch die Reduktion von DCIP (2,6-Dichlorophenolindophenol) in 1 ml Medium (60 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 3 mM KCN, 20 µg/ml Rotenon, 20 mM Succinat) und 20 µg isolierter Mitochondrien. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,3 mM PMS (Phenazin Methasulfat) und 0,18 mM DCIP initiiert (Aleari et al., 2005). Der Extinktionskoeffizient für DCIP betrug 21 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.2.14.5 Messung der Komplex III-Aktivität

Die Oxidation von 50 µM Decylubichinol durch Komplex III wurde mit Hilfe von Cytochrom C als Elektronenakzeptor bestimmt (Krahenbuhl et al., 1991). Um Decylubichinol zu erhalten wurde DBQ (10 mM) in Ethanol gelöst und auf pH 2 eingestellt. Das Chinon wurde dann durch einen Überschuss an Natrium-Borohydrid reduziert. Anschließend wurde Decylubichinol mit Diethylether/Cyclohexan (2:1 V/V) extrahiert, unter einem Strom von Nitrogengas getrocknet und in Ethanol gelöst (pH 2). Der Versuch wurde in Medium (mit 35 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2mM KCN (pH 7,2) durchgeführt, dem 2,5 mg/ml BSA, 15 µM Cytochrom C, 0,6 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosit sowie 5 µg/ml Rotenon zugesetzt wurden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µg isolierter Mitochondrien gestartet und die Enzymaktivität bei 550 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient für Cytochrom C betrug 18,5 mM⁻¹cm⁻¹.

2.2.14.6 Messung der Komplex IV-Aktivität

Die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität (COX-Aktivität) an isolierten Mitochondrien (100 µg/Ansatz) mit Hilfe des Cytochrome *c* Oxidase Assay Kit nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Rasmussen et al., 2000). Das Messprinzip beruht darauf, dass die Absorption von Cytochrom C bei einer Wellenlänge von 550 nm abhängig von seinem Oxidationsstatus ist. Cytochrom C wird durch Natriumhydrosulfit zu Ferrocycytochrom C reduziert und anschließend durch COX zu Ferricytochrom C reoxidiert. Die Oxidation von Ferrocycytochrom C durch die Cytochrom-C-Oxidase ist eine biphasische Reaktion mit einem schnellen Anstieg der Aktivität gefolgt von einer langsamen Reaktionsrate.

2.2.15 Detektion von sekretiertem A β ₁₋₄₀

Das Prinzip zur Detektion von sekretiertem A β ₁₋₄₀ beruht auf einem *solid phase sandwich* ELISAs. Der verwendete monoklonale Antikörper bindet spezifisch den NH₂-Terminus von humanem Abeta und ein weiterer Antikörper bindet spezifisch den COOH-Terminus von A β ₁₋₄₀. Diese Bindung wird durch einen sekundären anti-*rabbit* Antikörper detektiert, der an eine Meeretichperoxidase gekoppelt ist. Hierdurch ergibt sich nach Zugabe des Substrates eine Färbung, wobei die Intensität direkt proportional zur Konzentration des humanen A β ₁₋₄₀ in der Probe ist.

Bei einer fast konfluent gewachsenen Platte wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und 24 Stunden später jeweils 1 ml des Mediums entnommen, um die Menge an sezernierten Abeta zu detektieren. Das Medium wurde mit 1 µM PMSF versetzt und die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zudem wurden die Zellen in 1x PBS + Protease Inhibitor Cocktail aufgenommen und mittels Lowry die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.11).

Die Präparation der Standards und die Durchführung des ELISA-Kits wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden mittels ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Tau und der Mutation P301L auf die Mitochondrien

Es ist bekannt, dass die Mutation P301L zur mitochondrialen Dysfunktion in transgenen Mäusen führt (David et al., 2005b). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte der Überexpression von hTau40 und TauP301L in SH-SY5Y Zellen auf die mitochondriale Funktion untersucht werden. Diese humanen Neuroblastoma Zellen lagen stabil transfiziert entweder mit dem Leervektor pRc/RSV (vct) vor, oder überexprimierten die längste Tau-Isoform (hTau40) bzw. die P301L Mutation im Tau-Gen (TauP301L) (Ferrari et al., 2003). Durch den Vergleich der drei Zelltypen konnten die Effekte auf die mitochondriale Funktion durch die Überexpression von Tau und der Mutation unterschieden werden.

3.1.1 Veränderungen in der Morphologie

Bei der Alzheimer Demenz kommt es zu intrazellulären Ablagerungen von fibrillären Bündeln, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Die Mutation P301L begünstigt die Hyperphosphorylierung, wodurch Tau seine physiologische Funktion verliert, von den Mikrotubuli dissoziiert und verstärkt neurofibrilläre Bündel bildet (Alonso et al., 2004; Hong et al., 1998b). Durch die Destabilisierung der Mikrotubuli wird auch der Organell- und Vesikeltransport beeinflusst (Ebner et al., 1998; Roy et al., 2005). Des Weiteren ist auch bekannt, dass es durch die Expression von hTau40 in Tau-defizienten CHO-Zellen zu einer Zunahme der Zellgröße kommt (Trinczek et al., 1999). Daher wurde zunächst das mitochondriale Netzwerk mit Hilfe konfokaler Laserscanmikroskopie in den SH-SY5Y Zellen betrachtet (Abb.: 3-1 Seite 88).

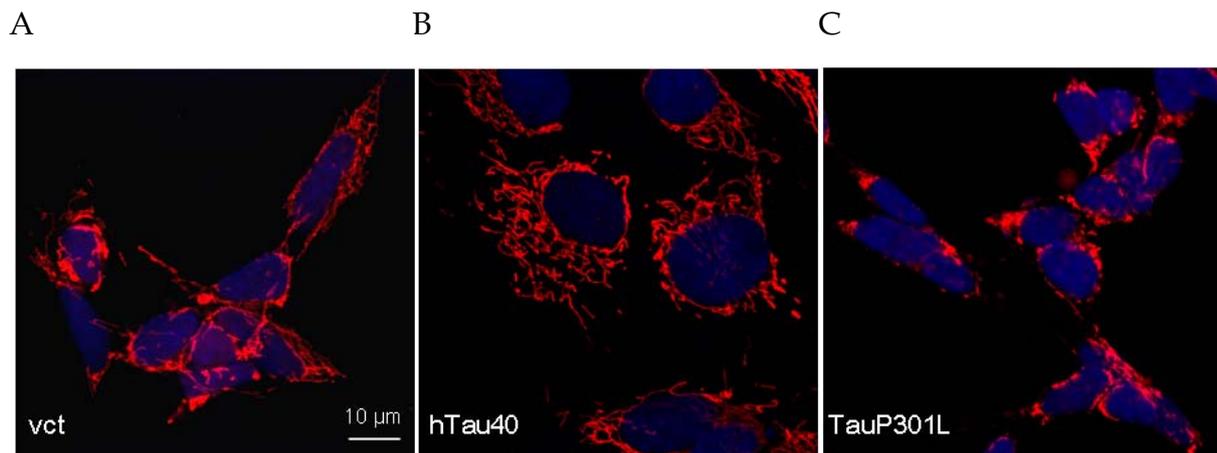


Abb.: 3-1 Der Einfluss von überexprimiertem Tau auf das mitochondriale Netzwerk der SH-SY5Y-Zellen

Aufnahme von fixierten (4% PFA) SH-SY5Y Zellen (A = vct, B = hTau40 und C = TauP301L) am CLSM. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker CMXRos (rot) und der Zellkern mit Höchst33258 (blau) angefärbt.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den drei Zelltypen. Auffällig war, dass die hTau40-Zellen (Abb.: 3-1 B) deutlich größer waren, als vct- und TauP301L-Zellen. Zum einen war ihr Zellkern und das gesamte Ausmaß der Zellen größer und zum anderen wiesen sie ein sehr ausgeprägtes und weitreichendes mitochondriales Netzwerk auf. Bei den vct-Zellen war auch ein mitochondriales Netzwerk vorhanden, was aufgrund der geringeren Zellgröße aber deutlich kleiner ausfiel (Abb.: 3-1 A). Im Gegensatz dazu bildeten die TauP301L-Zellen nur ein minimales Netzwerk aus (Abb.: 3-1 C). Die Mitochondrien befanden sich hauptsächlich um den Zellkern herum lokalisiert und erschienen leicht diffus. Das Clustering von einigen Mitochondrien um den Zellkern herum war bei allen drei Zelltypen zu beobachten.

Während die hTau40-Zellen sehr groß und flach waren, erschien der Zellkörper der TauP301L-Zellen mehr zusammengezogen und kugelig. Daher wurde zum Einen das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und auf die Zellzahl normiert, um eine Aussage über die Masse der Zellen machen zu können. Zum Anderen wurde die Dimension der Z-Ebene am CLSM gemessen, um die Höhe der Zellen zu bestimmen (Abb.: 3-2 Seite 89).

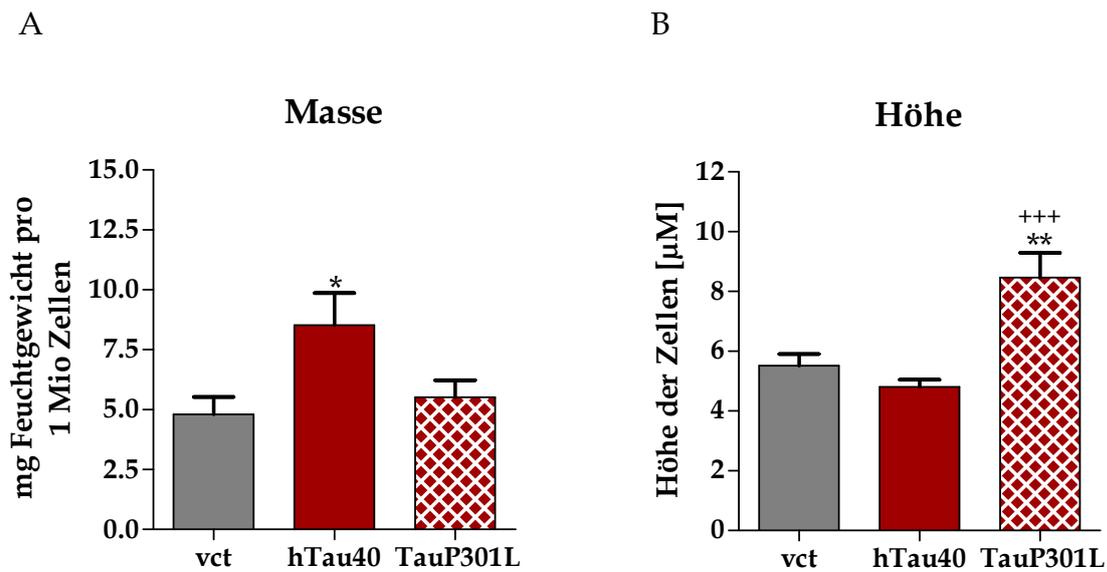


Abb.: 3-2 Der Einfluss von überexprimiertem Tau auf die Morphologie der SH-SY5Y-Zellen

Die Masse der Zellen wurde anhand des Feuchtgewichtes bestimmt, das auf die Zellzahl normiert wurde (A). Um eine Aussage über die Höhe der Zellen machen zu können, wurde die Dimension des Z-Stapels am CLSM bestimmt (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 10 (A) und 16 (B) Einzelexperimenten (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Das Feuchtgewicht pro eine Million Zellen war bei den hTau40-Zellen gegenüber den vct-Zellen signifikant erhöht, wobei es zwischen vct und TauP301L keinen Unterschied gab (Abb.: 3-2 A). Bei der Bestimmung der Zellhöhe zeigte sich kein Unterschied zwischen vct und hTau40, aber der Zellkörper der TauP301L-Zellen war im Vergleich zu den anderen Zelltypen signifikant höher (Abb.: 3-2 B). Dies ließ sich auf die Akkumulation der Mitochondrien um den Zellkern herum zurückführen.

3.1.2 Die drei Zelltypen weisen keinen Unterschied in der mitochondrialen Masse auf

Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der drei Zelltypen sollte ausgeschlossen werden, dass sie sich in der mitochondriale Masse unterscheiden. Die meisten Methoden zu Bestimmung der mitochondrialen Masse beruhen auf einer Färbung mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen. Allerdings kann hier nicht

ausgeschlossen werden, dass diese doch abhängig vom Membranpotential sind. Deshalb wurde mit Hilfe von quantitativer *real-time* PCR das Verhältnis zwischen mitochondrialer DNA (mtDNA) und nukleärer (nDNA) bestimmt (Bai et al., 2004b; Cote et al., 2002). Die Arbeitsgruppe um Bai konnte mit dieser Methode auch zeigen, dass ein Anstieg im mitochondrialen DNA-Gehalt mit der Proliferation von Mitochondrien korrelierte (Bai et al., 2004b). Daher wurden mit dieser Methode Rückschlüsse auf die mitochondriale Masse sowie den mtDNA-Gehalt der SH-SY5Y Zellen gezogen (Abb.: 3-3).

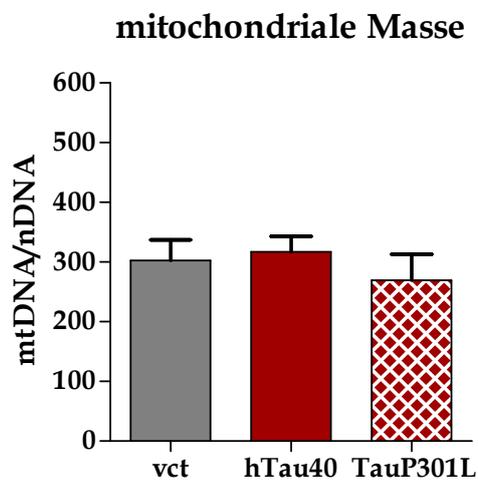


Abb.: 3-3 Das Überexprimieren von Tau hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Masse

Mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR wurde die mitochondriale Masse bestimmt. Hierfür wurde die Anzahl der Kopien eines mitochondrialen (mtB) und eines nukleären Gens (ASPG) bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt, um den mtDNA-Gehalt zu normalisieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelerperimenten

Die Anzahl der mtDNA-Kopien wurde auf die nDNA-Kopien normalisiert, woraus sich kein Unterschied in der mitochondrialen Masse ergab. Auch bei den Absolutwerten der mtDNA- und nDNA-Kopien zeigten sich keine Differenzen zwischen den drei Zelltypen, sodass man davon ausgehen konnte, dass keine Unterschiede im mtDNA-Gehalt vorlagen.

Aus diesem Ergebnis konnte man schließen, dass alle gemessenen Effekte nicht auf eine vermehrte oder verminderte Anzahl an Mitochondrien zurückzuführen waren, sondern auf eine mitochondriale Dysfunktion hinviesen.

3.1.3 Beweglichkeit der Mitochondrien

Die Hauptaufgabe von Tau besteht in der Stabilisierung der Mikrotubuli. Es ist auch bekannt, dass die Expression von hTau40 in Tau-defizienten Zellen den Transport von Mitochondrien beeinflusst, indem die unbewegliche Fraktion zunimmt (Stamer et al., 2002). Durch die Überexpression von hTau40 und TauP301L sind die Zellen einem chronisch umstrukturierten Zytoskelett ausgesetzt. Daher wurde die Beweglichkeit der Mitochondrien in den SH-SY5Y Zellen mit *Live Cell Imaging* am CLSM untersucht. Zur Verdeutlichung wird die Methode beispielhaft an einer Aufnahme der vct-Zellen gezeigt (Abb.: 3-4).

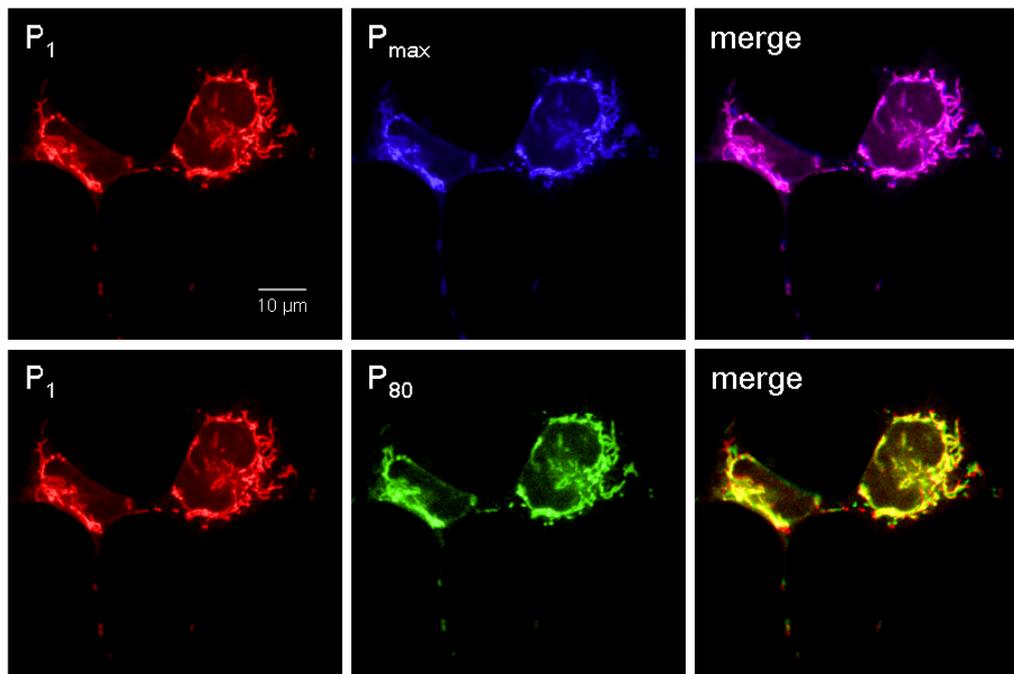


Abb.: 3- 4 Beweglichkeit der Mitochondrien

Für die Beweglichkeits-Messung der Mitochondrien wurden die Zellen mit MitoTracker Deep Red gefärbt und bei 37°C in der Klimakammer am CLSM vermessen. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde alle 1,5 Sekunden ein Bild von einer einzelnen Zelle gemacht und die Zunahme der Graustufen (= Zunahme der Gesamtfläche) im Vergleich zum Ausgangsbild berechnet. Beispielhaft ist die Methode an einer Aufnahme von vct-Zellen gezeigt. Die oberen drei Bilder geben graphisch die Auswertung der Methode wieder (P_1 = Ausgangsbild der Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker, P_{max} = maximale Intensität aller 80 Einzelbilder, merge = Überlagerung von P_1 und P_{max}). Die unteren drei Bilder geben die Bewegung der Mitochondrien im Verlauf der Aufnahme wieder (P_1 = Ausgangsbild der Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker, P_{80} = letztes Bild nach 2 Minuten, merge = Überlagerung des ersten und letzten Bildes der Aufnahme).

Die mitochondriale Beweglichkeit (Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker DeepRed) wurde innerhalb von 2 Minuten mit 80 Einzelbildern dokumentiert und anschließend die Zunahme der Graustufen (= Zunahme der Gesamtfläche) im Vergleich zum Ausgangsbild berechnet (Abb.: 3-5).

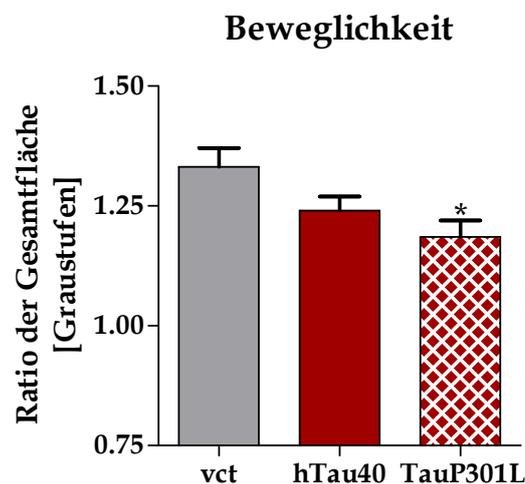


Abb.: 3- 5 Mitochondriale Beweglichkeit der SH-SY5Y Zellen

Innerhalb von 2 Minuten wurden 80 Einzelbilder der mit MitoTracker DeepRed gefärbten Mitochondrien gemacht und die Zunahme der Graustufen (= Zunahme der Gesamtfläche) im Vergleich zum Ausgangsbild berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 13-18 Einzelexperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L).

Die Überexpression von hTau40 führte zu einer tendenziellen Abnahme der mitochondrialen Beweglichkeit, wohingegen die Beweglichkeit der Mitochondrien in den TauP301L-Zellen im Vergleich zu den vct-Zellen signifikant verringert war. Beispielhaft ist die Methode graphisch anhand einer Aufnahme von vct-Zellen dargestellt.

Allerdings ließ sich anhand dieser Daten noch keine genaue Aussage über die Ursache der verminderten Mobilität der Mitochondrien machen.

3.1.4 Ist *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien beeinträchtigt?

Neben dem Transport von Mitochondrien entlang des Zytoskeletts unterliegt die Bewegung der Mitochondrien dynamischen Prozessen. Das sogenannte *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien dient unter anderem der Integrität der Mitochondrien, der Verbindung von Mitochondrien mit unterschiedlichem elektrischen oder biochemischen Status sowie der Aufteilung und dem Schützen von mtDNA (Berman et al., 2008b). Dies wird als Rettungsmechanismus diskutiert, da auf diese Weise beeinträchtigte oder geschädigte Mitochondrien Proteine und mtDNA austauschen können (Busch et al., 2006; Ono et al., 2001). Außerdem spielt es eine entscheidende Rolle bei der Apoptose (Youle et al., 2005). Da die TauP301L-Zellen eine verminderte mitochondriale Beweglichkeit aufwiesen wurde nun überprüft, ob diese nur aufgrund des umstrukturierten Zytoskeletts zustande kam oder auch *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien beeinträchtigt waren.

3.1.4.1 Untersuchung von *Fusion* und *Fission* mit photoaktivierbarem mitoGFP

Eine Möglichkeit um *Fusion* und *Fission* von Mitochondrien zu untersuchen besteht in der Transfektion mit photoaktivierbarem mitoGFP. Das sogenannte pA-GFP ist eine Variante des *Aequora victoria* GFP, dass durch Substitution einer Aminosäure zu einer stabilen und 100-fach stärkeren Fluoreszenz nach Laseraktivierung fähig ist (Patterson et al., 2002). Dieses Konstrukt wurde mit einer mitochondrialen Zielsequenz versehen, wodurch es sich für verschiedene Untersuchungen an Mitochondrien eignet (Karbowski et al., 2004). Die Zellen wurden transient mit pA-GFP transfiziert und nach 24 Stunden mittels FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) am CLSM untersucht, wobei in diesem Fall das Photobleaching der Photoaktivierung entsprach. Eine Abnahme der Fluoreszenz galt als Maß für *Fusion* und *Fission* Events, da die Abnahme die Diffusion der Fluoreszenz in ein benachbartes - vermutlich fusioniertes - Mitochondrium widerspiegelte (Abb.: 3-6 Seite 94).

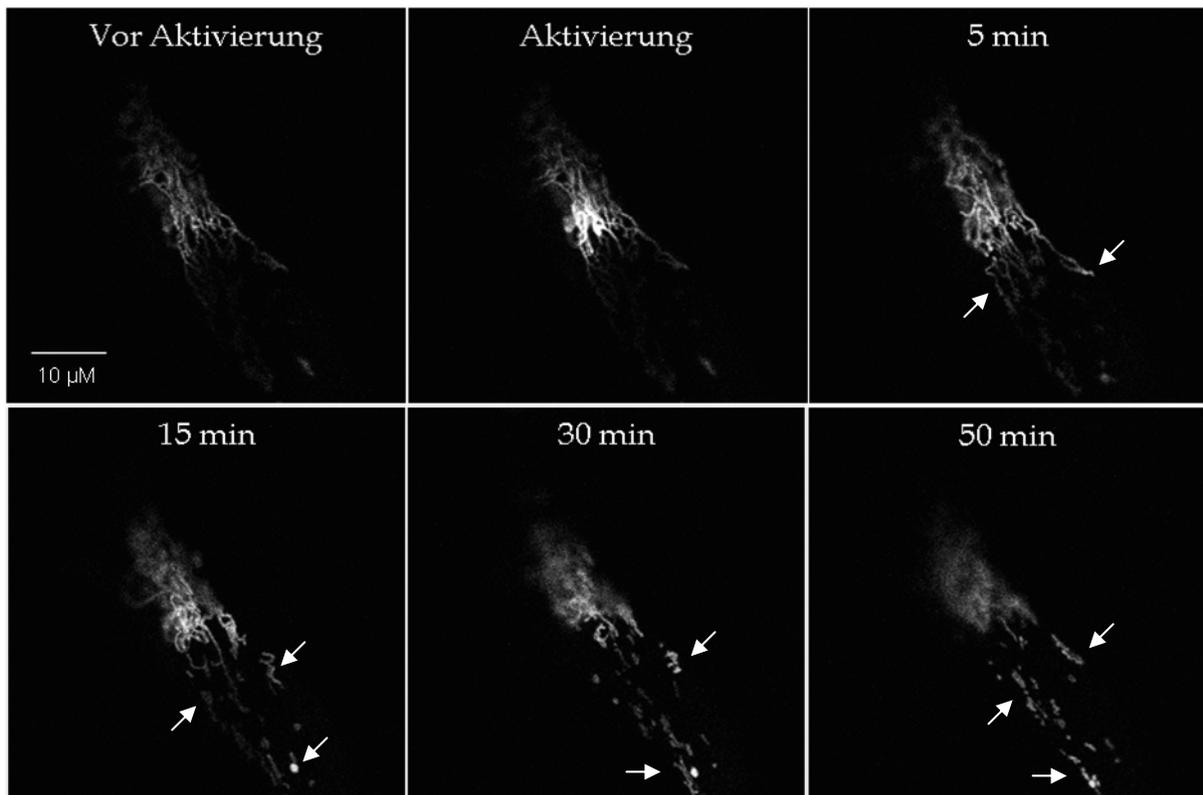


Abb.: 3-6 Beispiel für die Verteilung von photoaktivierbarem mitoGFP

Die transient transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden bei 37°C in der Klimakammer am CLSM vermessen. Die Aktivierung des ROI (*Region of interest*) erfolgte mit einem Diodenlaser im UV-Bereich bei 380 nm. Nach der Aktivierung wurde über eine Stunde alle 5-10 Minuten eine Aufnahme bei der Emmisionswellenlänge von GFP bei 509 nm gemacht. Die Pfeile weisen auf die Verteilung des mitoGFP im Verlauf der Zeit hin.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf wird deutlich, dass die TauP301L-Zellen signifikant weniger *Fusion* und *Fission* aufwiesen, als die vct-Zellen (Abb.: 3-7 Seite 95). Dies kam erst nach 15 Minuten zum Tragen, da die vct-Zellen in den ersten 10 Minuten nach Aktivierung kaum eine Abnahme der Fluoreszenz zeigten. Dagegen wiesen sie zwischen 10-20 Minuten einen starken Abfall der Fluoreszenz auf (~ 60%), der sich kontinuierlich über die nächste halbe Stunde nur noch um etwa weitere 20% verminderte. Im Gegensatz dazu kam es bei hTau40 und TauP301L innerhalb der ersten 5 Minuten schon zu einer 20%-igen Abnahme der Fluoreszenz. Ab da zeigten die TauP301L-Zellen bis zum Ende der Messung nur noch einen zusätzlichen Abfall um etwa 30%. Die Abnahme der Fluoreszenz bei den hTau40-Zellen befand sich, wie bei der mitochondrialen Bewegungsmessung, zwischen den Werten von vct und TauP301L.

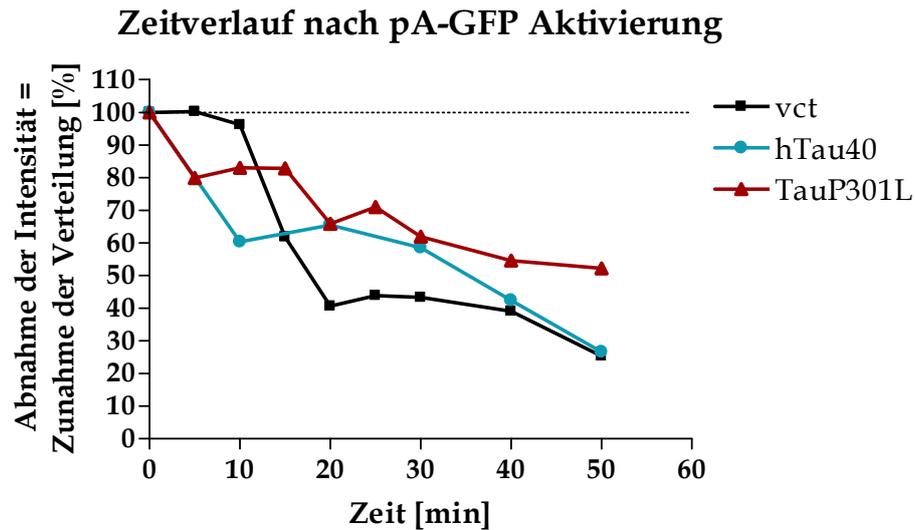


Abb.: 3-7 Zeitlicher Verlauf nach Aktivierung von pA-GFP

Die Hintergrundfluoreszenz vor der Aktivierung von mitoGFP wurde als 0-Wert gesetzt und der Wert nach der Aktivierung gleich 100%. Anschließend wurde alle 5-10 Minuten die Abnahme der Intensität (Graustufen) über eine Stunde aufgezeichnet. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von 5-12 Einzelexperimenten

Die hTau40- und TauP301L-Zellen reagierten sensibel auf die Aktivierung durch den Diodenlaser. Außerdem kam es erst nach 10-15 Minuten in allen drei Zelltypen zu einem relativ konstanten Abfall der Fluoreszenz. Hinzu kam, dass mit Zunahme der Messdauer die Zellen teilweise sehr gestresst reagierten, weshalb die Anzahl der Messpunkte ab 50 Minuten stark abgenommen hat. Deshalb wurde noch mal der Bereich zwischen 15-30 Minuten näher betrachtet (Abb.: 3-8 Seite 96).

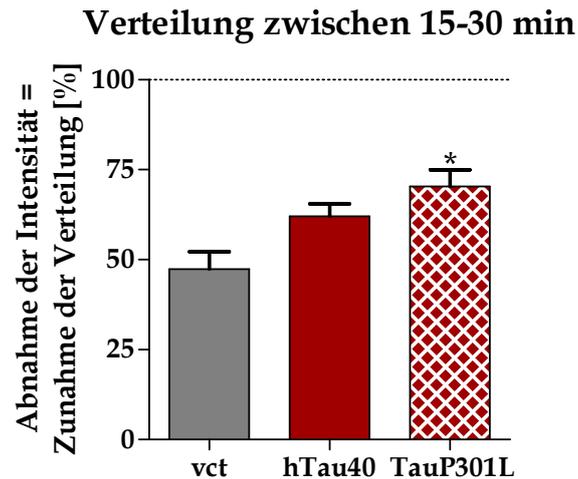


Abb.: 3- 8 Abnahme der Fluoreszenzintensität zwischen 15 und 30 min nach der Aktivierung von pA-GFP

Die *Fusion* und *Fission* Events wurden noch mal näher in dem Zeitfenster von 15 und 30 Minuten nach der Aktivierung von pA-GFP betrachtet. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 5-10 Einzelexperimenten (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test, * p < 0,05 vct vs. TauP301L*)

Hier zeigte sich deutlich, dass die Abnahme der Fluoreszenz in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den vct-Zellen vermindert war. Dieses war mit einer geringeren *Fusion*- und *Fission*-Aktivität in den Zellen gleichzusetzen. In den hTau40-Zellen war *Fusion* und *Fission* tendenziell, aber nicht signifikant, im Vergleich zu den vct-Zellen vermindert.

3.1.4.2 Gibt es auf Transkriptionsebene Unterschiede bei den an *Fusion* und *Fission* beteiligten Faktoren?

Die Aktivität von *Fusion* und *Fission* Events kann auf Transkriptionsebene reguliert werden (Honda et al., 2003). Um zu überprüfen ob Unterschiede zwischen den Zelltypen vorlagen, wurde die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und semiquantitative RT-PCRs mit Primern für die *Fusion* Faktoren Mfn1, Mfn2 und Opa1, die *Fission* Faktoren Fis1, Drp1 und MTP18 sowie β -Aktin für die Normalisierung durchgeführt (Abb.: 3-9 und 3-10 Seite 97).

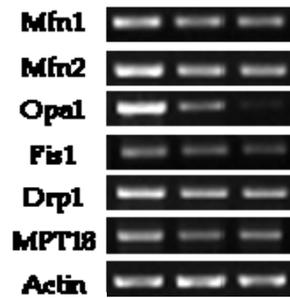


Abb.: 3- 9 Repräsentative Darstellung der Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid

Beispielhaft sind Banden der RT-PCR aller *Fusion* und *Fission* Faktoren nach Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt.

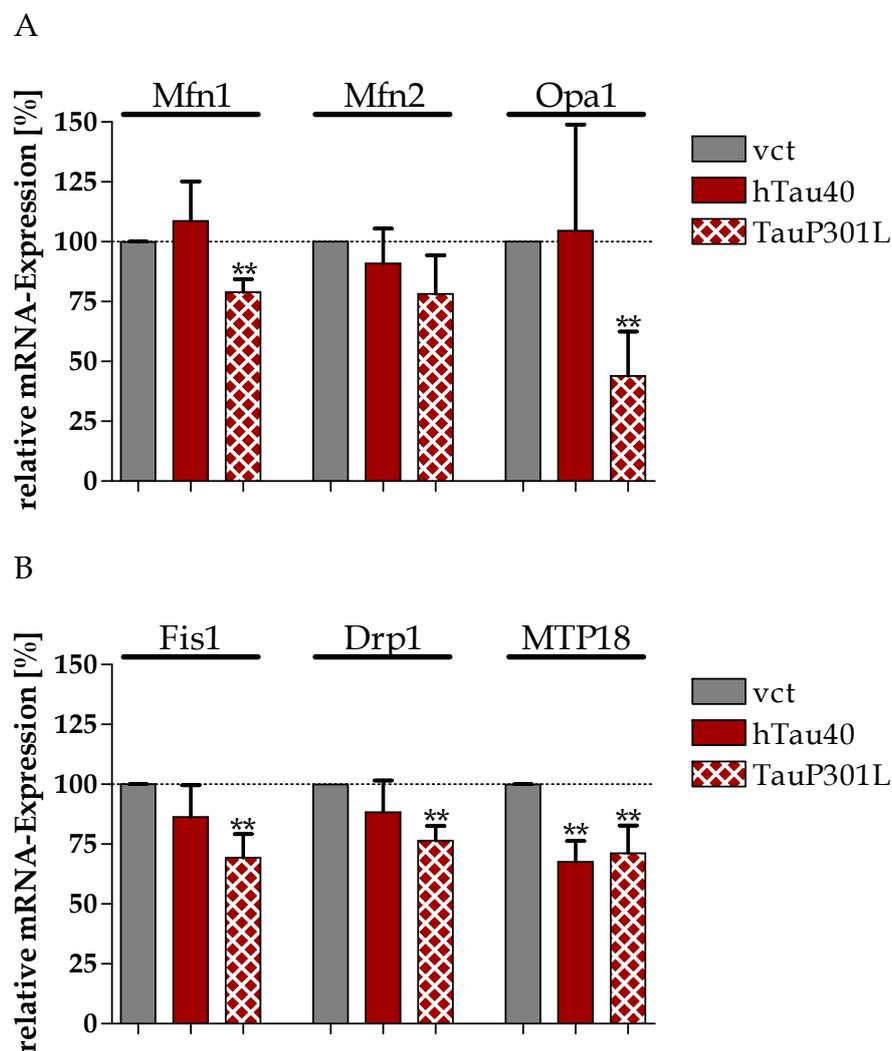


Abb.: 3- 10 Veränderte Transkription von an *Fusion* und *Fission* beteiligten Faktoren

Gezeigt ist die relative mRNA-Expression von an *Fusion* (A) und *Fission* (B) beteiligten Faktoren bezogen auf die jeweilige Aktin-Expression. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3-5 (Opa1), ansonsten 5-7 Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, ** $p < 0,01$ vct vs. hTau40 oder TauP301L)

Die Expression der *Fusion*-Faktoren Mfn1 und Opa1 (Abb.: 3-10 A), und der *Fission* Faktoren Fis1, Drp1 und MTP18 (Abb.: 3-10 B) war in den TauP301L-Zellen gegenüber den vct-Zellen signifikant erniedrigt. Im Gegensatz dazu war die Expression der *Fusion* Faktoren in den hTau40-Zellen nicht verändert. Allerdings waren die mRNA-Spiegel der *Fission* Faktoren Fis1 und Drp1 tendenziell und MTP18 sogar signifikant erniedrigt im Vergleich mit den vct-Zellen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse noch einmal in einer Tabelle zusammengefasst, wobei zum Einen die prozentualen Abweichungen gegenüber den vct-Zellen und zum Anderen die SEMs dargestellt sind (Tab.: 3-1).

	Mfn1	Mfn2	Opa1	Fis1	Drp1	MTP18
hTau40	+ 8,7% ±16,46% ns	-9,1% ±14,58% ns	+4,6% ±44,39% ns	-13,64% ±13,17% ns	-11,66% ±13,20% ns	-32,49% ±8,81% p < 0,01
TauP301L	-11,11% ±5,39% p < 0,01	11,82% ±16,18% ns	-56,02% ±18,51% p < 0,01	-30,66% ±9,89% p < 0,01	-23,61% ±6,12% p < 0,01	28,81% ±11,58% p < 0,01

Tab.: 3-1 Zusammenfassung der Veränderungen der *Fusion* und *Fission* Faktoren

Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte ± SEM von 3-5 (Opa1), ansonsten 5-7 Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, ** p < 0,01 vct vs. hTau40 oder TauP301L)

3.1.5 In wie weit variieren neben der veränderten Morphologie auch funktionelle Parameter in den Zellen?

Ein gut funktionierendes mitochondriales Netzwerk wird auch für den intramitochondrialen Austausch von metabolischen Substraten sowie der Aufrechterhaltung der respiratorischen Kapazität und des mitochondrialen Membranpotentials in hypoxischen Regionen der Zelle benötigt (Skulachev, 2001). Eine veränderte Morphologie und gestörte Dynamik der Mitochondrien kann daher auf einen gestörten Energiestatus der Zelle hinweisen.

3.1.5.1 Einfluss von Tau und der Mutation P301L auf den Energiestatus der Zelle

Es ist bekannt, dass die Mutation P301L in transgenen Mäusen im Alter zu verringerten basalen ATP-Spiegeln führt (David et al., 2005b). Das mitochondriale Membranpotential (MMP) war bei 12 und 15 Monate alten Tieren nicht verändert ((David et al., 2005b); Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurden diese Parameter nun in den SH-SY5Y Zellen untersucht. Der Vergleich bei den P301L-Mäusen wurde immer gegenüber nicht-transgenen Kontrolltieren gemacht. Daher entsprechen die Ergebnisse dem Vergleich von vct und TauP301L in den SH-SY5Y Zellen. Um die ATP-Spiegel zu bestimmen wurden die Zellen lysiert und das freigesetzte ATP mit einem Biolumineszenz-Assay gemessen. Um auszuschließen das veränderte ATP-Konzentrationen durch eine gesteigerte oder verminderte Glykolyserate zustande kommen, wurden die Lactat-Spiegel aus dem Medium nach 24 Stunden bestimmt. Da auch bekannt ist, dass NO die Aktivität der Cytochrom C Oxidase reversibel hemmt und damit die mitochondriale Atmung und die ATP-Produktion beeinflussen kann (Brown and Cooper, 1994), wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2DA die NO-Spiegel bestimmt. Das mitochondriale Membranpotential wurde mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff, dem Rhodamin123, ermittelt (Abb.: 3-11 Seite 100).

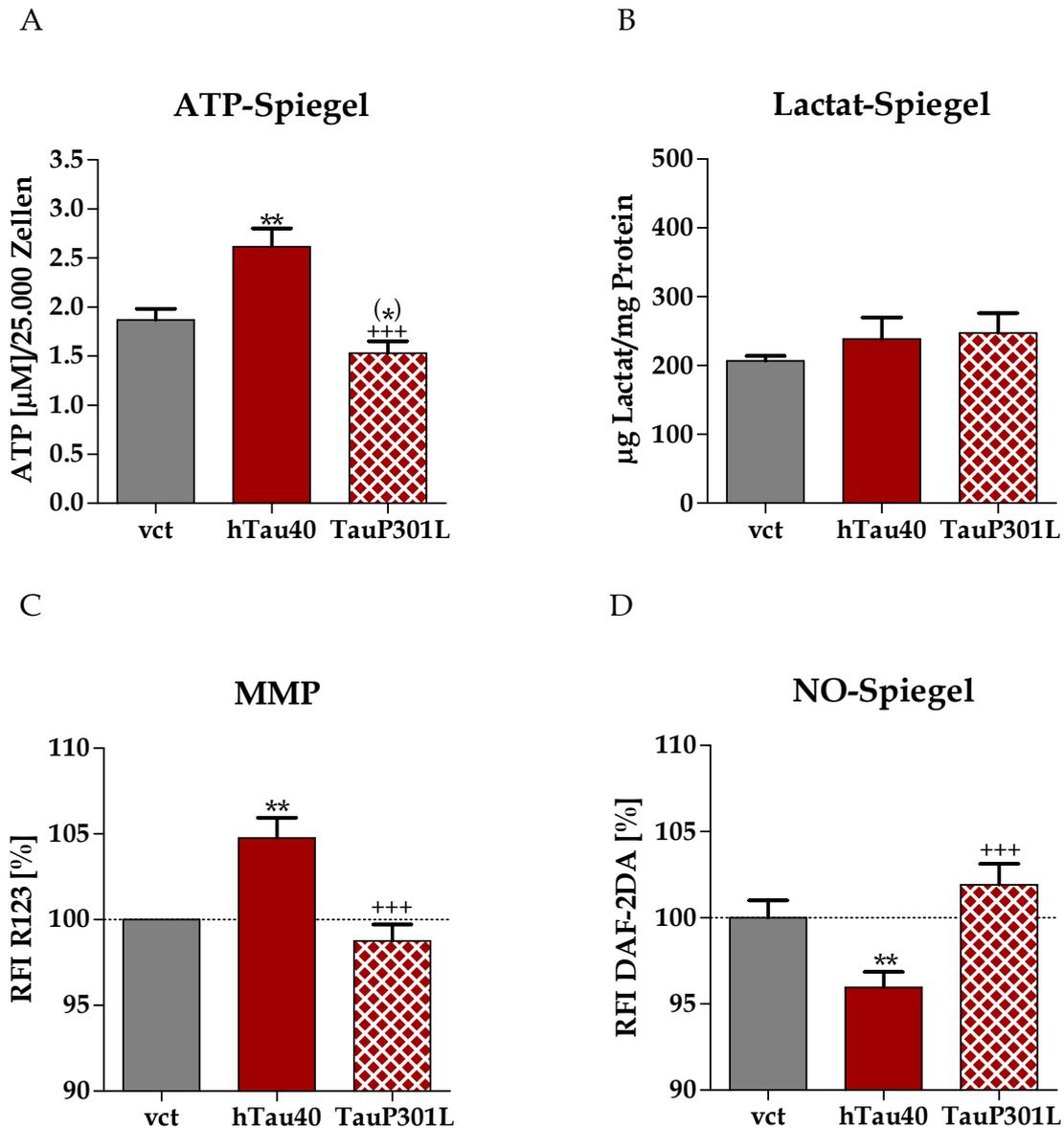


Abb.: 3- 11 Basale ATP-, Lactat- und NO-Spiegel sowie das mitochondriale Membranpotential der SH-SY5Y Zellen

Die Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag das MMP (C) und die NO-Spiegel (D) bestimmt. Für die ATP- (A) und Lactat-Spiegel (B) wurden die Zellen noch für weitere 24 Stunden kultiviert. Die ATP- und No-Spiegel sowie das MMP wurden auf die Zellzahl bezogen, wohingegen die Lactat-Spiegel auf den Proteingehalt normiert wurden (RFI = relative Fluoreszenzintensität). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 20 (A), 3 (B), 14 (C) und 16 (D) Einzelerperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. hTau40; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Die Überexpression von hTau40 führte zu signifikant erhöhten ATP-Spiegeln gegenüber den vct- (+39,8%) und TauP301L-Zellen (57,89%), wobei die TauP301L-Zellen zusätzlich eine deutliche Tendenz zu erniedrigten ATP-Spiegeln im Vergleich

zu den vct-Zellen aufwiesen (-18,09%) (Abb.: 3-11 A). Diese Unterschiede in den ATP-Spiegeln waren nicht auf eine gesteigerte Glykolyserate in den hTau40-Zellen zurückzuführen, da die drei Zelltypen keine Unterschiede in den Lactat-Spiegeln zeigten (Abb.: 3-11 B). Hinzu kam, dass das mitochondriale Membranpotential in den hTau40-Zellen im Vergleich zu den vct- und TauP301L-Zellen hyperpolarisiert war (Abb.: 3-11 C). Des Weiteren waren die NO-Spiegel in den hTau40-Zellen signifikant gegenüber den vct- und TauP301L-Zellen erniedrigt (Abb.: 3-11 D). Interessanterweise korrelierte das Ausmaß der Veränderungen im MMP und den NO-Spiegeln miteinander. Die erniedrigten ATP-Spiegel in den TauP301L-Zellen entsprachen den Ergebnissen in den 24 Monate alten P301L-Mäusen, die selbst im Alter von 12 Monaten schon tendenziell erniedrigte ATP-Spiegel aufwiesen. Bezogen auf das MMP wiesen die P301L-Mäuse im Alter von 12 und 15 Monaten auch nur eine tendenzielle Depolarisation im Vergleich mit den Kontrolltieren auf, was sich bei den TauP301L-Zellen widerspiegelte.

3.1.5.2 Einfluss auf die metabolische Aktivität und Zytotoxizität

Um nun zu testen, welchen Einfluss die Überexpression von hTau40 und TauP301L auf die Viabilität der Zellen hat, wurden zwei verschiedene Assays durchgeführt (Abb.: 3-12 Seite 102). Mit Hilfe des MTT-Tests, welcher das Reduktionsvermögen der Zellen, aber vor allem der Mitochondrien widerspiegelt (Mattson et al., 1995), erhält man einen Einblick in die metabolische Aktivität der Zellen. Die Reduktion des Formazans ist abhängig von NADH, weshalb sich daraus auch die NADH-Spiegel der Zelle ableiten lassen. Der ToxiLight-Assay ist ein Zytotoxizitäts-Test, der anhand von Biolumineszenz die Aktivität der Adenylatkinase (AK) im Medium nach Freisetzung aus geschädigten Zellen detektiert (Miret et al., 2006).

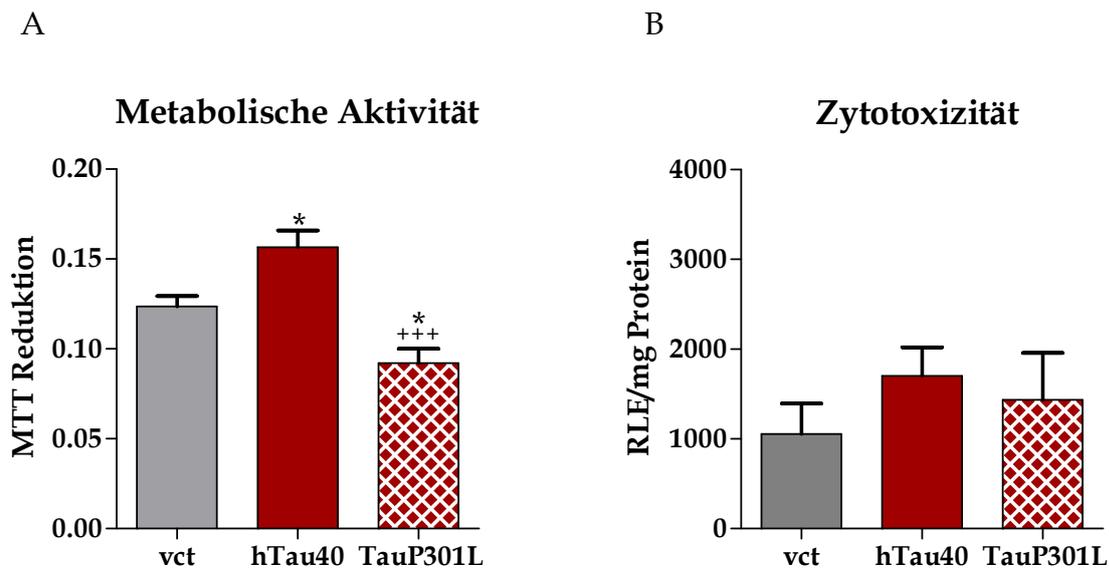


Abb.: 3- 12 Basale metabolische Aktivität und Zytotoxizität der SY5Y-Zellen

Die Zellen konnten über Nacht anwachsen und nach weiteren 24 Stunden wurde die metabolische Aktivität und Zytotoxizität der SH-SY5Y Zellen bestimmt. Die gemessenen Absorptionen wurden beim MTT-Assay auf die eingesetzte Zellzahl und beim ToxiLight-Assay auf den Proteingehalt normiert (RLE = relative Lumineszenz-Einheit). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 43 (A) und 4 (B) Einzelexperimenten (One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

In den hTau40-Zellen ist die metabolische Aktivität signifikant erhöht im Vergleich zu den vct- (26,7%) und TauP301L-Zellen (52,2%) (Abb.: 3-12 A). Die Mutation führte sogar zu einer zusätzlichen Abnahme der metabolischen Aktivität von 25,5% gegenüber den vct-Zellen. Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression von hTau40 und TauP301L keinen toxischen Effekt auf die SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-12 B).

3.1.5.3 Veränderte ROS-Spiegel in den SY5Y-Zellen

Mitochondrien stellen die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar, die beim Transport von Elektronen entlang der Atmungskettenkomplexe entstehen. Es ist auch bekannt, dass es im Alter vermehrt zur Superoxid-Radikal Produktion in den P301L-Mäusen kommt (David et al., 2005a). Außerdem waren die ATP-Spiegel und die metabolische Aktivität in den hTau40-Zellen erhöht und in den TauP301L-Zellen erniedrigt, weshalb die ROS-Spiegel mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen

bestimmt wurden (Abb.: 3-13). Hierfür wurde zum Einen DHE verwendet, das spezifisch Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) misst und zum Anderen DHR, das Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und andere Peroxide ($ROOH$) sowie mitochondriale ROS und Peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$) detektiert.

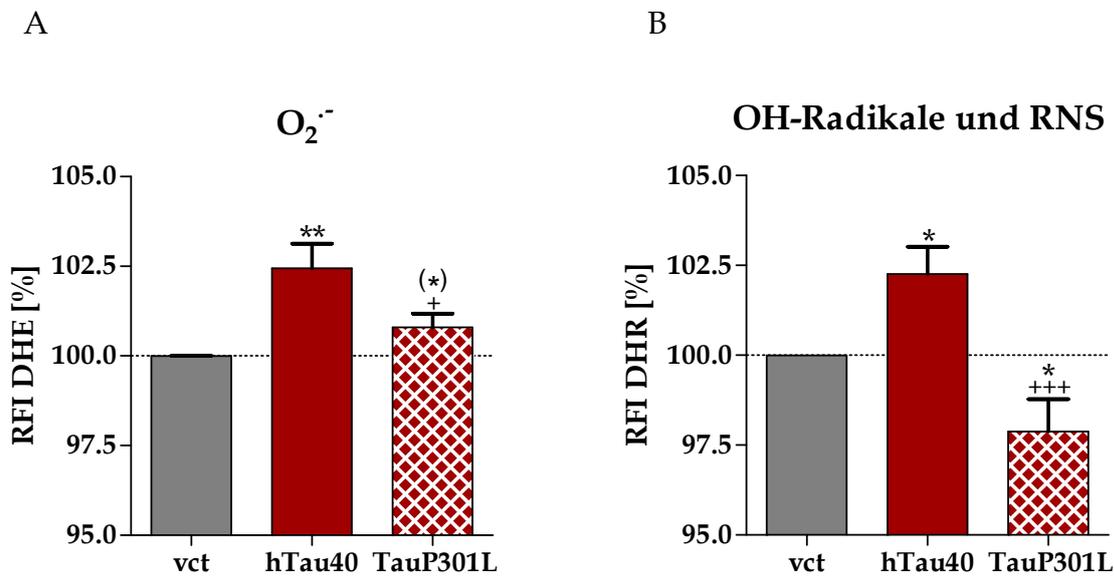


Abb.: 3- 13 Veränderte ROS-Spiegel in den SY5Y-Zellen

Zum Einen wurde die Menge an Superoxidanion-Radikalen mit DHE (A) und zum Anderen die Hydroxyl-Radikale sowie RNS mit Hilfe von DHR (B) bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 14 Einzelexperimenten, normalisiert pro Experiment (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Die hTau40-Zellen wiesen leicht erhöhte Superoxidradikal- und Hydroxylradikal-Spiegel um etwa 2,5% im Vergleich zu vct- und TauP301L-Zellen auf. Interessanterweise waren in den TauP301L-Zellen zwar die Superoxid-Radikale tendenziell erhöht (Abb.: 3-13 A), aber die Hydroxyl-Radikale signifikant gegenüber den vct-Zellen erniedrigt (Abb.: 3-13 B).

Die erhöhten Superoxidradikal-Spiegel in den TauP301L-Zellen gehen mit den Daten der P301L-Mäuse einher.

3.1.5.4 Erhöhte oxidative mtDNA-Schäden in den TauP301L-Zellen

Da Mitochondrien auch den Hauptangriffspunkt für ROS darstellen, sind vor allem mitochondriale Proteine, Lipide und die mitochondriale DNA (mtDNA) oxidativen Schäden ausgesetzt. Entsprechend der mitochondrialen Theorie des Alterns (Miquel et al., 1980), führen somatische Mutationen in der mtDNA zu fortschreitendem Energieverlust, der in Seneszenz und Tod der Zellen resultiert (Linnane et al., 1989; Meissner, 2007; Trifunovic et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob die veränderten ROS-Spiegel zu oxidativen Schäden in der mtDNA der SH-SY5Y Zellen geführt haben. Hierfür wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert und ein kleines (220 bp) und ein großes (8.9 kbp) Fragment der mtDNA mittels semiquantitativer PCR amplifiziert (Santos et al., 2002). Das kleine Fragment diente der Normalisierung des mtDNA-Gehalts und das normalisierte Amplifikationsprodukt der vct-Zellen wurde gleich 100% gesetzt (Abb.: 3-14).

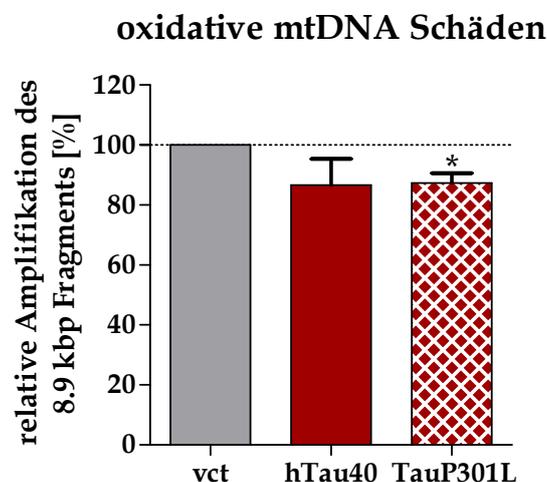


Abb.: 3- 14 Oxidative mtDNA-Schäden führen zu einer verminderten Amplifikation des großen mitochondrialen Fragments

Die genomische DNA wurde aus den Zellen isoliert und mit semiquantitativer PCR die oxidativen Schäden in der mtDNA bestimmt. Das kleine Fragment (mitoSmal = 220bp) diente der Normalisierung des mtDNA-Gehalts, wohingegen die verminderte Amplifikation des großen Fragments (mitoTall = 8,9kb) Aufschluss über oxidative Schäden der mtDNA gab. Das Verhältnis mitoTall/mitoSmal wird kleiner je mehr oxidative mtDNA Schäden vorliegen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Die relative Amplifikation des großen Fragments der mtDNA war in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den vct-Zellen erniedrigt, was auf einen Verlust an intakter mtDNA zurückzuführen war. Die hTau40-Zellen wiesen auch eine Tendenz für vermehrte mtDNA-Schäden auf, was aber aufgrund der niedrigen Versuchszahl nicht signifikant war.

3.1.6 Die Ultrastruktur der Mitochondrien der SY5Y-Zellen

Die Ultrastruktur von Mitochondrien variiert je nach Gewebe, Organismus und dem physiologischen Status der Zelle (REVEL et al., 1963). Hierbei kann die innere mitochondriale Membran eine enorme Vielfalt an Morphologien aufweisen (Munn, 1970). Sehr früh war auch schon bekannt, dass die Verteilung der Atmungskettenkomplexe innerhalb der inneren mitochondrialen Membran von der strukturellen Integrität der Mitochondrien abhängig ist (SCHNEIDER et al., 1951). Neuere Studien haben auch eine veränderte mitochondriale Morphologie bei der Alzheimer Demenz nachgewiesen (Baloyannis, 2006). Eine Untersuchung an transgenen Mäusen konnte auch zeigen, dass TauP301L zu pathologischen ultrastrukturellen Veränderungen von Neuronen führt (Lin et al., 2003). Nachdem im Rahmen dieser Dissertation schon gezeigt werden konnte, dass zum Einen *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien in den TauP301L-Zellen gestört, aber zum Anderen auch funktionelle Parameter, wie ATP- und NO- sowie ROS-Spiegel, MMP und die metabolische Aktivität verändert waren, wurde nun die Ultrastruktur der Mitochondrien anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht (Abb.: 3-15 Seite 106).

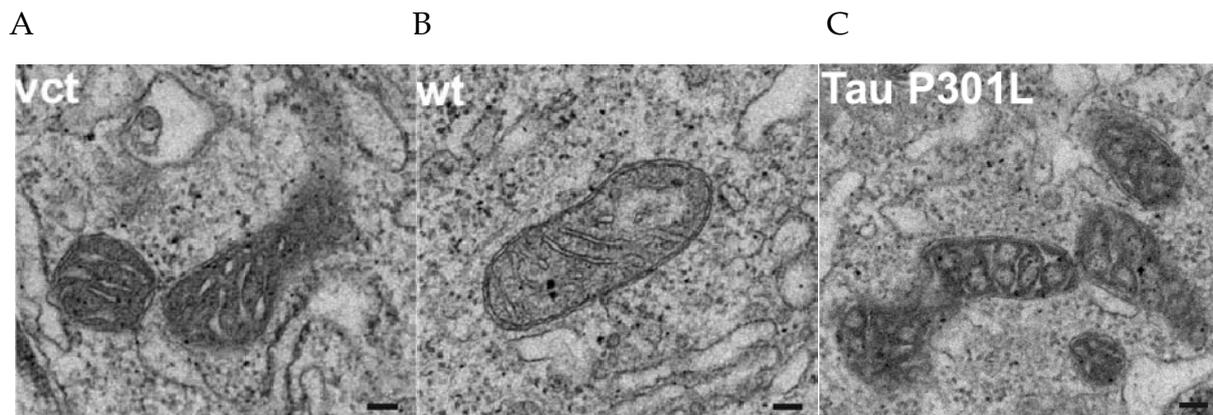


Abb.: 3- 15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mitochondrien der SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und am Elektronenmikroskop untersucht. Dargestellt sind die Mitochondrien der vct- (A), hTau40- (B) und TauP301L-Zellen (C) und der Maßstab entspricht 100 nm

Dargestellt sind drei beispielhafte elektronenmikroskopische Bilder von Mitochondrien der SH-SY5Y Zellen. Da zu wenige Bilder vorlagen, konnte keine stöchiometrische Auswertung über Anzahl und Größe der Mitochondrien gemacht werden. Auffällig war aber, dass sich vor allem die Ultrastruktur der Mitochondrien von den TauP301L-Zellen von den anderen unterschieden hat (Abb.: 3-15 C). Die Cristae-Struktur erschien aufgequollen, sodass die innere Membran kreisartige Gebilde formte. Im Gegensatz dazu bildeten die hTau40-Zellen viel feinere, dünne und fast parallel angeordnete Cristae aus (Abb.: 3-15 B). Die Cristae der vct-Zellen ähnelten mehr den hTau40-Zellen, erschienen aber teilweise auch etwas breiter als diese (Abb.: 3-15 A). Die Matrix der vct- und TauP301L-Zellen schien dunkler zu sein, als die der hTau40-Zellen, wobei dies auch eventuell auf unterschiedliche Schnittebenen zurückzuführen sein könnte. Allerdings korrelierte die Morphologie der Mitochondrien sehr schön mit den ATP-Spiegeln der einzelnen Zelltypen. Die Anordnung der Cristae in den hTau40-Zellen entspricht hohen ATP-Spiegeln und die geschwollenen Cristae und die verdichtete Matrix der TauP301L-Zellen weist optisch auf ein Energiedefizit und hohe ADP-Spiegel hin. Dies lässt sich auch auf die vct-Zellen übertragen.

3.1.7 Effekte des Entkopplers FCCP auf die mitochondriale Funktion

Bisher gibt es keine Untersuchungen, welche Effekte die Überexpression von hTau40 oder TauP301L auf die mitochondrialen Funktion in SH-SY5Y Zellen hat. Daher wurden die Auswirkungen eines Entkopplers der oxidativen Phosphorylierung (FCCP) auf die mitochondriale Funktion in den SH-SY5Y Zellen untersucht. Hierfür wurden die über Nacht angewachsenen Zellen mit verschiedenen FCCP-Konzentrationen [0,1; 1; 2,5; 5 und 10 μM] behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (akut, 3, 6 und 24 Stunden) die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel sowie das mitochondriale Membranpotential gemessen.

3.1.7.1 FCCP führt zeitabhängig zu einer Schädigung der mitochondrialen Funktion

Um die metabolische Aktivität zu bestimmen wurde der MTT-Assay verwendet, der Rückschlüsse auf den Zustand des zellulären Energiehaushaltes ermöglicht. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse nach Inkubation mit 2,5 μM FCCP im Zeitverlauf dargestellt (Abb. 3-16).

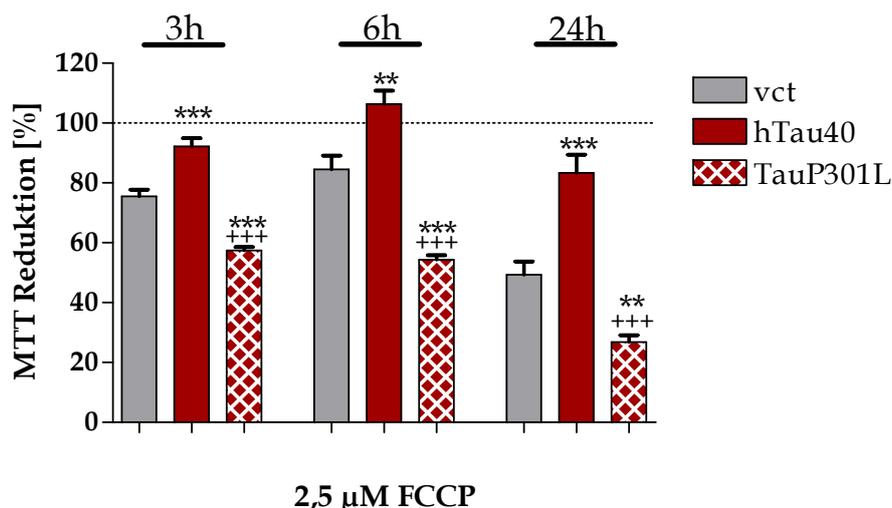


Abb.: 3- 16 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf die metabolische Aktivität

Einfluss von 2,5 μM FCCP auf die metabolische Aktivität der SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; +++ $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L

Die Inkubation mit 2,5 μM FCCP führte in den vct- und TauP301L-Zellen bei allen Zeitpunkten zu einer signifikanten Abnahme der metabolischen Aktivität gegenüber ihrer unstimulierten Kontrolle. Nach 3- und 6-stündiger Inkubation mit 2,5 μM FCCP war diese in den vct-Zellen um etwa 20% und in den TauP301L-Zellen um etwa 44% vermindert. Allerdings kam es nach 6 Stunden zu einer leichten Verbesserung der metabolischen Aktivität im Vergleich zu dem 3-Stunden Wert. Erst nach 24 Stunden kam es zu einem weiteren Abfall der metabolischen Aktivität, sodass die vct-Zellen nur noch 49,34% und die TauP301L-Zellen 26,83% gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die hTau40-Zellen nach kurzer Inkubationsdauer nur geringe Effekte auf die metabolische Aktivität auf. Hier kam es nach 3 Stunden zu einer Abnahme um 7,73% und nach 6 Stunden sogar zu einer tendenziellen Zunahme um 6,3%. Selbst nach einer 24-stündigen Exposition mit 2,5 μM FCCP kam es nur zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität um 16,64%, die allerdings signifikant erniedrigt gegenüber der unstimulierten Kontrolle war.

Es ist bekannt, dass es nach der Entkopplung der Atmungskette von der Phosphorylierung zu einem stark gesteigerten Elektronentransport kommt, was sich in den erniedrigten NADH-Spiegeln (verminderte NADH-Spiegel führen zu einer geringeren MTT-Reduktion) widerspiegelte. Im zeitlichen Verlauf waren die Effekte auf die metabolische Aktivität in allen Zelltypen bei allen getesteten FCCP-Konzentrationen nach 3 Stunden etwas stärker ausgeprägt, als nach 6-stündiger Inkubation. Bei den TauP301L-Zellen allerdings nur bei 0.1 und 1 μM FCCP (Daten nicht gezeigt). Es erfolgte anscheinend eine Art Gegenregulation, die kurzfristig wieder zu einem Anstieg der metabolischen Aktivität führte, aber nach 24 Stunden keine Wirkung mehr zeigte. Insgesamt wiesen die hTau40-Zellen eine signifikant geringere Schädigung nach FCCP-Stimulation gegenüber den vct- und TauP301L-Zellen auf. Die TauP301L-Zellen wiesen zusätzlich noch eine signifikant stärkere Inhibition der metabolischen Aktivität auf, als die vct-Zellen. Somit reagierte der Energiehaushalt der TauP301L-Zellen schon nach kurzer Zeit sehr sensibel auf die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch FCCP.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen auf die ATP-Spiegel der Zellen durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit FCCP untersucht, wobei hier wieder beispielhaft die Ergebnisse von 2,5 μ M FCCP dargestellt sind (Abb. 3-17).

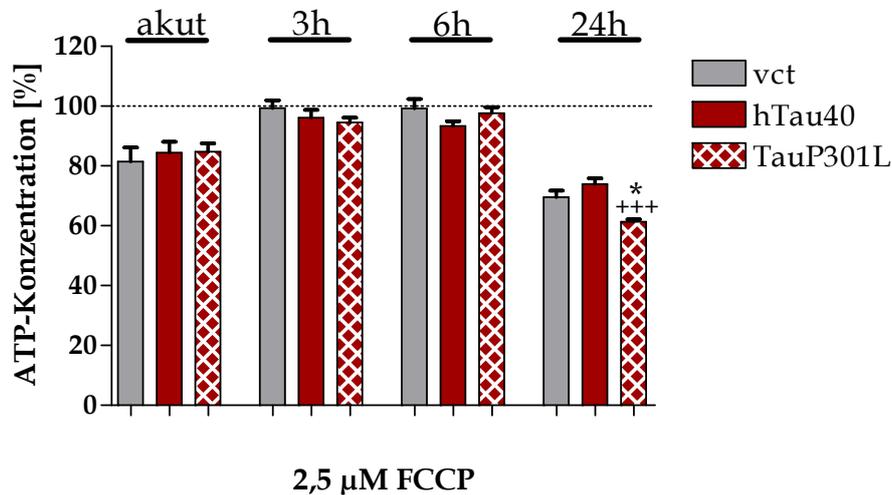


Abb.: 3- 17 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf die ATP-Spiegel

Einfluss von 2,5 μ M FCCP auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; +++ $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Der zeitliche Verlauf zeigte auch hier eine Art Gegenregulation. Nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung kam es akut in allen drei Zelltypen zu einem Abfall der ATP-Spiegel. Dies war bei allen getesteten Konzentrationen bis 0,1 μ M FCCP der Fall (Daten nicht gezeigt). Nach 3 Stunden kam es zu einer Erholung der ATP-Spiegel, die nach 6 Stunden Inkubation mit FCCP in der höchsten Konzentration schon wieder leicht abfielen (Daten nicht gezeigt). Nach 24 Stunden kam es dann in allen Zelltypen zu einer Abnahme der ATP-Spiegel die in TauP301L-Zellen (-38,7%) signifikant stärker ausgeprägt war, als in den vct- (-30,49%) und hTau40-Zellen (-26,07%).

Man kann davon ausgehen, dass die niedrigen Konzentrationen nicht die gesamte oxidative Phosphorylierung aller Mitochondrien der Zelle entkoppelt. Zum Einen versucht die Zelle anscheinend den ATP-Abfall mit einer verstärkten Atmung auszugleichen, was man an den erniedrigten NADH-Spiegeln (MTT-Assay) sieht.

Zum Anderen reagiert die Zelle auf solchen Stress, der einige Mitochondrien schädigt, mit einer erhöhten *Fusion* und Teilung der Mitochondrien. Hierdurch versucht sie intakte mit geschädigten Mitochondrien zu vereinen, um die abgefallenen ATP-Spiegel wieder auf ein normales Niveau anzuheben. Da in den TauP301L-Zellen *Fusion* und *Fission* vermindert ist, könnte dies ein weiterer Grund für den stärkeren ATP-Abfall nach 24 Stunden darstellen.

Zudem wurde noch das mitochondriale Membranpotential nach FCCP-Stimulation bestimmt, wobei auch hier wieder die Ergebnisse der 2,5 μ M-Stimulation gezeigt werden (Abb.: 3-18). Hier wurden Messungen nach 3 und 24 Stunden durchgeführt. Der 3h-Wert wurde gewählt, da dies den erstmöglichen Messpunkt im MTT-Assay darstellt. Auf den 6h-Wert wurde verzichtet, da sich dieser weder im MTT- noch im ATP-Assay von dem 3h-Wert unterschieden hatte. Daher wurde abschließend noch nach 24 Stunden gemessen, da hier in den anderen beiden Assays Veränderungen gesehen worden waren.

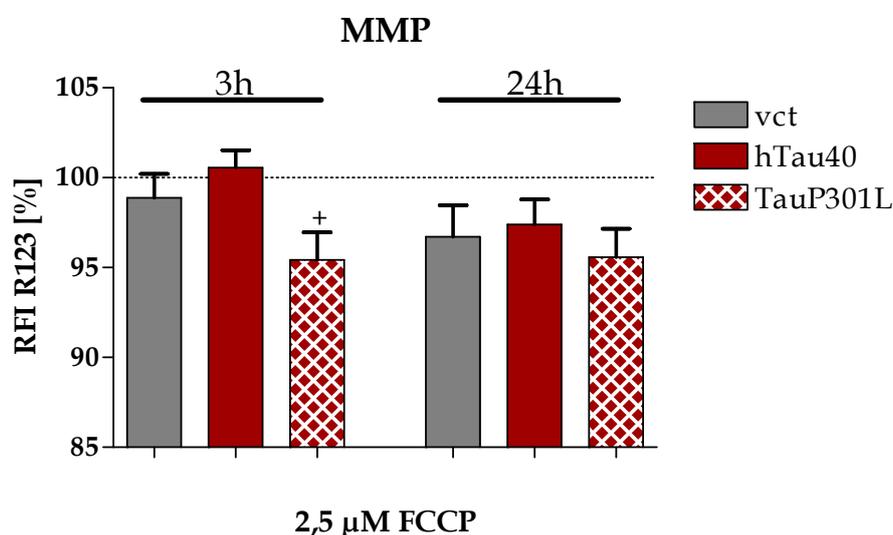


Abb.: 3- 18 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf das MMP

Einfluss von 2,5 μ M FCCP auf das mitochondriale Membranpotential der SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Nach 3 Stunden war eine signifikante Abnahme im mitochondrialen Membranpotential der TauP301L-Zellen im Vergleich mit den hTau40-Zellen messbar. Deren MMP zeigte keine Veränderungen nach kurzfristiger FCCP-Stimulation, wohingegen die vct-Zellen immerhin eine leichte Depolarisation aufwiesen. Diese Ergebnisse passen zu den MTT-Daten. Die TauP301L-Zellen reagieren auf FCCP mit einer stärkeren Abnahme der metabolischen Aktivität, was mit erniedrigten NADH-Spiegeln einher geht. Nachdem die Zellen mit einer erhöhten *Fusion* und Teilung der Mitochondrien auf den Abfall der ATP-Spiegel reagiert haben, was in einem stark gesteigerten Elektronentransport und dadurch erniedrigten NADH-Spiegeln resultiert, führte dies durch die Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung zu einem Rückfluss der Protonen in den Matrixraum. Hierdurch kam es zu einer leichten Depolarisation in den vct-Zellen und einer stärker ausgeprägten Depolarisation in den TauP301L-Zellen. Nach 24 Stunden kam es in allen Zelltypen zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, wobei aber keine Unterschiede mehr detektiert werden konnten.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die zeitabhängigen Effekte und die sich daraus ergebenden Signifikanzen nach Stimulation von 2,5 μM FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP zusammengefasst (Tab.: 3-2 Seite 112).

Zeit	hTau40 (MTT)	P301L (MTT)	hTau40 (ATP)	P301L (ATP)	hTau40 (MMP)	P301L (MMP)
akut	/	/	n.s.	n.s.	/	/
3h	*** +16,70%	*** -18,07% +++ -34,77%	n.s.	n.s.	n.s.	+ -5,13%
6h	** +21,78%	*** -30,22% +++ -52,00%	n.s.	n.s.	/	/
24h	*** +34,02%	** -22,51% +++ -56,53%	n.s.	* -8,20% +++ -12,63%	n.s.	n.s.

Tab.: 3-2 Zusammenfassung der zeitabhängigen Effekte von 2,5 μ M FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP der SY5Y-Zellen

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 6 Einzelerperimenten (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Es ist offensichtlich, dass FCCP einen deutlichen Einfluss auf die metabolische Aktivität der SH-SY5Y Zellen hatte, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß auf die jeweiligen Zelltypen. Dagegen waren Unterschiede zwischen den drei Zelltypen beim MMP nur nach 3 Stunden und auf die ATP-Spiegel nur nach 24 Stunden messbar. In beiden Fällen waren keine Unterschiede zwischen vct- und hTau40-Zellen detektierbar.

3.1.7.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP

Neben den zeitabhängigen Effekten konnte auch eine Konzentrationsabhängigkeit nach FCCP-Stimulation nachgewiesen werden. Da die deutlichsten Effekte nach 24 Stunden auftraten, wird daher die Konzentrationsabhängigkeit auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das mitochondriale Membranpotential

beispielhaft an dieser Inkubationszeit gezeigt (Abb.: 3-19 Seite 112, -20 Seite 113 und -21 Seite 114).

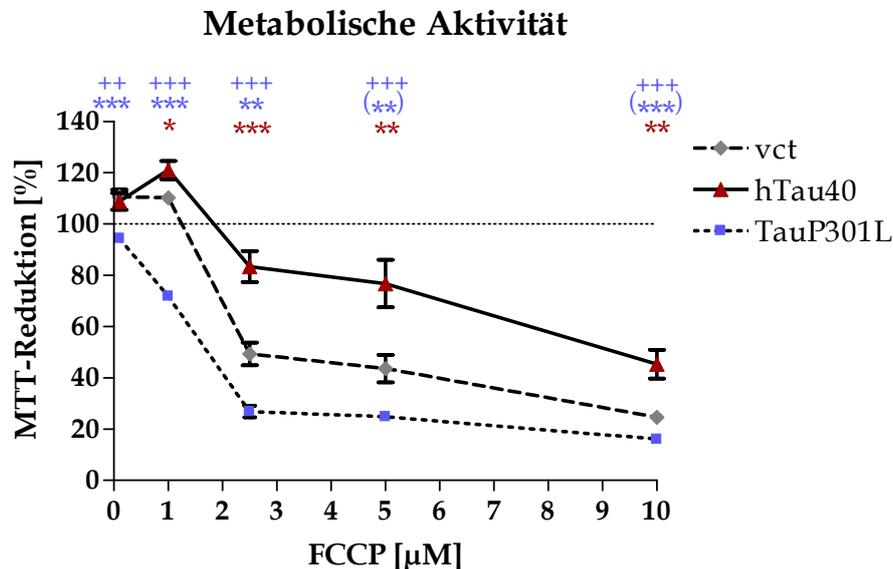


Abb.: 3- 19 Effekte von FCCP auf die metabolische Aktivität nach 24h Inkubation

Der Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit FCCP auf die metabolische Aktivität der vct- (graue Raute), hTau40- (rotes Dreieck) und TauP301L-Zellen (blaues Viereck). Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 und ** $p < 0,01$ vct vs. TauP301L; ++ $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (**) $p < 0,01$ vct vs. TauP301L)

In den TauP301L-Zellen führte schon die niedrigste Konzentration von 0,1 μ M FCCP zu einer signifikanten Abnahme der metabolischen Aktivität, wobei die vct- und hTau40-Zellen im Gegensatz dazu bei 0,1 und 1 μ M sogar eine Zunahme aufwiesen (Abb.: 3-19). Bei 2,5 und 5 μ M FCCP nahm die metabolische Aktivität in den vct-Zellen auf etwa 45%, bei den hTau40-Zellen auf etwa 80% und bei den TauP301L-Zellen auf 25% gegenüber der jeweils unbehandelten Kontrolle ab. Die Inkubation mit 10 μ M FCCP führte noch mal zu einer weiteren Abnahme auf 25% in den vct-Zellen, 45% in den hTau40-Zellen und 16% in den TauP301L-Zellen. Somit reagierte der Energiehaushalt der TauP301L-Zellen bei allen Konzentrationen am empfindlichsten auf die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch FCCP. Die Zunahme der metabolischen Aktivität der vct- und hTau40-Zellen nach

24-stündiger Stimulation mit 0,1 und 1 μM FCCP könnte eine Reaktion auf die Entkopplung der Atmungskette von der Phosphorylierung sein. Bei diesen niedrigen Konzentrationen scheinen die vct- und hTau40-Zellen noch die Möglichkeit zu haben auf den durch die Entkopplung entstandenen verstärkten Elektronentransport mit einer erhöhten NADH-Produktion zu reagieren, um diesen zu ermöglichen. Die TauP301L-Zellen haben basal schon niedrigere NADH-Spiegel und können daher anscheinend auch bei den niedrigen FCCP-Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation dem nicht durch eine Gegenregulation entgegenwirken.

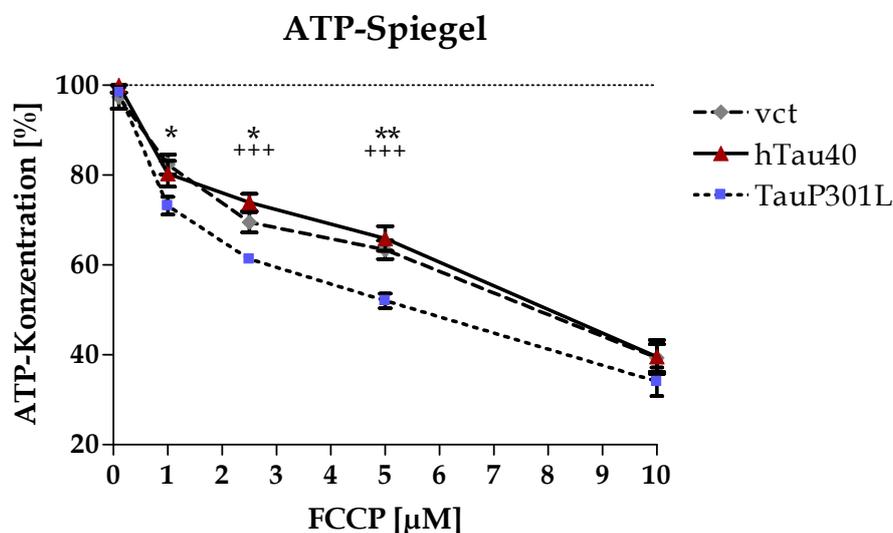


Abb.: 3- 20 Effekte von FCCP auf die ATP-Spiegel nach 24h Inkubation

Der Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit FCCP auf die ATP-Spiegel der vct- (graue Raute), hTau40- (rotes Dreieck) und TauP301L-Zellen (blaues Viereck). Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Ab einer Konzentration von 1 μM FCCP kam es in den SH-SY5Y Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der ATP-Spiegel (Abb.: 3-20). Diese war in den TauP301L-Zellen bei 1, 2,5 und 5 μM signifikant stärker ausgeprägt ($\sim 10\%$), als in den vct- und hTau40-Zellen. Bei 10 μM sanken die ATP-Spiegel in allen drei Zelltypen auf etwa 38% gegenüber der unstimulierten Kontrolle ab, wobei keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten.

Zudem konnten nach Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung keine Unterschiede in der Sensitivität auf die ATP-Spiegel zwischen vct- und hTau40-Zellen festgestellt werden. Nur die TauP301L-Zellen reagierten erneut empfindlicher auf die Stimulation mit FCCP.

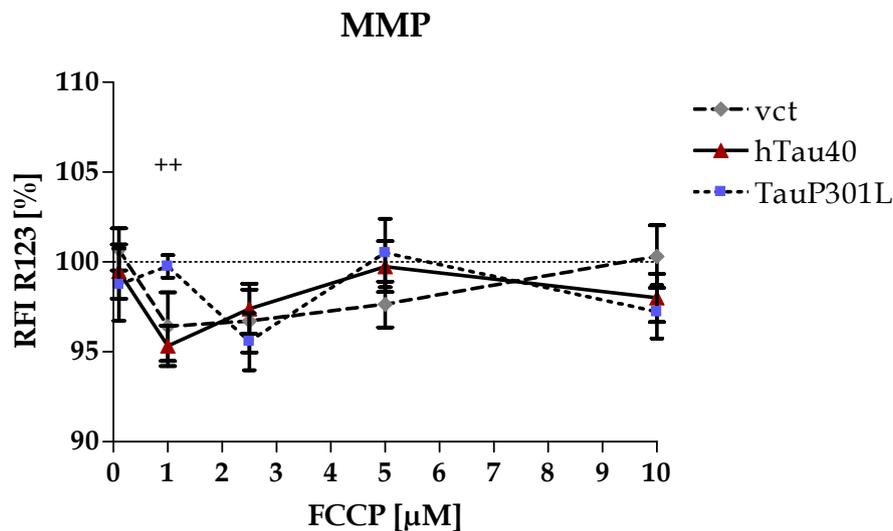


Abb.: 3-21 Effekte von FCCP nach 24-stündiger Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential

Der Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit FCCP auf das MMP der vct- (graue Raute), hTau40- (rotes Dreieck) und TauP301L-Zellen (blaues Viereck). Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*, ** $p < 0,01$ hTau40 vs. TauP301L)

Auf das mitochondriale Membranpotential hatte FCCP nach 24-stündiger Inkubation nur minimale und je nach verwendeter Konzentration recht unterschiedliche Effekte (Abb.: 3-21). Die vct-Zellen zeigten bei 0,1 und 10 μ M keine Effekte auf das MMP und wiesen bei 1, 2,5 und 5 μ M eine Depolarisation von 3-4% gegenüber der unstimulierten Kontrolle auf. Bei den hTau40-Zellen kam es hingegen nur bei 1, 2,5 und 10 μ M zu einer geringen Depolarisation von 2-3%, wobei 1 μ M FCCP zu der stärksten Depolarisation von etwa 5% führte. Die TauP301L-Zellen zeigten dagegen bei den Konzentrationen von 0,1, 2,5 und 10 μ M eine Depolarisation, die bei 2,5 μ M FCCP am deutlichsten mit etwa 4,5% ausgeprägt war. Nur bei der Inkubation mit 1 μ M FCCP konnten nach 24 Stunden Unterschiede zwischen den Zelltypen

festgestellt werden, wobei das MMP der hTau40-Zellen signifikant gegenüber den TauP301L-Zellen erniedrigt war.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die Effekte der unterschiedlichen Konzentrationen von FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das mitochondriale Membranpotential zusammengefasst (Tab.: 3-3).

FCCP	hTau40 (MTT)	P301L (MTT)	hTau40 (ATP)	P301L (ATP)	hTau40 (MMP)	P301L (MMP)
0,1 µM	n.s.	*** -16,21% ++ -14,48%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1 µM	* +10,80%	*** -38,45% +++ -49,24%	n.s.	* -9,17%	n.s.	(++ +4,42%)
2,5 µM	*** +34,02%	** -22,51% +++ -56,53%	n.s.	* -8,20% ++ -12,63%	n.s.	n.s.
5 µM	** +33,17%	(**) -18,81% +++ -51,98%	n.s.	** -11,37% +++ -13,89%	n.s.	n.s.
10 µM	** +20,76%	(***) -8,57% +++ -29,34%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 3-3 Zusammenfassung der Effekte von FCCP nach 24h Inkubation auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP der SY5Y-Zellen

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 6 Einzelerperimenten (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * p < 0,05 vct vs. hTau40 oder TauP301L; ++ p < 0,01 hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (**) p < 0,01 vct vs. TauP301L; (++) p < 0,01 hTau40 vs. TauP301L)

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit FCCP führten alle Konzentrationen zu Veränderungen der metabolischen Aktivität der SH-SY5Y Zellen. Bei den ATP-Spiegel und dem MMP waren keine Unterschiede zwischen vct- und hTau40-Zellen detektierbar, sodass die ATP-Spiegel nur in den TauP301L-Zellen zusätzlich erniedrigt waren.

3.1.7.3 Die Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette führt zu einer Erhöhung der Glykolyserate

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit FCCP kam es zu einer deutlichen Abnahme der ATP-Spiegel. Daher wurde außerdem überprüft, ob die SH-SY5Y Zellen versuchen diesem Energieverlust durch eine erhöhte Glykolyserate entgegenzuwirken (Abb.: 3-22).

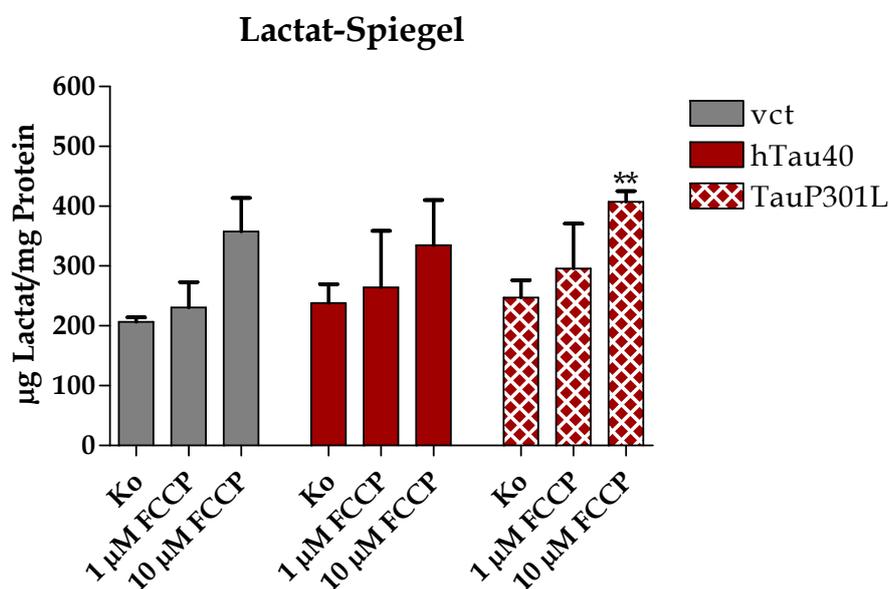


Abb.: 3- 22 Lactat-Spiegel nach 24-stündiger Inkubation mit FCCP

Der Einfluss von 1 und 10 µM FCCP auf die Lactat-Spiegel der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. 10 µM FCCP)

Nach dem 1 µM FCCP auch nur einen 20%-igen Abfall der ATP-Spiegel verursachte, hatte diese Konzentration auch kaum Einfluss auf die Glykolyserate. Die leichte Erhöhung diente wahrscheinlich dem Ausgleich der verbrauchten NADH-Spiegel, um den verstärkten Elektronentransport nach Entkopplung der Atmung durch FCCP auszugleichen. Die Inkubation mit 10 µM FCCP führte hingegen in allen drei Zelltypen zu einer Zunahme der Lactat-Spiegel. Dieser war in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht.

3.1.7.4 Zytotoxische Wirkung von FCCP

Da nach FCCP-Stimulation nicht nur die ATP-Spiegel, sondern auch die metabolische Aktivität stark abgenommen hatte, wurde zusätzlich die zytotoxische Wirkung auf die SH-SY5Y Zellen bestimmt (Abb.: 3-23).

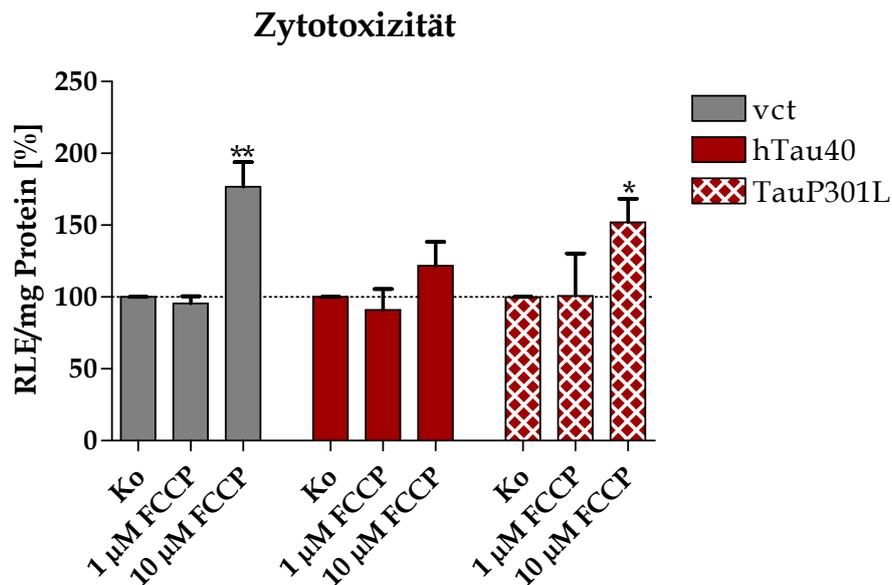


Abb.: 3- 23 Zytotoxizität nach 24h Inkubation mit FCCP

Gezeigt sind die zytotoxischen Effekte von 1 und 10 µM FCCP auf die SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. 10 µM FCCP)

Hier zeigte sich, dass die Stimulation mit 1 µM FCCP für 24 Stunden keinen zytotoxischen Effekt auf die SH-SY5Y Zellen ausübte. Allerdings führte die Inkubation mit 10 µM FCCP zu zytotoxischen Effekten. Diese waren in den vct- und den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht.

Wie sich auch in den anderen Assays gezeigt hatte, waren die SH-SY5Y Zellen in dem gewählten Zeitrahmen für die Versuche bei niedrigen FCCP-Konzentrationen noch in der Lage, die Entkopplung der Atmung zu tragen. Einzig die TauP301L-Zellen wiesen schon ab 2,5 µM FCCP eine zusätzliche mitochondriale Dysfunktion auf. Ab höheren Konzentrationen führte die Entkopplung der Atmung von der

Phosphorylierung auch in den vct- und den hTau40-Zellen zu einer deutlichen Schädigung der mitochondrialen Funktion.

3.2 Untersuchung der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus mehreren hintereinander geschalteten Enzymkomplexen mit redoxaktiven und prosthetischen Gruppen. Hier werden aus der Glykolyse, dem Fettsäureabbau und dem Citratzyklus stammende Elektronen vom NADH oder FADH₂ auf molekularen Sauerstoff übertragen. Während des Elektronentransportes werden gleichzeitig H⁺ von der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Dies erzeugt einen elektrochemischen Gradienten der zum Einen für das stark negative Membranpotential (elektrisches Potential) und zum Anderen für den Protonengradienten (chemisches Potential) verantwortlich ist. Dieser treibt dann nach der chemiosmotischen Theorie von Mitchell die ATP-Synthese an. Es gibt Hinweise, dass es im Alter und bei neurodegenerativen Erkrankungen zu einer verminderten Aktivität von einzelnen Atmungskettenkomplexen kommt. Bei der Alzheimer Demenz wurde eine verminderte Komplex IV-Aktivität (Chagnon et al., 1995) und bei Parkinson Patienten eine reduzierte Komplex I-Aktivität nachgewiesen (Mann et al., 1992; Mizuno et al., 1989). Außerdem gibt es Daten die zeigen, dass bei Huntington die Aktivitäten von Komplex I und II verändert sind (Parker, Jr. et al., 1990).

Studien an transgenen Mäusen mit der P301L-Mutation konnten Veränderungen in der Expression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, Unterschiede in der Komplexaktivität sowie Abweichungen beim MMP nach Inhibition mit Komplexinhibitoren nachweisen (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurden diese Faktoren auch in den SH-SY5Y Zellen näher untersucht. Alle Versuche zu den ATP-Spiegeln, dem MMP sowie der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit Komplexinhibitoren wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen und nach 1- und 24-stündiger Inkubationszeit durchgeführt. Der

Übersicht halber wird hier nur eine Konzentration des jeweiligen Komplexinhibitors nach 24-stündiger Inkubation dargestellt und diskutiert.

3.2.1 Hemmung der Komplexe führt nur teilweise zur Steigerung der Glykolyserate

Da nach Hemmung der verschiedenen Atmungskettenkomplexe Effekte auf die ATP-Spiegel zu erwarten waren, wurde deren Einfluss auf die Glykolyserate überprüft. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit den verschiedenen Komplexinhibitoren inkubiert, anschließend die Lactat-Spiegel aus dem Medium bestimmt und auf den Proteingehalt normiert (Abb.: 3-24 Seite 121). Für die Inhibierung von Komplex I wurde 10 μM Rotenon, für Komplex II 50 μM Thenoyltrifluoroacetone (TTFA), für Komplex III 10 μM Antimycin und für Komplex V 10 μM Oligomycin verwendet. Da Natriumazid mit dem Lactat-Assay interagiert, konnte der Effekt nach Komplex IV-Inhibierung nicht gemessen werden.

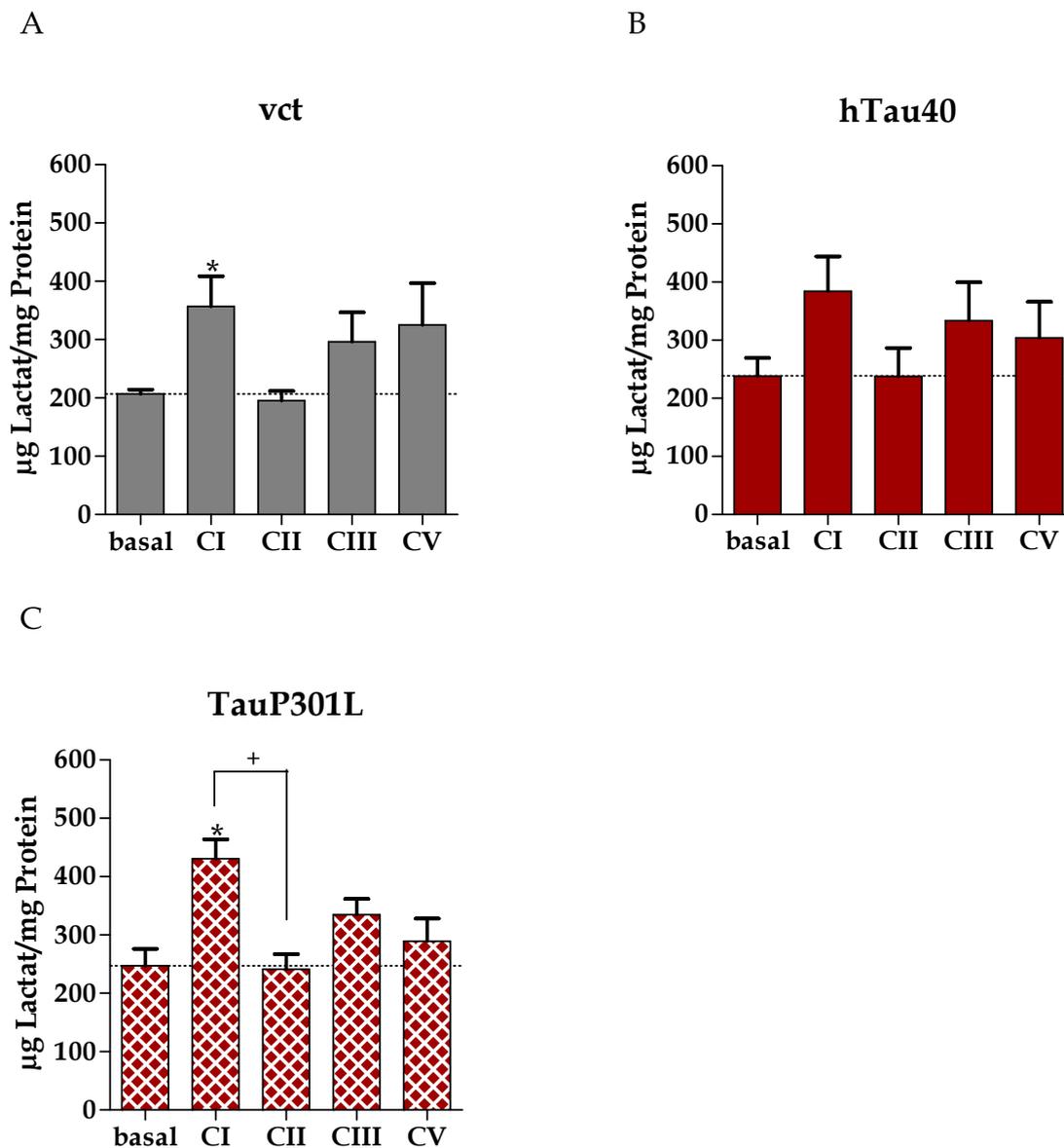


Abb.: 3- 24 Lactat-Spiegel nach 24h Inkubation mit verschiedenen Komplex-Inhibitoren

Veränderte Lactat-Spiegel nach Inhibierung von Komplex I (10 µM Rotenon), II (50 µM TTFA), III (10 µM Antimycin) und V (10 µM Oligomycin) in den vct- (A), hTau40- (B) und TauP301L-Zellen (C). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten normiert auf den Proteingehalt (Unpaired *t* test, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. 10 µM Rotenon; One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test, + $p < 0,05$ Komplexinhibitor vs. Komplexinhibitor)

Die Hemmung von Komplex II durch TTFA führte in den SH-SY5Y Zellen nicht zu einer veränderten Lactat-Produktion. Nach der Inhibierung von Komplex I, III und Komplex V wiesen alle drei Zelltypen eine tendenzielle Zunahme der Lactat-Spiegel auf. Allerdings führte nur die Hemmung von Komplex I durch Rotenon in den vct- und TauP301L-Zellen zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der unstimulierten

Kontrolle (Abb.: 3-24 A, C). Die Lactat-Spiegel waren in den TauP301L-Zellen nach Komplex I-Hemmung sogar auch signifikant höher, als nach Inhibierung von Komplex II. Insgesamt führte die Hemmung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe in den SH-SY5Y Zellen zu ähnlichen Effekten auf die Glykolyserate.

3.2.2 Zytotoxische Wirkung von Komplexinhibitoren

Des Weiteren wurde das Ausmaß der Zytotoxizität der verschiedenen Komplexinhibitoren auf die SH-SY5Y Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen wieder über 24 Stunden mit 10 μ M Rotenon (Komplex I), 50 μ M TTFA (Komplex II), 10 μ M Antimycin (Komplex III), 10 mM Natriumazid (Komplex IV) oder 10 μ M Oligomycin (Komplex V) inkubiert und die Freisetzung der Adenylatkinase aus den Zellen mit dem ToxiLight-Assay durch Biolumineszenz bestimmt (Abb.: 3-25 Seite 123).

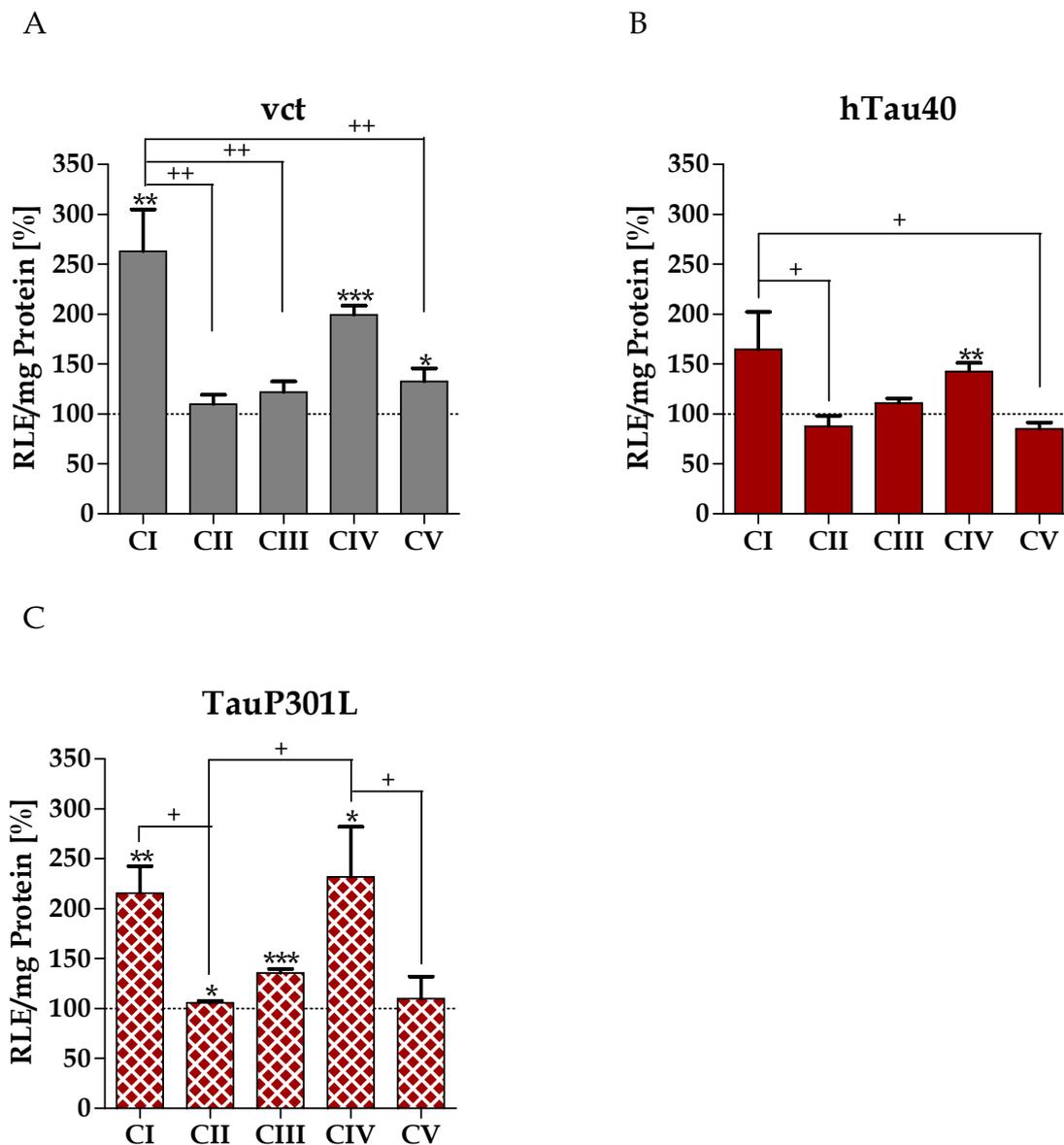


Abb.: 3- 25 Zytotoxizität nach 24h Inkubation mit Komplex-Inhibitoren

Die Inhibierung von Komplex I (10 μ M Rotenon), II (50 μ M TTFA), III (10 μ M Antimycin), IV (10 mM NaN_3) und V (10 μ M Oligomycin) hat unterschiedliche zytotoxische Auswirkungen auf die vct- (A), hTau40- (B) und TauP301L-Zellen (C). Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten normiert auf den Proteingehalt, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. Komplexinhibitor; *One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, + $p < 0,05$ Komplexinhibitor vs. Komplexinhibitor)

Die Inhibierung von Komplex I, IV und V führte in den vct-Zellen zu einer erhöhten Zytotoxizität gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb.: 3-25 A). Wenn die einzelnen Komplexinhibitoren untereinander verglichen wurden, war die

Zytotoxizität von Rotenon signifikant stärker ausgeprägt, als nach Stimulation mit TTFA, Antimycin oder Oligomycin. Bei den hTau40-Zellen führte nur die Stimulierung mit Natriumazid zu einer signifikant erhöhten Zytotoxizität gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb. 3-25 B). Die Inkubation mit TTFA und Oligomycin wirkte sogar minimal protektiv, sodass nach Inhibierung von Komplex II und V die Zytotoxizität signifikant niedriger war, als nach Rotenon-Stimulation. Im Gegensatz dazu erhöhten alle Komplexinhibitoren bis auf Oligomycin die Zytotoxizität gegenüber der unstimulierten Kontrolle in den TauP301L-Zellen (Abb.: 3-25 C). Vergleicht man hier die zytotoxischen Effekte der einzelnen Komplexinhibitoren miteinander, so war der Effekt nach Natriumazid-Inhibierung signifikant stärker, als nach Inkubation mit TTFA und Oligomycin. Auch die Hemmung von Rotenon wirkte zytotoxischer auf die TauP301L-Zellen, als die Hemmung durch TTFA.

3.2.3 Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase)

Komplex I ist aus 42-43 verschiedenen Polypeptiden aufgebaut, die unter anderem Eisen-Sulfat-Zentren und ein FMN-haltiges Flavoprotein als prosthetische Gruppe beinhalten (Hatefi, 1985; Hinchliffe et al., 2005). Er ist L-förmig aufgebaut und besitzt einen langen hydrophilem Arm, der in die Membran integriert ist, und einen kurzen Arm mit hydrophobem Anteil, der in die Matrix ragt. Dieser enthält das flavinhaltige Nukleotid (FMN) und das aktive NADH-Zentrum (Friedrich et al., 2004). Komplex I reduziert NADH, das vor allem aus dem Citratzyklus stammt, und pro oxidiertem $\text{NADH} + \text{H}^+$ werden netto vier Protonen in den Intermembranraum transportiert. Bei dem Elektronentransfer von FMNH_2 auf Ubichinon entstehen auch häufig reaktive Sauerstoffspezies (Zickermann et al., 2008).

3.2.3.1 Hemmung von Komplex I durch Rotenon

Rotenon ist ein spezifischer Inhibitor von Komplex I (Chance et al., 1963). Außerdem wird das Pestizid auch eingesetzt, um das Komplex I-Defizit bei Parkinson in verschiedensten Modellen nachzustellen (Panov et al., 2005; Sherer et al., 2007; Testa et al., 2005). Außerdem konnte an isolierten Mitochondrien von 12 Monate alten transgenen P301L-Mäusen nach akuter Gabe von Rotenon eine signifikant verminderte Depolarisation detektiert werden (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurde nun geschaut, welchen Einfluss die 24-stündige Inkubation von 10 μ M Rotenon auf die ATP- und Lactat-Spiegel, das MMP (Abb.: 3-26 Seite 126) sowie die Viabilität der SH-SY5Y Zellen hat (Abb.: 3-27 Seite 127).

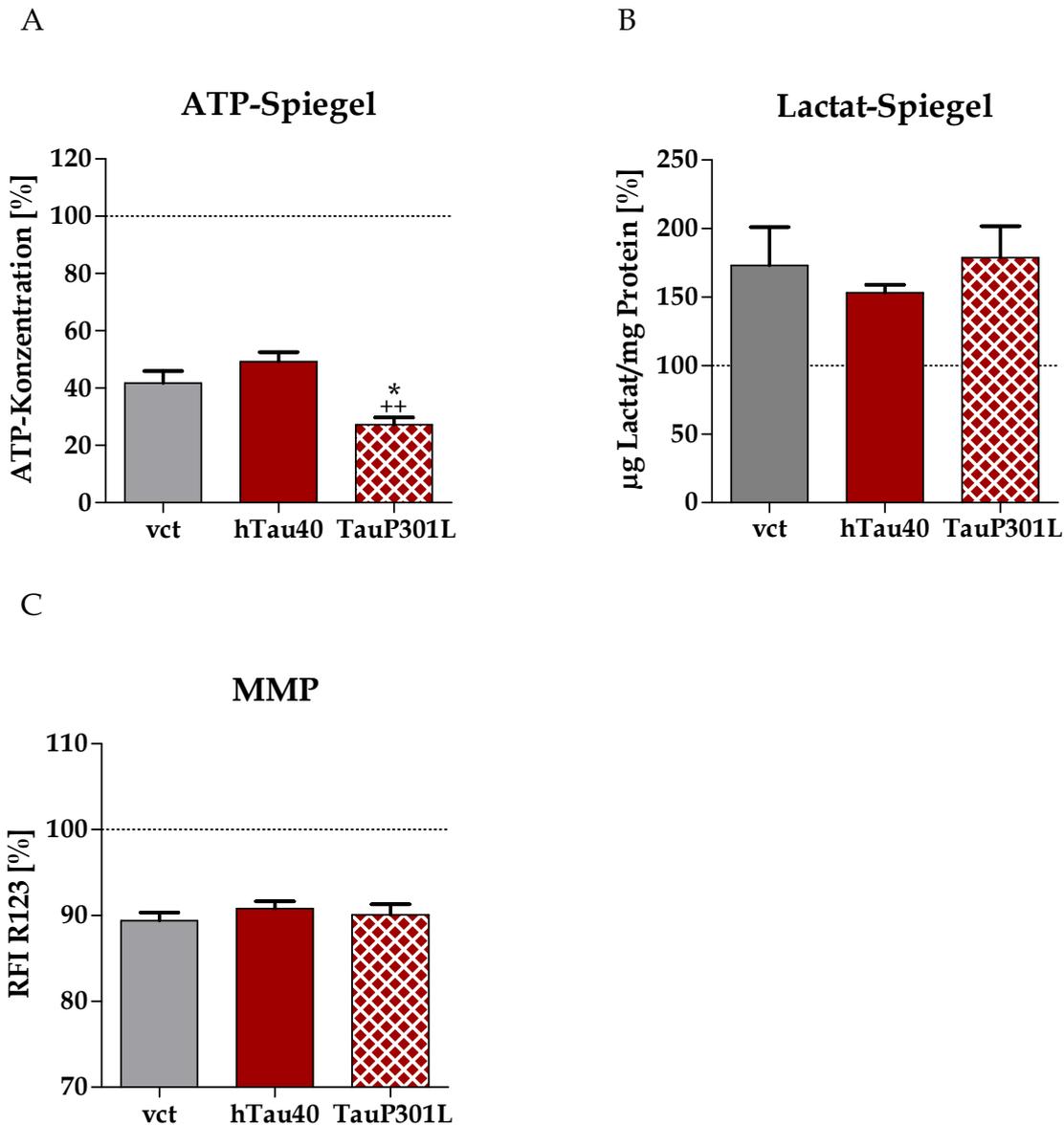


Abb.: 3-26 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 µM Rotenon für 24h

Effekte von 10 µM Rotenon nach 24-stündiger Inkubation auf die ATP- (A) und Lactat-Spiegel (B) sowie auf das MMP (C) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A), 3 (B) und 6 (C) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L und ** $p < 0,01$ hTau40 vs. TauP301L)

Die Hemmung von Komplex I führte in den SH-SY5Y Zellen zu einem drastischen Abfall der ATP-Spiegel. Dieser war in den TauP301L-Zellen um etwa 18% stärker ausgeprägt, als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-26 A). Dem entsprechend kam es in allen drei Zelltypen zu einem Anstieg der Lactat-Spiegel, wobei hier aber

keine Unterschiede messbar waren (Abb.: 3-26 B). Ebenso kam es zu einem etwa 10%-igen Abfall des Membranpotentials in den SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-26 C).

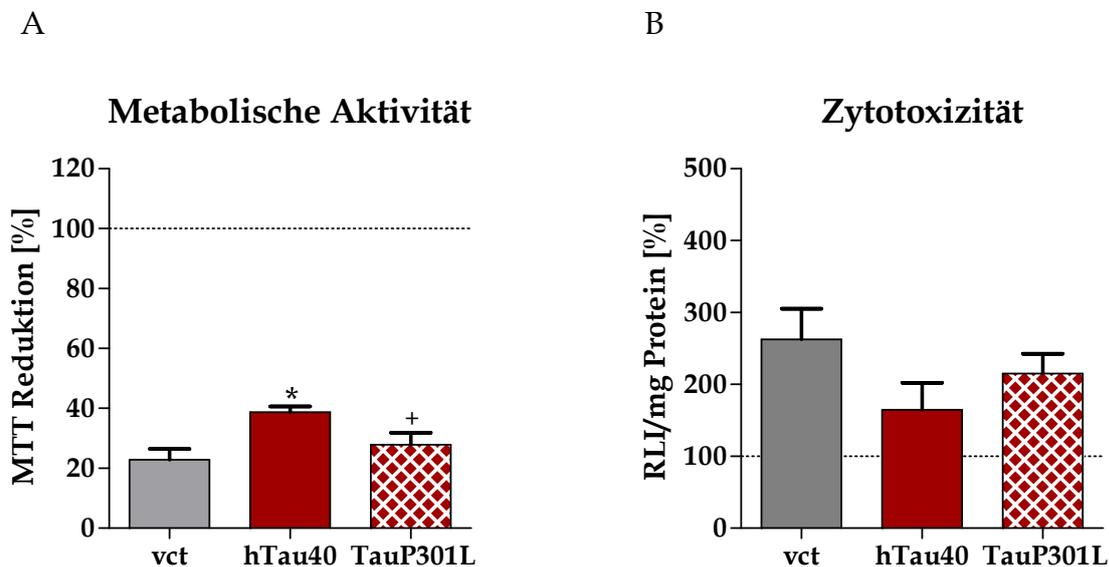


Abb.: 3- 27 Viabilität nach Rotenon-Inkubation

Effekte von 10 μ M Rotenon nach 24-stündiger Inkubation auf die metabolische Aktivität (A) und Zytotoxizität (B) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40, + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Die metabolische Aktivität nahm nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μ M Rotenon sehr stark ab, wobei die Abnahme in hTau40-Zellen signifikant geringer ausfiel, als in den vct- und TauP301L-Zellen (Abb.: 3-27 A). Die vct-Zellen wiesen nur noch 22,88%, die hTau40-Zellen noch 38,79% und die TauP301L-Zellen noch 27,84% der metabolischen Aktivität im Vergleich zur jeweils unstimulierten Kontrolle auf. Dem entsprechend kam es in allen drei Zelltypen zu einer erhöhten Zytotoxizität, die tendenziell in den hTau40-Zellen am geringsten ausgeprägt war (Abb.: 3-27 B). Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der Toxizität von Rotenon auf die drei Zelltypen gemessen werden.

3.2.3.2 Expression der 20 kDa-Untereinheit

Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte in den TauP301L-Mäusen eine Runterregulierung der 30 kDa Untereinheit der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase nachgewiesen werden (David et al., 2005b). Da es methodisch nicht möglich war die Expression derselben Untereinheit in den SH-SY5Y Zellen zu überprüfen, wurde mit einem Antikörpercocktail, der jeweils gegen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe gerichtet ist, die Expression der 20 kDa-Untereinheit von Komplex I im Westernblot überprüft (Abb.: 3-28).

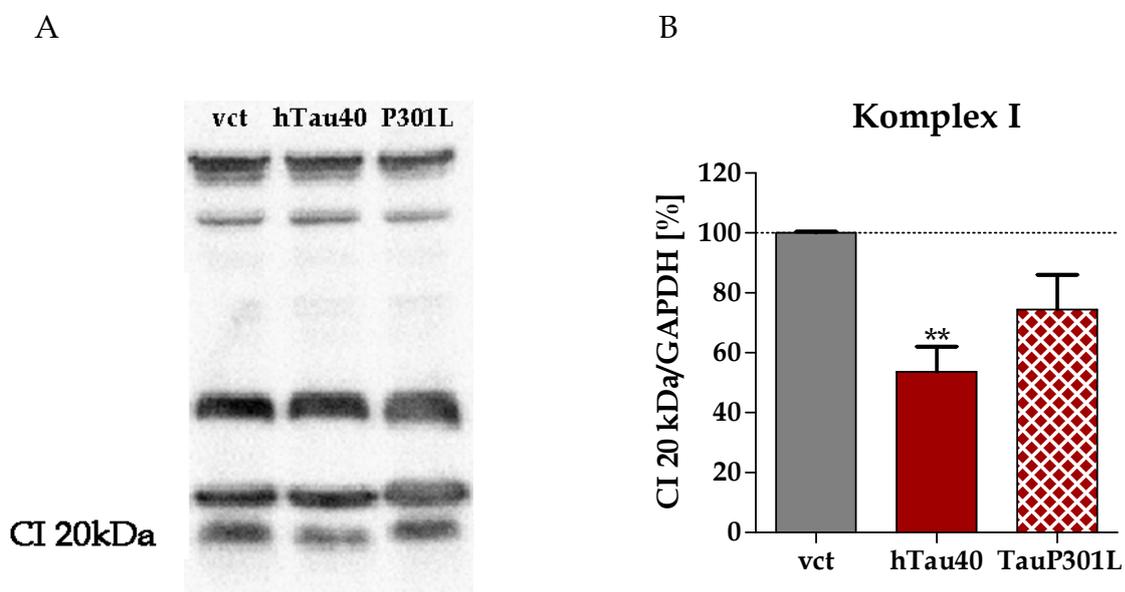


Abb.: 3- 28 Veränderte Expression der 20 kDa-Untereinheit von Komplex I in den SY5Y-Zellen

Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der 20 kDa-Untereinheit von Komplex I. Dargestellt ist eine beispielhafte SDS-Page (A) und die Auswertung (B) der prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten, normiert auf GAPDH (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. hTau40)

Hier zeigte sich, dass die 20 kDa-Untereinheit in den TauP301L-Zellen nur tendenziell, aber nicht signifikant vermindert exprimiert wurde (Abb.: 3-28 B). Im Gegensatz dazu wiesen die hTau40-Zellen nur eine etwa 50%-tige Expression der Komplex I-Untereinheit im Vergleich zu den vct-Zellen auf.

3.2.3.3 Veränderte Komplex I-Aktivität

Da die TauP301L-Zellen nach Inhibition mit Rotenon einen stärkeren Abfall der ATP-Spiegel aufwiesen, die metabolische Aktivität in den hTau40-Zellen nach Inhibierung von Komplex I nicht so stark abgenommen hatte wie in den anderen Zellen und zusätzlich die Expression der 20 kDa-Untereinheit von Komplex I vermindert war, wurde die Komplex I-Aktivität in den SH-SY5Y Zellen von Virginie Rhein bestimmt (Abb.: 3-29 Seite 130). Außerdem ist bereits bekannt, dass die Mitochondrien der TauP301L-Mäuse eine signifikant geringere Komplex I-Aktivität (DBQ/HAR) aufweisen, wohingegen sich der Gehalt an intaktem Komplex I (NADH:HAR) nicht unterscheidet ((David et al., 2005a); Dissertation Susanne Kirr, 2008).

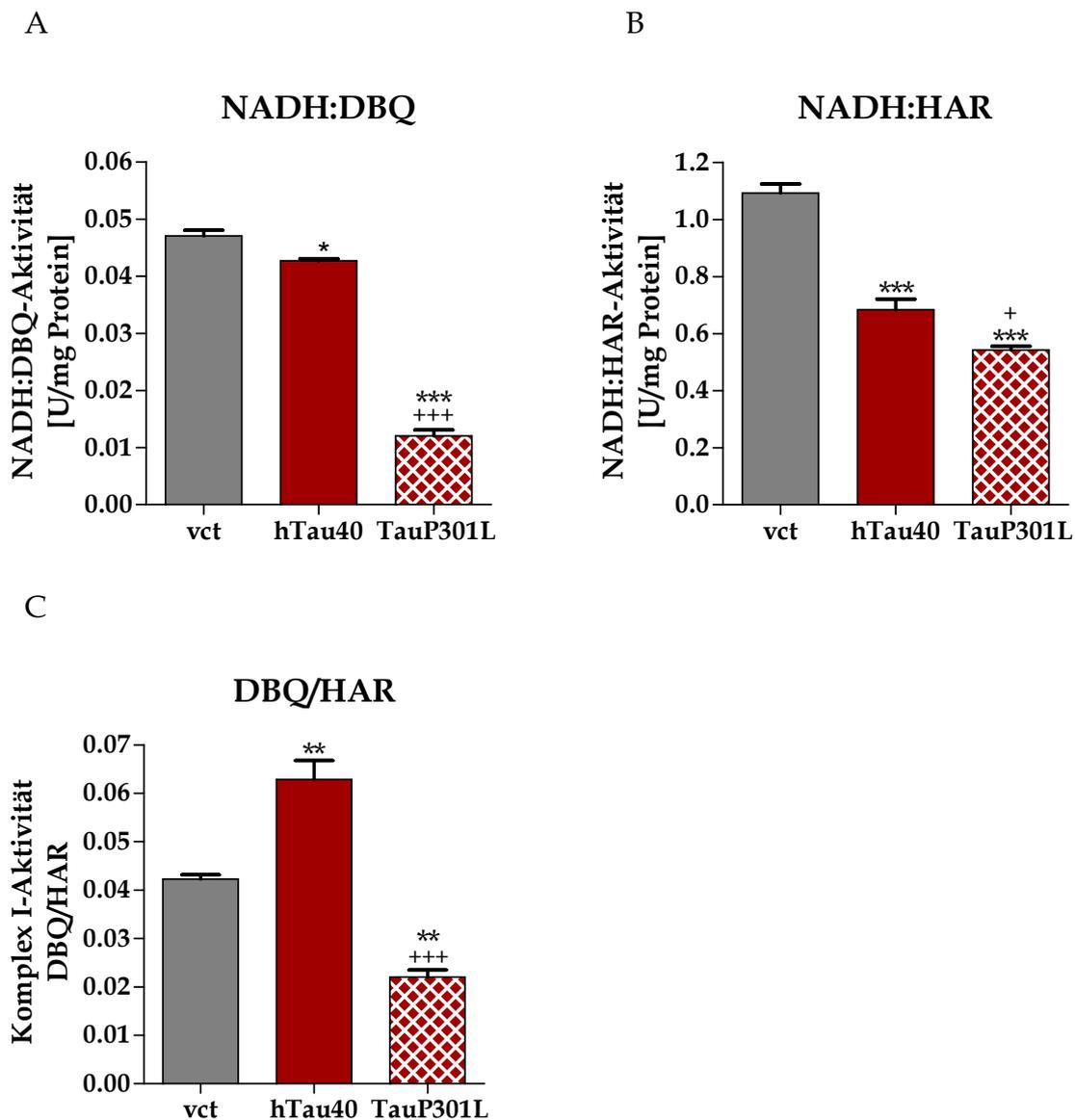


Abb.: 3- 29 Veränderter Komplex I-Gehalt und DBQ:HAR-Aktivitäten

Die NADH:DBQ-Messung (A) gibt Aufschluss über die Aktivität von Komplex I und die NADH:HAR-Messung (B) wiederum über die Menge an intaktem Komplex I in der Präparation. Die Ratio DBQ/HAR (C) ergibt dann das Resultat der Aktivität bezogen auf den Gehalt an funktionierendem Komplex I. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

In den SH-SY5Y Zellen unterschied sich die NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (NADH:DBQ)-Aktivität, wobei die vct-Zellen signifikant höhere Aktivität aufwiesen, als die hTau40- und TauP301L-Zellen (Abb.: 3-29 A). In den TauP301L-Zellen war die NADH:DBQ-Aktivität sogar noch deutlich geringer ausgeprägt. Die hTau40-Zellen wiesen etwa 10% weniger NADH:DBQ-Aktivität im Vergleich zu den vct-Zellen auf

und die TauP301L-Zellen kamen insgesamt nur auf 25% der Aktivität der vct-Zellen. Im Gegensatz zu den P301L-Mäusen unterschied sich aber auch die NADH:hexaammineruthenium (III)-chloride (NADH:HAR)-Aktivitäten in den SH-SY5Y Zellen (Abb. 3-29 B). Die Bestimmung der NADH:HAR-Aktivität dient zur Quantifizierung des Komplex I-Gehaltes der Mitochondrien-Präparation. Da schon die Expression in den hTau40-Zellen stark vermindert war (Abschnitt: 3.2.3.2) ist es nicht erstaunlich, dass die NADH-HAR-Aktivität um fast 40% niedriger lag, als in den vct-Zellen. Allerdings wiesen die TauP301L-Zellen auch eine um 50% verminderte NADH-HAR-Aktivität auf, wobei die Expression hier nur tendenziell vermindert war. Dem zufolge unterschied sich der Gehalt an intaktem Komplex I der SH-SY5Y Zellen. Die Normalisierung der Komplex I-Aktivität mit dem Komplex I-Gehalt (DBQ/HAR) ergab, dass die Überexpression von hTau40 zu einer erhöhten Komplex I-Aktivität führte (Abb. 3-29 C). Diese führte zu einer etwa 50%-igen Erhöhung der Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die TauP301L-Zellen durch einen funktionellen Defekt der Komplex I-Aktivität gekennzeichnet waren. Dieser spiegelte sich in einer Reduktion der Aktivität um knapp 50% wider.

Häufig werden die Aktivitäten der einzelnen Komplexe auch auf die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) normiert (Aleari et al., 2005; Fukui et al., 2007; Letellier et al., 2000). Diese weist im Alter (Yarian et al., 2006), ebenso wie nach Aß-Stress (Aleari et al., 2005; Canevari et al., 1999; Casley et al., 2002) keine Veränderungen in der Aktivität auf. Obwohl Aß keinen Einfluss auf die Citrat-Synthase hat, wurde in postmortem Hirngewebe von Alzheimer Patienten eine erniedrigte CS-Aktivität nachgewiesen (Kish et al., 1999). Allerdings gibt es auch eine Studie, die eine unveränderte CS-Aktivität bei AD zeigte (Bubber et al., 2005a). Um zu überprüfen, ob hierfür die Tau-Pathologie der Alzheimer Demenz verantwortlich ist und um die Aktivitäten der Komplexe laut Literatur zu normieren, wurde die Aktivität der Citrat-Synthase in den SH-SY5Y Zellen von Virginie Rhein bestimmt. Zusätzlich wurde diese dann auf die Aktivität von Komplex I (NADH:DBQ) bezogen (Abb.: 3-30 Seite 132).

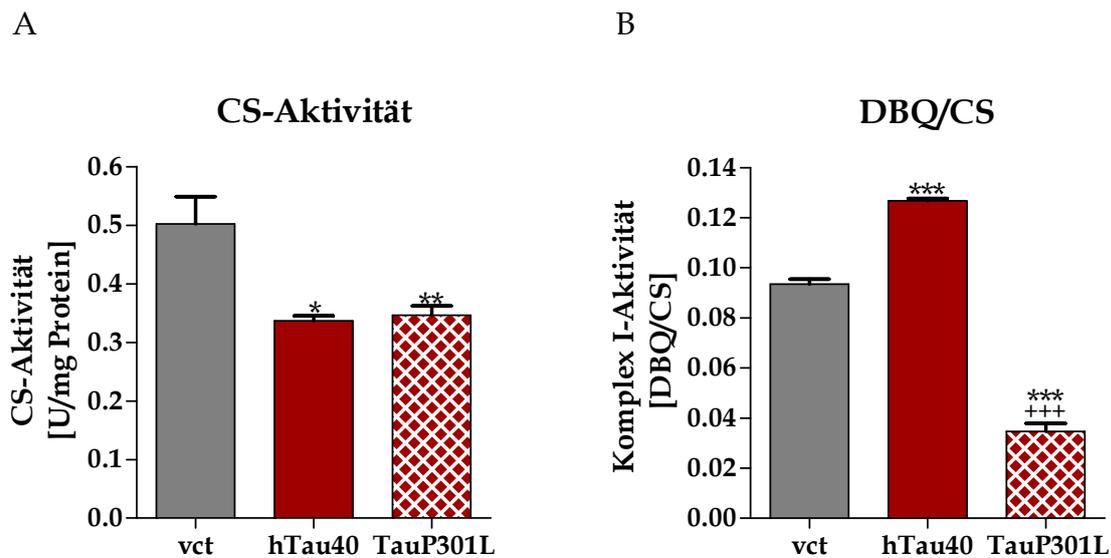


Abb.: 3-30 Veränderte Komplex I-Aktivität bezogen auf die Citratsynthase-Aktivität

In der Literatur wird die Komplexaktivität neben der Proteinnormierung auch auf die Aktivität der Citrat-Synthase (A) normalisiert. Die Normalisierung von NADH:DBQ auf die CS-Aktivität (B) führt zu demselben Ergebnis wie DBQ/HAR. Dieses würde sich ebenfalls durch eine Normierung von NADH:DBQ auf die Expression der 20-kDa Untereinheit von Komplex I (siehe Abb.: 3-28 Seite 127) ergeben (Daten nicht gezeigt). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelerperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Interessanterweise war die Aktivität der Citrat-Synthase in den hTau40- und TauP301L-Zellen signifikant um etwa 30% erniedrigt (Abb.: 3-30 A). Das führte dazu, dass bezogen auf die Komplex I-Aktivität die Unterschiede zwischen den drei Zelltypen nicht mehr ganz so stark ausgeprägt waren, obwohl die Differenzen hochsignifikant waren (Abb.: 3-30 B). Die Komplexaktivität war in den hTau40-Zellen um 35% erhöht gegenüber den vct-Zellen und die TauP301L-Zellen wiesen insgesamt nur noch eine Aktivität von etwa 37% auf.

Durch die Bestimmung der CS-Aktivität konnte mit zwei unterschiedlichen Validierungsmethoden die veränderte Komplex I-Aktivität in den SH-SY5Y Zellen nachgewiesen werden.

3.2.4 Komplex II (Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase)

Komplex II ist zum Einen eine membrangebundene Komponente des Citratzyklus (Succinat Dehydrogenase) die Succinat zu Fumarat umwandelt und zum Anderen in der mitochondrialen Atmungskette involviert. Das integrale Protein hat FAD kovalent gebunden (prosthetische Gruppe) und mehrere Eisen-Sulfat-Cluster, die den Elektronentransport zu Ubichinon und Häm *b* katalysieren (Cecchini, 2003). Allerdings werden hier nicht wie bei Komplex I, III und IV Protonen in den Intermembranraum gepumpt.

3.2.4.1 Inhibition durch TTFA

Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) ist ein klassischer Inhibitor der Reduktion von Ubichinon an Komplex II, indem es die Bindungsstelle für Ubichinon besetzt (Sun et al., 2005). Die Inhibition mit TTFA hat in P301L-Mäusen zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials geführt, wobei keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und P301L-Mäusen detektiert werden konnten (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurde nun überprüft, welchen Einfluss die 24-stündige Inkubation mit TTFA auf die ATP- und Lactat-Spiegel und das MMP (Abb.: 3-31 Seite 134) sowie die metabolische Aktivität und Zytotoxizität (Abb.: 3-32 Seite 135) der SH-SY5Y Zellen hat.

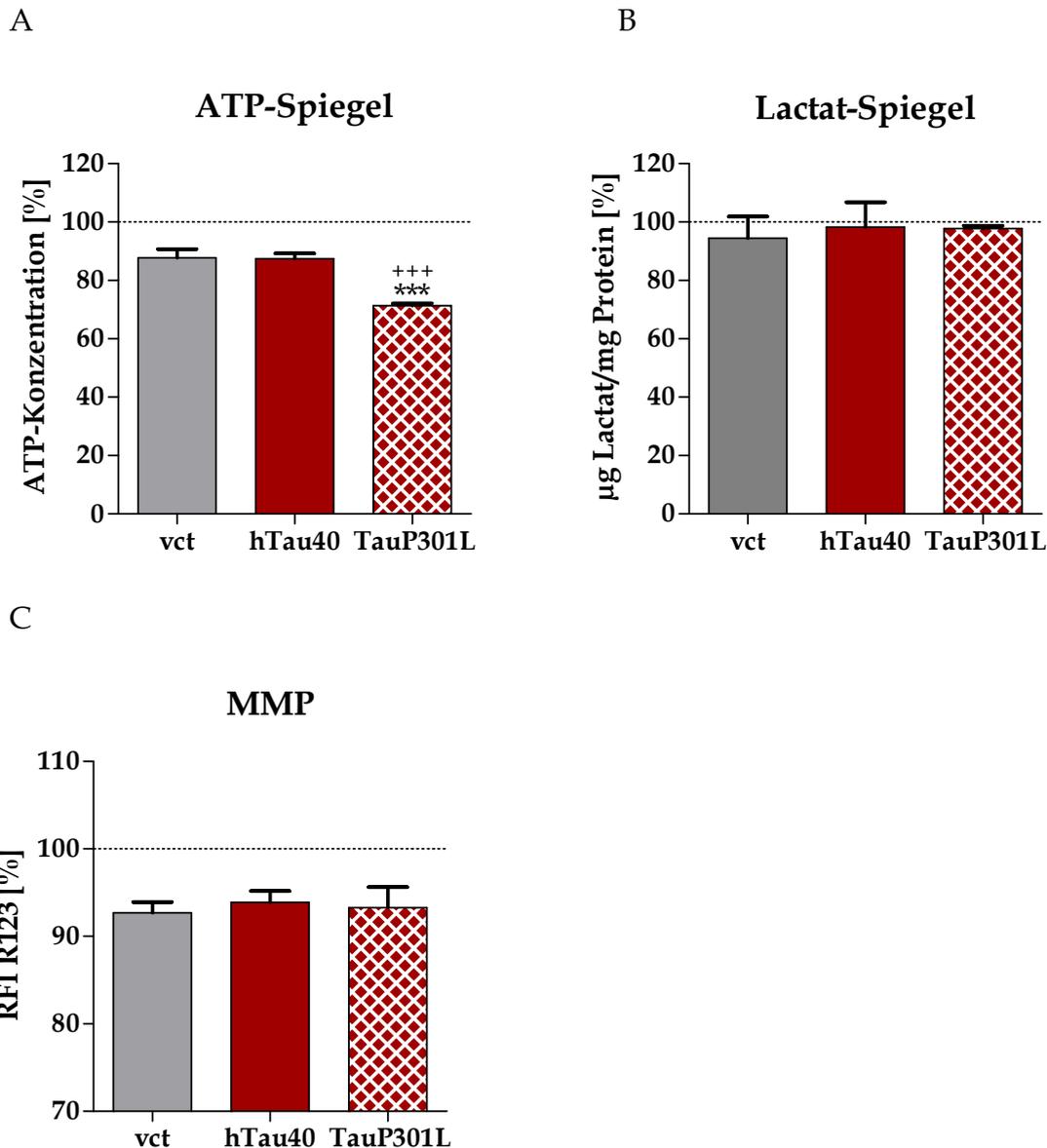


Abb.: 3-31 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit TTFA für 24h

Effekte von 5 µM TTFA auf die ATP-Spiegel (A) und von 50 µM TTFA auf die Lactat-Spiegel (B) sowie auf das MMP (C) der SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 (A, C) und 3 (B) Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, *** $p < 0,001$ vct vs. hTau40; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Die Inhibierung von Komplex II mit 5 µM TTFA führte in den TauP301L-Zellen zu einer signifikant stärkeren Abnahme der ATP-Spiegel im Vergleich zu den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-31 A). Da die ATP-Spiegel häufig sehr sensitiv auf Stressoren reagieren, wurde hier die niedrigere Konzentration dargestellt. Der ATP-Abfall

betrug in den vct-Zellen 12,29%, in den hTau40-Zellen 12,6% und in den TauP301L-Zellen 28,64%, gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle. Dem gegenüber hatte die Inkubation mit 50 μ M TTFA keinen Einfluss auf die Glykolyserate, da keine Veränderungen in den Lactat-Spiegeln detektiert werden konnten (Abb.: 3-31 B). Allerdings kam es in allen Zelltypen zu einem ähnlichen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials um 6-7% (Abb.: 3-31 C). Das keine Unterschiede im MMP gemessen werden konnten, entspricht den Daten aus den P301L-Mäusen.

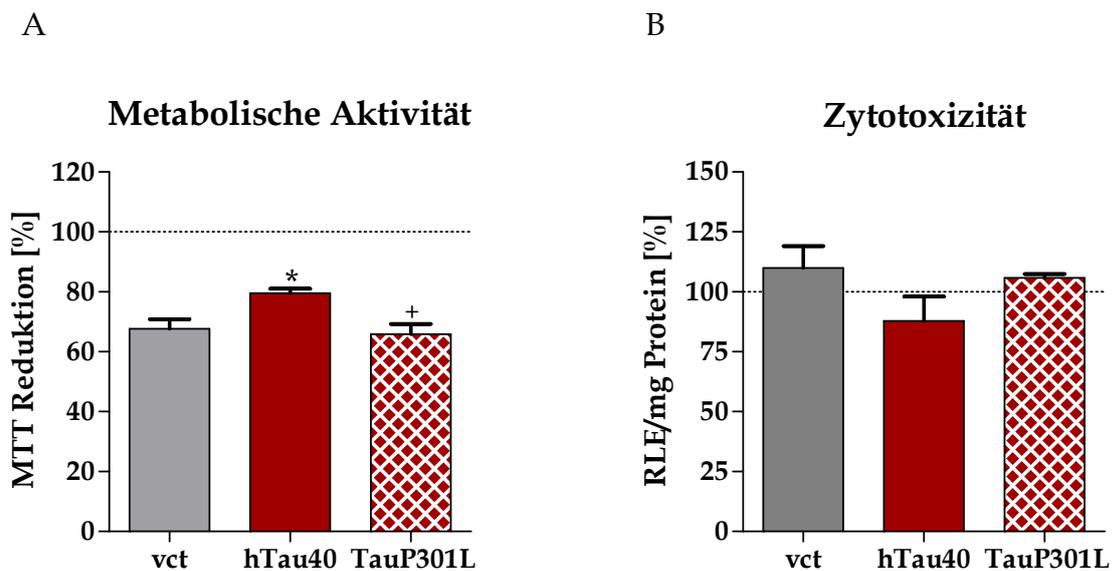


Abb.: 3- 32 Viabilität nach TTFA-Inkubation

Effekte von 50 μ M TTFA nach 24-stündiger Inkubation auf die metabolische Aktivität (A) und Zytotoxizität (B) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) und 4 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Die metabolische Aktivität nahm in allen drei Zelltypen ab, wobei die Abnahme in den hTau40-Zellen signifikant geringer ausfiel, als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-32 A). Nach 24-stündiger Inkubation mit 50 μ M TTFA lag die metabolische Aktivität in den vct-Zellen bei 67,66%, in den hTau40-Zellen bei 79,56% und in den TauP301L-Zellen bei etwa 65,82% gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu wies TTFA kaum zytotoxische Effekte auf (Abb.: 3-32 B). Zwischen

den Zelltypen gab es keine signifikanten Unterschiede, wobei die hTau40-Zellen sogar eine tendenzielle Abnahme der Zytotoxizität aufwiesen.

3.2.4.2 Expression 30 kDa-Untereinheit

Da die Inhibierung von Komplex II zu Unterschieden in den ATP-Spiegeln der TauP301L-Zellen und zu Veränderungen in der metabolischer Aktivität der vct- und hTau40-Zellen geführt hatte, wurde der Proteingehalt von Komplex II über die Expression der 30 kDa-Untereinheit überprüft (Abb.: 3-33).

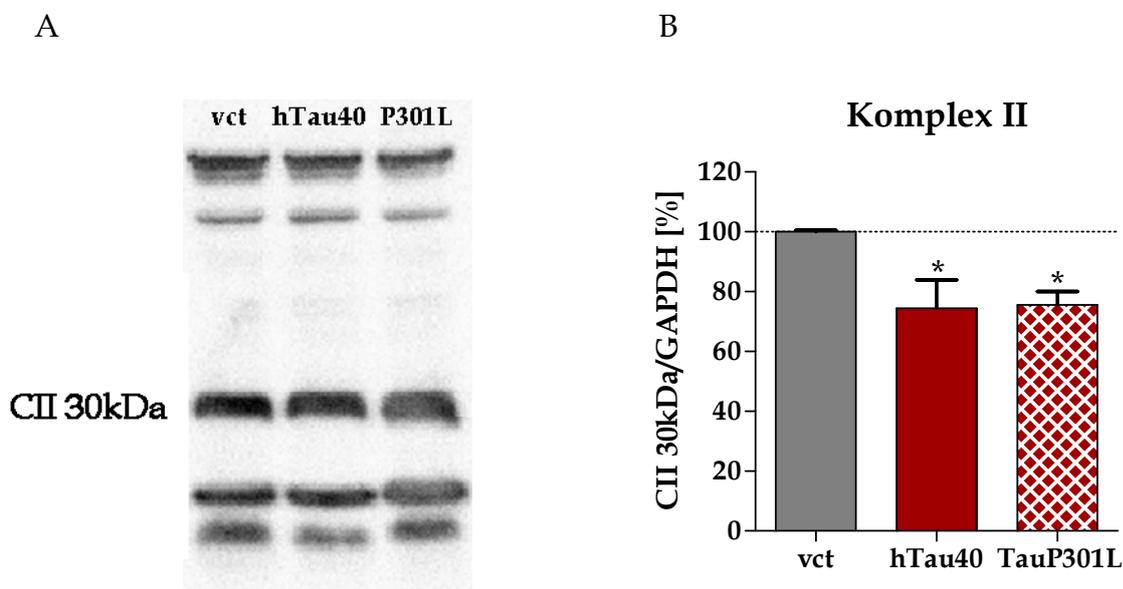


Abb.: 3- 33 Veränderte Expression der 30 kDa-Untereinheit von Komplex II in den SY5Y-Zellen

Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der 30 kDa-Untereinheit von Komplex II. Dargestellt ist eine beispielhafte SDS-Page (A) und die Auswertung (B) der prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten, normiert auf GAPDH (*One way ANOVA – Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L)

Es zeigte sich, dass die 30 kDa-Untereinheit von Komplex II in den hTau40- und TauP301L-Zellen signifikant weniger stark exprimiert wurde, als in den vct-Zellen (Abb.: 3-33 B). Die Expression war in beiden Zelltypen etwa 25% weniger stark ausgeprägt.

3.2.4.3 Veränderte Komplex II-Aktivität

Da die Expression der 30 kDa-Untereinheit von Komplex II in den hTau40- und TauP301L-Zellen vermindert war, wurde nun die Aktivität von Komplex II von Virginia Rhein gemessen (Abb.: 3-34). Die Komplex II-Aktivität kann durch die Abnahme der Absorption bei 600 nm detektiert werden, die durch die Reduktion von DCIP (2,6-dichlorphenolindo-phenol) zustande kommt (Aleari et al., 2005).

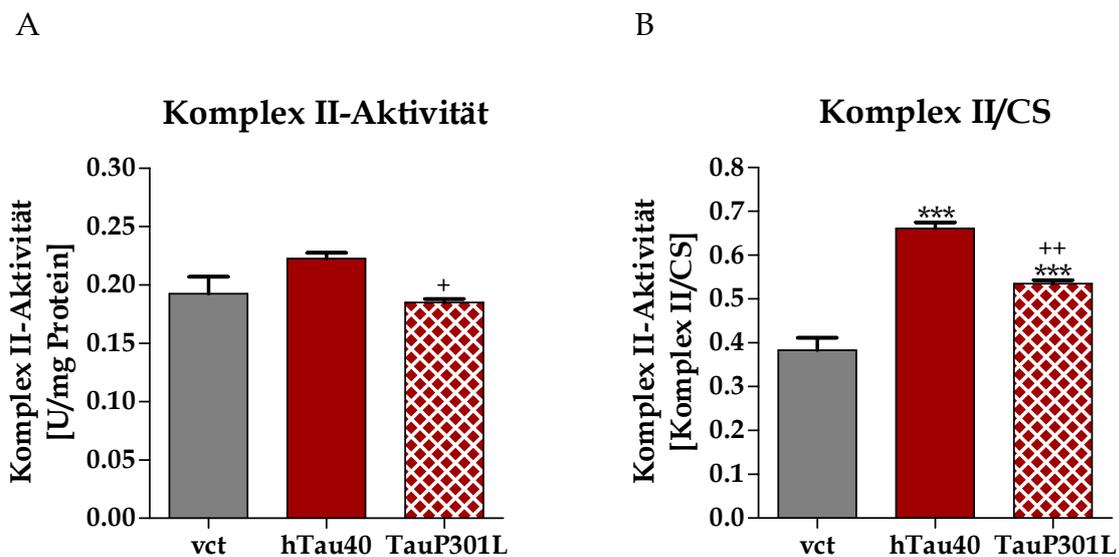


Abb.: 3- 34 Veränderte Komplex II-Aktivität

Gezeigt sind die gemessene Komplex II-Aktivität (A) und die Normierung auf die CS-Aktivität (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ^{***} $p < 0,001$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; ⁺ $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Beim Vergleich der Komplex II-Aktivitäten der SH-SY5Y Zellen war diese in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den hTau40-Zellen erniedrigt (Abb.: 3-34 A). Allerdings müssen diese Werte zusätzlich noch auf die CS-Aktivität normiert werden, um Unterschiede im mitochondrialen Proteingehalt auszugleichen. Hier zeigte sich, dass die hTau40- (172,5%) und TauP301L-Zellen (139,6%) eine signifikant erhöhte Komplex II-Aktivität aufwiesen (Abb.: 3-34 B). Diese war in den hTau40-Zellen sogar noch mal deutlich gegenüber den TauP301L-Zellen erhöht.

3.2.5 Komplex III (Cytochrom C Reduktase; Cytochrom b-c₁-Komplex)

Komplex III besteht aus 9-10 Polypeptiden und besitzt mehrere Redoxzentren, darunter Häm c₁ und ein Eisen-Schwefel-Zentrum (Hatefi, 1985). Die freie Energie aus den Oxidationsreaktionen wird zum Transport von zwei Protonen in den Intermembranraum genutzt. Daher stellt auch Komplex III eine Quelle für ROS dar. Der Mechanismus der Kopplung von Elektronentransfer und Protonentransport im Komplex III wird als Q-Zyklus bezeichnet. Hier wird Ubiquinol (Coenzym Q) oxidiert und Cytochrom c reduziert. Cytochrom c ist ein peripheres Protein, das an den Intermembranraum grenzt und den Transfer der Elektronen von Komplex III zu Komplex IV übernimmt.

3.2.5.1 Inhibition durch Antimycin

Antimycin ist einer der potentesten Inhibitoren des Q-Zyklus. Es bindet spezifisch an das Chinon- Reduktionszentrum (Q_i-Seite) des Cytochrom b-c₁-Komplexes (Slater, 1973) und blockiert hierdurch die Übertragung der Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom C. In den P301L-Mäusen führte die Inkubation mit Antimycin zu einer Abnahme des MMPs, wobei kein Unterschied zu den Kontrolltieren messbar war (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurde nun überprüft, welchen Einfluss die 24-stündige Inkubation mit Antimycin auf die ATP- und Lactat-Spiegel und das MMP (Abb.: 3-35 Seite 139) sowie die metabolische Aktivität und Zytotoxizität (Abb.: 3-36 Seite 140) der SH-SY5Y Zellen hat.

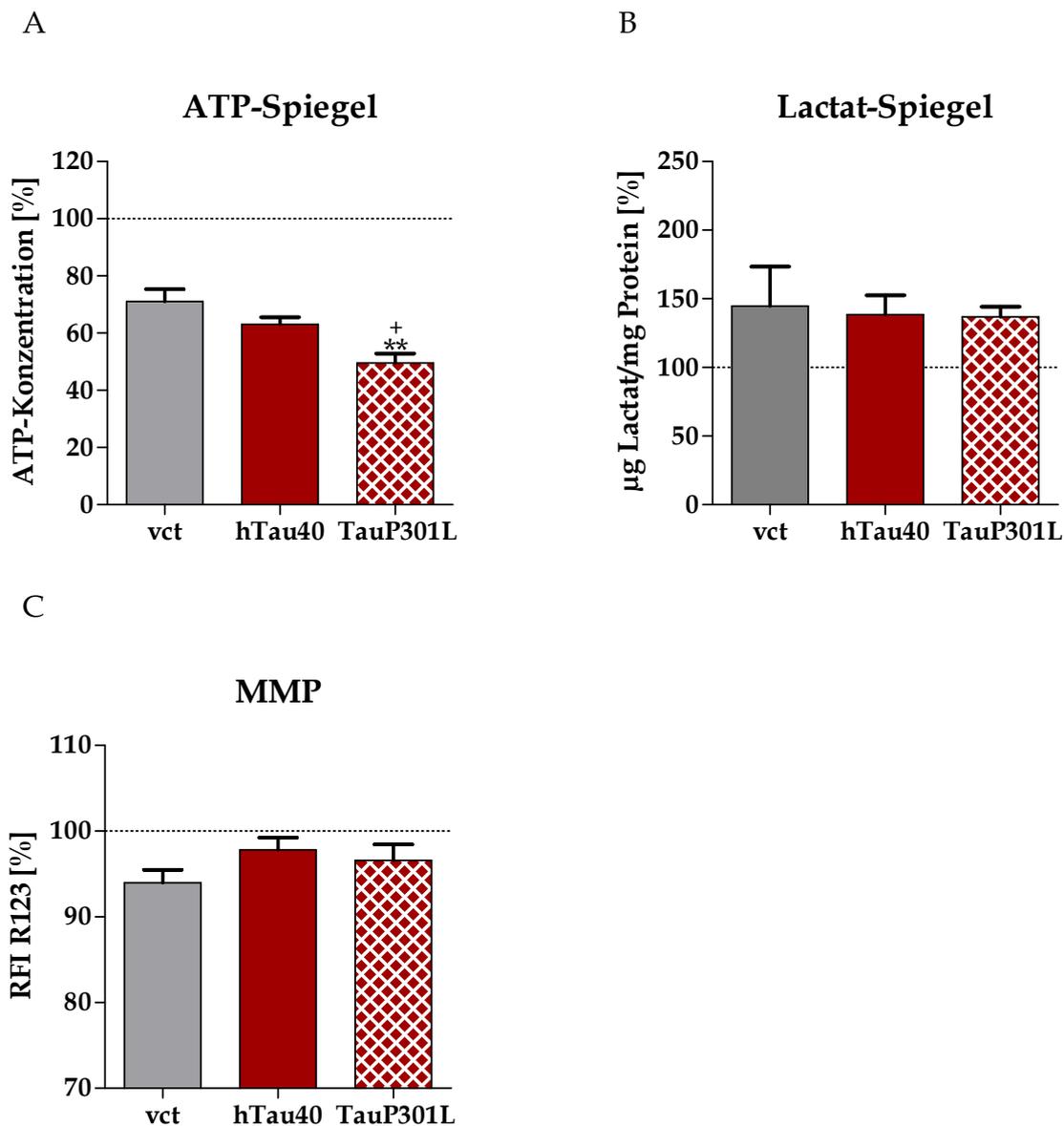


Abb.: 3-35 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 μ M Antimycin für 24h

Effekte von 1 μ M Antimycin auf die ATP-Spiegel (A) und von 10 μ M Antimycin auf die Lactat-Spiegel (B) sowie auf das MMP (C) der SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C) und 3 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. TauP301L und + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Die Hemmung von Komplex III führte in allen Zellen zu einer Abnahme der ATP-Spiegel, die in den TauP301L-Zellen stärker ausfiel, als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb. 3-35 A). Die Hemmung mit Antimycin führte zu einem 50%-igen ATP-Abfall in den TauP301L-Zellen und zu einer 30-35%-igen Abnahme in den vct- und

hTau40-Zellen. Des Weiteren wurde in allen Zelltypen eine Zunahme der Lactat-Spiegel gemessen, sodass die Glykolyserate in den Zellen erhöht war um zusätzlich ATP generieren zu können (Abb. 3-35 B). Auf das MMP hatte die Inkubation mit Antimycin nur eine geringe depolarisierende Wirkung (2-3%), die in den vct-Zellen mit etwa 6% tendenziell etwas stärker ausgeprägt war (Abb.: 3-35 C). Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Zelltypen nicht signifikant.

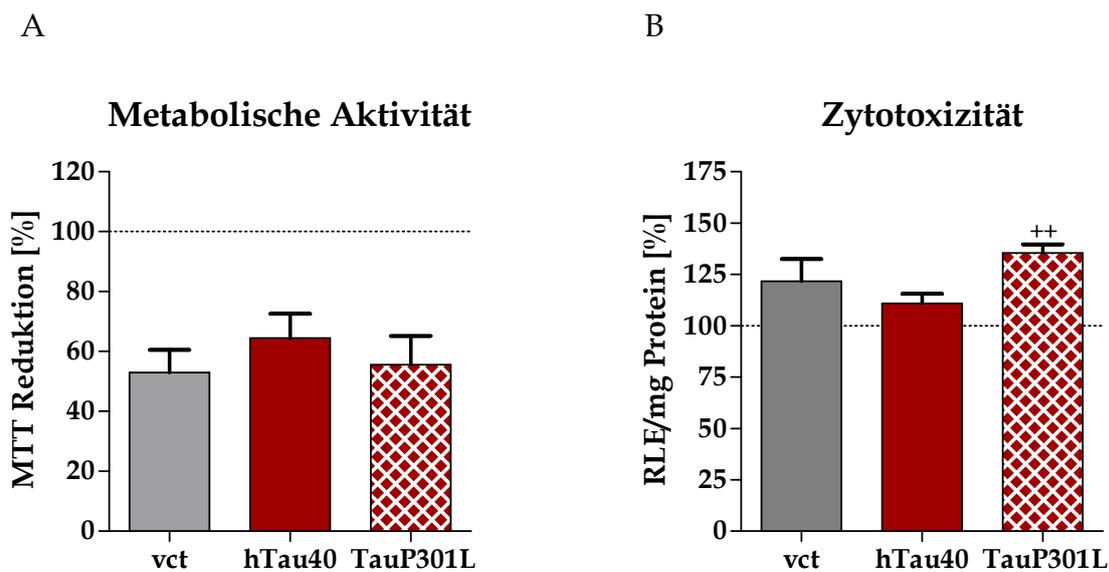


Abb.: 3- 36 Viabilität nach Antimycin-Inkubation

Effekte von 10 μ M Antimycin nach 24-stündiger Inkubation auf die metabolische Aktivität (A) und Zytotoxizität (B) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) und 4 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (Unpaired *t* test, ** $p < 0,01$ hTau40 vs. TauP301L)

Die metabolische Aktivität war in allen drei Zelltypen um etwa 35-45% erniedrigt, wobei zwischen den Zelltypen keine Unterschiede detektierbar waren (Abb.: 3-36 A). Nur in den hTau40-Zellen war die Abnahme tendenziell etwas schwächer ausgeprägt. Im Gegensatz dazu war die Inkubation mit Antimycin für die TauP301L-Zellen deutlich zytotoxischer, als für die hTau40-Zellen (Abb.: 3-36 B). Der zytotoxische Effekt lag in den vct-Zellen bei etwa 121,8%, bei den hTau40-Zellen bei 111,0% und bei den TauP301L-Zellen bei etwa 135,4%, wobei die jeweilige unstimulierte Kontrolle auf 100% gesetzt wurde.

3.2.5.2 Expression der Untereinheit Core II

Obwohl keine Unterschiede bei der 2D-SDS Analyse in den P301L-Mäusen detektiert wurden (David et al., 2005b), die P301L-Zellen aber nach Inkubation mit Antimycin erniedrigte ATP-Spiegel und erhöhte Toxizität aufwiesen, wurden die Expressionslevel der Core II-Untereinheit von Komplex III in den SH-SY5Y Zellen überprüft (Abb.: 3-37).

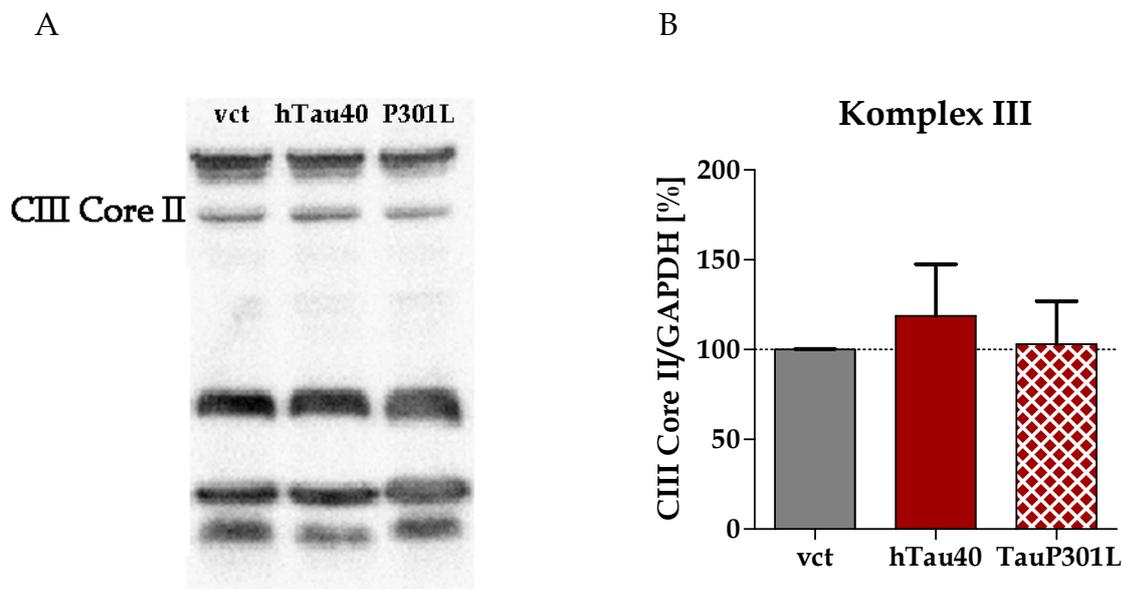


Abb.: 3- 37 Veränderte Expression der Core II-Untereinheit von Komplex III in den SY5Y-Zellen

Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der CoreII -Untereinheit von Komplex III. Dargestellt ist eine beispielhafte SDS-Page (A) und die Auswertung (B) der prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelerperimenten, normiert auf GAPDH

Die Expression der Core II-Untereinheit von Komplex III schwankte stark, was sich in der hohen Standardabweichung widerspiegelt (Abb.: 3-37 B). Allerdings kam es in den hTau40-Zellen eher zu einer tendenziell erhöhten Expression ($118,7\% \pm 28,87\%$) und bei den TauP301L-Zellen zu keiner Veränderung ($103,1\% \pm 23,76\%$).

3.2.5.3 Veränderte Komplex III-Aktivität

Um die Aktivität von Komplex III zu bestimmen wird die Oxidation von Decylubiquinol durch Komplex III bei 550 nm gemessen (von Virginie Rhein), wobei Cytochrom C als Elektronenakzeptor fungiert (Abb.: 3-38) (Aleari et al., 2005; Krahenbuhl et al., 1991).

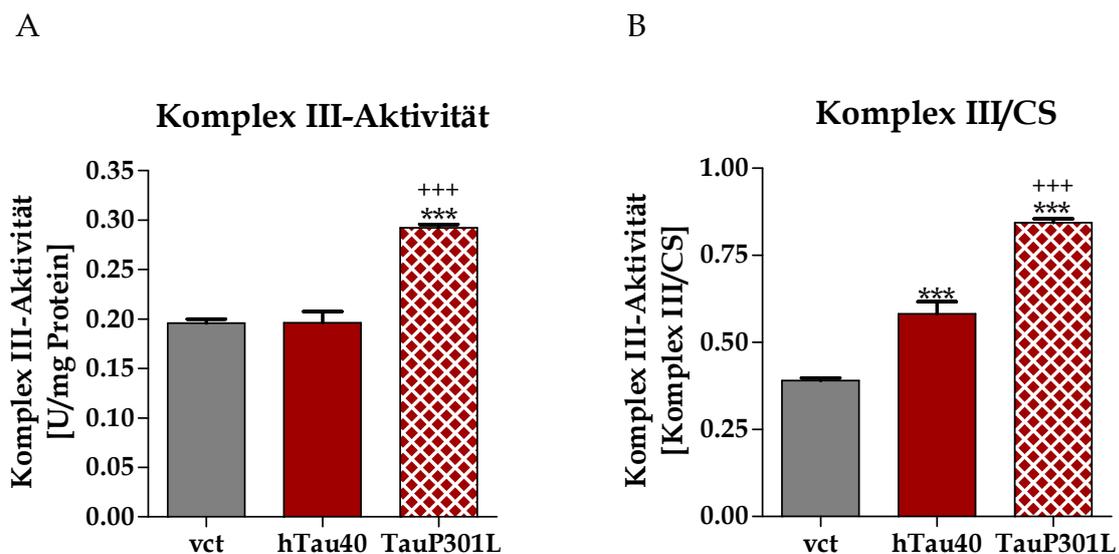


Abb.: 3- 38 Veränderte Komplex III-Aktivität

Gezeigt sind die gemessene Komplex III-Aktivität (A) und die Normierung auf die CS-Aktivität (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelerperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, *** $p < 0,001$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; *** $p < 0,001$ hTau40 vs. TauP301L)

Bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge an Mitochondrien, wiesen die TauP301L-Zellen eine 49%-tige Erhöhung der Komplex III-Aktivität gegenüber den vct- und hTau40-Zellen auf (Abb.: 3-38 A). Aufgrund der niedrigen CS-Aktivität kam es nach Normierung der Werte auf eine 116,4%-tige Steigerung der Komplex III-Aktivität der TauP301L-Zellen im Vergleich zu den vct-Zellen (Abb.: 3-38 B). Dies war sogar noch um 67,1% höher, als die Komplex III-Aktivität in den hTau40-Zellen. Die Überexpression von hTau40 führte bezogen auf die CS-Aktivität auch zu einer um 49,3% erhöhten Aktivität von Komplex III gegenüber den vct-Zellen.

3.2.6 Komplex IV (Cytochrom C Oxidase)

Am Komplex IV erfolgt die letzte katalytische Reaktion der mitochondrialen Atmungskette. Es ist ein Transmembranprotein mit zwei Häm *a* Molekülen (Häm *a* und Häm *a*₃) als prosthetische Gruppen und zwei Kupfer-Zentren (Cu_A und Cu_B) als Kofaktoren. Hier wird Cytochrom *c* oxidiert und mit dessen vier Elektronen O₂ zu H₂O reduziert. Dabei werden vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert.

3.2.6.1 Inhibierung von Komplex IV durch Natriumazid (NaN₃)

Natriumazid führt zur Hemmung der Cytochrom C Oxidase, indem es chemisch eine Hypoxie auslöst. Es blockiert reversibel die Sauerstoffbindungsstelle an der Häm *a*₃-Untereinheit von Komplex IV, wodurch die Energieproduktion der Mitochondrien gehemmt und die Abgabe von Sauerstoffradikalen erhöht wird (Park et al., 1999). Die Inkubation mit NaN₃ führte in den Kontrolltieren und P301L-Mäusen zu einer gleichwertigen Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Es wurde nun untersucht, welche Auswirkungen die 24-stündige Inkubation mit NaN₃ auf die ATP-Spiegel und das MMP (Abb.: 3-39 Seite 144) sowie die metabolische Aktivität und Zytotoxizität (Abb.: 3-40 Seite 145) der SH-SY5Y Zellen hat.

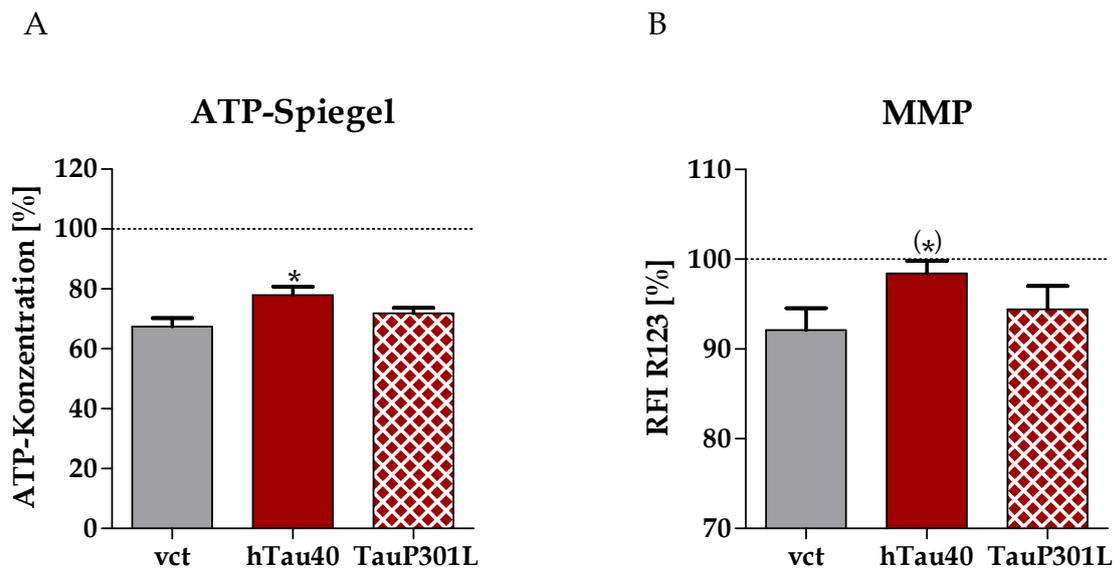


Abb.: 3-39 Veränderungen der ATP-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 mM Natriumazid für 24h

Effekte von 10 mM Natriumazid auf die ATP-Spiegel (A) und das MMP (B) der SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. hTau40)

Die Hemmung von Komplex IV führte zu einem Abfall der ATP-Spiegel der in den hTau40-Zellen signifikant geringer ausfiel, als in den vct-Zellen (Abb.: 3-39 A). Die ATP-Spiegel waren in den vct-Zellen auf 67,4%, in den hTau40-Zellen auf 77,9% und in den TauP301L-Zellen auf 71,8% gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle verringert. Außerdem führte NaN_3 zu einer leichten Abnahme des MMPs in den vct- (7,88%) und TauP301L-Zellen (5,59%) (Abb.: 3-39 B). Die Depolarisation war in den vct-Zellen signifikant stärker ausgeprägt, als in den hTau40-Zellen. Das keine Unterschiede zwischen vct- und TauP301L-Zellen detektiert werden konnten, entspricht den Daten der P301L-Mäusen.

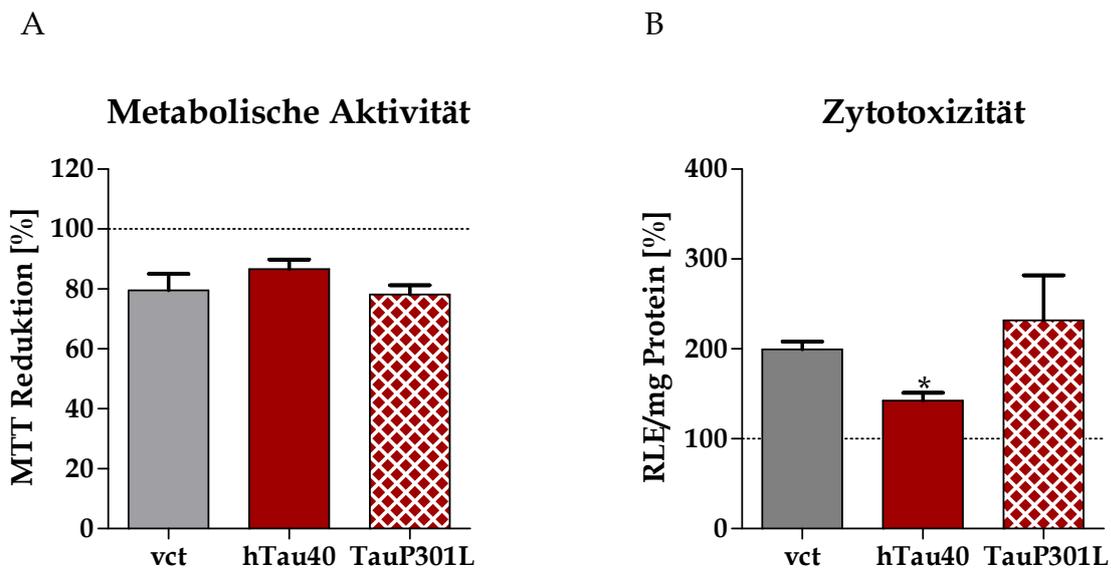


Abb.: 3- 40 Viabilität nach Inkubation mit Natriumazid

Effekte von 10 mM NaN_3 nach 24-stündiger Inkubation auf die metabolische Aktivität (A) und Zytotoxizität (B) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) und 4 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40)

Die metabolische Aktivität nahm nach Inkubation mit NaN_3 in allen drei Zelltypen um 15-20% ab, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren (Abb.: 3-40 A). Allerdings führte die Inhibierung von Komplex IV zu einem Anstieg der Zytotoxizität, der in den hTau40-Zellen signifikant geringer ausfiel, als in den vct-Zellen (Abb.: 3-40 B). Der Effekt war in den TauP301L-Zellen eigentlich am stärksten ausgeprägt, aber aufgrund der Schwankungen nicht signifikant.

3.2.6.2 Expression der Untereinheit COX II

Da die hTau40-Zellen mit einem geringeren Abfall der ATP-Spiegel und des MMPs auf die Inhibierung von Komplex IV reagierten, wurde die Expression der COX II-Untereinheit der Cytochrome C Oxidase überprüft (Abb.: 3-41 Seite 146).

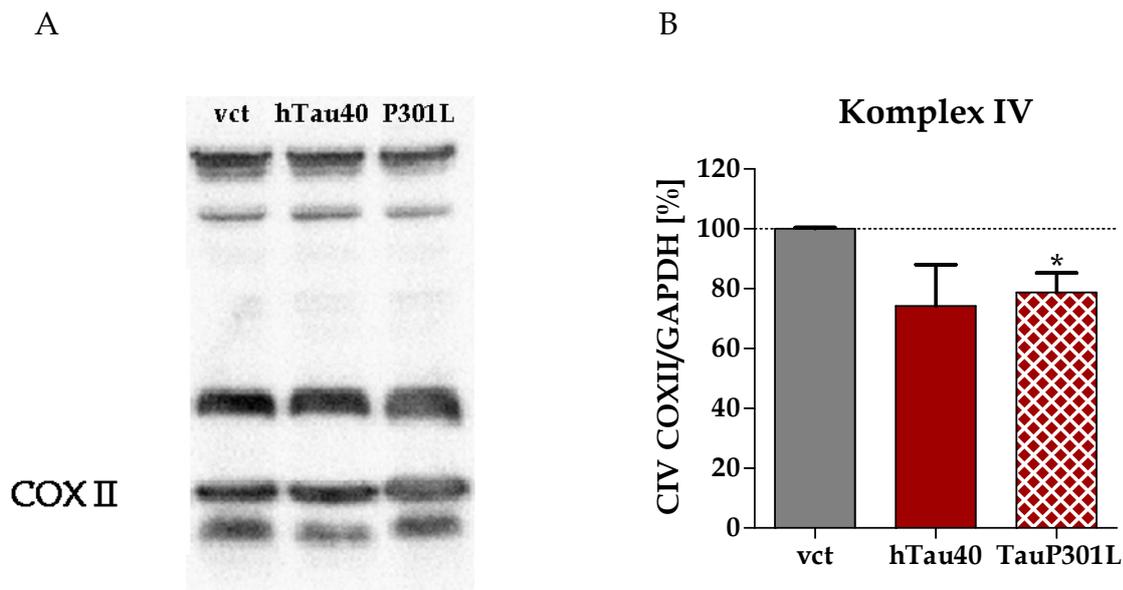


Abb.: 3- 41 Veränderte Expression der COX II-Untereinheit von Komplex IV in den SY5Y-Zellen

Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der COX II-Untereinheit von Komplex IV. Dargestellt ist eine beispielhafte SDS-Page (A) und die Auswertung (B) der prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten, normiert auf GAPDH (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Es zeigte sich, dass die Expression der COX II-Untereinheit in den hTau40- und TauP301L-Zellen um etwa 15-18% geringer war, als in den vct-Zellen (Abb.: 3-41 B). Aufgrund der hohen Schwankungen war die Abnahme in den hTau40-Zellen nicht signifikant. Allerdings war die Expression in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den vct-Zellen erniedrigt.

3.2.6.3 Die Aktivität von Komplex IV ist nicht verändert

Die Aktivität der Cytochrom C Oxidase (COX-Aktivität) kann durch eine Verminderung der Absorption bei 550 nm gemessen werden, die durch die Oxidation von Ferrocycytochrom C (reduziertes Cytochrom C) zu Ferricytochrom C durch die Cytochrom C Oxidase entsteht (Rasmussen et al., 2000). Es ist auch bereits bekannt, dass in den P301L-Mäusen die COX-Aktivität nicht verändert ist (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Da die Expression der COX II-Untereinheit in den TauP301L-Zellen vermindert war wurde von Virginie Rhein überprüft, ob dies einen Einfluss auf die COX-Aktivität hat (Abb.: 3-42 Seite 147).

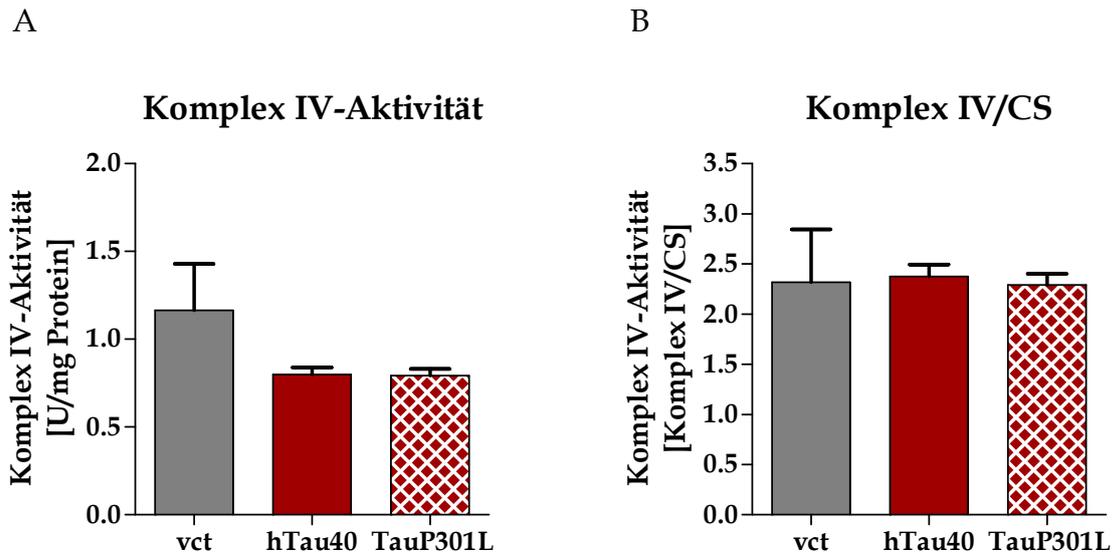


Abb.: 3-42 COX-Aktivität ist nicht verändert

Gezeigt werden die gemessene Komplex IV-Aktivität (A) und die Normierung auf die CS-Aktivität (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3-5 Einzelexperimenten

Die Aktivität von Komplex IV war in den hTau40- und TauP301L-Zellen tendenziell, aber nicht signifikant, gegenüber den vct-Zellen erniedrigt (Abb.: 3-42 A). Durch die Normierung auf die CS-Aktivität verdeutlichten sich noch mal die identischen COX-Aktivitäten in den drei Zelltypen (Abb.: 3-42 B). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus den P301L-Mäusen überein.

3.2.7 Komplex V (F_0F_1 -ATP-Synthase)

Die mitochondriale ATP-Synthase besteht aus zwei verschiedenen Komponenten. Der F_1 -Teil ragt als peripheres Membranprotein in die Matrix der Mitochondrien, während der F_0 -Teil einen Protonen-Kanal durch die Membran bildet (Boyer, 1998). Dieser kann in der Membran rotieren und durch den Protonenstrom wird Energie erzeugt, sodass es schließlich zu der Synthese von ATP aus ADP und P_i kommt.

3.2.7.1 Inhibition durch Oligomycin

Oligomycin ist ein hoch affiner Hemmstoff der F_0 -Untereinheit von Komplex V (HUIJING et al., 1961; Matsuno-Yagi et al., 1985). In den P301L-Mäusen führte die Hemmung von Komplex V mit Oligomycin zu einer signifikant stärkeren Abnahme des Membranpotentials (David et al., 2005a) (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Daher wurde nun untersucht, welchen Einfluss die 24-stündige Inkubation mit Oligomycin auf die ATP- und Lactat-Spiegel und das MMP (Abb.: 3-43 Seite 149) sowie die metabolische Aktivität und Zytotoxizität (Abb.: 3-44 Seite 150) der SH-SY5Y Zellen hat.

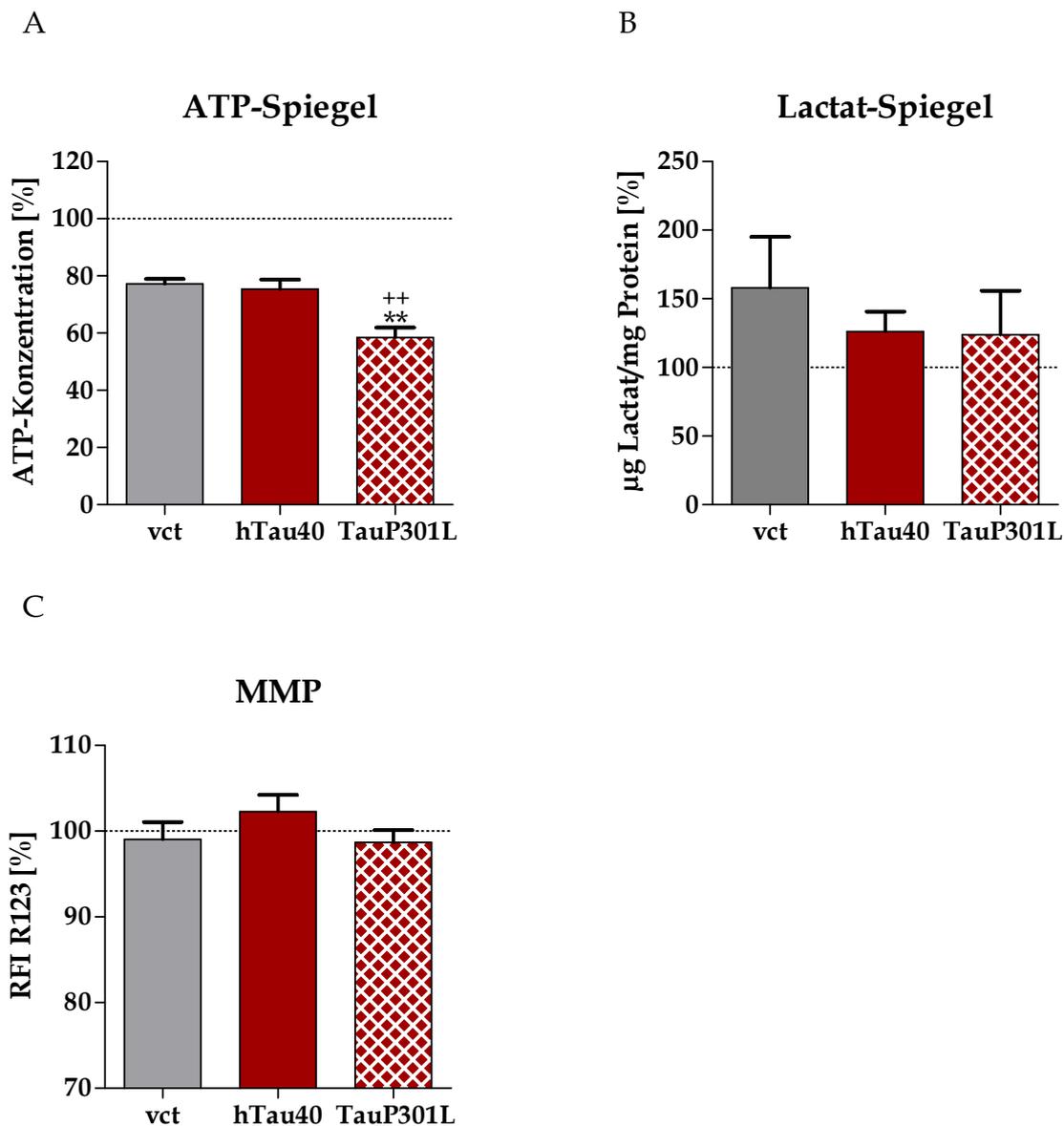


Abb.: 3-43 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 μ M Oligomycin für 24h

Effekte von 1 μ M Oligomycin auf die ATP-Spiegel (A) und 10 μ M Oligomycin auf die Lactat-Spiegel (B) sowie auf das MMP (C) der SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C) und 3 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. TauP301L und ++ $p < 0,01$ hTau40 vs. TauP301L)

Die Hemmung von Komplex V durch Oligomycin führte in den TauP301L-Zellen zu einer signifikant stärkeren Abnahme der ATP-Spiegel im Vergleich zu vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-43 A). Die ATP-Spiegel fielen in den vct-Zellen auf 77,27%, in den hTau40-Zellen auf 75,32% und in den TauP301L-Zellen auf 58,49% im Vergleich

zu der jeweils unstimulierten Kontrolle. Die Zellen versuchten dem ATP-Verlust mit einer gesteigerten Glykolyserate entgegenzuwirken, was sich durch erhöhte Lactat-Spiegel auszeichnete (Abb.: 3-43 B). Diese fielen in den vct-Zellen tendenziell höher aus, aber aufgrund der starken Schwankungen waren keine Unterschiede zwischen den drei Zelltypen messbar. Erstaunlicherweise hatte die Inkubation mit Oligomycin keinen Effekt auf das mitochondriale Membranpotential der SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-43 C). Somit konnten die Effekte von Oligomycin auf das MMP der P301L-Mäuse in den Zellen nicht bestätigt werden.

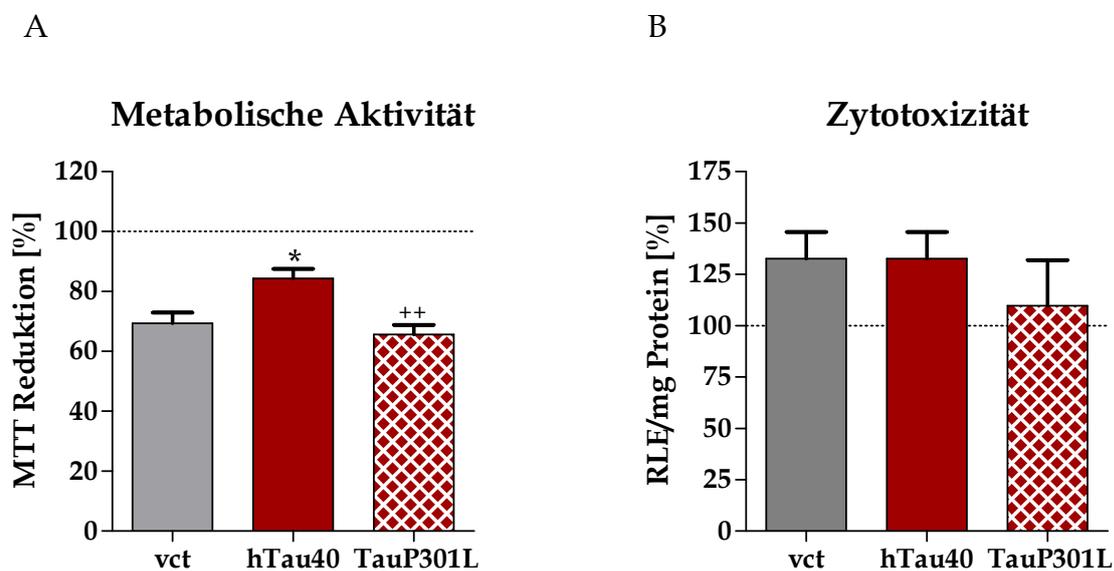


Abb.: 3-44 Abnahme der metabolischen Aktivität und erhöhte Zytotoxizität nach 24-stündiger Hemmung von Komplex V mit 10 μ M Oligomycin

Effekte von 1 μ M Oligomycin auf die metabolische Aktivität (A) und 10 μ M Oligomycin auf die Zytotoxizität (B) der SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) und 4 (B) Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40; ** $p < 0,01$ hTau40 vs. TauP301L)

Die Inkubation mit Oligomycin führte in allen Zelltypen zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität, die in den vct- und TauP301L-Zellen signifikant stärker ausgeprägt war, als in den hTau40-Zellen (Abb.: 3-44 A). Dabei nahm die metabolische Aktivität in den vct-Zellen um 30,60%, in den hTau40-Zellen um 15,65% und in den TauP301L-Zellen um 34,40% gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle ab. Die Hemmung von Komplex V führte auch zu einer

erhöhten Zytotoxizität in den SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-44 B). Der Effekt war in den TauP301L-Zellen sogar tendenziell geringer ausgeprägt, als in den vct- und hTau40-Zellen, aber es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelltypen vor.

3.2.7.2 Expression der Untereinheit F1 α

Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte in den TauP301L-Mäusen eine Runterregulierung der sogenannten D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase nachgewiesen werden (David et al., 2005b). Diese befindet sich in dem nichtenzymatischen F₀-Teil. In Bakterien findet sich allerdings kein Homolog und die exakte Funktion ist bisher unklar. Weiterhin wurde in *postmortem* Gehirnen von FTDP-17-Patienten auch eine verminderte Expression der D-Kette der ATP-Synthase gefunden (David et al., 2005b) Es war methodisch nicht möglich die Expression derselben Untereinheit in den SH-SY5Y Zellen zu überprüfen. Daher wurde mit einem Antikörpercocktail, der jeweils gegen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe gerichtet ist, die Expression der α -Untereinheit von Komplex V mittels Westernblot überprüft (Abb.: 3-45 Seite 152). Da auch schon basal Unterschiede in den ATP-Spiegeln der Zellen vorhanden waren wurde überprüft, ob diese eventuell durch unterschiedliche Expressionslevel zu erklären sind.

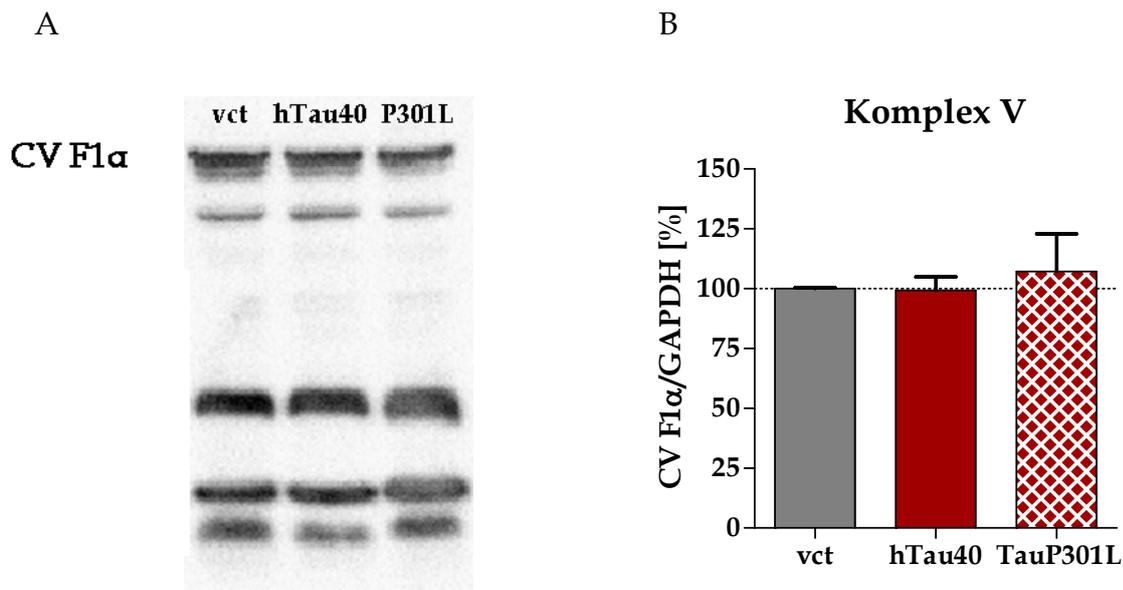


Abb.: 3-45 Die Expression der F1 α -Untereinheit von Komplex V ist in den SY5Y-Zellen nicht verändert

Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der F1 α -Untereinheit von Komplex V. Dargestellt ist eine beispielhafte SDS-Page (A) und die Auswertung (B) der prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten, normiert auf GAPDH

Die SH-SY5Y Zellen wiesen keine Unterschiede in der Expression der F1 α -Untereinheit der ATP-Synthase auf (Abb.: 3-45 B).

3.3 Auswirkungen sekundärer Insulte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

Die Pathologie der Alzheimer Demenz setzt sich hauptsächlich aus zwei Komponenten zusammen - den intrazellulären Ablagerungen der neurofibrillären Bündel und den extrazellulären Amyloid-Plaques. Die Amyloid-Kaskaden-Theorie besagt, dass zunächst die A β -Pathologie auftritt und folglich zu den Tau-Ablagerungen führt und nicht umgekehrt (Selkoe, 1996). Des Weiteren spielt bei der Entwicklung der sporadischen Alzheimer Demenz, neben Risikofaktoren wie das Apo E4-Allel, vor allem das Alter und der damit verbundenen erhöhte oxidative Stress eine Rolle (Nunomura et al., 2001). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss zusätzlicher oxidativer (H₂O₂) und nitrosativer (SNP) Stress sowie verschiedene

Amyloid-Spezies (A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen) auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen hat.

3.3.1 Die Stressoren führen nicht zu einer signifikant erhöhten Glykolyserate

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Stickstoffmonoxid (NO) sowie A β an den Mitochondrien angreifen (Brown et al., 1994a; Casley et al., 2002; Crouch et al., 2005; Manczak et al., 2006) und daher zum Teil auch einen Einfluss auf die ATP-Spiegel haben. Daher wurde untersucht, ob die Inkubation mit diesen Stressoren zu einer Veränderung der Glykolyserate führt, um eventuelle Effekte auf die ATP-Spiegel auszugleichen (Abb.: 3-46 Seite 154).

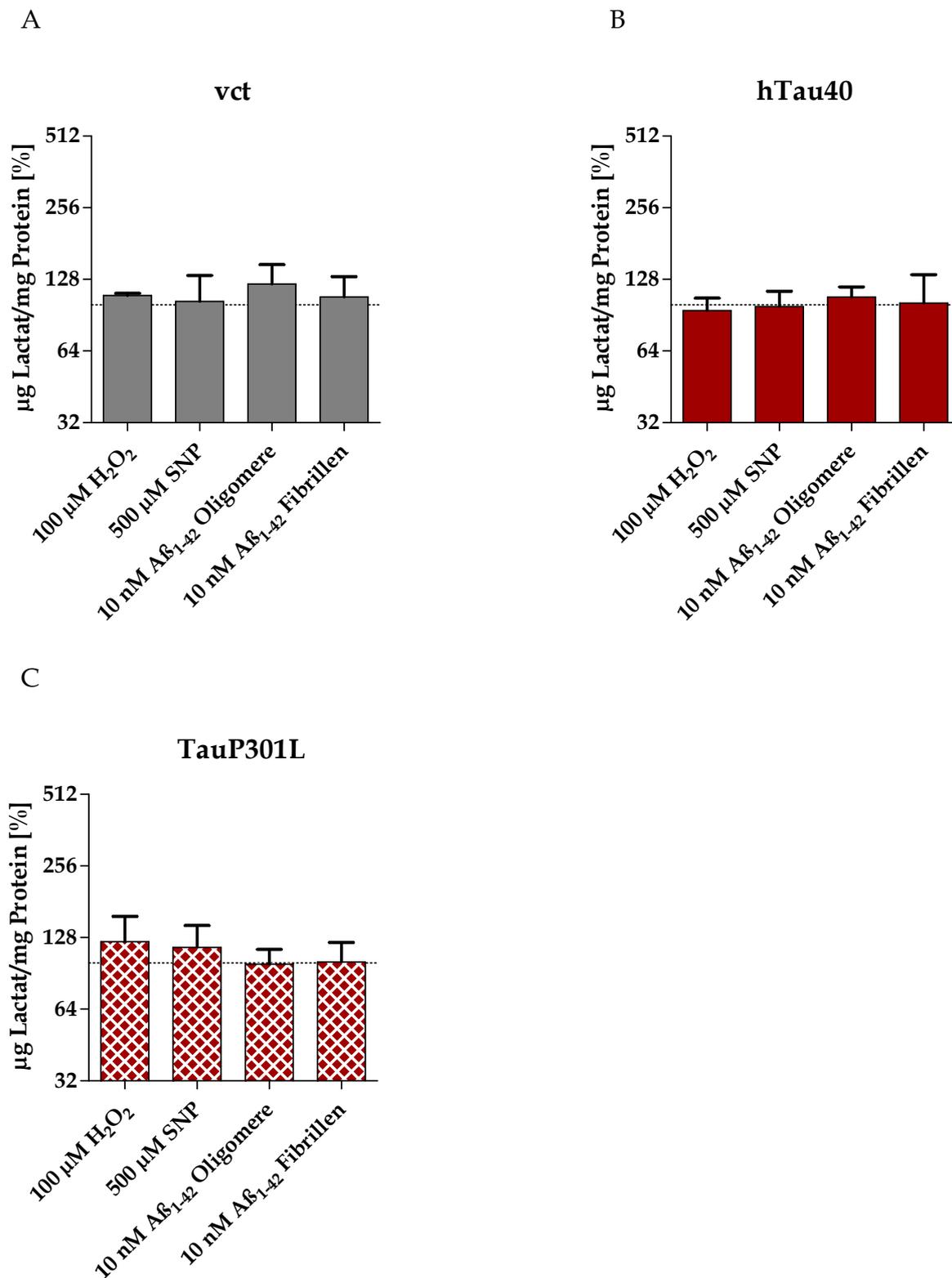


Abb.: 3-46 Lactat-Spiegel nach zusätzlichem oxidativen, nitrosativen und A β -Stress für 24 Stunden
 Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 μ M H₂O₂, 500 μ M SNP oder 10 nM A β ₁₋₄₂ Oligomere bzw. Fibrillen inkubiert und anschließend die Lactat-Spiegel bestimmt. Gezeigt sind die Effekte auf die vct- (A), hTau40- (B) und die TauP301L-Zellen (C). Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*; nicht signifikant gegenüber unstimulierter Kontrolle)

Die verschiedenen Stressoren führten in keinem der drei Zelltypen zu einer signifikanten Veränderung der Lactat-Spiegel. Bei den vct-Zellen kam es zu einer tendenziellen Erhöhung der Lactat-Spiegel nach Inkubation mit A β ₁₋₄₂-Oligomeren (22,5%) (Abb.: 3-46 A). Die hTau40-Zellen zeigten nach Stimulation mit den diversen Stimuli keine Effekte auf die Glykolyserate (Abb.: 3-46 B). In den TauP301L-Zellen führte oxidativer und nitrosativer Stress zu einer tendenziellen Erhöhung der Glykolyserate (Abb.: 3-46 C). Die Inkubation mit H₂O₂ führte zu erhöhten Lactat-Spiegeln um 23% und die SNP-Inkubation steigerte die Lactat-Spiegel um 16,3%. Da aber nur ein n=3 vorlag und es zu großen Schwankungen zwischen den Werten kam, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.3.2 Wie zytotoxisch ist zusätzlicher oxidativer und nitrosativer Stress sowie A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen für die SY5Y-Zellen?

Es ist allgemein bekannt, dass oxidativer und nitrosativer Stress sowie A β ₁₋₄₂-Oligomere und Fibrillen toxisch sind. Daher wurde untersucht, wie zytotoxisch diese Agenzien für die SH-SY5Y Zellen sind (Abb.: 3-47 Seite 156).

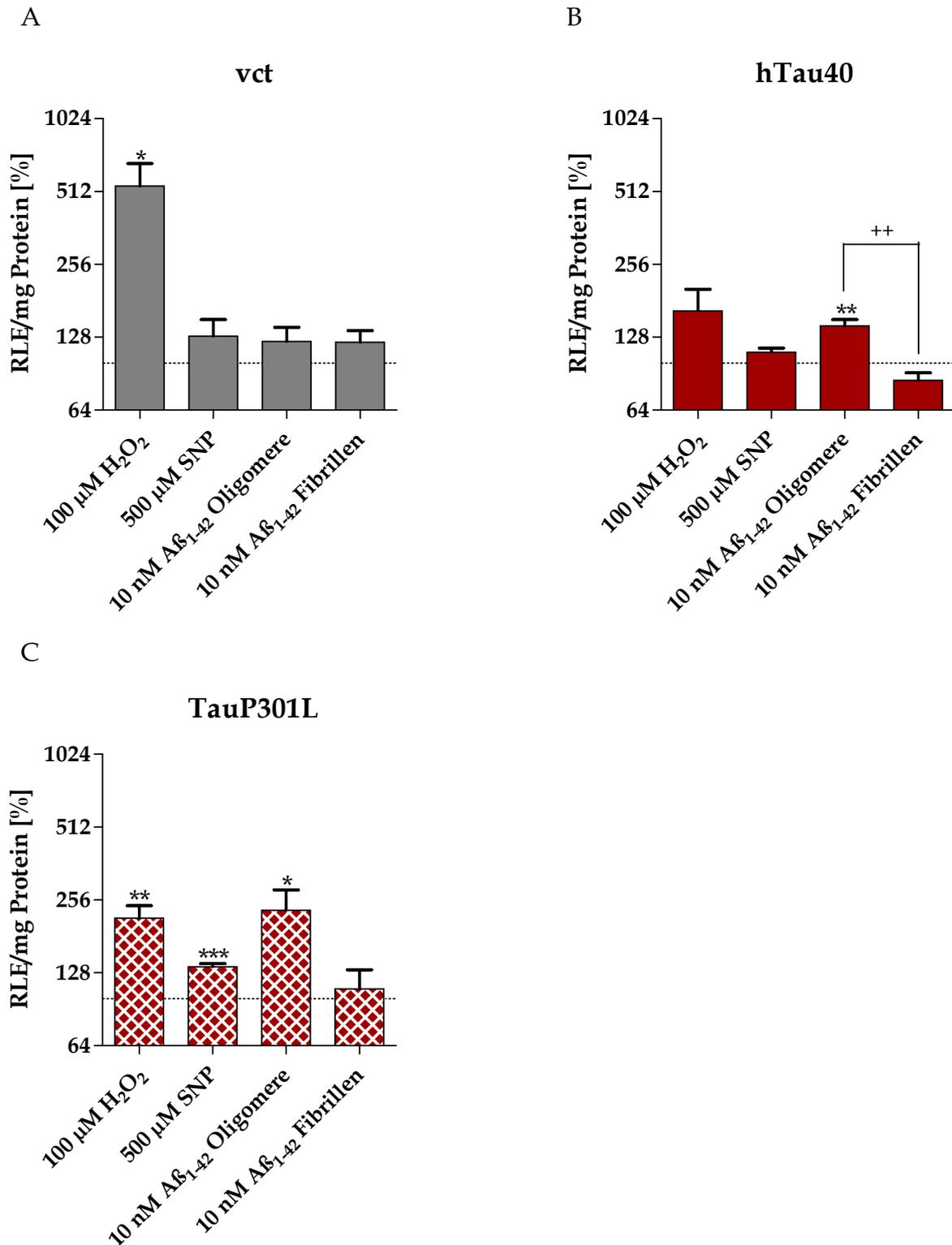


Abb.: 3-47 Zytotoxizität in den SH-SY5Y Zellen nach zusätzlichem oxidativen, nitrosativen und Aβ-Stress für 24 Stunden

Gezeigt ist die Zytotoxizität in den vct- (A), hTau40- (B) und TauP301L-Zellen (C) nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µM H₂O₂, 500 µM SNP oder 10 nM Aβ₁₋₄₂ Oligomere bzw. Fibrillen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 3-4 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*, * p < 0,05 unstimulierte Kontrolle vs. Stressor; ++ p < 0,01 Oligomere vs. Fibrillen)

Die verschiedenen Stressoren wiesen eine unterschiedliche Toxizität in den drei Zelltypen auf. In den vct-Zellen führten alle Stressoren zu einer Erhöhung der Zytotoxizität, wobei diese nur nach Stimulierung mit H_2O_2 signifikant erhöht war (Abb.: 3-47 A). Interessanterweise kam es in den hTau40-Zellen nur durch H_2O_2 und den $\text{A}\beta_{1-42}$ -Oligomeren zu einer Erhöhung der Zytotoxizität, wobei nur die Inkubation mit den Oligomeren in einer signifikanten Erhöhung gegenüber der unstimulierten Kontrolle resultierte (Abb.: 3-47 B). Zudem waren die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Oligomere im Vergleich mit den $\text{A}\beta_{1-42}$ -Fibrillen signifikant zytotoxischer. Außerdem führte die Inkubation mit den $\text{A}\beta_{1-42}$ -Fibrillen sogar zu einer tendenziellen Verminderung der Zytotoxizität in den hTau40-Zellen. Im Gegensatz dazu führten bei den TauP301-Zellen alle Stimuli bis auf die $\text{A}\beta_{1-42}$ -Fibrillen zu einer signifikanten Erhöhung der Zytotoxizität (Abb.: 3-47 C).

Interessant war, dass sich die Toxizität von $\text{A}\beta_{1-42}$ -Oligomeren und Fibrillen in den vct-Zellen nicht unterschied, sehr wohl aber in den hTau40- und TauP301L-Zellen. Hier wiesen $\text{A}\beta_{1-42}$ -Oligomere, wie auch in der Literatur beschrieben, eine erhöhte Toxizität im Vergleich zu den $\text{A}\beta_{1-42}$ -Fibrillen auf (Berman et al., 2008a; Cleary et al., 2005; Eckert et al., 2008a). Zusätzlich führte die Überexpression von Tau unabhängig vom Phosphorylierungsgrad zu einer verminderten H_2O_2 -Toxizität in den SH-SY5Y Zellen.

3.3.3 Oxidativer Stress durch H_2O_2

Wasserstoffperoxid wird von der Superoxiddismutase (SOD) und anderen Oxidasen aus dem Superoxidanion-Radikal gebildet. Im Vergleich mit anderen ROS weist H_2O_2 eine geringe Reaktivität auf, kann aber leicht durch Membranen diffundieren. Unter experimentellen Bedingungen konnten in der extrazellulären Flüssigkeit Konzentrationen bis zu $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 nachgewiesen werden (Hyslop et al., 1995). Eine Studie an ausdifferenzierten N2a-Zellen (murine Neuroblastoma Zellen) hat auch gezeigt, dass die Überexpression von hTau40 zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Neuriten nach Inkubation mit H_2O_2 geführt hat, da in diesen

Zellen die Mitochondrien und Peroxisomen – die bei der Entgiftung von H₂O₂ mitwirken – kaum in den Neuriten, sondern hauptsächlich im Soma der Zellen lokalisiert sind (Stamer et al., 2002).

3.3.3.1 ROS-Bildung nach zusätzlichem oxidativem Stress

In den SH-SY5Y Zellen wurden schon basale Unterschiede der ROS-Spiegel detektiert (Abschnitt: 3.1.5.3). Daher wurde nun das Ausmaß der ROS-Bildung in den drei Zelltypen nach zusätzlichem oxidativem Stress in Form von H₂O₂ untersucht (Abb.: 3-48).

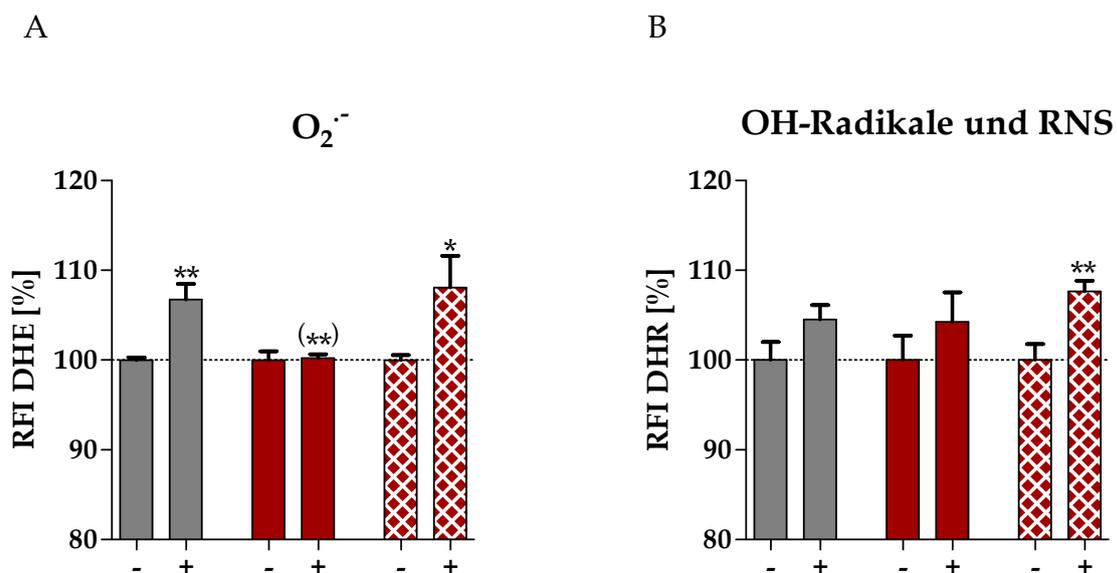


Abb.: 3-48 ROS-Bildung wird durch zusätzlichen oxidativen Stress erhöht

Die SH-SY5Y Zellen wurden mit 250 µM H₂O₂ inkubiert und nach 30 min die Superoxidanion-Radikal- (A) und nach 45 min die Hydroxylradikal-Spiegel (B) bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 (A) und 8 (B) Einzelexperimenten (*Unpaired t test*, * p < 0,05 unstimulierte Kontrolle vs. 250 µM H₂O₂; (***) p < 0,01 vct vs. hTau40)

Die kurzfristige Inkubation mit 250 µM H₂O₂ führte nur in den vct- und TauP301L-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Superoxidanion-Radikale um etwa 7-8% (Abb.: 3.48 A). Interessanterweise kam es in den hTau40-Zellen zu keiner Veränderung der O₂⁻-Spiegel. Des Weiteren kam es in allen drei Zelltypen zu einer

geringen Erhöhung der Hydroxyl-Radikale, die nur in den TauP301L-Zellen signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle war (Abb.: 3-48 B).

3.3.3.2 Oxidativer Stress führt zum Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel sowie des MMPs und hat nur geringe Auswirkungen auf die Glykolyserate

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die 24-stündige Inkubation mit 100 μM H_2O_2 auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel, das MMP und die Glykolyserate der SH-SY5Y-Zellen hat (Abb.: 3-49 Seite 160).

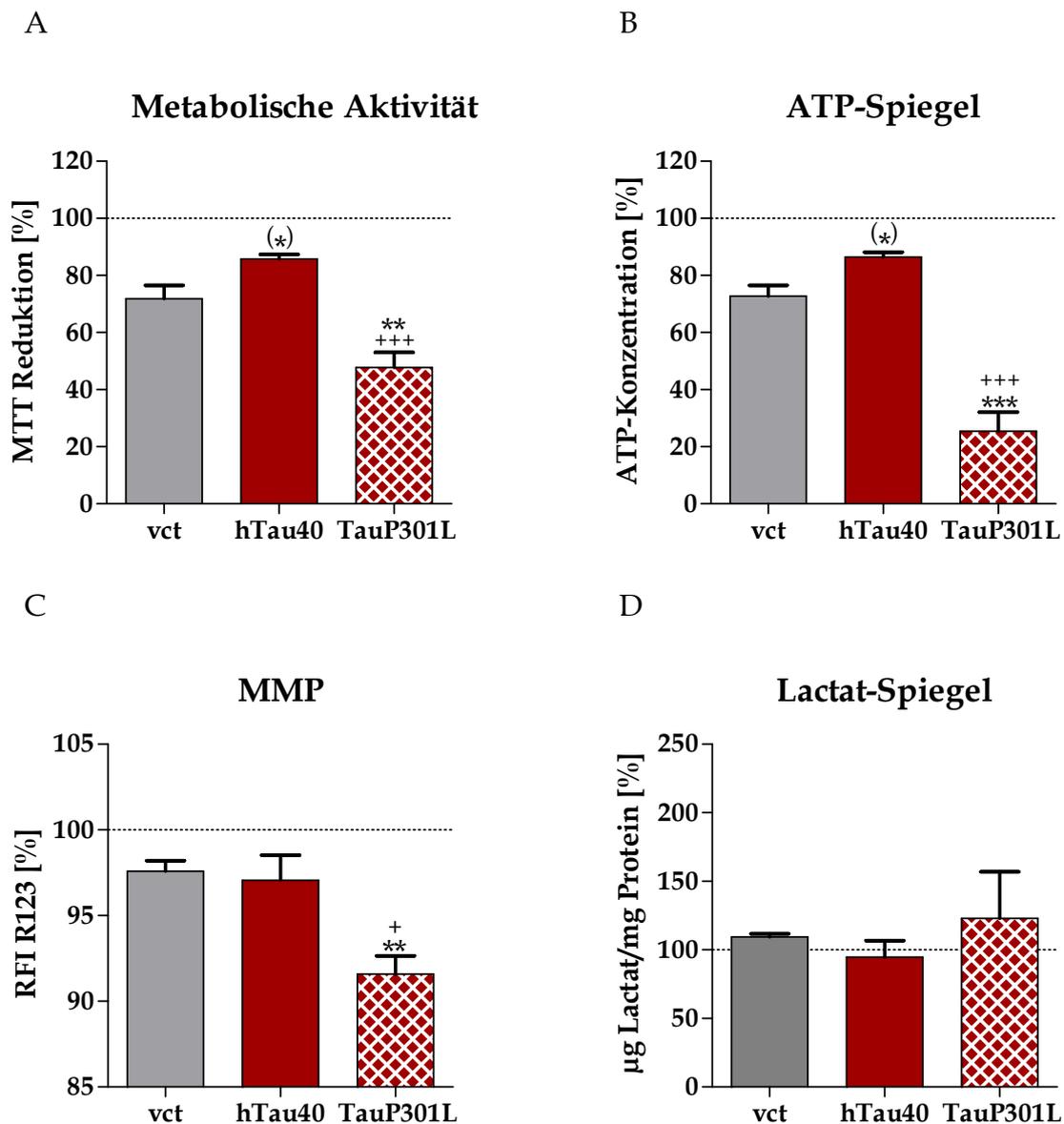


Abb.: 3-49 Oxidativer Stress führt zum Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel sowie des MMPs und hat nur geringe Auswirkungen auf die Glykolyserate

Gezeigt sind die Effekte von 100 μM H_2O_2 nach 24-stündiger Inkubation auf die metabolische Aktivität (A), die ATP- (B) und Lactat-Spiegel (D) sowie das MMP (C) der SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 5-7 (A), 4 (B), 6 (C) und 3 (D) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, ** $p < 0,01$ vct vs. TauP301L und + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. hTau40)

Der zusätzliche oxidative Stress führte in allen drei Zelltypen zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität, die in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausfiel, als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-49 A). Außerdem war die Abnahme in den

hTau40-Zellen tendenziell geringer, als in den vct-Zellen. Insgesamt verringerte sich die metabolische Aktivität in den vct- Zellen auf 71,82%, in den hTau40-Zellen auf 85,79% und in den TauP301L-Zellen auf 47,78% im Vergleich zu der jeweils unstimulierten Kontrolle. Ebenso führte die Inkubation mit H₂O₂ in allen drei Zelltypen zu einem Abfall der ATP-Spiegel, der in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausfiel (Abb.: 3-49 B). Hierbei sanken die ATP-Spiegel in den vct-Zellen auf 72,73%, in den hTau40-Zellen auf 86,44% und in den TauP301L-Zellen sogar auf 25,48% gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle ab. Allerdings kam es nur in den TauP301L-Zellen zu einem tendenziellen Anstieg der Lactat-Spiegel (Abb.: 3-49 D). Auf das Membranpotential der SH-SY5Y Zellen hatte H₂O₂ auch einen leichten depolarisierenden Effekt, der in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausgeprägt war, als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-49 C). Das Ausmaß der Depolarisation lag in den vct- und hTau40-Zellen bei etwa 3% und in den TauP301L-Zellen bei 8,4%.

Insgesamt zeigte sich, dass die SH-SY5Y Zellen sensitiver gegenüber oxidativem Stress sind. Die Expression von TauP301L führte zu einem verstärkten Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel und des Membranpotentials gegenüber den vct- und den hTau40-Zellen. Dazu passen auch die tendenziell erhöhten Lactat-Spiegel nach Inkubation mit H₂O₂, wodurch die Zellen versuchen dem deutlichen ATP-Abfall mit einer erhöhten Glykolyserate entgegenzuwirken.

3.3.4 Nitrosativer Stress durch SNP

Stickstoffmonoxid wird durch verschiedene NO-Synthasen (NOS) synthetisiert und aktiviert hauptsächlich die lösliche Guanylatzyklase. Des Weiteren hemmt NO unter anderem Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette oder interagiert mit Superoxidanion-Radikal zu Peroxynitrit, dass diverse toxische Eigenschaften aufweist (Radi et al., 2002). Vor einiger Zeit wurde eine mitochondriale Isoform der NOS entdeckt, die vermutlich eine Splicevariante der nNOS (neuronal NOS)

darstellt (Bates et al., 1995; Bates et al., 1996; Kanai et al., 2001). Die physiologische Konzentration von NO beträgt zwischen 0,1 und 100 nM (Brown et al., 1994b).

3.3.4.1 Akute Änderung der NO- und ATP-Spiegel durch SNP

Da schon basale Unterschiede in den NO- und ATP-Spiegeln der SH-SY5Y Zellen vorlagen (Abschnitt 3.1.5.1), wurden die Auswirkungen von zusätzlichem nitrosativen Stress auf die Mitochondrien untersucht. Hierfür wurden die Zellen kurzfristig mit Natriumnitroprussid (SNP) – einem NO-Donor – inkubiert (Maneiro et al., 2005) und anschließend die NO- und ATP-Spiegel bestimmt (Abb.: 3-50).

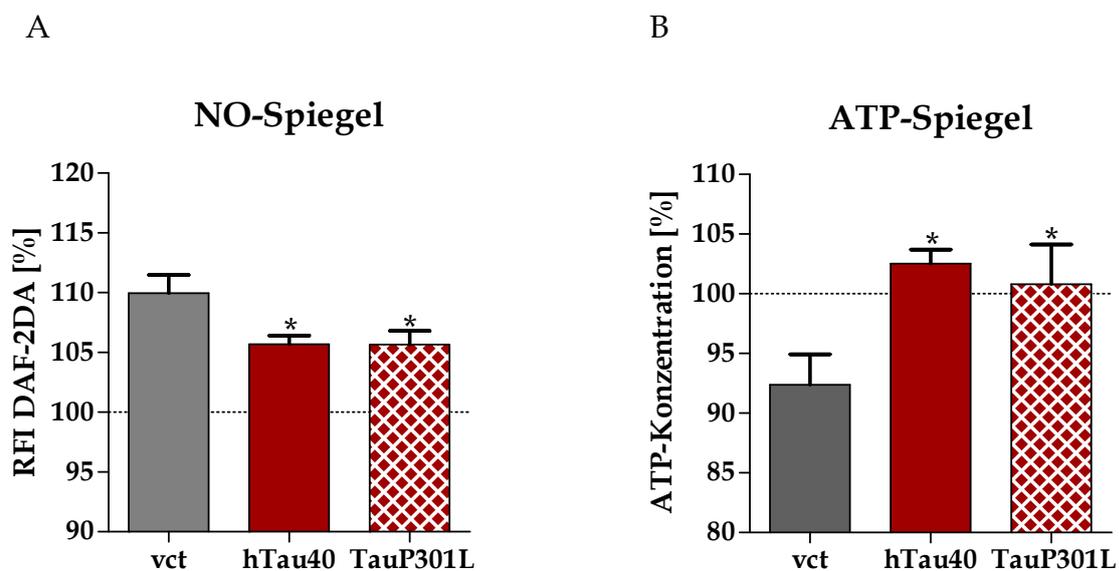


Abb.: 3-50 Anstieg der NO- und Abfall der ATP-Spiegel nach akuter SNP-Stimulation

Die SH-SY5Y Zellen wurden mit 500 μ M SNP inkubiert und direkt die ATP-Spiegel (B) sowie nach 30 min die NO- Spiegel (A) bestimmt. Gezeigt ist der Anstieg bzw. der Abfall gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 8 (A) und 5 (B) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L)

Die kurze Exposition mit SNP führte in allen drei Zelltypen zu einem Anstieg der NO-Spiegel (Abb. 3-50 A). Allerdings war dieser in den vct-Zellen fast doppelt so stark ausgeprägt (10%), wie in den hTau40- und TauP301L-Zellen (5,7%). Die akute

Messung der ATP-Spiegel nach SNP-Inkubation spiegelte die erhöhten NO-Spiegel und dessen hemmende Wirkung auf die Atmungskette der vct-Zellen wider (Abb.: 3-50 B). Hier kam es zu einer Abnahme der ATP-Spiegel um 8,62%, wohingegen es in den hTau40-Zellen zu einer tendenziellen Erhöhung und in den TauP301L-Zellen zu keiner Änderung kam.

3.3.4.2 Langfristiger nitrosativer Stress führt zu geringen Veränderungen der ATP-Spiegel sowie des MMPs der TauP301L-Zellen und hat kaum Auswirkungen auf die Glykolyserate

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SNP zu akuten Änderungen der mitochondrialen Funktion der SH-SY5Y Zellen führte (Abschnitt 3.3.4.1), wurde nun die Auswirkung einer langfristigen Exposition untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit 500 μ M SNP inkubiert und anschließend die ATP- und Lactat-Spiegel sowie das MMP untersucht (Abb.: 3-51 Seite 164).

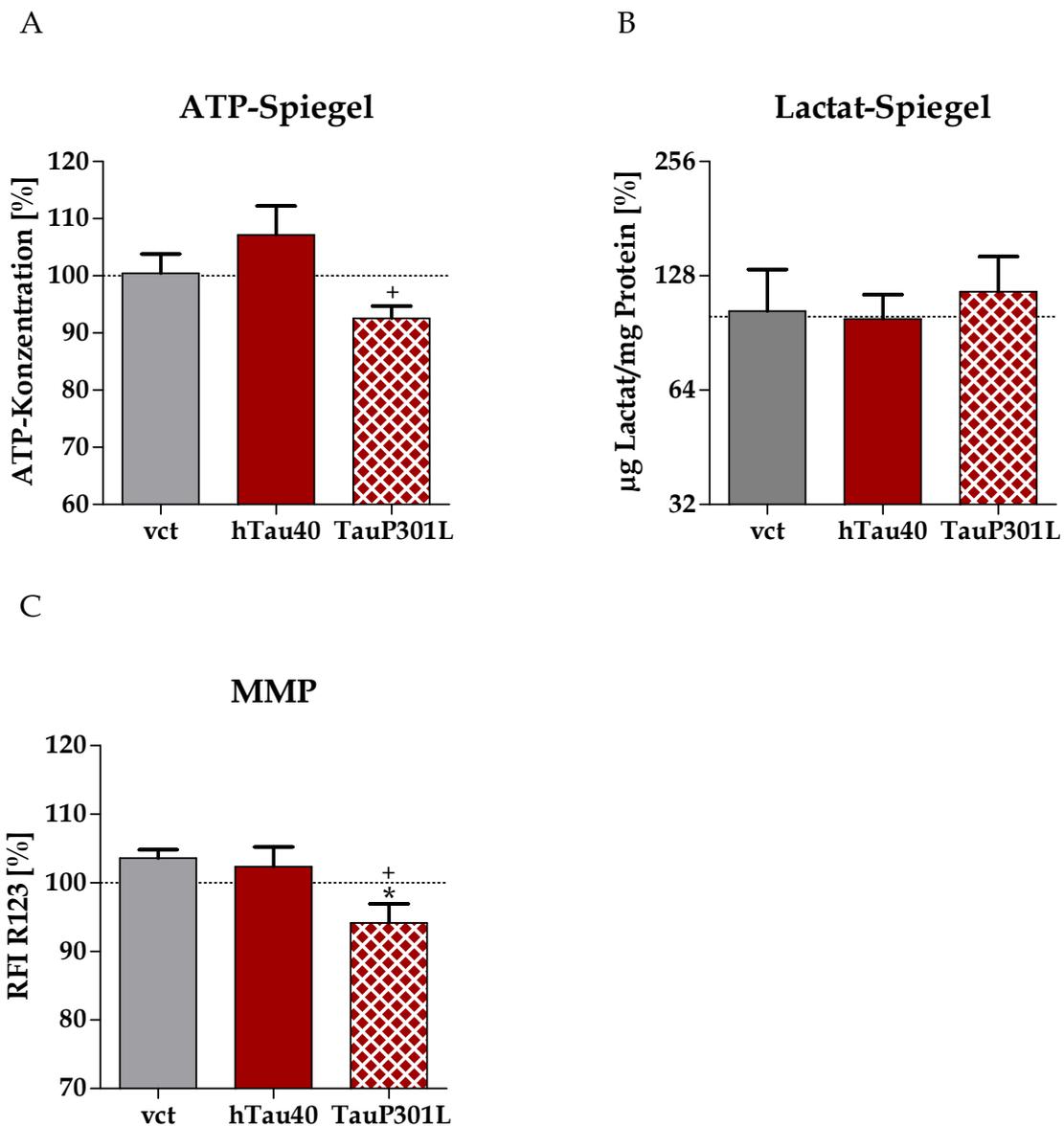


Abb.: 3-51 Inkubation mit SNP zeigt geringe Effekte auf die ATP-Spiegel und das MMP in den TauP301L-Zellen

Gezeigt sind die ATP- (A) und Lactat-Spiegel (B) sowie das MMP nach 24-stündiger Inkubation mit 500 µM SNP. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 4-5 (A), 3 (B) und 6 (C) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA – Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. TauP301L und + $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Die 24-stündige Inkubation mit SNP hatte nur einen geringen Einfluss auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-51 A). Die vct-Zellen zeigten keine Veränderung, wohingegen die hTau40-Zellen geringfügig erhöhte (107,2%) und die TauP301L leicht erniedrigte (92,56%) ATP-Spiegel aufwiesen. Dieser Abfall führte zu

signifikant erniedrigten ATP-Spiegeln in den TauP301L- gegenüber den hTau40-Zellen. Dem entsprechend hatte SNP unter diesen Versuchsbedingungen auch keinen Einfluss auf die Lactat-Spiegel (Abb.: 3-51 B). Allerdings war das Membranpotential der TauP301L-Zellen gegenüber den vct- und hTau40-Zellen signifikant erniedrigt (Abb.: 3-51 C).

3.3.4.3 Auswirkungen von nitrosativem Stress auf die Viabilität und die Zytotoxizität

Obwohl SNP nur einen geringen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hatte, wurde noch die metabolische Aktivität und Zytotoxizität in den SH-SY5Y Zellen überprüft (Abb.: 3-52).

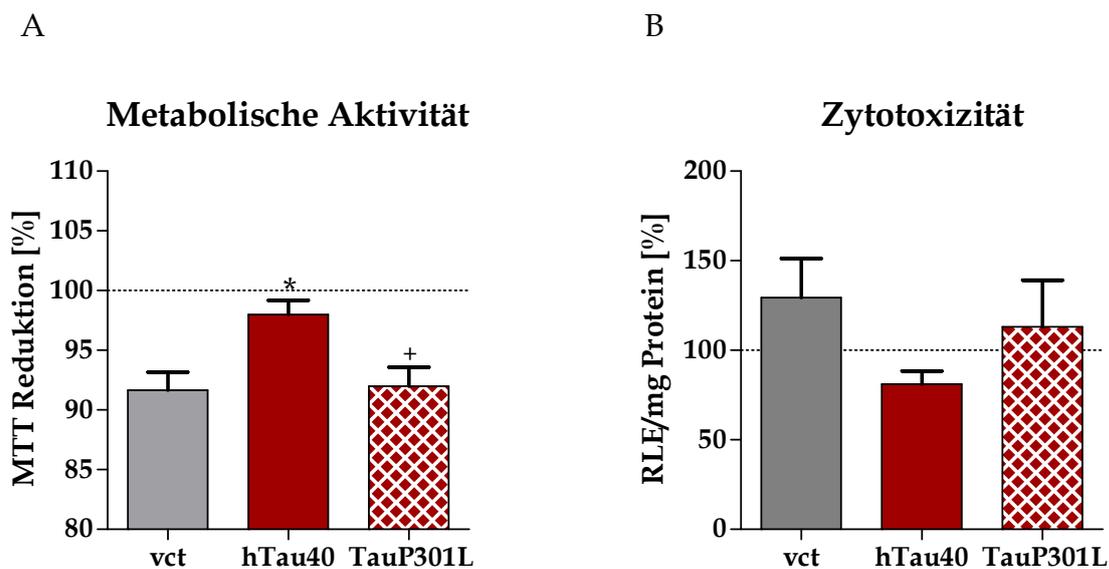


Abb.: 3-52 Zytotoxizität von nitrosativem Stress und dessen Einfluss auf die Viabilität

Gezeigt sind die metabolische Aktivität (A) und die Zytotoxizität nach 24-stündiger Inkubation mit 500 μ M SNP. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 und + $p < 0,05$ vct vs. TauP301L)

Die 24-stündige Exposition mit SNP führte in den SH-SY5Y Zellen zu einer geringen Abnahme der metabolischen Aktivität (Abb.: 3-52 A). Diese fiel in den hTau40-Zellen

allerdings signifikant geringer aus (-2.02%), als in den vct- (-8,44%) und TauP301L-Zellen (-8,01%). Dieses Bild spiegelte sich auch in der zytotoxischen Wirkung von SNP wider (Abb.: 3-52 B). Hier kam es in den hTau40-Zellen sogar zu einer tendenziellen Abnahme der Zytotoxizität (81,08%), wohingegen es in den vct- (129,5%) und TauP301L-Zellen (113,0%) zu einer leichten Erhöhung der Werte kam. Allerdings waren die Schwankungen der Messwerte zu groß, sodass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Zelltypen ergaben.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass zusätzlicher nitrosativer Stress in den SH-SY5Y Zellen nur einen minimalen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hatte. Außerdem waren die akuten Effekte fast stärker ausgeprägt, als nach 24-stündiger Exposition. Allerdings waren die TauP301L-Zellen empfindlicher gegenüber erhöhten NO-Spiegeln, was sich in einem stärkeren ATP- und Membranpotentialabfall zeigte. Bezogen auf die metabolische Aktivität und Zytotoxizität führte die Überexpression von hTau40 zu einer Art Schutz gegenüber den erhöhten NO-Spiegeln.

3.3.5 Auswirkungen verschiedener Aggregationsformen von A β ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Funktion

Die extrazellulären Ablagerungen (senilen Plaques) bei der Alzheimer Demenz bestehen hauptsächlich aus aggregiertem A β . Ursprünglich ging man davon aus, dass die Toxizität durch die Aggregationsform bedingt ist (Pike et al., 1991). Neuere Untersuchungen haben allerdings zeigen können, dass bereits lösliches oligomeres A β neurotoxisch wirken kann (McLean et al., 1999; Walsh et al., 2002) und die Oligomerisierung auch intrazellulär stattfindet (Walsh et al., 2000). Obwohl A β ₁₋₄₂ nur einen geringen Anteil (5-10%) an der Gesamtmenge an A β ausmacht, zeichnet es sich doch durch das höchste Aggregationspotential aus (Finder et al., 2007). Daher wurden die Auswirkungen von oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen untersucht. Hierfür wurden

unterschiedliche Konzentrationen [10, 50, 100, 500 und 1000 nM] getestet und nach 3 und 24 Stunden die verschiedenen Assays durchgeführt.

3.3.5.1 A β -Spiegel der SH-SY5Y Zellen

Es ist bekannt, dass eine 5-tägige Exposition mit A β ₁₋₄₂ zur Ausbildung von neurofibrillären Bündeln in den hTau40- und TauP301L-Zellen führt (Ferrari et al., 2003). Daher wurde untersucht, ob die Überexpression von hTau40 oder TauP301L einen Einfluss auf die A β -Spiegel in den SH-SY5Y Zellen hat (Abb.: 3.53). Hierfür wurde mittels eines ELISAs der A β ₁₋₄₀-Spiegel bestimmt, da dieses den größeren Anteil am Gesamt-A β ausmacht.

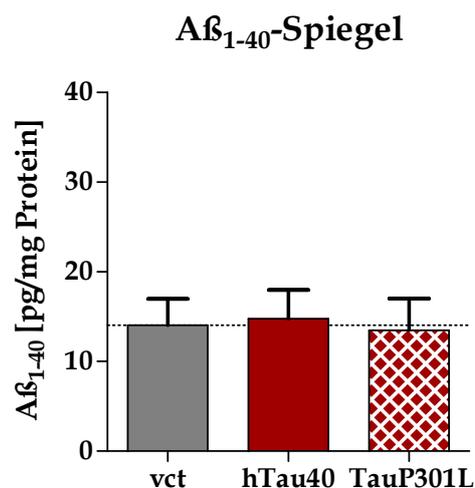


Abb.: 3-53 Die A β ₁₋₄₀-Spiegel der SH-SY5Y Zellen

Nach 24 Stunden wurde das sezernierte A β ₁₋₄₀ aus dem Medium bestimmt und auf die Proteinmenge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 7 Einzelexperimenten

Die A β ₁₋₄₀-Spiegel unterschieden sich nicht in den SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-53). Bei allen drei Zelltypen konnten um die 14 pg/mg Protein A β ₁₋₄₀ nachgewiesen werden. Da die Werte schon sehr nahe an der Nachweisgrenze des ELISAs lagen (<6 pg/mg), wurde von einer Bestimmung des in viel geringerem Maße vorkommenden A β ₁₋₄₂ abgesehen.

3.3.5.2 A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen haben nur geringe Effekte auf die ATP-Spiegel

Frühere Studien haben gezeigt, dass A β *in vitro* wie *in vivo* zu erniedrigten ATP-Spiegeln führt. Dies konnte zum Einen nach 24-stündiger Inkubation mit fibrillärem A β ₁₋₄₂ in PC12 Zellen (Keil et al., 2004) und zum Anderen als chronischer Effekt durch die Überexpression von APPwt bzw. APPsw in Neuroblastoma Zellen (Wang et al., 2008b) und transgenen Mäusen (Eckert et al., 2008b) beobachtet werden. Allerdings wurde bisher noch nicht der Einfluss von oligomeren oder fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die ATP-Produktion in Tau überexprimierenden Zellen oder auf die Mutation P301L untersucht (Abb.: 3-54 Seite 169).

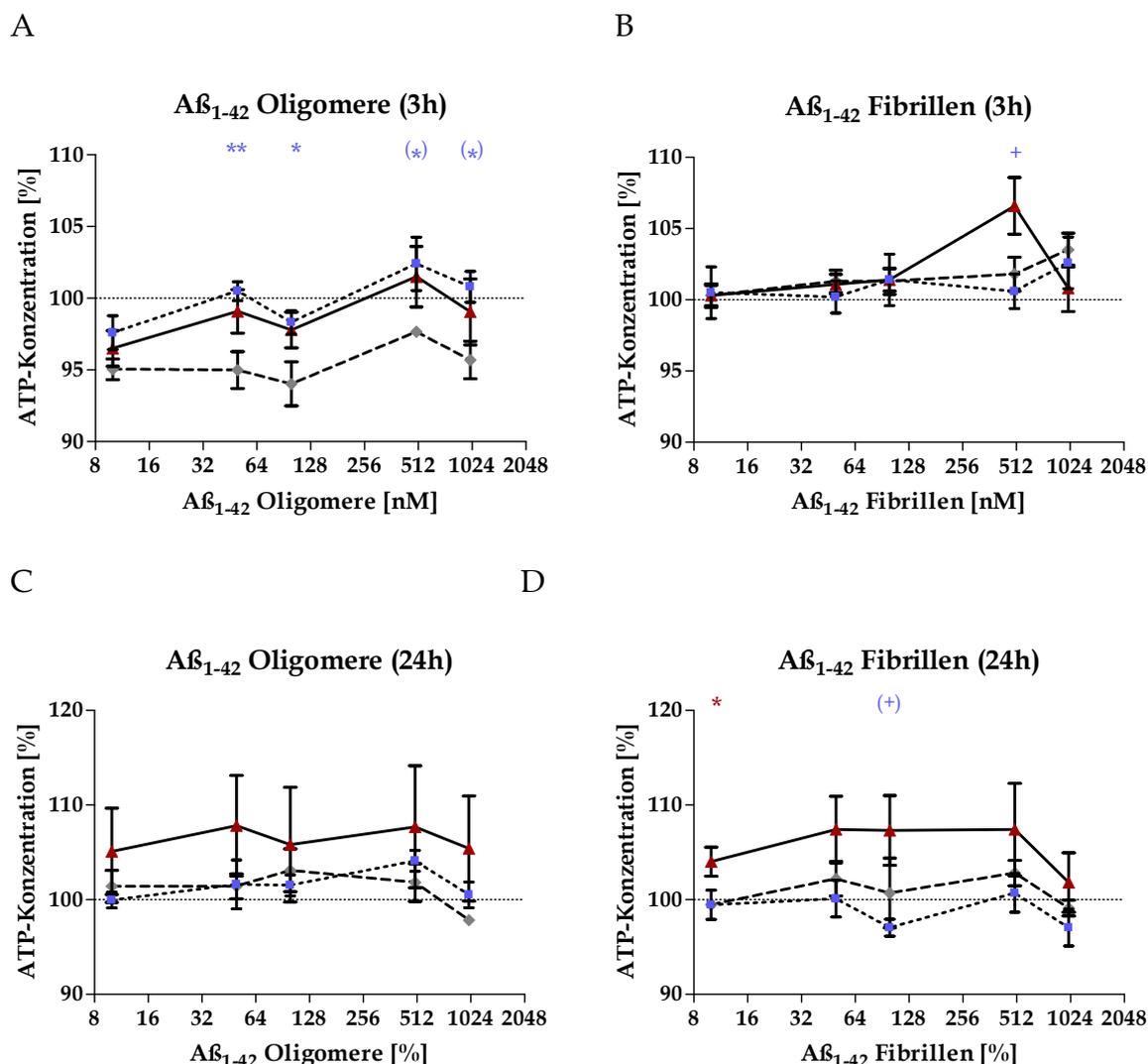


Abb.: 3-54 Die verschiedenen Aggregationsformen von Aβ₁₋₄₂ haben geringe, aber unterschiedliche Wirkungen auf die ATP-Spiegel

Die Zellen wurden für 3 (A, B) oder 24 Stunden (C, D) mit oligomerem (A, C) oder fibrillärem Aβ₁₋₄₂ (B, D) inkubiert und anschließend die ATP-Spiegel gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 8 (A, B) und 5 (C, D) Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht; vct = graue Raute, hTau40 = rotes Dreieck und TauP301L = blaues Viereck (One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test, * p < 0,05 vct vs. hTau40 oder TauP301L; + p < 0,05 hTau40 vs. TauP301L; Unpaired t test, (*) p < 0,05 vct vs. TauP301L; (+) p < 0,05 hTau40 vs. TauP301L)

Die kurze Inkubationsdauer mit Aβ₁₋₄₂-Fibrillen hatte eigentlich keinen Einfluss auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3.54 B). Interessanterweise kam es bei 500 nM Aβ₁₋₄₂-Fibrillen zu einem signifikanten Anstieg in den hTau40-Zellen verglichen mit den TauP301L-Zellen. Ansonsten kam es bei 1000 nM zu einem

minimalen Anstieg der ATP-Spiegel in den vct- und TauP301L-Zellen von 2-3%. Die Inkubation mit oligomerem A β ₁₋₄₂ führte in den vct-Zellen bei allen Konzentrationen zu einem Abfall der ATP-Spiegel um etwa 5% (Abb.: 3-54 A). Bei den hTau40- und TauP301L-Zellen kam es nur bei 10 und 100 nM zu einer Abnahme, die bei 10 nM am stärksten ausgeprägt war (hTau40 -3,5% und TauP301L -2,4%). Insgesamt hatten die Oligomere auf die ATP-Spiegel der vct-Zellen vor allem im Vergleich mit den TauP301L-Zellen den größten Einfluss, wohingegen die Fibrillen nach 3-stündiger Inkubation keinen Effekt auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen hatten. Im Folgenden sind die sich daraus ergebenden Signifikanzen tabellarisch zusammengefasst (Tab.: 3-4).

A β ₁₋₄₂ [nM]	10	50	100	500	1000
hTau40 (Oligomere)	n.s.	* +4,10%	n.s.	n.s.	n.s.
P301L (Oligomere)	n.s.	* +5,46%	* +4.28%	(* +4.76%)	(** +5.06%)
hTau40 (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P301L (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	+ -6,01%	n.s.

Tab.: 3-4 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 3-stündigen A β ₁₋₄₂- Inkubation auf die ATP-Spiegel

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 8 Einzelexperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * p < 0,05 vct vs. hTau40 oder TauP301L; + p < 0,05 hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) p < 0,05 vct vs. TauP301L)

Nach 24-stündiger Inkubation mit oligomeren A β ₁₋₄₂ kam es in den vct-Zellen nur bei 1000 nM zu einem geringen Abfall der ATP-Spiegel (-2,17%) (Abb.: 3-54 C). Bei den hTau40-Zellen kam es bei allen Konzentrationen zu einem Anstieg der ATP-Spiegel von 5-7%, allerdings waren hier die Messschwankungen sehr stark ausgeprägt. In

den TauP301L-Zellen kam es nur bei 500 nM zu einer geringen Zunahme (+4,10%). Die Inkubation mit fibrillärem A β ₁₋₄₂ hatte keinen Einfluss auf die ATP-Spiegel der vct-Zellen (Abb.: 3-54 D). Die hTau40-Zellen zeigten bei allen Konzentrationen bis auf 1000 nM wieder einen Anstieg um 4-7%, der bei 10 nM signifikant gegenüber den vct-Zellen war. Bei den TauP301L-Zellen führte die Inkubation mit 100 und 1000 nM fibrillärem A β ₁₋₄₂ zu einer geringen Abnahme der ATP-Spiegel um 3%. Im Folgenden sind noch mal die sich daraus ergebenden Signifikanzen tabellarisch zusammengefasst (Tab.: 3-5).

A β ₁₋₄₂ [nM]	10	50	100	500	1000
hTau40 (Oligomere)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P301L (Oligomere)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
hTau40 (Fibrillen)	* +4,50%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P301L (Fibrillen)	n.s.	n.s.	(+ -10.21%)	n.s.	n.s.

Tab.: 3-5 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 24-stündigen A β ₁₋₄₂- Inkubation auf die ATP-Spiegel

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 5 Einzelerperimenten (*One way ANOVA – Post Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*, * p < 0,05 vct vs. hTau40; *Unpaired t test*, (+) p < 0,05 hTau40 vs. TauP301L)

Insgesamt führte die Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ unter diesen Versuchsbedingungen nur zu geringen Veränderungen der ATP-Spiegel. Bei der kurzfristigen Inkubation waren die Oligomere für die vct-Zellen deutlich toxischer, als die Fibrillen, was sich durch signifikant erniedrigte ATP-Spiegel zeigte. Nach 24-stündiger Exposition mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ wiesen die hTau40-Zellen leicht erhöhte ATP-Spiegel auf, wohingegen diese keinen Einfluss auf die ATP-Spiegel der vct- und TauP301L-Zellen hatten. Es kann aber nicht ausgeschlossen

werden, dass *in vivo* nicht doch ein Teufelskreis besteht, der dann auch einen Einfluss auf die ATP-Spiegel hat.

3.3.5.3 A β_{1-42} Oligomere und Fibrillen führen nicht zu einer erhöhten Glykolyserate

Obwohl oligomeres und fibrilläres A β_{1-42} nur einen geringen Effekt auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen hatte (Abschnitt 3.3.5.2), wurde der Einfluss auf die Glykolyserate getestet (Abb.: 3-55). Da nach 24-stündiger Inkubation die Effekte auf die ATP-Spiegel und die metabolische Aktivität schon bei 10 nM deutlich ausgeprägt waren (Abb.: 3-54 C und D, Abb.: 3-57 C und D), wurde auch die Glykolyserate nach Exposition mit 10 nM oligomerem und fibrillärem A β_{1-42} bestimmt.

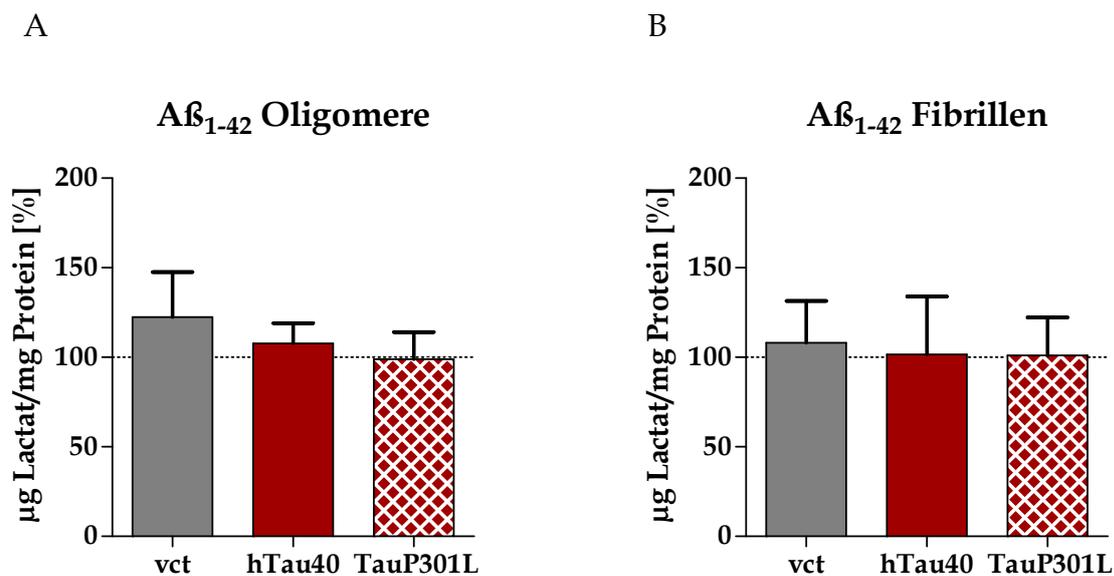


Abb.: 3-55 A β_{1-42} Oligomere und Fibrillen haben kaum Einfluss auf die Lactat-Spiegel

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 nM oligomerem (A) und fibrillärem A β_{1-42} (B) inkubiert und anschließend die Lactat-Spiegel aus dem Medium bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelerperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht

Nach Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β_{1-42} kam es zu keiner Veränderung der Lactat-Spiegel in den SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-55 A und B). Nur

die Exposition von 10 nM oligomeren A β ₁₋₄₂ führte in den vct-Zellen zu einer tendenziellen Erhöhung der Lactat-Spiegel, die aber aufgrund der hohen Schwankungen nicht signifikant war (Abb.: 3-55 A).

Die unveränderte Glykolyserate nach 24-stündiger Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ geht mit den geringen Effekten auf die ATP-Spiegel einher.

3.3.5.4 A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen führen zu geringfügigen Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials

Es ist bereits bekannt, dass oligomeres und fibrilläres A β ₁₋₄₂ schon in geringer Konzentration (50 nM) und nach 4-stündiger Inkubationszeit in den P301L-Mäusen zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führt (David et al., 2005a; Eckert et al., 2008a). Daher wurde dies nun in den SH-SY5Y Zellen näher untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 3 und 24 Stunden mit verschiedenen oligomeren und fibrillären A β ₁₋₄₂-Konzentrationen [10, 50, 100, 500 und 1000 nM] inkubiert und anschließend das MMP mit dem Fluoreszenzfarbstoff R123 gemessen (Abb.: 3-56 Seite 174).

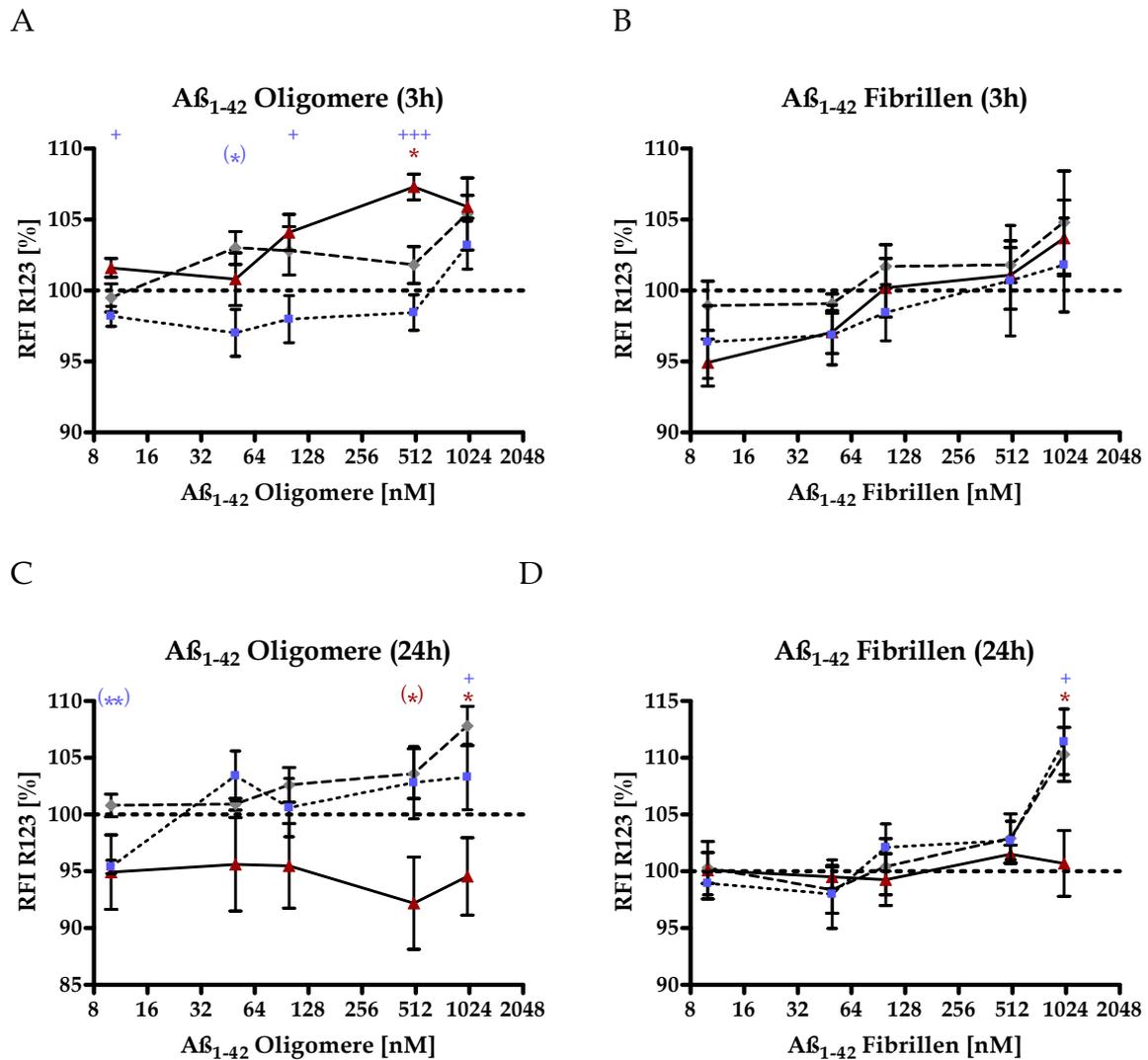


Abb.: 3-56 Geringfügige Änderungen des MMP nach Inkubation mit $A\beta_{1-42}$ Oligomeren und Fibrillen

Die Zellen wurden für 3 (A, B) oder 24 Stunden (C, D) mit oligomerem (A, C) oder fibrillärem $A\beta_{1-42}$ (B, D) inkubiert und anschließend das MMP gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 5 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht; vct = graue Raute, hTau40 = rotes Dreieck und TauP301L = blaues Viereck (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40 oder TauP301L; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. TauP301L; (+) $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L)

Nach kurzer Expositionsdauer von 3 Stunden mit oligomerem $A\beta_{1-42}$ kam es in den vct-Zellen ab 50 nM zu einer leichten Hyperpolarisation, die bei 1000 nM am stärksten (+5,4%) ausgeprägt war (Abb.: 3-56 A). Bei den hTau40-Zellen kam es ab 100 nM oligomerem $A\beta_{1-42}$ ebenfalls zu einer Hyperpolarisation, die bei 500 nM am stärksten ausgeprägt war (+7,3%). Im Gegensatz dazu wiesen die TauP301L-Zellen

bei fast allen Konzentrationen eine leichte Depolarisation auf. Nur bei 1000 nM oligomerem A β ₁₋₄₂ kam es zu einer leichten Hyperpolarisation (+3,2%). Die Inkubation mit fibrillärem A β ₁₋₄₂ führte zu keinen signifikanten Unterschieden beim mitochondriale Membranpotential der SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-56 B). Das MMP der vct-Zellen war nur nach 1000 nM fibrillärem A β ₁₋₄₂ leicht hyperpolarisiert (+4,8%), ebenso das der hTau40-Zellen (+3,7%). Allerdings kam es bei den hTau40- (-5%) und TauP301L-Zellen (-3%) bei 10 und 50 nM fibrillärem A β ₁₋₄₂ zu einer leichten Depolarisation des MMP. Die sich daraus ergebenden Signifikanzen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tab.: 3-6).

A β ₁₋₄₂ [nM]	10	50	100	500	1000
hTau40 (Oligomere)	n.s.	n.s.	n.s.	* +5,47%	n.s.
P301L (Oligomere)	+ - 3,38%	(* - 6,04%)	+ - 6,09%	+++ - 8,87%	n.s.
hTau40 (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P301L (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.: 3-6 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 3-stündigen A β ₁₋₄₂- Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 5 Einzelexperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Tukey's Multiple Comparison Test*, * p < 0,05 vct vs. hTau40 oder tauP301L; *Unpaired t test*, (*) p < 0,05 vct vs. TauP301L)

Nach 24-stündiger Inkubation mit oligomerem A β ₁₋₄₂ kam es in den vct-Zellen bei 100 und 500 nM zu einer leichten (~ +3%) und bei 1000 nM zu einer stärkeren Hyperpolarisation (+7,8%) des MMP (Abb.: 3-56 C). Im Gegensatz dazu führten alle Konzentrationen in den hTau40-Zellen zu einer Depolarisation um etwa 5,5%. Bei den TauP301L-Zellen kam es nach Inkubation mit 10 nM oligomeren A β ₁₋₄₂ zu einer leichten Depolarisation (-4,61%) und bei 50 nM zu einer leichten Hyperpolarisation

(+3,4%). Die restlichen Konzentrationen führten zu großen Schwankungen, sodass hier kein Effekt auf das MMP messbar war. Die Exposition mit fibrillärem A β ₁₋₄₂ führte nur bei 1000 nM in den vct- (+10,3%) und TauP301L-Zellen (+11,4%) zu einer deutlichen Hyperpolarisation des MMP (Abb.: 3-56 D). Die restlichen Konzentrationen hatten hier keinen Einfluss auf das MMP der SH-SY5Y Zellen. Im Folgenden sind die sich daraus ergebenden Signifikanzen tabellarisch zusammengefasst (Tab.: 3-7).

A β ₁₋₄₂ [nM]	10	50	100	500	1000
hTau40 (Oligomere)	n.s.	n.s.	n.s.	(*) -11,39%	* -13,28%
P301L (Oligomere)	(**) -5,24%	n.s.	n.s.	n.s.	+ +8,79%
hTau40 (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* -9,60%
P301L (Fibrillen)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+ +10,66%

Tab.: 3-7 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 24-stündigen A β ₁₋₄₂- Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential

Die angegebenen Werte beziehen sich auf den Unterschied der einzelnen Zelltypen im Vergleich zu den vct-Zellen (*) oder den hTau40-Zellen (+). Dargestellt sind die Abweichungen der prozentualen Mittelwerte von 5 Einzelerperimenten (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * p < 0,05 vct vs. hTau40 und + p < 0,05 hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) p < 0,05 vct vs. hTau40 oder. TauP301L)

Obwohl insgesamt die Effekte auf das MMP stark abhängig vom Zelltyp und der Inkubationsdauer waren, konnten die depolarisierenden Effekte von 50 nM oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ nach kurzer Inkubationsdauer der P301L-Mäuse in den TauP301L-Zellen bestätigt werden.

3.3.5.5 Einfluss von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen auf die metabolische Aktivität

Nachdem vor allem die oligomere Form von A β ₁₋₄₂ einen Effekt auf die ATP-Spiegel und das mitochondriale Membranpotential gezeigt hatte, wurden nun die Auswirkungen von oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die metabolische Aktivität der SH-SY5Y Zellen untersucht (Abb.: 3-57).

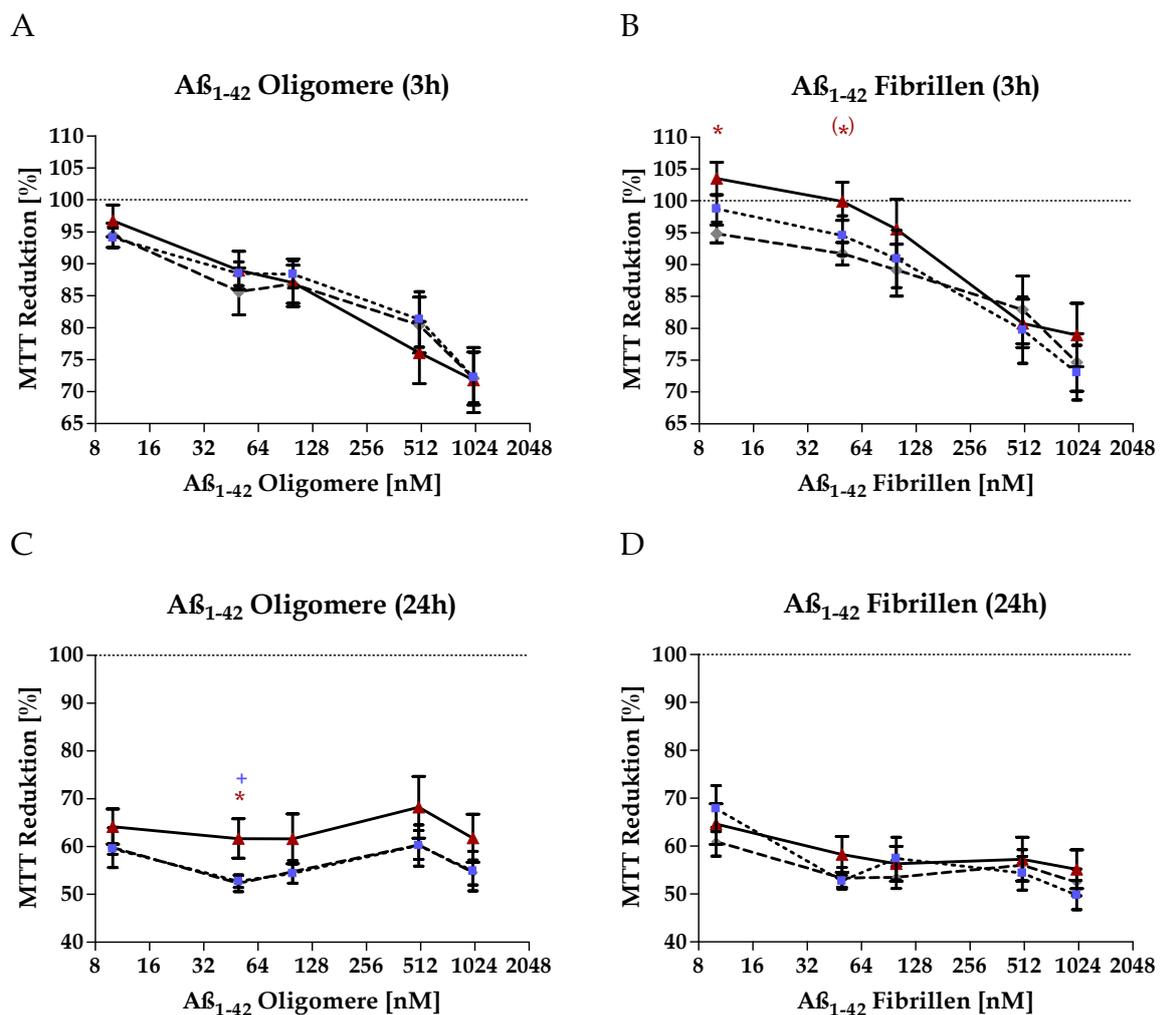


Abb.: 3-57 Abnahme der metabolischen Aktivität durch Inkubation mit A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen

Die Zellen wurden für 3 (A, B) oder 24 Stunden (C, D) mit oligomerem (A, C) oder fibrillärem A β ₁₋₄₂ (B, D) inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 7 (A, B) und 5 (C, D) Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht; vct = graue Raute, hTau40 = rotes Dreieck und TauP301L = blaues Viereck (*One way ANOVA - Post Test: Newman-Keuls Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40; + $p < 0,05$ hTau40 vs. TauP301L; *Unpaired t test*, (*) $p < 0,05$ vct vs. hTau40)

Die kurzzeitige Exposition mit oligomerem A β ₁₋₄₂ führte in allen drei Zelltypen schon ab 10 nM (~ -5%) zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der metabolischen Aktivität, die bei 1000 nM auf etwa 72% der jeweils unstimulierten Kontrolle abgenommen hatte (Abb.: 3-57 A). Allerdings waren hier keine Unterschiede zwischen den Zelltypen detektierbar. Fibrilläres A β ₁₋₄₂ führte nach kurzer Inkubationsdauer erst ab 500 nM zu einer ähnlichen Schädigung wie oligomeres A β ₁₋₄₂ (Abb.: 3-57 B). Bei 50 nM waren auch die Oligomere etwa 8% toxischer für die SH-SY5Y Zellen, als die Fibrillen. Generell reagierten die vct- und TauP301L-Zellen am empfindlichsten auf die Fibrillen, vor allem bei 10 und 50 nM war die metabolische Aktivität der vct-Zellen signifikant gegenüber den hTau40-Zellen erniedrigt, wobei aber kein Unterschied zwischen hTau40 und TauP301L detektiert werden konnte. Nach einer 24-stündigen Exposition mit A β ₁₋₄₂ nahm die metabolische Aktivität unabhängig von der verwendeten Konzentration und vom Aggregationszustand um etwa 40-50% ab (Abb.: 3-57 C und D). Interessanterweise hemmte oligomeres A β ₁₋₄₂ die metabolische Aktivität der vct- und TauP301L-Zellen stärker, als die der hTau40-Zellen, wobei nach Behandlung mit den Fibrillen keine Unterschiede zwischen den Zelltypen detektierbar waren.

Insgesamt führte die Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ kaum zu Unterschieden in der metabolischen Aktivität zwischen den drei Zelltypen. Bei der kurzfristigen Inkubation waren die Oligomere in den niedrigeren Konzentrationen etwas toxischer, als die Fibrillen, wobei es aber bei beiden Aggregationszuständen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der metabolischen Aktivität kam. Nach 24-stündiger Exposition wiesen die hTau40-Zellen eine leicht erhöhte metabolische Aktivität nach Inkubation mit oligomerem A β ₁₋₄₂ auf. Außerdem war hier die Hemmung fast unabhängig von Konzentration und Aggregatzustand des A β ₁₋₄₂.

3.3.5.6 Zytotoxizität von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen

Nachdem bereits eine 24-stündige Exposition mit 10 nM oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ zu einer maximalen Inhibierung der metabolischen Aktivität in den SH-SY5Y

Zellen geführt hatte, wurde nun die Zytotoxizität von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen bestimmt (Abb.: 3-58).

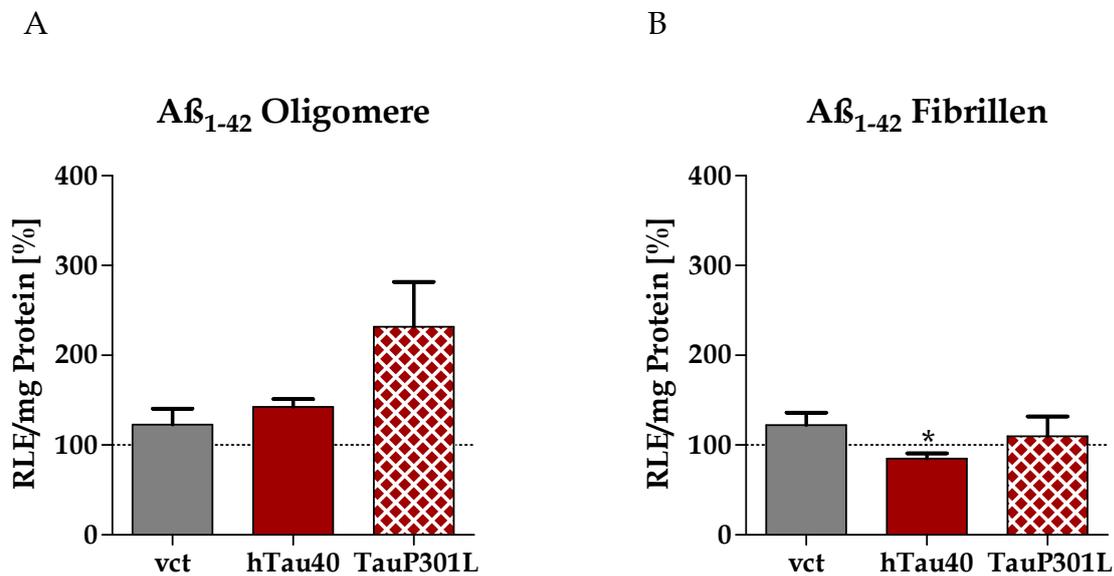


Abb.: 3-58 Zytotoxizität von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 nM oligomerem (A) und fibrillärem A β ₁₋₄₂ (B) inkubiert und anschließend deren Zytotoxizität auf die SH-SY5Y Zellen bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 3-4 Einzelexperimenten, wobei die jeweils eigene unstimulierte Kontrolle 100% entspricht (*Unpaired t test*, * $p < 0,05$ vct vs. hTau40).

Es zeigte sich, dass auch hier die Oligomere und Fibrillen unterschiedliche Effekte auf die SH-SY5Y Zellen hatten. Während der zytotoxische Effekt von A β ₁₋₄₂ auf die vct-Zellen unabhängig vom Aggregationszustand zu sein schien (+23%), waren für die hTau40- und TauP301L-Zellen die Oligomere viel zytotoxischer (Abb.: 3-58 A), als die Fibrillen (Abb.: 3-58 B). Die Inkubation mit 10 nM oligomerem A β ₁₋₄₂ führte in den hTau40-Zellen zu einem Anstieg um 42,6% und in den TauP301L-Zellen sogar um 131,8%. Aufgrund der starken Messschwankungen bei den TauP301L-Zellen waren die Unterschiede aber nicht signifikant. Interessanterweise kam es in den hTau40-Zellen nach Inkubation mit 10 nM fibrillärem A β ₁₋₄₂ zu einer geringen Abnahme der Zytotoxizität (-15,33%), sodass die Fibrillen zu einer signifikant erhöhten Zytotoxizität in den vct-Zellen gegenüber den hTau40-Zellen führten. Auf die TauP301L-Zellen hatten die Fibrillen keinen zytotoxischen Effekt.

Insgesamt waren für die hTau40 und TauP301L überexprimierenden Zellen die Oligomere zytotoxischer, als die Fibrillen, wohingegen beide Aggregationsformen einen ähnlichen zytotoxischen Effekt bei den vct-Zellen hervorriefen.

4. Diskussion

4.1 Die veränderte mitochondriale Morphologie der hTau40 und TauP301L-Zellen spiegelt die jeweilige metabolische Situation der Zellen wieder

Die physiologische Hauptaufgabe von Tau besteht in der Stabilisierung der Mikrotubuli. Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gebundenen und freiem Tau, das durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird. Die Mutation P301L führt dazu, dass Tau zum Einen schneller und zum Anderen in einem stärkeren Ausmaß phosphoryliert wird (Alonso et al., 2004). Dadurch kann Tau nicht mehr so gut an die Mikrotubuli binden und verliert seine Fähigkeit die Dynamik der Mikrotubuli zu regulieren (Bunker et al., 2006a; Hasegawa et al., 1998; Hong et al., 1998b). Außerdem führt die Mutation P301L im Vergleich zu Wildtyp Tau verstärkt zur Keimbildung von monomerem Tau, wodurch dann fibrillogene Strukturen (PHFs) entstehen können (Aoyagi et al., 2007).

Durch die Stabilisierung der Mikrotubuli hat Tau auch einen entscheidenden Einfluss auf den Transport von essentiellen zellulären Komponenten wie Vesikel, die beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Signalmolekülen enthalten, aber auch größere Organellen wie Mitochondrien, die im Soma und in Axonen mit Motorproteinen entlang der Mikrotubuli transportiert werden (Roy et al., 2005). Hierdurch wird die Energieversorgung und Viabilität der Zellen garantiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von Tau in neuronalen und nichtneuronalen Zellen den Kinesin-abhängigen schnellen Transport (bis zu mehreren hundert Millimetern pro Tag) von Vesikeln, Neurofilamenten und Mitochondrien vermindert (Ebner et al., 1998; Stamer et al., 2002; Trinczek et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird der langsame axonale Transport von Tau selbst (ein bis mehrere Millimeter pro Tag) weder durch verschiedene Isoformen, noch durch die P301L Mutation beeinflusst (Utton et al., 2002). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass Tau mit Dynactin (Dynein-Aktivator-Komplex) interagiert und

die Bindung des Dynactin/Dynein-Komplex an die Mikrotubuli verstärkt (Magnani et al., 2007). Dynactin stabilisiert wiederum die Interaktion von Dynein mit den Mikrotubuli und vermittelt so dessen Bindung an Vesikel und an membrangebundene Aktinfilamente. Somit hat Tau einen Einfluss auf den anterograden sowie retrograden Transport von Mikrotubuli und Vesikeln. Außerdem kann Tau mit seiner Projektionsdomäne unter anderem an die Plasmamembran binden und so die Morphologie von Neuronen sowie die Ausbildung von Neuriten beeinflussen (Brandt et al., 1995).

Eine Studie an transgenen Mäusen konnte direkte strukturelle wie funktionelle Effekte durch die Überexpression der P301L-Mutation auf die mitochondriale Funktion aufdecken (David et al., 2005a). Diese Mäuse weisen eine mitochondriale Dysfunktion durch eine verminderte Komplex I-Aktivität auf, die im Alter zu einer schlechteren mitochondrialen Atmung und erniedrigten ATP-Synthese führt. Außerdem ist die mitochondriale Dysfunktion durch erhöhte ROS-Spiegel, veränderte Lipidperoxidation sowie einer Hochregulierung von antioxidativen Enzymen in Folge des oxidativen Stresses gekennzeichnet.

Ausgehend von diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit durch Nachahmung der Tau-Pathologie der Zusammenhang zwischen der Verteilung und der Morphologie der Mitochondrien sowie der metabolischen Situation in den SH-SY5Y Zellen untersucht. Außerdem konnte zwischen den Auswirkungen der Überexpression von hTau40 an sich und der Mutation P301L differenziert werden. Da allerdings keine Daten zur absoluten Quantifizierung der Tau-Spiegel in den verschiedenen Zelltypen vorliegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass leichte Unterschiede in der Tau-Expression zwischen den hTau40- und den TauP301L-Zellen die Resultate beeinflussen. Die Gruppe um Ferrari *et al.* hat die Expression per Westernblot überprüft und vergleichbare Expressionsspiegel der 4R Tau-Isoformen in hTau40 und TauP301L detektiert, die etwa 10-fach höher war als in den Kontroll-Zellen (Ferrari et al., 2003).

4.1.1 Auswirkungen durch die Überexpression von hTau40 auf die mitochondriale Funktion und Morphologie

4.1.1.1 Morphologie und mitochondriale Dynamik in den hTau40-Zellen

Durch die Überexpression von hTau40 kommt es zu morphologischen Veränderungen, die in einer Zunahme der Zellgröße und einem ausgedehnten mitochondrialen Netzwerk resultieren (Abb.: 3-1 B Seite 88). Diese Befunde gehen mit Beobachtungen von der Gruppe Trinczek *et al.* einher, dass die Expression von hTau40 in Tau-defizienten CHO-Zellen zu einer Zunahme der Zellgröße führt (Trinczek *et al.*, 1999). Zusätzlich spiegelt sich dies auch in der Masse der Zellen wieder, die bei den hTau40-Zellen signifikant erhöht ist (Abb.: 3-2 A Seite 89). Die Zunahme der Zellgröße und das ausgedehnte mitochondriale Netzwerk kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Die verstärkte Expression von hTau40 führt anscheinend zu einer besseren Stabilisierung der Mikrotubuli. Denn solange ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Tau besteht, müsste sich das größere Angebot an Tau in einer verstärkten Stabilisierung der Mikrotubuli resultieren. Bekannt ist, dass Tau die Bindung von Dynactin an die Mikrotubuli verstärkt und damit indirekt auch den Transport von Vesikeln und Organellen über Dynein beeinflussen kann (Magnani *et al.*, 2007). Außerdem kann Tau entweder selbst mit der Plasmamembran oder über den Dynactin/Dynein-Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett und der Plasmamembran interagieren und so einen Einfluss auf die Morphologie von Neuronen ausüben (Brandt *et al.*, 1995; Magnani *et al.*, 2007). Somit könnte eine erhöhte Menge an Tau zum einen direkt die Morphologie über Bindung an die Plasmamembran oder zum anderen indirekt über die verstärkte Stabilisierung des Dynactin/Dynein-Komplexes beeinflussen.

Das ausgedehnte mitochondriale Netzwerk kann auch auf die verbesserte Stabilisierung der Mikrotubuli zurückgeführt werden. Dadurch ist eine bessere Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle möglich. Außerdem weisen die hTau40-Zellen beim *Live Cell Imaging* eine tendenziell geringere mitochondriale Beweglichkeit (Abb.: 3-5 Seite 92) und eine leicht verminderte *Fusion* und *Fission* Rate

auf (Abb.: 3-8 Seite 96). Zusätzlich waren auf mRNA-Ebene die *Fission*-Parameter Fis1 und Drp1 tendenziell und MPT18 sogar signifikant gegenüber den Kontrollzellen erniedrigt (Abb.: 3-9 B Seite 97). Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen *Fusion* und *Fission* in Richtung *Fusion* verschoben, was auch einen Anteil an dem ausgedehnten Netzwerk haben kann. Ob allerdings die Runterregulierung der *Fission*-Faktoren primär oder sekundär stattfindet, kann aus der gegebenen Datenlage nicht eindeutig festgestellt werden. Im Allgemeinen ermöglicht die *Fission* von Mitochondrien deren Erneuerung, Umverteilung und die Proliferation in Synapsen (Baloh et al., 2007; Hoppins et al., 2007), wohingegen die *Fusion* von Mitochondrien deren Interaktion und Kommunikation miteinander, sowie deren Bewegung und Verteilung über weite Strecken und in Synapsen erleichtert (Baloh et al., 2007; Chen et al., 2007a). Vielleicht ist bei dem ausgedehnten Netzwerk und dem guten metabolischen Status der hTau40-Zellen die Erneuerung und Umverteilung der Mitochondrien nicht nötig, da alle Bereiche der Zelle ausreichend mit Energie versorgt werden.

Allerdings widersprechen diese Befunde der vorliegenden Arbeit einigen Publikationen. So hat die Gruppe um Mandelkow in diversen neuronalen und nicht-neuronalen Modellen gezeigt, dass die Expression von hTau40 zu einer Lokalisierung der Mitochondrien in der Nähe des Zellkerns führt, vermutlich indem es die Bindung von Kinesin an die Mikrotubuli beeinflusst und somit den Kinesin-abhängigen Transport von Organellen, Neurofilamenten und APP-Vesikeln in den Modellen verändert (Ebner et al., 1998; Stamer et al., 2002; Trinczek et al., 1999).

Die Unterschiede könnten in den verwendeten Zelllinien begründet sein. Die meisten Versuche wurden mit CHO-Zellen durchgeführt, die nicht über endogenes Tau verfügen. Eine Überexpression von hTau40 kann hier vermutlich die gezeigten Effekte hervorrufen, da die benötigte Regulation über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Zyklen wohl nicht gewährleistet ist. Des Weiteren wurden die Versuche in ausdifferenzierten N2a-Zellen (murine Neuroblastoma-Zellen) oder primären hippocampalen Neuronen durchgeführt, die jeweils über sehr lange Neuriten ($\sim 50 \mu\text{M}$) verfügten. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Ausdifferenzierung für die unterschiedlichen Ergebnisse entscheidend ist, die zum

einen zu einer Ausbildung von Neuriten und Axonen und zum anderen zur Rekrutierung von somatischem Tau in den Bereich der Neuriten und Axone führt. Da unterschiedliche Zellmodelle verwendet wurden, ist kein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich.

Obwohl die hTau40-Zellen ein ausgeprägtes mitochondriales Netzwerk aufweisen, gibt es keine Unterschiede in der Anzahl der mtDNA-Kopien (Abb.: 3-3 Seite 90). Dies ergibt sich, indem man die Anzahl der mtDNA-Kopien auf die Anzahl der Kopien eines nukleären Gens (nDNA-Kopien) bezieht. Obwohl der Zellkern der hTau40-Zellen größer erscheint (Abb.: 3-1 B Seite 88), unterscheiden sich auch die Absolutwerte der nDNA-Kopien nicht von den anderen Zelltypen. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass nicht nur das Verhältnis von mtDNA zu nDNA, sondern auch die Absolutwerte gleich sind. Denn wenn beide Werte höher wären als bei den Kontroll-Zellen würde sich dasselbe Verhältnis ergeben und der Wert mtDNA/nDNA gleich sein. Zudem hat die Gruppe um Bai *et al.* zeigen können, dass eine Zunahme an mtDNA mit einer erhöhten mitochondrialen Masse einhergeht (Bai *et al.*, 2004b). Somit kann man ausschließen, dass alle gemessenen Effekte auf eine unterschiedliche Anzahl an Mitochondrien bzw. eine unterschiedliche mitochondriale Masse zurückzuführen ist und diese Effekte direkt die mitochondriale Funktion widerspiegeln.

4.1.1.2 Metabolische Veränderungen in den hTau40-Zellen

In den SH-SY5Y Zellen führt die Überexpression der längsten Tau-Isoform zu deutlichen Veränderungen der mitochondrialen Funktion. Die metabolische Aktivität ist stark gegenüber den Kontroll-Zellen erhöht (Abb.: 3-10 A Seite 97). Das bedeutet, dass die Zelle über viel NADH als Reduktionsäquivalent verfügt, sodass wiederum mehr Elektronen in die Atmungskette eingespeist werden können. Hierdurch können auch mehr Protonen von den Atmungskettenkomplexen in den Intermembranraum transportiert werden, was in einem stärker negativem (hyperpolarisiertem) mitochondrialen Membranpotential resultiert (Abb.: 3-11 C

Seite 100). Dies treibt wiederum die ATP-Synthese an, was sich in signifikant erhöhten ATP-Spiegeln widerspiegelt (Abb.: 3-11 A Seite 100). Da die Lactat-Spiegel in den hTau40-Zellen nicht verändert sind kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhten ATP-Spiegel nicht aufgrund einer erhöhten Glykolyserate, sondern auf die verstärkte oxidative Phosphorylierung zurückzuführen ist (Abb.: 3-11 B Seite 100). Hinzu kommt, dass die NO-Spiegel geringer sind, als in den Kontroll-Zellen (Abb.: 3-11 D Seite 100). NO kann die Aktivität der Cytochrom C Oxidase reversibel hemmen (Brown et al., 1994a) oder zu Peroxynitrit weiterreagieren und so auch die anderen Atmungskettenkomplexe inhibieren, wodurch es einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung und die ATP-Spiegel haben kann. Somit ergänzen die erniedrigten NO-Spiegel das Bild der besseren mitochondrialen Aktivität der hTau40-Zellen.

Interessanterweise kommt es in den hTau40-Zellen sogar zu einer verminderten Expression von Komplex I und Komplex II (Abb.: 3-28 B Seite 128 und 3-33 B Seite 136). Diese Befunde gehen mit der Messung der NADH:HAR-Aktivität einher, die Auskunft über intakten bzw. vorhandenen Komplex I in der mitochondrialen Präparation gibt (Abb.: 3-29 B Seite 129). Diese Messung wird verwendet, um die gemessene Komplex I-Aktivität zusätzlich zur Normierung auf den Proteingehalt der Präparation noch auf den mitochondrialen Gehalt, genauer auf den Gehalt an Komplex I, zu standardisieren. Für die Normalisierung der anderen Komplex-Aktivitäten wird in der Literatur die Aktivität der Citrat-Synthase bestimmt (Aleari et al., 2005; Fukui et al., 2007; Letellier et al., 2000). Dieses Enzym des Citratzyklus ist ebenfalls in den hTau40-Zellen signifikant erniedrigt (Abb.: 3-30 A Seite 132), was sich gut mit der erniedrigten Expression von Komplex II ergänzt, der ein membranständiges Enzym sowohl der Atmungskette, aber auch des Citratzyklus, darstellt. Bezieht man nun die gemessenen Komplex-Aktivitäten auf die CS-Aktivität bzw. bei Komplex I auf die NADH:HAR-Aktivität, ergeben sich deutlich erhöhte Aktivitäten der Komplexe I-III (Abb.: 3-29 C Seite 130, 3-30 B Seite 132, 3-34 B Seite 137 und 3-38 B Seite 142). Nur die Aktivität von Komplex IV ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht verändert, ebenso wie dessen Expression (Abb.: 3-42 B Seite 147 und 3-41 B Seite 146). Somit scheinen die Komplexe I und II, die für die

Einschleusung der Elektronen in die Atmungskette verantwortlich sind, trotz verminderter Expression deutlich effektiver im Vergleich mit den Kontroll-Zellen zu arbeiten. Es wäre sehr interessant, wenn dies ein direkter Einfluss der Überexpression von Tau ist, was aus den vorliegenden Daten aber nicht eindeutig geschlossen werden kann. Hierfür könnte man die Tau-Expression über siRNA inaktivieren und anschließend die Expression und Aktivität der Komplexe überprüfen. Komplex III wies keine Unterschiede in der Expression und in der direkt gemessenen Aktivität auf, aber die normierte Aktivität war eindeutig erhöht. Da über Komplex I und Komplex II verstärkt Elektronen in die Atmungskette eingefügt und zu Komplex III weitergeleitet werden, passt sich dessen Aktivität vielleicht auf die erhöhte Elektronendichte an. Die Aktivität von Komplex V konnte nicht bestimmt werden, wobei dessen Expression auch nicht verändert war (Abb.: 3-45 B Seite 152). Die ATP-Generierung durch die F_0F_1 -ATPase ist von dem Protonengradienten abhängig ist und wird durch diesen angetrieben (Elston et al., 1998). Da durch die erhöhten Komplexaktivitäten mehr Protonen in den Intermembranraum transportiert werden, kann das hyperpolarisierte Membranpotential für die gesteigerte ATP-Produktion verantwortlich sein.

Es ist bekannt, dass an Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette die vorwiegende Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stattfindet (Chen et al., 2003b; Sugioka et al., 1988; Turrens et al., 1980b). Daher führt eine erhöhte Aktivität zwangsläufig auch zu einer erhöhten ROS-Produktion, was sich in erhöhten Superoxidradikal- und Hydroxylradikal-Spiegeln der hTau40-Zellen zeigt (Abb.: 3-13 Seite 103). Allerdings gibt es auch Studien die zeigen, dass ein stärker negatives Membranpotential für die ROS-Bildung verantwortlich ist (Korshunov et al., 1997). Da die ROS-Spiegel in den hTau40-Zellen nicht massiv erhöht sind wird wahrscheinlich nicht die Schwelle im Membranpotential überschritten, die für eine stark erhöhte ROS-Bildung nötig ist. Somit sind hier die erhöhten ROS-Spiegel vermutlich auf die hohe Aktivität der Komplexe zurückzuführen. Anscheinend hat sich auch das antioxidative System an die erhöhten Radikal-Spiegel angepasst, da es nur zu einer tendenziellen Erhöhung der oxidativen mtDNA-Schäden in den hTau40-Zellen kommt (Abb.: 3-14 Seite 104). Da die mitochondriale DNA nicht über

die gleichen Reparatursysteme wie die genomische DNA verfügt und durch die räumliche Nähe zur Atmungskette verstärkt oxidativem Stress ausgesetzt ist, tragen Mutationen zum Altern und neurodegenerativen Erkrankungen bei (Jacobs, 2003). Allerdings werden ROS nicht nur in die Matrix, sondern vor allem von Komplex III auch in den Intermembranraum abgegeben, wodurch sie auch Proteine, Lipide und andere Zellstrukturen schädigen können, was schließlich zum Zelltod führt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch die Zytotoxizität in den hTau40-Zellen minimal gegenüber den Kontroll-Zellen erhöht ist (Abb.: 3-12 B Seite 102).

Die Ultrastruktur der Mitochondrien der hTau40-Zellen spiegelt eindeutig die metabolische Situation der Zellen wieder (Abb.: 3-15 B Seite 106). Schon Studien Mitte der 1960-er Jahre von Hackenbrock ergaben, dass die Morphologie der Mitochondrien abhängig von Energiegehalt ist (Hackenbrock, 1966). Die ausgeprägten Cristae mit schmalen Abständen und die helle Matrix entsprechen dem so genannten *orthodox state*, was für einen hohen Anteil an ATP spricht und der *State 4*-Atmung gleichkommt. Bei der *State 4*-Atmung ist ADP der limitierende Faktor und tritt nach vollständiger Phosphorylierung des vorhandenen ADP ein. Die Gruppe um Demongeot *et al.* hat vor kurzem, basierend auf einem mathematischen Model, eine Funktion der mitochondrialen Cristae darin gedeutet, den Abstand zwischen dem Adeninnukleotid-Transporter und dem Ort der Transformation von $\text{ADP} + \text{P}_i$ (Phosphorylierung) zu minimieren, um höchste Effizienz in der ATP-Produktion zu gewährleisten (Demongeot *et al.*, 2007). Somit könnte das in die Mitochondrien transportierte ADP sofort und effektiv in den hTau40-Zellen umgesetzt werden.

Dies ist bisher die erste Studie zur Auswirkung von hTau40 auf die mitochondriale Funktion. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Überexpression von hTau40 einen positiven Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und Funktion ausübt. Dies spiegelt sich unter anderem in einem ausgedehnten mitochondrialen Netzwerk, verbesserter metabolischen Aktivität und verstärkter Aktivität der Atmungskettenkomplexe I-III wieder, die wiederum in erhöhten ATP-Spiegeln resultieren. In der folgenden Abbildung sind die funktionellen Auswirkungen durch

die Expression von hTau40 in den SH-SY5Y Zellen noch einmal zusammengefasst (Abb.: 4-1).

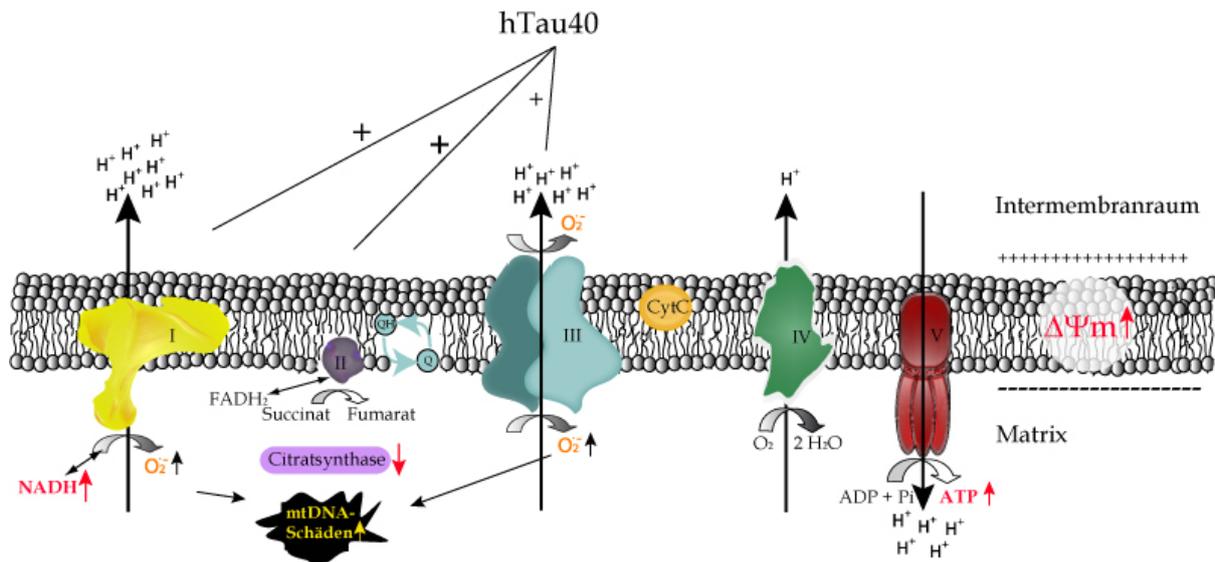


Abb.: 4-1 Funktionelle Effekte durch die Expression von hTau40 in den SH-SY5Y Zellen

Die Überexpression von hTau40 führt auf funktioneller Ebene der Mitochondrien zu einer verbesserten metabolischen Aktivität sowie verstärkter Aktivität der Atmungskettenkomplexe I-III, das wiederum in erhöhten Superoxidanionradikal-Spiegeln, einem hyperpolarisiertem Membranpotential und erhöhten ATP-Spiegeln resultiert.

4.1.2 Effekte durch die Überexpression von der Tau-Mutation P301L auf die Funktion und Morphologie der Mitochondrien

4.1.2.1 Morphologie und mitochondriale Dynamik in den TauP301L-Zellen

Die Mutation P301L scheint die Stabilisierung der Mikrotubuli negativ zu beeinflussen, wie das auch schon in diversen Publikationen beschrieben ist (Alonso et al., 2004; Bunker et al., 2006b; Hong et al., 1998b). Dies führt zu deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie in den TauP301L-Zellen, die sich durch einen kompakteren Zellkörper, der kugelig und höher als bei den Kontroll-Zellen ist, auszeichnet (Abb.: 3-2B Seite 89). Auch die Lokalisation der Mitochondrien ist hauptsächlich perinukleär, das heißt um den Zellkern herum konzentriert (Abb.: 3-1 Seite 88). Ein Netzwerk ist kaum vorhanden und die Mitochondrien erscheinen zum

Teil fast vesikelartig. Vermutlich führt die Mutation zu einer verstärkten Phosphorylierung von Tau, was in mehreren Veränderungen in der Zelle resultiert. Durch die verstärkte Phosphorylierung kann Tau nicht mehr so gut an die Mikrotubuli binden und verliert hierdurch vermutlich seine Funktion, die Bindung von Dynactin an die Mikrotubuli zu verstärken (Magnani et al., 2007), wodurch der Transport von Vesikeln und Organellen über Dynein negativ beeinflusst sein könnte. Neben der verstärkten Phosphorylierung führt die Mutation bekanntlich zu einer verminderten Dynamik und Zusammenbau der Mikrotubuli, wodurch die Zelle einem chronisch umstrukturiertem Zytoskelett ausgesetzt ist. Dies beeinträchtigt vermutlich generell den Transport entlang der Mikrotubuli. Außerdem erhöht sich der Pool an freiem Tau gegenüber an die Mikrotubuli gebundenem Tau, was einen wesentlichen Faktor bei der Nukleation von löslichem Tau zur Fibrillen-Bildung ausmacht. Hinzu kommt, dass die Mutation P301L aufgrund der stärkeren Neigung zur β -Struktur zu einer vermehrten PHF-Bildung führt (von Bergen et al., 2001). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verstärkte PHF-Bildung nicht auch einen Einfluss auf die Morphologie der Zelle und der Mitochondrien selbst hat.

Neben der Morphologie ist auch die Bewegung der Mitochondrien und die *Fusion* und *Fission* in den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den Kontroll-Zellen erniedrigt (Abb.: 3-5 Seite 92 und 3-8 Seite 96). Die im *Live cell imaging* beobachtete verminderte Bewegung und *Fusion* und *Fission* der Mitochondrien könnte aufgrund des umstrukturierten Zytoskeletts zustande kommen. Allerdings spiegelt die mitochondriale Morphologie der P301L-Zellen interessanterweise auch den Alterungsprozess wieder. In gealterten HUVEC-Zellen sind die Mitochondrien auch um den Zellkern herum lokalisiert, ebenso wie *Fusion* und *Fission* vermindert ist (Jendrach et al., 2005). Somit könnten die beobachteten Effekte der P301L-Zellen neben dem veränderten Zytoskelett auch auf Prozesse zurückzuführen sein, die denen des Alterns nahe kommen. Dies zeigt sich auch in der Runterregulierung der mRNA-Expression der *Fusion* und *Fission*-Faktoren (Abb.: 3-9 Seite 97). Eine verminderte *Fusion* und *Fission*-Rate wird im Alter mit der Anhäufung für vermehrte mtDNA-Schäden in Zusammenhang gebracht (Jendrach et al., 2005). Dies ist

ebenfalls bei den TauP301L-Zellen zu beobachten, die signifikant mehr oxidative mtDNA-Schäden aufweisen, als die Kontroll-Zellen (Abb.: 3-14 Seite 104).

Obwohl sich die Morphologie der Mitochondrien aufgrund der Überexpression der P301L-Mutation verändert hat, konnten keine Unterschiede in mtDNA- oder nDNA-Gehalt gemessen werden (Abb.: 3-3 Seite 90). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die P301L-Zellen nicht in der Anzahl der mtDNA-Kopien sowie der mitochondrialen Masse unterscheiden und die gemessenen Effekte auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen sind. Dieser Befund geht mit Daten von der Gruppe um Sumpter *et al.* einher, die keine Unterschiede in der Anzahl der Mitochondrien in NFT-haltigen Neuronen und Neuronen ohne NFTs im Gehirn von Alzheimer Patienten gefunden haben (Sumpter et al., 1986).

4.1.2.2 Metabolische Veränderungen in den TauP301L-Zellen

Die Überexpression von TauP301L in den SH-SY5Y Zellen führt zu einer Verschlechterung der mitochondrialen Funktion. Sie wiesen eine deutlich geringere metabolische Aktivität auf, sodass die Zelle anscheinend weniger NADH als Reduktionsäquivalent zur Verfügung hat (Abb.: 3-12 A Seite 102). Somit können weniger Elektronen über Komplex I und II in die Atmungskette geschleust werden, wodurch auch weniger Protonen in den Intermembranraum gelangen. Dies spiegelt sich in einem leicht depolarisierten mitochondrialen Membranpotential im Vergleich mit den Kontroll-Zellen wieder (Abb.: 3-11 C Seite 100), was den Daten von 12 und 15 Monate alten P301L-Mäusen entspricht ((David et al., 2005a) Dissertation Susanne Kirr, 2008). Diese Tiere weisen auch eine tendenzielle Depolarisation des MMPs auf, wobei dies, wie bei den TauP301L-Zellen, nicht signifikant erniedrigt ist. Ob es im Alter zu einer weiteren Depolarisation des MMPs kommt kann nur vermutet werden, da hierzu keine experimentellen Daten vorliegen. Der verminderte protonenchemische Gradient scheint auch dazu zu führen, dass die ATP-Synthase weniger ATP synthetisiert, was in erniedrigten ATP-Spiegeln resultiert (Abb.: 3-11 A Seite 100). Diese erniedrigten ATP-Spiegel wurden auch bei 24 Monate alten P301L-

Mäusen gemessen (David et al., 2005a). Zu den Daten der mitochondrialen Funktion der TauP301L-Zellen passt auch, dass die NO-Spiegel tendenziell erhöht sind (Abb.: 3-11 D Seite 100). Wie bereits erwähnt, kann NO die Aktivität der Cytochrom C Oxidase reversibel hemmen (Brown et al., 1994a) und somit einen Einfluss auf die ATP-Gehalt der Zelle ausüben. Daher führt vielleicht die Kombination aus tendenziell erhöhten NO-Spiegeln und leicht depolarisiertem MMP zu einer signifikanten Abnahme der ATP-Spiegel in den TauP301L-Zellen. Die Daten weisen insgesamt auf eine leicht verschlechterte mitochondriale Funktion in den TauP301L-Zellen hin, die aber anscheinend noch keinen Schwellenwert erreicht hat, um das Energiedefizit mit einer erhöhten Glykolyserate auszugleichen, da sich die Lactat-Spiegel nicht von den Kontroll-Zellen unterscheiden (Abb.: 3-11 B Seite 100).

Die basalen Unterschiede in der mitochondrialen Funktion der TauP301L-Zellen sind anscheinend auf Defekte der Atmungskette zurückzuführen. Denn neben der verminderten Expression einiger Atmungskettenkomplexe waren auch die Aktivitäten selbst verändert. Die Expression der 20 kDa-Untereinheit (NDUFB8) von Komplex I war in den TauP301L-Zellen tendenziell erniedrigt (Abb.: 3-28 B Seite 128). Auch in den P301L-Mäusen konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie eine verminderte Expression der 30 kDa-Untereinheit festgestellt werden (David et al., 2005a). Ebenso war in den TauP301L-Zellen die NADH:HAR-Aktivität deutlich erniedrigt (Abb.: 3-28 B Seite 128), was zusätzlich ein Hinweis auf einen geringeren Komplex I-Gehalt in der mitochondrialen Präparation gibt. Komplex I der mitochondrialen Atmungskette besteht aus 14 Kern-Untereinheiten, die in Pro- und Eukaryonten konservierte Strukturen darstellen sowie bis zu 32 zusätzliche Untereinheiten, wodurch Komplex I mit zu den größten membrangebundenen Proteinkomplexen zählt (Brandt, 2006). Diese 14 zentralen Untereinheiten beinhalten alle Redoxzentren (Weidner et al., 1993), das flavinhaltige Nukleotid (FMN) und bis zu neun Eisen-Schwefel-Zentren (Hinchliffe et al., 2005; Ohnishi, 1998) und reichen aus, um alle bioenergetischen Funktionen auszuüben. Der Elektronenakzeptor Hexa-Ammin-Ruthenium (III) (HAR) ist in dem hydrophilen Arm, der in die mitochondriale Matrix ragt, lokalisiert, ebenso wie die 30 kDa-Untereinheit. Die 20 kDa-Untereinheit zählt zu den zusätzlichen Untereinheiten von Komplex I und

kommt in allen vielzelligen Organismen vor (Metazoa). Es wird spekuliert, dass kleine Untereinheiten ($M_r = 6-19$ kDa) mit einer einzigen Transmembrandomäne (STMD = *single transmembrane domain*) den Einbau der mitochondrial kodierten Untereinheiten fördern und organisieren, indem sie mit ihnen über ihre hydrophobe Transmembrandomäne interagieren und sie somit an den Komplex binden (Abdrakhmanova et al., 2004). Somit betrifft die Runterregulierung der 20 kDa-Untereinheit und die stark verminderte NADH:HAR-Aktivität in den TauP301L-Zellen zwei wichtige Bereiche von Komplex I. Dies spiegelt sich auch in der normierten Komplex I-Aktivität wieder, die um 50% (DBQ/HAR) bis 60% (DBQ/CS) niedriger als die der Kontroll-Zellen ist (Abb.: 3-29 C Seite 130, 3-30 B Seite 132). Da es in den P301L-Mäusen auch zu einer erniedrigten Komplex I-Aktivität kam (David et al., 2005a) kann davon ausgegangen werden, dass die Mutation P301L zu einem funktionellen Defekt der Komplex I-Aktivität führt. Dies führt anscheinend dazu, dass die Elektronen schlechter aufgenommen werden und somit auch weniger weitergeleitet werden.

Wie die erniedrigten NADH-Spiegel schon angedeutet haben, scheint die Glykolyse und der Citratzyklus durch die Überexpression von TauP301L beeinflusst zu sein. In den SH-SY5Y Zellen hat sich dies durch eine erniedrigte CS-Aktivität (Abb.: 3-30 A Seite 132) und durch eine verminderte Expression der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) gezeigt (Abb.: 3-33 B Seite 136). Diese Befunde werden von der *Proteomic*-Studie an den P301L-Mäusen untermauert, da hier eine Runterregulierung der Triosephosphat-Isomerase (TPI) – einem Enzym der Glykolyse – und der zytosolischen Malat-Dehydrogenase (MDHC) – dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Malat zu Oxalacetat – festgestellt wurden (David et al., 2005a). Ob diese beiden Enzyme in den SH-SY5Y Zellen auch vermindert exprimiert werden, kann hier nur vermutet werden. Das Unterschiede in den betroffenen Enzymen des Energiestoffwechsels auftreten, ist vermutlich auf die unterschiedlichen Modelle zurückzuführen. Schließlich wird das humane P301L einmal in Mäusen und einmal in humanen Neuroblastoma-Zellen exprimiert. Festzuhalten ist aber, dass TauP301L einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel hat und zur Veränderung einiger Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus führt. Obwohl die Expression von Komplex II

signifikant erniedrigt ist, weist dieser nach Normierung auf die CS eine 40%-igen Steigerung der Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-Zellen auf (Abb.: 3-34 B Seite 137). Dies ist wahrscheinlich eine Art Kompensationsmechanismus, um trotz des verminderten Angebots an NADH und FADH₂ und der geringen Komplex I-Aktivität so viele Elektronen wie möglich in die Atmungskette zu schleusen. Das dies ein gängiger Mechanismus ist, belegt eine kürzliche Veröffentlichung von der Gruppe um Gibson, die eine erhöhte Komplex II-Aktivität in Gehirnen von Alzheimer Patienten nachweisen konnte, obwohl mehrere Enzym-Aktivitäten des Citratzyklus verändert waren (vermindert: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH) um 41%, Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) um 27%, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDHC) um 57%; erhöht: Succinat-Dehydrogenase (SDH) um 44% und Malat-Dehydrogenase (MDH) um 54%) (Bubber et al., 2005a).

Auf Expressionsebene sind bei Komplex III keine Unterschiede zu den Kontroll-Zellen festzustellen (Abb.: 3-37 B Seite 141). Allerdings ergibt schon die Messung der Komplex III-Aktivität ohne Normierung auf die CS-Aktivität eine 50%-ige erhöhte Aktivität (Abb.: 3-38 A Seite 142), die sich durch die Normierung auf insgesamt 116% gegenüber den Kontroll-Zellen erhöht hat (Abb.: 3-38 B Seite 142). Diese drastisch erhöhte Aktivität scheint dazu zu dienen, möglichst sensibel auf den verminderten Elektronentransfer reagieren zu können, sodass ein höchstes Maß an Effizienz gewährleistet ist. Zusätzlich gilt zu bedenken, dass die Aktivitätsmessung jeweils im Überschuss der Substrate stattfindet, was innerhalb der Zelle nicht gegeben ist. Zudem könnte die erhöhte Aktivität von Komplex III dafür verantwortlich sein, dass nur ein tendenzieller Abfall des mitochondrialen Membranpotentials zu beobachten ist (Abb.: 3-11 C Seite 100). Dadurch könnten die hauptsächlich von Komplex II eingeschleusten Elektronen zu einem verstärkten Protonenfluss über Komplex III führen, der die geringe Aktivität von Komplex I bezogen auf den Protonenfluss nahezu ausgleichen kann. Betrachtet man den weiteren Verlauf der mitochondrialen Atmungskette, so ist die Expression von Komplex IV in den TauP301L-Zellen signifikant im Vergleich mit den Kontroll-Zellen verringert (Abb.: 3-41 B Seite 146). Allerdings führt die verminderte Expression nicht zu einer Veränderung der Komplex IV-Aktivität (Abb.: 3-42 B Seite 147). Dies geht mit den Ergebnissen der

P301L-Mäuse einher, bei denen die Aktivität von Komplex IV auch nicht verändert ist (David et al., 2005a). Allerdings kommt es in den P301L-Mäusen zu einer Runterregulierung der D-Kette von der ATP-Synthase. Im Westernblot konnte nur die F1 α -Untereinheit der SH-SY5Y Zellen überprüft werden und die wies, ebenso wie bei den Tieren, eine unveränderte Expression auf (Abb.: 3-45 B Seite 152).

Insgesamt führt die Mutation P301L zu einem funktionellen Defekt der mitochondrialen Atmungskette, was sich neben einer verminderten Expression von Komplex I, II und IV in einer veränderten Aktivität von Komplex I-III in den SH-SY5Y Zellen zeigt. Hervorzuheben ist hier vor allem die Reduktion der Komplex I-Aktivität um 50-60%, die vermutlich für die Hochregulierung der Aktivitäten von Komplex II und III verantwortlich ist. In den P301L-Tieren wurde im Alter eine Beeinträchtigung der Komplex I-abhängigen *State 3*- sowie FCCP entkoppelten Atmung gemessen (David et al., 2005a). Hierdurch kommt es ebenfalls zu einem reduzierten Atmungskontrollindex RCR (*respiratory control ratio*), was für eine Beeinträchtigung der relativen Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkette spricht. Bei den jungen Tieren ist die Aktivität von Komplex I zwar schon vermindert, aber anscheinend kann der Komplex I-Defekt noch durch die anderen Atmungskettenkomplexe ausgeglichen werden, da es nicht zu einer verminderten Atmungsrate kommt. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob bei den SH-SY5Y Zellen auch eine Beeinträchtigung der Komplex I-abhängigen *State 3*- oder der FCCP entkoppelten Atmung vorliegt. Da aber die ATP-Spiegel in den TauP301L-Zellen verringert sind, könnte dies der Fall sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen zudem mit früheren Studien überein, die eine veränderte Expression von Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, zeigen konnten. In verschiedenen Gehirn-Regionen von Alzheimer Patienten wurde eine verminderte mRNA-Expression von mitochondrial sowie kernkodierten Genen von Komplex I, IV und V nachgewiesen (Aksenov et al., 1999; Chandrasekaran et al., 1997; Fukuyama et al., 1996; Manczak et al., 2004).

Des Weiteren führt die Mutation TauP301L zu einer Veränderung der ROS-Spiegel (Abb.: 3-13 Seite 103). Die Superoxidationradikal-Spiegel sind im Vergleich zu den

Kontroll-Zellen leicht aber signifikant erhöht. Dies entspricht den Daten an alten P301L-Mäusen (David et al., 2005a). Vermutlich lassen sich die erhöhten ROS-Spiegel direkt auf den Komplex I-Defekt der TauP301L-Zellen zurückzuführen. Bereits vor vielen Jahren haben Turrens und Boveris gezeigt, dass die Inhibierung von Komplex I zu einer Steigerung der Superoxidanionradikal-Spiegel führt (Turrens et al., 1980b). Kürzlich hat die Gruppe um Verkaart *et al.* nachgewiesen, dass die erhöhten ROS-Spiegel aufgrund der verminderten Komplex I-Aktivität zustande kommen und nicht auf einen anomal zusammengebauten Komplex zurückzuführen sind (Verkaart et al., 2007). Das in den TauP301L-Zellen verminderte Hydroxylradikal-Spiegel gemessen wurden, scheint methodischen Ursprungs zu sein. Der verwendete Farbstoff Dihydrorhodamin 123 ist ungeladen und farblos, wodurch er mittels Diffusion Membranen überwinden kann. Durch die Reaktion entweder mit H_2O_2 , in Gegenwart von Peroxidasen, Cytochrom C oder Eisen, oder mit Peroxynitrit wird der Farbstoff zu dem fluoreszierenden Rhodamin 123 (R123) oxidiert. Allerdings wird R123 – wie auch in der vorliegenden Arbeit – zur Bestimmung des MMPs verwendet. Deshalb spiegelt die DHR-Messung wohl eher das MMP als ROS-Spiegel der SH-SY5Y Zellen wieder. Somit scheint dieser Farbstoff eher ungeeignet für die Messung von ROS zu sein und es wäre interessant die H_2O_2 -Spiegel mit einem anderen Farbstoff wie H2DCF-DA oder Amplex® Red zu bestimmen. Wegen der hohen Reaktivität von 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. Obwohl die Superoxidanionradikal-Spiegel in den TauP301L-Zellen nur leicht erhöht waren, konnten signifikant höhere Menge an oxidativen mtDNA-Schäden festgestellt werden (Abb.: 3-14 Seite 104). Dies ist vermutlich auf die verminderte *Fusion* und *Fission*-Rate der Mitochondrien zurückzuführen, was ebenfalls an gealterten HUVEC-Zellen nachgewiesen werden konnte (Jendrach et al., 2005).

Neben den ganzen metabolischen Veränderungen durch die TauP301L-Mutation spiegelt sich diese Situation auch in der Ultrastruktur der Mitochondrien wieder (Abb.: 3-15C Seite 106). Die Cristae-Struktur wirkt aufgequollen und die innere

Membran formt kreisartige Gebildete. Zudem war die Matrix recht dunkel und lichtundurchlässig. Vom Prinzip her ähnelt diese Morphologie - bis auf die kreisförmigen Gebilde der inneren Membran - der *State 3*-Atmung (Hackenbrock, 1966). Bei der *State 3*-Atmung sind alle Substrate vorhanden und es überwiegt der ADP-Anteil. Interessanterweise war bei gealterten P301L-Mäusen die *State 3*-Atmung verringert (David et al., 2005a). Wenn man das auf die Ultrastruktur der Mitochondrien der TauP301L-Zellen überträgt, würden die kreisförmigen Gebilde zusammen mit dem funktionellen Komplex I-Defekt dies erklären. Somit könnte auch die Effizienz der ATP-Generierung durch den Abstand der Cristae negativ beeinflusst sein (Demongeot et al., 2007).

Neben der Studie an den P301L-Mäusen ist dies die erste Untersuchung zu den Auswirkungen der TauP301L-Mutation auf die mitochondriale Funktion. Insgesamt führt diese zu einer verminderten mitochondrialen Aktivität, die vor allem durch den funktionellen Defekt von Komplex I zum Tragen kommt. Unter basalen Bedingungen kann die Zelle noch durch diverse Kompensationsmechanismen den Mangel überbrücken, obwohl er auch hier schon durch eine verminderte metabolische Aktivität, drastisch erniedrigte Aktivität von Komplex I und verringerte ATP-Spiegel deutlich wird. Gleichzeitig spiegeln die Morphologie sowie einige funktionelle Parameter der TauP301L-Zellen auch den Alterungsprozess wieder. In der folgenden Abbildung sind die funktionellen Auswirkungen durch die Expression von TauP301L in den SH-SY5Y Zellen noch einmal zusammengefasst (Abb.: 4-2 Seite 198).

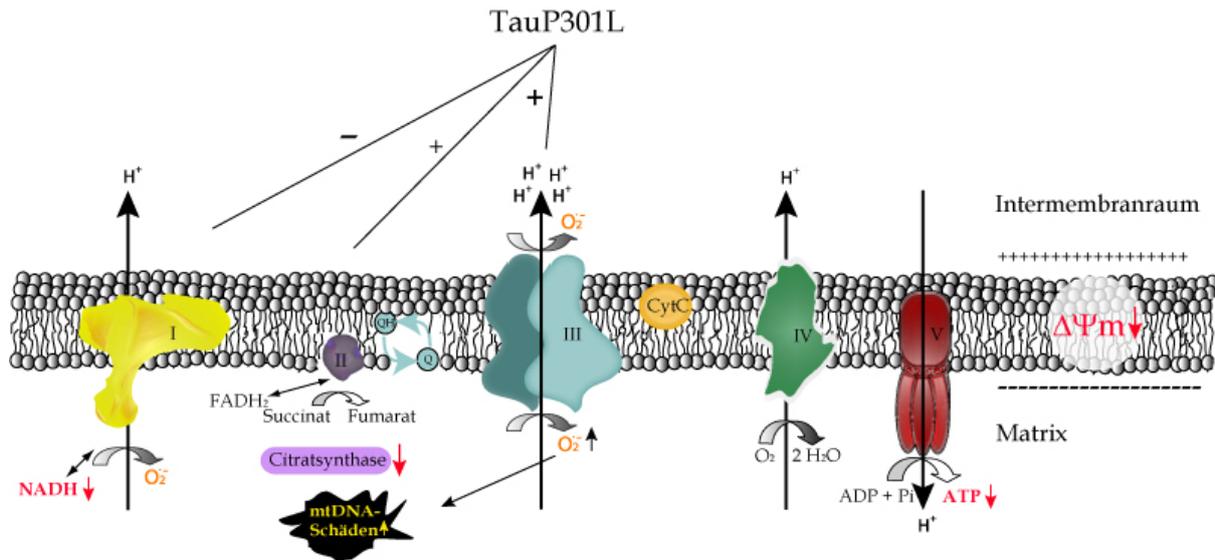


Abb.: 4-2 Funktionelle Effekte durch die Expression von TauP301L in den SH-SY5Y Zellen

Die Überexpression von TauP301L führt auf funktioneller Ebene der Mitochondrien zu einer verminderten metabolischen Aktivität sowie einem funktionellen Defekt von Komplex I, der sich durch eine drastisch verringerte Aktivität äußert, sowie eine Gegenregulation hervorruft, die sich durch erhöhte Aktivität der Atmungskettenkomplexe II und III zeigt. Dies resultiert wiederum in erhöhten Superoxidanionradikal-Spiegeln, einem leicht depolarisiertem Membranpotential und erniedrigten ATP-Spiegeln.

4.1.3 Zusammenfassung der Effekte von hTau40 und TauP301L auf die Funktion und Morphologie der Mitochondrien

4.1.3.1 Tau hat einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der SH-SY5Y Zellen

Im Rahmen der Alzheimer Demenz kommt es zu Veränderungen der Gen-Regulation und Expression, die vielfältige Funktionen und Bereiche der Zellphysiologie betreffen (Blalock et al., 2004). Im Fokus des Interesses stehen hauptsächlich Enzyme, die an der Energiegewinnung beteiligt sind, und deren Tragweite von der Glykolyse, über den Citratzyklus bis hin zur mitochondrialen Atmungskette reicht. Die Gruppe um Brooks *et al.* hat kürzlich gezeigt, dass es im Hippokampus von Alzheimer Patienten zu einer verminderten Transkription von diversen Faktoren kommt, die am Energiehaushalt der Zelle beteiligt sind (Brooks et al., 2007b). Andere Studien hingegen haben eine veränderte mRNA-Expression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, IV und V in diversen Hirnarealen von

Alzheimer Patienten nachgewiesen (Aksenov et al., 1999; Chandrasekaran et al., 1997; Fukuyama et al., 1996; Manczak et al., 2004). Die Gruppe um Kim *et al.*, hat auf Proteinebene eine Runterregulierung von der *Core I*-Untereinheit von Komplex III und der F1 β -Untereinheit der ATP-Synthase bei Alzheimer Patienten aufgedeckt (Kim et al., 2000), ebenso wie eine verminderte Expression von Komplex IV gefunden wurde (Kish et al., 1999). Diese verschiedenen Studien zeigen auch, dass die veränderte mRNA-Expression nicht immer folglich mit dem Proteingehalt korrelieren muss (Gygi et al., 1999).

Die Studie an den P301L-Mäusen hat auch einen direkten Einfluss der Tau-Pathologie auf diverse Bereiche der Zellphysiologie enthüllt (David et al., 2005a). Unter anderem ist die Expression von fünf Proteinen signifikant verändert, die an der mitochondrialen Atmung (Untereinheiten von Komplex I und V) oder dem Metabolismus (TPI, Anorganische Pyrophosphatase und MDH) beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte sogar noch einmal unterschieden werden, ob der Effekt auf die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette spezifisch durch die P301L-Mutation oder durch die Überexpression von hTau40 zustande kommt. Die Veränderungen der Expressionslevel gegenüber den Kontroll-Zellen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab.: 4-1). Die Aktivität der Citratsynthase wurde ebenso mit aufgenommen, wie die NADH:HAR-Aktivität, da beide Messungen für die Normierung auf den mitochondrialen Gehalt verwendet werden.

	NADH:HAR	KI	CS	KII	KIII	KIV	KV
hTau40	↓	↓	↓	↓	↔	(↓)	↔
TauP301L	↓	(↓)	↓	↓	↔	↓	↔

Tab.: 4-1 Expression der Atmungskettenkomplexe

Die Pfeile zeigen die Effekte durch die Expression von hTau40 bzw. TauP301L im Vergleich mit den vct-Zellen auf die Expression der Atmungskettenkomplexe der SH-SY5Y Zellen. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

Dies zeigt eindeutig, dass die Expression der Atmungskettenkomplexe durch die Überexpression von Tau erniedrigt ist und dies unabhängig davon, ob es die pathologische Mutation enthält oder nicht. Bei den TauP301L-Zellen war Komplex I deutlich, aber nicht signifikant erniedrigt, ebenso wie Komplex IV bei den hTau40-Zellen, was in der Tabelle durch Klammern dargestellt ist. Der rote Pfeil soll verdeutlichen, dass die NADH:HAR-Aktivität in den TauP301L-Zellen noch mal signifikant niedriger war als in den hTau40-Zellen. Dies ist die erste Studie, die die Auswirkungen von Tau auf die Expression der Atmungskettenkomplex in Zellen zeigt. Da eine verminderte Expression nicht unbedingt mit der Aktivität korreliert, kann allein durch diese Tatsache noch kein weiterer Rückschluss auf die mitochondriale Funktion gefolgert werden.

Die Aktivität der Citrat-Synthase wird anscheinend direkt oder indirekt durch Tau beeinflusst. Unabhängig von der pathologischen Mutation führt die Überexpression von Tau zu einer Erniedrigung der CS-Aktivität. Es gibt nur wenige Studien an postmortem Hirngewebe von Alzheimer Patienten, die die CS-Aktivität untersucht haben. Die Gruppe von Kish *et al.* konnte bei zwei unabhängigen Untersuchungen an insgesamt 34 klinisch dementen und histopathologisch bestätigten Gehirnen von Alzheimer Patienten jedes Mal eine signifikant erniedrigte CS-Aktivität nachweisen (Kish *et al.*, 1992; Kish *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu hat die Gruppe um Bubber *et al.* in ihrer Studie an 13 AD-Gehirnen keinen Unterschied in der CS-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt, ebenso wie die Gruppe um Maurer *et al.* (Bubber *et al.*, 2005a; Maurer *et al.*, 2000). Da mehrere Studien gezeigt haben, dass zum einen das Alter (Yarian *et al.*, 2006) und zum anderen Aß keinen Einfluss auf die Aktivität der Citrat-Synthase haben (Aleari *et al.*, 2005; Canevari *et al.*, 1999; Casley *et al.*, 2002) kann daraus geschlossen werden, dass vermutlich Tau für den gemessenen Effekt bei AD verantwortlich ist, was durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden konnte. Somit scheint Tau unabhängig davon, ob es die pathologische Mutation enthält oder nicht, einen Einfluss auf die Citrat-Synthase und damit auf den Citratzyklus sowie die mitochondriale Funktion zu haben.

Neben der veränderten Gen-Regulation haben mehrere Studien Unterschiede in der Aktivität von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette und des Citratzyklus bei der Alzheimer Demenz nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass es zu einer 30-40%-ig verringerten Aktivität der Cytochrom C Oxidase (Cardoso et al., 2004; Chagnon et al., 1995; Cottrell et al., 2001; Maurer et al., 2000) und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (α KGDH) kommt (Gibson et al., 1988; Kish et al., 1992; Mastrogiacoma et al., 1996). Eine umfassendere Studie von Bubber *et al.* hat die Aktivitäten aller Enzyme des Citratzyklus im Gehirn von Alzheimer Patienten bestimmt wobei einige erniedrigt (PDH, α KGDH, ICDH) und andere erhöht (SDH und MDH) sind (Bubber et al., 2005b). In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivitäten der Komplexe I-IV bestimmt und einhergehend mit der Studie an den P301L-Mäusen deutliche Veränderungen der Komplex I-Aktivität gemessen (David et al., 2005a). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab.: 4-2).

	DBQ/HAR	DBQ/CS	KII/CS	KIII/CS	KIV/CS
hTau40	↑	↑	↑	↑	↔
TauP301L	↓	↓	↑	↑	↔

Tab.: 4-2 Komplexaktivitäten der SH-SY5Y Zellen

Die Pfeile zeigen die Effekte durch die Expression von hTau40 bzw. TauP301L im Vergleich mit den vct-Zellen auf die Komplexaktivitäten der SH-SY5Y Zellen. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

Bis auf die Aktivität von Komplex IV, die durch die Expression von Tau nicht beeinflusst ist, gab es bei allen anderen Komplexen Veränderungen in der Aktivität. Tau zeigt deutlich in Abhängigkeit von der pathologischen Mutation einen gegensätzlichen Effekt auf die Aktivität von Komplex I. Während die Überexpression von hTau40 sogar zu einer deutlich verbesserten Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-Zellen führt, resultiert die Expression der P301L-Mutation in einer drastischen Abnahme der Komplex I-Aktivität. Die Überexpression von hTau40 scheint generell einen positiven Effekt auf die Atmungskette zu haben. Die Aktivität

von Komplex II ist auch erhöht, sogar signifikant höher als die der TauP301L-Zellen, was durch den roten Pfeil angedeutet ist. Da so vermehrt Elektronen über Komplex I und Komplex II in die Atmungskette eingeschleust werden, resultiert hieraus vermutlich auch die Erhöhung der Komplex III-Aktivität. Die TauP301L-Zellen weisen zwar im Vergleich mit den Kontroll-Zellen auch eine erhöhte Aktivität von Komplex II auf, die aber nicht so stark ausgeprägt ist wie bei den hTau40-Zellen und wohl eher auf Kompensationsmechanismen zurückzuführen ist. Dies steigert sich noch in der sehr stark erhöhten Aktivität von Komplex III, wodurch wohl die verminderte Elektronendichte so effektiv wie möglich in der Atmungskette weitergeleitet werden soll. Diese deutlich unterschiedlichen Effekte von hTau40 und TauP301L auf die mitochondriale Atmungskette resultieren dementsprechend in weiteren funktionellen Störungen der mitochondrialen Funktion.

4.1.3.2 Die verschiedenen Effekte von hTau40 und TauP301L auf Komplex I bedingen die funktionellen Unterschiede

Die gegensätzlichen Effekte von hTau40 und TauP301L auf die Aktivität von Komplex I führen zu weitgreifenden Veränderungen im Zellstoffwechsel der SH-SY5Y Zellen. Vor allem die daraus resultierenden ATP-Spiegel zeigen deutlich, dass die Überexpression von hTau40 zu einer Verbesserung und TauP301L zu einer Verschlechterung des Energiehaushaltes führt. Dies ist nicht durch eventuelle Unterschiede in der Anzahl der Mitochondrien oder einer erhöhten Glykolyserate bedingt, da hier keine basalen Unterschiede zwischen den drei Zelltypen festgestellt werden konnten. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab.: 4-3 Seite 203).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	NO	O ₂ ⁻	oxid. mtDNA- Schäden
hTau40	↑	↑	↑	↓	↑	(↑)
TauP301L	↓	(↓)	↓	(↑)	↑	↑

Tab.: 4-3 Auswirkungen von Tau auf die Physiologie der SH-SY5Y Zellen

Die Pfeile zeigen die Auswirkungen auf die Physiologie der SH-SY5Y Zellen durch die Expression von hTau40 bzw. TauP301L im Vergleich mit den vct-Zellen. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

Im direkten Vergleich zeigt sich, dass sich die unterschiedliche Aktivität von Komplex I auf alle weiteren gemessenen Parameter der SH-SY5Y Zellen auswirkt. Tendenzielle, aber nicht signifikante, Effekte sind in Klammern dargestellt. Dass das Membranpotential der TauP301L-Zellen nur tendenziell depolarisiert ist, ist wohl auf die sehr hohe Aktivität von Komplex III und den damit verbundenen Protonentransport zurückzuführen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es durch die veränderte Aktivität eines Atmungskettenkomplexes zu einer Rückkopplung auf den Citratzyklus kommt (Park et al., 1999). Hier führte die Hemmung von Komplex IV zu einer verminderten Aktivität der α KGDH, wodurch weniger NADH gebildet wurde. Von daher wäre es sehr interessant zu testen, ob die durch hTau40 und TauP301L veränderte Aktivität von Komplex I auch die Aktivität der α KGDH in den SH-SY5Y Zellen beeinflusst und es dadurch zu den unterschiedlichen NADH-Spiegeln kommt. In den hTau40-Zellen kommt es nur zu einer tendenziellen Erhöhung der oxidativen mtDNA-Schäden, wohingegen diese bei den TauP301L-Zellen signifikant gegenüber den Kontroll-Zellen erhöht sind. Dieser geringe Unterschied zwischen den beiden Tau-überexprimierenden Zellen ist vermutlich nicht auf eine unterschiedliche Enzymausstattung gegen oxidative Schäden zurückzuführen, sondern auf die verminderte *Fusion* und *Fission*-Rate der TauP301L-Zellen. Eine Studie von der Gruppe um Ono *et al.* konnte zeigen, dass *Fusion* die Mitochondrien vor Schäden durch Mutationen durch Austausch der mtDNA schützen konnte (Ono et al., 2001). Im Gehirn von Alzheimer Patienten konnten auch vermehrt mtDNA-Mutationen im Vergleich zu alten Kontrollen festgestellt werden

(Coskun et al., 2004; Hamblet et al., 2006; Wallace et al., 1995). Dies kann dann als Folge zu biochemischen Veränderungen und einer gestörten Energie-Produktion führen (Porteous et al., 1998). Daher könnten die oxidativen mtDNA-Schäden in den TauP301L-Zellen zu einer weiteren Schädigung der mitochondrialen Funktion beitragen und somit einen Teufelskreislauf in Gang bringen. Eine Untersuchung von der Gruppe um Lin *et al.* konnte ebenfalls zeigen, dass der Bereich der mtDNA, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, im Gehirn von Alzheimer Patienten somatische mtDNA-Mutationen aufweist (Lin et al., 2002). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit die PCR-Produkte nicht weiter untersucht, sondern nur eine Zunahme der oxidativen mtDNA-Schäden gemessen. Daher kann nicht mit eindeutiger Sicherheit gesagt werden, dass die durch die Tau-Pathologie hervorgerufenen Veränderungen den somatischen mtDNA-Mutationen der Alzheimer Patienten entsprechen.

In der folgenden Abbildung sind die funktionellen Auswirkungen durch die Überexpression von Tau auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen noch einmal im Vergleich dargestellt (Abb.: 4-3 Seite 205).

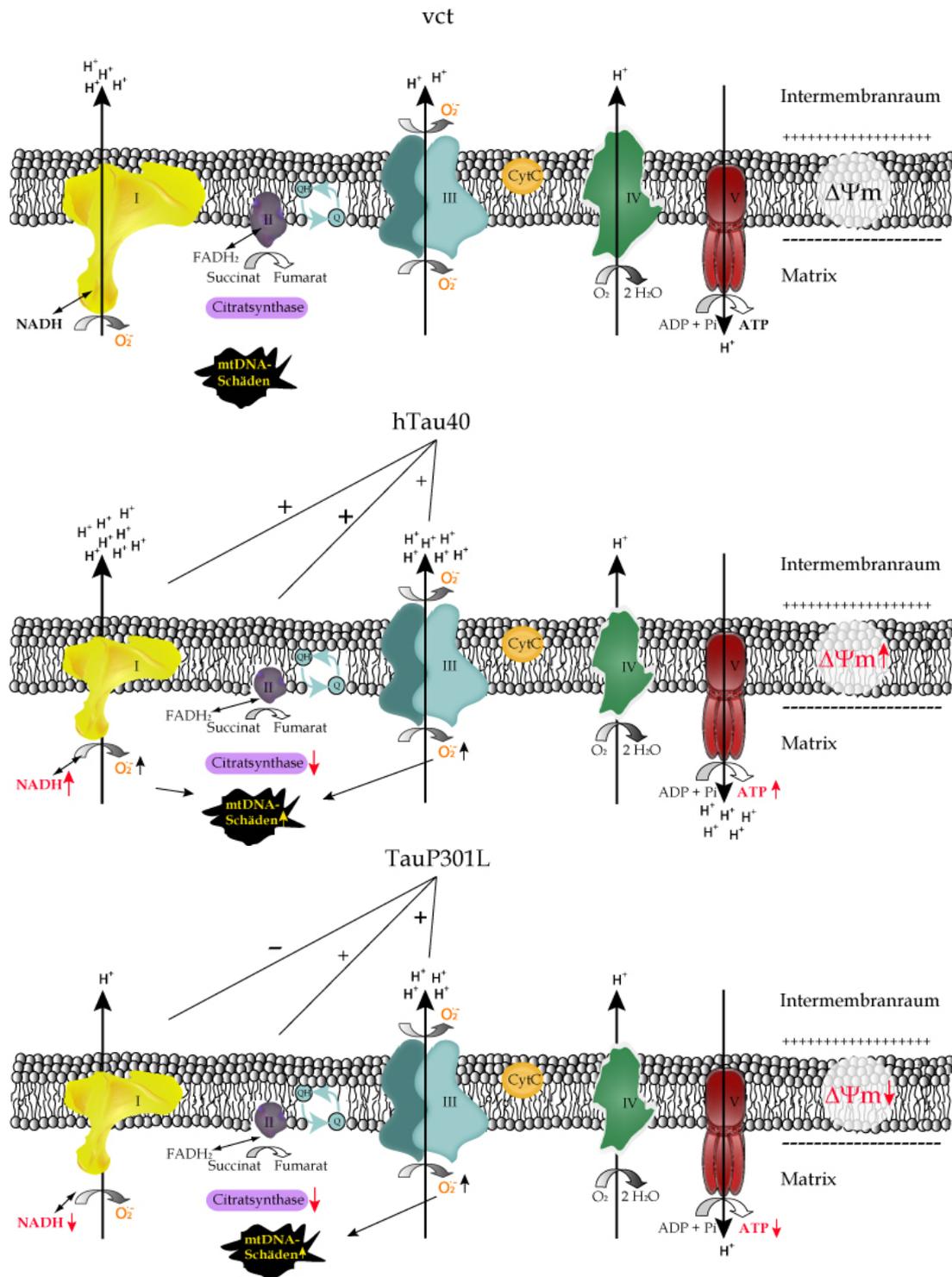


Abb.: 4-3 Zusammenfassung der funktionelle Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

Die Überexpression von Tau führt unabhängig von der pathologischen Mutation zu einer verminderten Expression von Komplex I, II und IV. Dies führt aber auf funktioneller Ebene der Mitochondrien zu unterschiedlichen Effekten, die sich hauptsächlich durch die Veränderungen der Komplex I-Aktivitäten manifestieren. Zusätzlich kommt es zu veränderten metabolischen Aktivitäten, erhöhten Superoxidanionradikal-Spiegeln die zu mehr mtDNA-Schäden führen, sowie Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential und unterschiedlichen ATP-Spiegeln.

4.1.3.3 Die unterschiedlichen Komplex I-Aktivitäten beeinflussen Morphologie, Dynamik sowie die Ultrastruktur der Mitochondrien

Die aus den unterschiedlichen Komplex I-Aktivitäten der hTau40- und TauP301L-Zellen resultierenden ATP-Spiegel tragen erheblich zu der Morphologie, Dynamik sowie der Ultrastruktur der SH-SY5Y Zellen bei. So zeigt sich schon allein in den Unterschieden der Cristae-Struktur, wie in der Literatur beschrieben (PALADE, 1953), dass die Oberfläche der Cristae positiv mit der aus der oxidativen Phosphorylierung entstandenen ATP-Menge korreliert. Die Theorie dahinter besagt, dass die Cristae-Struktur der effizientesten ATP-Produktion dient, indem so der Abstand zwischen Adenin-Translokation und P_i -Transformation minimiert wird (Demongeot et al., 2007). Ebenso konnten durch Injektion von ATP bzw. ADP in die Mitochondrien Veränderungen in der Dichte der Matrix und der Ausbildung der Cristae beobachtet werden (Bereiter-Hahn J et al., 1983; Hackenbrock, 1968), die dem Energiestatus der SH-SY5Y Zellen entsprechen.

Ebenso gibt es Hinweise, dass ein möglicher Kontrollmechanismus für die Transportrichtung der Mitochondrien in der Zelle von der Affinität der Motormoleküle zu mitochondrialem ATP und damit vom Energiestatus der Organellen abhängig ist. So kommt es eher zum anterograden Transport von ATP-reichen Mitochondrien durch Kinesin, wie unter ATP-armen Konditionen der retrograde Transport der Mitochondrien über Dynein präferiert wird (Bereiter-Hahn et al., 2008). Zudem wird die Bewegung von Mitochondrien auch durch den Energiestatus und die Atmung beeinflusst (Bereiter-Hahn J. et al., 1972; Katayama et al., 2006)

Einen Beweis dafür, dass sämtliche Effekte in den SH-SY5Y Zellen auf die Komplex I-Aktivität zurückzuführen sind, hat vor kurzem die Gruppe um Höglinger erbracht (Escobar-Khondiker et al., 2007). Neuronale Primärkulturen wurden mit dem Komplex I Inhibitor Annonacin behandelt und wiesen nach 48 Stunden einen konzentrationsabhängigen Abfall der ATP-Spiegel auf. Zusätzlich kam es zu einer

Umverteilung von Tau aus dem Axon in den Zellkörper und schließlich zum Zelltod. Interessanterweise kam es ebenfalls zu einem retrograden Transport von Mitochondrien, wobei teilweise an deren äußeren Membran Tau angeheftet war. Diese Effekte spiegeln die Daten der TauP301L-Zellen wieder, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hier ein Teufelskreislauf vorliegt. Die Mutation P301L führt zu einem funktionellen Defekt von Komplex I, der wiederum zu verminderten ATP-Spiegeln und retrogradem Transport der Mitochondrien führt sowie einer Umverteilung von Tau in den Zellkörper. Somit ist auch der Umkehrschluss plausibel, dass eine verbesserte Funktion von Komplex I in den hTau40-Zellen zu den hohen ATP-Spiegeln und dem ausgedehnten mitochondrialen Netzwerk führt. Weitere Studien belegen diese Theorie und haben gezeigt, dass Rotenon (Komplex I Inhibitor) in Ratten eine zerebrale Tauopathie auslösen kann (Hoglinger et al., 2005). Ebenso führt die Behandlung mit Rotenon in Fibroblasten zu einer ähnlichen perinukleären Morphologie der Mitochondrien mit den beobachteten Clustern (Benard et al., 2007) wie es in den TauP301L-Zellen der Fall ist. Dies alles deutet darauf hin, dass der Funktionalität von Komplex I eine weitaus größere Bedeutung zukommt, als nur an der Energieversorgung über die Atmungskette beteiligt zu sein. Ob diese weiteren Effekte direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Zellphysiologie ausüben, ist noch nicht eindeutig geklärt. Klar ist aber, dass ein Defekt von Komplex I neben dem Alterungsprozess auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson eine entscheidende Rolle spielt.

4.1.3.4 Die Mutation spiegelt den Alterungsprozess auf funktioneller, wie struktureller Ebene wieder

Im Alter kommt es zu Veränderungen von diversen zellulären Funktionen und Parametern. Vor allem die Ansammlung von oxidativen Schäden und die Abnahme der mitochondrialen Kompetenz im Alter ATP zu produzieren sind zwei grundlegende Konzepte der „mitochondrialen Hypothese des Alterns“ (Beckman et al., 1998). Hierbei ist Komplex I und IV sehr stark betroffen, da viele ihrer Untereinheiten durch mtDNA kodiert werden. Diese ist im Laufe der Jahre verstärkt

oxidativem Stress ausgesetzt, wodurch es zu Mutationen und Veränderungen im Energiehaushalt der Mitochondrien kommen kann (Muller-Hocker et al., 1992). Zudem wurde vielfach eine verminderte Komplex I- und IV-Aktivität im Alter beschrieben (Lenaz et al., 2000; Navarro, 2004). Viele der funktionellen und strukturellen Veränderungen, die durch die Mutation TauP301L in den SH-SY5Y Zellen hervorgerufen werden, spiegeln den Alterungsprozess wieder. Sie weisen zum einen eine erhöhte Rate an oxidativen mtDNA-Schäden auf. Der Alterungsprozess manifestiert sich weiterhin deutlich in einer erniedrigten Aktivität von Komplex I. Auch bei Primaten wurde im Alter eine erniedrigte Komplex I-Aktivität gemessen (Bowling et al., 1993). Als Folge der verminderten NADH-Ubichinon-Reduktase-Aktivität weisen die TauP301L-Zellen erniedrigte ATP-Spiegel auf. Generell kommt es im Alter zu einer verminderten Effektivität und Kapazität der oxidativen Phosphorylierung, wie die Gruppe um Greco *et al.* bereits an humanen Fibroblasten zeigen konnte (Greco et al., 2003). Über die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien im Alter gibt es bisher nur wenige Studien, aber die Gruppe um Jendrach *et al.* konnte an gealterten HUVEC-Zellen eine verminderte mitochondriale Bewegung, weniger *Fusion* und *Fission* sowie eine perinukleäre Verteilung der Mitochondrien beobachten (Jendrach et al., 2005). Diese Befunde konnte ebenso in den TauP301L-Zellen gezeigt werden. Somit beschleunigt die Mutation TauP301L anscheinend den Alterungsprozess der Zelle und könnte dadurch Neurodegeneration auslösen.

4.2 Vulnerabilität der SH-SY5Y Zellen gegenüber diversen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung kann in jeder Stufe der ATP-Gewinnung durch bestimmte Inhibitoren beeinflusst und gehemmt werden. Hierbei hemmt Rotenon die Übertragung der Elektronen über Kofaktoren von NADH auf Ubichinon durch die NADH-Dehydrogenase sowie den damit verbundenen Transport von Protonen (Chance et al., 1963). Die Übertragung der Elektronen von FADH₂ durch die Succinat-Dehydrogenase auf Ubichinon wird durch TTFA inhibiert (Sun et al., 2005).

Antimycin bindet spezifisch an das Chinon-Reduktionszentrum (Q_i -Seite) des Cytochrom $b-c_1$ -Komplexes (Slater, 1973) und blockiert hierdurch die Übertragung der Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom C. Die Cytochrome C Oxidase kann durch Natriumazid gehemmt werden, das reversibel die Sauerstoffbindungsstelle an der Häm a_3 -Untereinheit von Komplex IV blockiert und dadurch die Energieproduktion inhibiert sowie die Abgabe von Sauerstoffradikalen erhöht (Park et al., 1999). Oligomycin ist ein hoch affiner Hemmstoff der F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase (Matsuno-Yagi et al., 1985), wodurch der Protonenfluss durch die ATP-Synthase und damit die Generierung von ATP gehemmt wird. Generell kann der Elektronenfluss über die Atmungskette durch sogenannte Entkoppler, wie zum Beispiel FCCP (Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethoxyphenylhydrazon), von der Phosphorylierung getrennt werden (Brennan et al., 2006). Dies führt zum gesteigerten Elektronentransport, wobei die Protonen an der ATP-Synthase vorbei in den Matrixraum zurückfließen können. Dabei wird die gespeicherte Enthalpie des Protonengradienten in Form von Wärme frei und es kommt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, da der Elektronentransport mit Maximalgeschwindigkeit abläuft.

Durch die Inhibierung der einzelnen Komplexe und Entkopplung der Atmungskette von der Phosphorylierung können Vermutungen über die relative Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkette angestellt werden. Eine definitive Aussage darüber wäre nur nach Bestimmung der *State 3*- und *State 4*-Atmung möglich, aus deren Ratio sich der Respiratorische Kontrollindex (RCR) bilden lässt, doch dies war methodisch nicht durchführbar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit diverse Parameter nach Inhibierung oder Entkopplung der Atmungskette bestimmt, um eine Aussage über die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen machen zu können.

4.2.1 Die Entkopplung der Atmung von der oxidativen Phosphorylierung führt zur Schädigung der mitochondrialen Funktion

Die Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung führt zu einem stark gesteigerten Elektronentransport und einem Abfall der ATP-Spiegel. Dies konnte nach 24-stündiger Inkubation mit FCCP auch in den SH-SY5Y Zellen gezeigt werden (für die konzentrations- und zeitabhängigen Effekte siehe Abschnitt 3.1.7.1 und 3.1.7.2). Der geringe Effekt auf das mitochondriale Membranpotential scheint wohl durch die gewählten FCCP-Konzentrationen bedingt zu sein (Abb.: 3-21 Seite 114). Die Gruppe um Cheng *et al.* hat an einer murinen Hepatozyten-Zelllinie nach Inkubation mit 8 μ M FCCP ebenso keinen Effekt auf das MMP messen können, sondern erst nach der Verwendung von höheren Konzentrationen (Cheng *et al.*, 2003). Andere Publikationen hingegen zeigen schon ab geringen FCCP-Konzentrationen einen Einfluss auf das Membranpotential (Brennan *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2004). Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedlich verwendeten Zelltypen zurückzuführen sein, wobei eventuell auch der Farbstoff Rhodamin123 einen Einfluss auf den Effekt hat. Die Gruppe um Salvioli *et al.* konnte zeigen, dass es in der humanen Leukemie-Zelllinie U937 nach Inkubation mit 250 nM FCCP zu keinen Veränderungen des mitochondriale Membranpotentials nach Rhodamin123-Färbung kam, wohingegen die Färbungen mit JC-1 und DiOC₆ deutliche Effekte auf das MMP aufwiesen (Salvioli *et al.*, 1997). Im Widerspruch zu den vorliegenden Daten konnte allerdings die Gruppe um Kahlert *et al.* eine Depolarisation nach FCCP-Stimulation mit dem Farbstoff R123 detektieren (Kahlert *et al.*, 2008). Somit scheinen die Ergebnisse nach FCCP-Stimulation zum einen Zelltypabhängig und zum anderen vom verwendeten Farbstoff abhängig zu sein und daher nicht direkt übertragbar.

Neben dem geringen depolarisierendem Effekt von FCCP, führt die Inkubation zu einem stark gesteigerten Elektronenfluss, was sich in den erniedrigten NADH-Spiegeln widerspiegelt (Abb.: 3-19 Seite 113). Da den TauP301L-Zellen schon basal geringere NADH-Spiegel zur Verfügung stehen, können sie auf den erhöhten

Verbrauch anscheinend schlechter reagieren wie die vct- und hTau40-Zellen. Somit kommt es in den TauP301L-Zellen zu einer signifikant stärkeren Depletion der NADH-Spiegel. Ähnlich verhält es sich mit den ATP-Spiegeln. Die Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung führt in allen drei Zelltypen zu einem Abfall der ATP-Spiegel, der in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausfällt (Abb.: 3-20 Seite 114). Trotz einer tendenziell erhöhten Glykolyserate im Vergleich zu den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-22 Seite 117), können die TauP301L-Zellen dem zusätzlichen Insult nicht so gut entgegenwirken. In den P301L-Mäusen kommt es im Alter zu einer verminderten FCCP-abhängigen Entkopplung der Atmungsrate (David et al., 2005a). Der Elektronentransport läuft unter diesen Umständen mit Maximalgeschwindigkeit ab, vorausgesetzt alle Substrate und ADP sind im Überschuss vorhanden. In den TauP301L-Zellen sind basal schon die ATP- und NADH-Spiegel erniedrigt, sodass hier eine geringere Kapazität für den maximalen Elektronentransport vorliegt, was auch die Ergebnisse an den P301L-Mäusen erklären könnte. Zusätzlich liegt noch ein Komplex I-Defekt vor, der ebenso eine mindernde Auswirkung auf den maximalen Elektronentransport hat. Das die Stimulation mit FCCP an sich in SH-SY5Y Zellen zu einem Abfall der ATP-Spiegel führt, konnte auch die Gruppe um Korlipara *et al.* zeigen (Korlipara et al., 2004).

Man kann davon ausgehen, dass die niedrigen FCCP-Konzentrationen nicht die gesamte oxidative Phosphorylierung aller Mitochondrien der Zelle entkoppeln, da erst ab der höchsten Konzentration ein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität in den vct- und TauP301L-Zellen zu beobachten war (Abb.: 3-23 Seite 118). Normalerweise reagieren Zellen auf solchen Stress, der einige Mitochondrien schädigt, mit einer erhöhten Fusion und Teilung der Mitochondrien. Hierdurch versuchen sie intakte mit geschädigten Mitochondrien zu vereinen, um die abgefallenen ATP-Spiegel wieder auf ein normales Niveau anzuheben. Da in den TauP301L-Zellen Fusion und Fission unter basalen Bedingungen vermindert ist, könnte dies ein weiterer Grund für den stärkeren ATP-Abfall nach Entkopplung der Atmungskette mit FCCP darstellen.

4.2.2 Auswirkungen diverser Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

4.2.2.1 Hemmung von Komplex I durch Rotenon

Die Hemmung von Komplex I durch das Insektizid Rotenon hat drastische Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen. Aufgrund des vorliegenden funktionalen Defekts von Komplex I in den TauP301L-Zellen reagieren diese sensibler auf die Schädigung mit Rotenon. Dies zeigt sich vor allem durch einen deutlichen Abfall der ATP-Spiegel (Abb.: 3-26 A Seite 126). Es kommt zwar in allen drei Zelltypen durch den Pasteur Effekt zu einem Anstieg der Lactat-Spiegel (Abb.: 3-26 B Seite 126), aber die TauP301L-Zellen weisen trotzdem weniger ATP auf als die vct- und hTau40-Zellen. Der sogenannte Pasteur Effekt tritt bei einer verminderten mitochondrialen Funktion zu Tage, indem durch diese Dysfunktion die Glykolyse stimuliert wird, um den ATP-Verlust auszugleichen (Holmsen et al., 1980). Diese, durch die Hemmung der Atmung stimulierte Lactat-Produktion, verhält sich äquivalent zu der gehemmten ATP-Produktion der Mitochondrien. Währenddessen wird Pyruvat zu Lactat reduziert, um oxidierte Pyridin-Nukleotide (NAD⁺ und NADP⁺) zu regenerieren. Dies zeigt sich auch in den stark erniedrigten NADH-Spiegeln der SH-SY5Y Zellen nach Inhibierung von Komplex I (Abb.: 3-27 A Seite 127). Interessanterweise zeigen die hTau40-Zellen nach Stimulation mit Rotenon einen geringeren Abfall der NADH-Spiegel im Vergleich zu den vct- und TauP301L-Zellen, obwohl der prozentuale Abfall zu der jeweils eigenen, unstimulierten Kontrolle betrachtet wird. Somit können die basal deutlich erhöhten NADH-Spiegel der hTau40-Zellen dafür nicht verantwortlich sein. Da die Komplex I-Aktivität auch einen sehr großen Beitrag an der Aufrechterhaltung und Generierung des mitochondrialen Membranpotentials hat ist es nicht verwunderlich, dass die Inhibierung zu einer deutlichen Depolarisation in den SH-SY5Y Zellen führt (Abb.: 3-26C Seite 126). Allerdings kam es nicht, wie in den P301L transgenen Mäusen, zu einer stärkeren Depolarisation in den TauP301L-Zellen ((David et al., 2005a) Dissertation Susanne Kirr, 2008). Zum einen wurden hierfür isolierte Mitochondrien verwendet, sodass kein direkter Vergleich möglich ist. Zum anderen wurde nach

einer kürzeren Inkubationszeit gemessen, wobei eine einstündige Inkubation mit Rotenon ebenso zu keinen Unterschieden im Abfall des mitochondrialen Membranpotentials der SH-SY5Y Zellen führte (nicht gezeigte Daten). Ebenso resultiert die Schädigung der mitochondrialen Funktion durch das Insektizid Rotenon in einer stark gesteigerten Zytotoxizität, die in den vct- und TauP301L-Zellen signifikant gegenüber der jeweils unstimulierten Kontrolle erhöht ist (Abb.: 3-27B Seite 127). Interessanterweise scheint die signifikant (hTau40-Zellen) bzw. tendenziell (TauP301L-Zellen) verminderte Expression von Komplex I keinen Einfluss auf die Inhibition durch Rotenon in den gemessenen Assays zu haben. Vermutlich liegt dies an der gewählten Inkubationsdauer, da die langfristige Hemmung von Komplex I durch Rotenon definitiv zu einem Abfall der ATP-Spiegel, des Membranpotentials und schließlich zum Zelltod führt (Barrientos et al., 1999). In der folgenden Tabelle sind die Effekte nach Inkubation mit Rotenon auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-3).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Lactat	Zytotox
hTau40	↓	↓	↓	↑	↑
TauP301L	↓	↓	↓	↑	↑

Tab.: 4-3 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Rotenon

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit Rotenon im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp.

4.2.2.2 Inhibierung von Komplex II durch TTFA

Die Inhibierung von Komplex II durch TTFA führt in den SH-SY5Y Zellen zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion. Allerdings kommt es nicht zur Auslösung des Pasteur-Effekts, da keine Veränderungen in der Lactat-Produktion detektiert wurden (Abb.: 3-31 Seite 134). Hierzu passt auch, dass die mitochondriale

Funktion durch die Inkubation mit TTFA anscheinend nur gering geschädigt wird, da es nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität kommt (Abb.: 3-32 B Seite 135). Allerdings hätte man auch erwarten können, dass die Tau überexprimierenden Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit nach Inkubation mit TTFA aufweisen, da sowohl die hTau40- wie auch die TauP301L-Zellen neben einer verminderten Expression von Komplex II auch eine erhöhte Aktivität aufweisen (Abb.: 3-33 B Seite 136 und 3-34 B Seite 137). Vermutlich ist die gewählte Konzentration zu gering, um alle Komplexe der Mitochondrien zu hemmen, weshalb die verminderte Expression und die erhöhte Aktivität nicht zum Tragen kommen. In der Literatur ist es durchaus üblich weitaus höhere Konzentration zu verwenden (Byun et al., 2008; Chen et al., 2007b).

Bei der Einschleusung von Elektronen durch Komplex II in die Atmungskette werden keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt, die durch den dadurch aufgebauten elektrochemischen Gradienten für die ATP-Generierung verantwortlich sind. Vermutlich kommt es daher nach Inhibierung mit TTFA nur zu einem geringen Abfall der ATP-Spiegel, der aber in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausgeprägt ist (Abb.: 3-31 A Seite 134). Dies ist nicht verwunderlich, da nun die einzige Möglichkeit zur Einschleusung von Elektronen zur ATP-Generierung über Komplex I besteht und die TauP301L-Zellen eine deutlich erniedrigte Komplex I-Aktivität aufweisen. Trotzdem kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, der allerdings in allen drei Zelltypen gleich stark ausgeprägt ist (Abb.: 3-31 C Seite 134). Dies passt zu den Ergebnissen an den transgenen P301L Mäusen, die nach TTFA-Inkubation einen gleichstarken Abfall des mitochondrialen Membranpotentials aufwiesen ((David et al., 2005a) Dissertation Susanne Kirr, 2008)). Da es zu einem Abfall des Membranpotentials kommt, könnte auf die erniedrigten NADH-Spiegel nach Inkubation mit TTFA zurückzuführen sein (Abb.: 3-32 A Seite 135). Da die Zellen nur über Komplex I Energie generieren können sinken die NADH-Spiegel, wodurch den Zellen wiederum weniger NADH zur Verfügung, um Elektronen über Komplex I in die Atmungskette einzuschleusen. Somit werden auch weniger Protonen in den Intermembranraum gepumpt, was über einen längeren Zeitraum zu einem Abfall des Membranpotentials führen kann. Warum es aber zu einer gleichwertigen Depolarisation in allen drei Zelltypen kommt, obwohl die NADH-Spiegel in den hTau40-Zellen signifikant weniger

abfallen als in den vct- und TauP301L-Zellen, ist unklar. Die Gruppe um Byun *et al.* konnte an humanen Hepatozyten ebenfalls zeigen, dass TTFa zu einem leichten Abfall der ATP-Spiegel und zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials führt (Byun et al., 2008). In der folgenden Tabelle sind die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit TTFa in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-4).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Lactat	Zytotox
hTau40	↓	↓	↓	↔	(↓)
TauP301L	↓	↓	↓	↔	(↑)

Tab.: 4-4 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit TTFa

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit TTFa im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

4.2.2.3 Antimycin-Hemmung von Komplex III

Die Hemmung von Komplex III durch Antimycin führt zu einem deutlichen Abfall der ATP-Spiegel, der in den TauP301L-Zellen signifikant stärker ausgeprägt ist als in den vct- und hTau40-Zellen (Abb.: 3-35 A Seite 139). Ebenso wie nach Inhibierung von Komplex I kommt es in Folge des ATP-Abfalls zur erhöhten Lactat-Produktion aufgrund des Pasteur-Effektes (Abb.: 3-35 Seite 139). Dies konnte die Gruppe um Pauwels *et al.* bereits an murinen Neuroblastoma-Zellen und Neuronen zeigen (Pauwels et al., 1985). Bei der Produktion von Lactat kommt es zu einem erhöhten Verbrauch von NADH um oxidierte Pyridin-Nukleotide zu generieren. Dies zeigt sich in der verminderten metabolischen Aktivität der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit Antimycin, was erniedrigten NADH-Spiegeln gleich kommt (Abb.: 3-36 A Seite 140). Gleichzeitig kommt es aber nur zu einem geringen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (Abb.: 3-35 C Seite 139). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Daten an isolierten Mitochondrien der P301L transgenen

Mäuse, die nach Inkubation mit Antimycin einen deutlichen Abfall des Membranpotentials zeigten (Dissertation Susanne Kirr, 2008). Allerdings konnten auch hier keine Unterschiede bei der Depolarisation im Vergleich mit der Kontrolle gemessen werden. Die Gruppe um van Raam *et al.* konnte nach Inkubation mit Antimycin nur einen geringen Abfall der ATP-Spiegel, erhöhte Lactat-Spiegel und einen deutlichen Abfall des MMPs in einer Subklasse von humanen Blutzellen (Neutrophile) messen, die allerdings basal schon eine verminderte Komplex III-Aktivität aufwiesen (van Raam *et al.*, 2008). Zudem wurden die Zellen nur für 2 Stunden inkubiert, weshalb die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können. In SH-SY5Y Zellen haben zwei Gruppen Effekte nach Antimycin-Inkubation zeigen können, die teilweise mit den Daten der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Die Gruppe um Shang *et al.* hat eine Abnahme der metabolischen Aktivität nach Hemmung von Komplex III gezeigt, aber ebenso einen starken Abfall des MMPs detektiert (Shang *et al.*, 2005), der in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Die Gruppe um Watabe *et al.* konnte einen Abfall der ATP-Spiegel nach 24-stündiger Inkubation mit Antimycin in SH-SY5Y Zellen zeigen (Watabe *et al.*, 2007). Allerdings ist hier nichts über die basale Aktivität von Komplex III bekannt und da es sich um untransfizierte Zellen handelt, sind die Ergebnisse nur auf die vct-Zellen zu übertragen.

Interessanterweise reagieren die TauP301L-Zellen am empfindlichsten auf die Inhibition mit Antimycin. Diese haben basal die höchste Komplex III-Aktivität, um den funktionellen Defekt von Komplex I auszugleichen. Daher führt die Inhibition von Komplex III zu einem deutlich stärkeren Abfall der ATP-Spiegel und signifikant erhöhten Toxizität. In der folgenden Tabelle sind die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit Antimycin in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-5 Seite 217).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Lactat	Zytotox
hTau40	↓	(↓)	↓	↑	↑
TauP301L	↓	(↓)	↓	↑	↑

Tab.: 4-5 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Antimycin

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit Antimycin im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

4.2.2.4 Hemmung von Komplex IV durch Natriumazid

Die Inhibierung von Komplex IV durch Natriumazid führt nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer mäßigen Schädigung der mitochondrialen Funktion der SH-SY5Y Zellen, obwohl NaN_3 Komplex IV nur reversibel hemmt. Der deutlichste Effekt zeigt sich in dem Abfall der ATP-Spiegel, der in den hTau40-Zellen signifikant geringer ausgeprägt ist als in den vct-Zellen (Abb.: 3-39 A Seite 144). Da NaN_3 mit dem Lactat-Assay interagiert, konnten die Lactat-Spiegel nach Hemmung von Komplex IV nicht bestimmt werden. Es ist aber anzunehmen, dass diese wie nach Hemmung von Komplex I und III in Folge einer erhöhten Glykolyserate in den SH-SY5Y Zellen ansteigen, um den Energieverlust durch Hemmung der Atmungskette auszugleichen. Dies zeigt sich auch in der erniedrigten metabolischen Aktivität in allen Zelltypen (Abb.: 3-40 A Seite 145), was ebenfalls die Gruppe um Park *et al.* in Mikroglia-Zellen zeigen konnte (Park *et al.*, 1999). Allerdings führt in diesem Zellmodell die 24-stündige Inkubation mit 10 mM NaN_3 nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität, obwohl es zu einem deutlichen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies kommt. Dies ist auch vermutlich der Grund, warum es in den SH-SY5Y Zellen zu einer deutlich erhöhten Zytotoxizität kommt, die allerdings in den hTau40-Zellen signifikant niedriger ausgeprägt ist als in den vct-Zellen (Abb.: 3-40 B Seite 145). Dies korreliert mit den MMP-Daten, da die hTau40-Zellen keinen Abfall nach NaN_3 -Inkubation zeigen (Abb.: 3-39 B Seite 144). Die vct- und TauP301L-Zellen

weisen ein depolarisiertes MMP auf, was den Daten der P301L-Mäuse entspricht (David et al., 2005a).

Die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach Hemmung von Komplex IV weisen kaum Unterschiede zwischen den drei Zelltypen auf. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Tau bei neurodegenerativen Erkrankungen keinen Einfluss auf Komplex IV hat, was sich ebenso in der unveränderten Komplex IV-Aktivität der SH-SY5Y Zellen gezeigt hat. In der folgenden Tabelle sind die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit Natriumazid in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-6).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Zytotox
hTau40	↓	(↓)	↓	↑
TauP301L	↓	(↓)	↓	↑

Tab.: 4-6 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Natriumazid

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit Natriumazid im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Die Klammern zeigen einen tendenziellen Effekt.

4.2.2.5 NO-induzierte Hemmung von Komplex IV

Die Inkubation mit Natriumnitroprussid (SNP) – einem NO-Donor – hat nur geringe Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen. Die akuten Messungen zeigen eindeutig, dass die NO-Spiegel nach SNP-Inkubation in allen drei Zelltypen ansteigen, allerdings ist dieser Anstieg in den vct-Zellen signifikant stärker ausgeprägt als in den hTau40- und TauP301L-Zellen (Abb.: 3-50 A Seite 162). Ebenso kommt es hauptsächlich in den vct-Zellen zu einem spontanen Abfall der ATP-Spiegel (Abb.: 3-50 B Seite 162). Dies ist vermutlich auf die Inhibierung der Komplex IV-Aktivität zurückzuführen. Die Gruppe um Brorson *et al.* hat ebenfalls zeigen können, dass NO rasch und konzentrationsabhängig zu einem Abfall der ATP-Spiegel in primären hippokampalen Neuronen führt (Brorson et al., 1999). Warum die Tau-überexprimierenden Zellen aber akut weniger sensitiv auf die erhöhten NO-

Spiegel reagieren ist unklar. Da NO ein diffusibles Gas ist und reaktive NO-Spezies rasch mit anderen Strukturen oder Molekülen zum Beispiel zu Peroxynitrit reagieren ist es nicht verwunderlich, dass nach der 24-stündigen Inkubation mit SNP nur geringe Effekte auf die mitochondriale Funktion messbar sind. Allerdings wird seit einiger Zeit neben der wichtigen Rolle von NO zyklisches GMP über die Aktivierung der Guanylatzyklase zu generieren, auch immer mehr eine Funktion bei der Modulierung der Energiekonservierung im Gehirn diskutiert. Über einige Zwischenschritte führt NO nach Inhibierung von Komplex IV zur Aktivierung der Phosphofruktokinase, dem Schlüsselenzym der Glykolyse. Ebenso kann NO zur Aktivierung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase führen, wodurch zum Einen durch die Bildung von Glukose-6-Phosphat, ein Vorläufer für viele metabolische Glukose-verbrauchende Stoffwechselwege, gebildet und zum Anderen Redox-Äquivalente in Form von NADPH(H⁺) generiert wird (Bolanos et al., 2008). Letzteres wird gerade in Neuronen hauptsächlich als Kofaktor für den regenerierenden Stoffwechselweg des Antioxidants Glutathion (GSH) verwendet, welches von seiner oxidierten Form (GSSG) durch die Glutathion-Reduktase generiert wird (Kletzien et al., 1994). Über diesen Weg kann NO eine neuroprotektive Funktion ausüben (Ben-Yoseph et al., 1996) und dies erklärt vermutlich auch die geringen Änderungen der Zytotoxizität in den SH-SY5Y Zellen, obwohl NO eben auch als RNS nitrosativen Schaden in der Zelle anrichten kann.

Obwohl nach 24-stündiger Inkubation mit SNP die Effekte auf die mitochondriale Funktion nur sehr gering sind, weisen die TauP301L-Zellen im Vergleich mit den hTau40-Zellen einen stärkeren Abfall der metabolischen Aktivität, des MMPs und der ATP-Spiegel auf (Abb.: 3-52 A Seite 165 sowie 3-51 A und C Seite 164). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass NO mit O₂ zu Peroxynitrit reagiert, was wiederum Komplex I der Atmungskette hemmen kann (Radi et al., 2002). Die TauP301L-Zellen weisen eine deutlich geringere Komplex I-Aktivität auf und eine weitere Hemmung könnte die Effekte nach SNP-Inkubation erklären. In der folgenden Tabelle sind die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach langfristigen Inkubation mit SNP in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-7 Seite 220).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Lactat	Zytotox
hTau40	(↓)	↔	(↑)	↔	(↓)
TauP301L	↓	↓	↓	↔	(↑)

Tab.: 4-7 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit SNP

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit SNP im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

4.2.2.6 Inhibierung von Komplex V durch Oligomycin

Durch Inkubation mit Oligomycin kommt es zur Hemmung der F_0 -Untereinheit von Komplex V. Dies führt zur Hemmung des Protonenstroms, wodurch es zu einer Abnahme der ATP-Synthase-Aktivität kommt, was sich dementsprechend auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen auswirkt. Es kommt zu einem Abfall der ATP-Spiegel (Abb.: 3-43 A Seite 149) und in Folge dessen zu einem Anstieg der Lactat-Spiegel aufgrund des Pasteur-Effektes (Abb.: 3-43 B Seite 149). Die Produktion von Lactat führt zu einem erhöhten Verbrauch von NADH um oxidierte Pyridin-Nukleotide zu generieren. Dies zeigt sich in der verminderten metabolischen Aktivität der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit Oligomycin, was erniedrigten NADH-Spiegeln gleich kommt (Abb.: 3-44 A Seite 150). Gleichzeitig kommt es aber nach 24-stündiger Inkubation zu keinem Effekt auf das mitochondriale Membranpotential (Abb.: 3-43 C Seite 149). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Daten an isolierten Mitochondrien der P301L transgenen Mäuse, die allerdings nach Inkubation mit einer fünfmal höheren Konzentration mit Oligomycin einen deutlichen Abfall des Membranpotentials zeigen ((David et al., 2005a) Dissertation Susanne Kirr, 2008)). Dieser ist in den P301L-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt. Hierfür könnte die verminderte Expression der D-Kette der ATP-Synthase in den P301L-Mäusen verantwortlich sein. Aus methodischen Gründen konnte in den SH-SY5Y Zellen nur die Expression einer anderen Untereinheit der ATP-Synthase untersucht werden, die allerdings keinerlei Veränderung aufwies (Abb.: 3-45 B Seite

152). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression der D-Kette in den TauP301L-Zellen ebenfalls verändert ist. Zudem wird diskutiert, dass die Hemmung von Komplex V mit Oligomycin zu einer Hyperpolarisation des MMPs führen müsste, da durch die oxidative Phosphorylierung weiterhin Protonen in den Intermembranraum transportiert werden und es hier zu einem Stau kommt. Dies konnte bei der verwendeten Inkubationsdauer von 24 Stunden nicht mehr gezeigt werden, da dieser Effekt vermutlich nach einer kürzeren Inkubationsdauer zum Tragen kommt. Nach der 24-stündigen Inkubation überwiegt der Abfall der ATP-Spiegel, der durch erhöhte Lactat-Spiegel nicht mehr vor einer verstärkten Zytotoxizität schützen kann (Abb.: 3-44 B Seite 150).

Die TauP301L-Zellen weisen nach Hemmung von Komplex V eine verminderte metabolische Aktivität sowie erniedrigte ATP-Spiegel im Gegensatz zu den hTau40-Zellen auf. Dies deutet wiederum auf einen Defekt in der Energiegewinnung der TauP301L-Zellen hin, der unabhängig von der verminderten oxidativen Phosphorylierung besteht. In der folgenden Tabelle sind die Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit Oligomycin in Abhängigkeit von der Tau-Überexpression dargestellt (Tab.: 4-8).

	metabolische Aktivität	MMP	ATP	Lactat	Zytotox
hTau40	↓	(↑)	↓	↑	↑
TauP301L	↓	↔	↓	↑	↑

Tab.: 4-8 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Oligomycin

Die Pfeile stellen jeweils den Effekt nach Inkubation mit Oligomycin im Vergleich zur jeweils eigenen unstimulierten Kontrolle dar. Ein roter Pfeil steht für einen signifikant stärkeren Effekt im Vergleich mit dem anderen Zelltyp und in Klammern ist ein tendenzieller Effekt angedeutet.

4.2.3 Vergleich der Effekte von diversen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette und ihrer Auswirkung auf die mitochondriale Funktion

Eine Aussage über die relative Effizienz der metabolischen Kopplung der Elektronentransportkette in den SH-SY5Y Zellen lässt sich nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Energiegewinnung sowie der Inhibierung der einzelnen Komplexe klar zusammenfassen. Die hTau40-Zellen reagieren auf die Entkopplung und die Hemmung der Atmungskettenkomplexe weniger sensitiv als die vct- und TauP301L-Zellen. Dies zeigt sich vor allem bei der metabolischen Aktivität und den ATP-Spiegeln. Nur nach Hemmung von Komplex IV durch Natriumazid sind keine Unterschiede zwischen hTau40- und TauP301L-Zellen vorhanden. Dies macht deutlich, dass die Überexpression von Tau keinen Einfluss auf die Aktivität von Komplex IV hat und im Umkehrschluss die Hemmung von Komplex IV nicht zu Unterschieden der mitochondrialen Funktion der Tau-überexprimierenden Zelltypen führt.

Interessanterweise zeigt sich aber auch, dass die TauP301L-Zellen nach Hemmung von Komplex I, II, III und V sowie nach der Entkopplung durch FCCP einen zusätzlichen Energieverlust im Vergleich mit den vct-Zellen aufweisen. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die TauP301L-Zellen schlechter in Lage sind den mitochondrialen Stress auszugleichen und ihre relative Effizienz der metabolischen Kopplung geringer ist.

Die Unterschiede in den Ergebnissen nach Inhibierung von Komplex IV durch Natriumazid und durch NO (SNP) sind vermutlich auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen zurückzuführen. Während Natriumazid chemisch eine Hypoxie auslöst, scheint NO eher regulatorisch die Aktivität von Komplex IV zu hemmen. Zudem führt Natriumazid zu einer gesteigerten ROS-Bildung, die sich in der deutlich gesteigerten Zytotoxizität der SH-SY5Y Zellen zeigt. NO weist im Gegensatz dazu sogar neuroprotektive Eigenschaften auf, weshalb die mitochondriale Funktion der vct- und hTau40-Zellen auch kaum verändert ist. Vermutlich durch die Bildung

von Peroxynitrit und der daraus folgenden Hemmung von Komplex I kommt es in den TauP301L-Zellen zu einem Abfall der ATP-Spiegel und des MMPs sowie einer verminderten metabolischen Aktivität. Dies liefert weitere Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion der TauP301L-Zellen, die schon durch moderate Insulte zu einer verschlechterten Funktion der Mitochondrien führt.

4.3 Die Auswirkungen von oxidativem Stress und amyloiden Spezies auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

Das Altern stellt den Hauptrisikofaktor dar, um an der sporadischen Form der Alzheimer Demenz zu erkranken (Harman, 2006; Katzman, 1986; Katzman et al., 1991). Dies ist hauptsächlich auf oxidativen Stress zurückzuführen, dessen Schäden im Alter akkumulieren können (Beckman et al., 1998). Zudem wird oxidativer Stress auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Dieser wird mit verschiedenen Gen-Mutationen assoziiert, welche die familiäre Form von AD (APP, Presenilin 1 und 2) und PD (Parkin, PINK-1 oder DJ-1) auslösen, aber auch mit diversen genetischen (z.B. Epsilon4 Allel des Apolipoproteins) und umweltbedingten Risikofaktoren (Exposition mit Pestiziden oder Metallen) (Nunomura et al., 2007).

Die Pathologie der Alzheimer Demenz setzt sich vorwiegend aus den intrazellulären Ablagerungen der neurofibrillären Bündel und den extrazellulären Amyloid-Plaques zusammen. Im Laufe der letzten Jahre richtete sich die Aufmerksamkeit allerdings weniger auf die extrazellulären, fibrillären Amyloid-Spezies, sondern mehr auf die löslichen intrazellulär vorkommenden oligomeren Formen. Denn nach neuen Erkenntnissen steht der große unlösliche Pool von A β in den Plaques des limbischen und assoziativen Kortex von AD-Patienten im Gleichgewicht mit einem kleineren Pool von diffusionsfähigen A β -Oligomeren, der anscheinend die synaptische Funktion und das Gedächtnis im Hippokampus stören kann (Selkoe, 2002).

Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen die Auswirkungen von oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen untersucht. Da oxidativer Stress als frühester Event in

der Pathologie der Alzheimer Demenz diskutiert wird (Nunomura et al., 2001) wurde ebenfalls getestet, wie sich zusätzlicher oxidativer Stress in Form von H_2O_2 auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen auswirkt.

4.3.1 Oxidativer Stress hat deutliche Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

Die Inkubation mit H_2O_2 führt bereits nach kurzer Zeit zu einem signifikanten Anstieg der Superoxidradikal-Spiegel in den vct- und TauP301L-Zellen (Abb.: 3-48 A Seite 157). Interessanterweise zeigen die Superoxidradikal-Spiegel der hTau40-Zellen keine Veränderungen, was auf zwei mögliche Ursachen zurückzuführen sein kann. Zum einen weisen die hTau40-Zellen basal schon erhöhte Superoxid- und Hydroxylradikal-Spiegel auf (Abb.: 3-13 Seite 103). Unter physiologischen Bedingungen wird das Superoxidradikal von der Superoxiddismutase (SOD) und anderen Oxidasen zu H_2O_2 umgewandelt. Allerdings können auch das Superoxidradikal und H_2O_2 in Gegenwart von Eisen miteinander reagieren, woraus wiederum Hydroxylradikale entstehen. Diese sind sehr kurzlebige ROS, die rasch zur Protein-, Lipid- oder DNA-Oxidation führen können. Da auch die Hydroxylradikal-Spiegel in den hTau40-Zellen nur tendenziell erhöht sind (Abb.: 3-48 B Seite 158) deutet dies darauf hin, dass die entstandenen Hydroxylradikale entweder schon zelluläre Strukturen oxidiert haben oder aber das H_2O_2 durch die H_2O_2 -entgiftenden Enzyme (Katalase und Glutathion-Peroxidase) erfolgreich zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wurde. Somit wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob entweder die Aktivität der antioxidativen Enzyme oder aber die Produkte der Lipidperoxidation in den hTau40-Zellen erhöht sind. Diese Untersuchung würde sich ebenso für die TauP301L-Zellen anbieten. Diese weisen nach Stimulation mit H_2O_2 sowohl signifikant erhöhte Superoxidradikal- wie auch Hydroxylradikal-Spiegel auf (Abb.: 3-48 Seite 158). Dies könnte auf eine verminderte Aktivität oder Kapazität der antioxidativen Enzyme hinweisen. Da DHR vornehmlich mitochondriale ROS bestimmt (Royall et al., 1993) wurde nun

untersucht, welche Auswirkungen dieser zusätzliche oxidative Stress auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen hatte.

Oxidativer Stress in Form von H_2O_2 führt zu einer verschlechterten mitochondrialen Funktion der SH-SY5Y Zellen, der in allen drei Zelltypen in einer erhöhten Zytotoxizität resultiert (Abb.: 3-47 Seite 156). Die Auswirkungen des oxidativen Stresses zeigen sich zudem in einer verminderten metabolischen Aktivität, ebenso wie in erniedrigten ATP-Spiegeln und einem depolarisiertem Membranpotential (Abb.: 3-49 A-C Seite 160). Allerdings scheint oxidativer Stress die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen auf einem anderen Weg zu schädigen als zum Beispiel die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. Hier kam es meist nach Schädigung der mitochondrialen Funktion aufgrund des Pasteur-Effekt zu einer Steigerung der Glykolyserate, was wiederum zu erhöhten Lactat-Spiegeln führte, um das ATP-Defizit auszugleichen (Lenaz et al., 2000). Dies ist aber nach Inkubation mit H_2O_2 nicht der Fall (Abb.: 3-49 D Seite 160). Betrachtet man allerdings die Auswirkungen der Überexpression von hTau40, so zeigt sich wieder ein protektiver Effekt auf die mitochondriale Funktion nach zusätzlichem (in dem Fall oxidativem) Stress für die Zellen. Im Vergleich mit den vct-Zellen weisen sie einen geringeren Abfall der metabolischen Aktivität und der ATP-Spiegel auf (Abb.: 3-49 A und B Seite 160) und im Vergleich mit den TauP301L-Zellen zusätzlich noch einen geringere Depolarisation des MMPs. Zudem weisen nur die vct- und TauP301L-Zellen einen signifikanten Anstieg der Zytotoxizität im Vergleich mit der eigenen unstimulierten Kontrolle auf (Abb.: 3-47 Seite 156). Dieser Befund widerspricht Ergebnissen von Stamer *et al.*, die an ausdifferenzierten N2a-Zellen (murine Neuroblastoma Zellen) eine erhöhte Empfindlichkeit der Neuriten nach Inkubation mit H_2O_2 gefunden haben, wenn diese hTau40 überexprimierten (Stamer et al., 2002). Dieses Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, dass es aufgrund der Überexprimierung in den Zellen zu einer Umverteilung der Mitochondrien und Peroxisomen kommt, die in Folge dessen kaum in den Neuriten, sondern hauptsächlich im Soma der Zellen lokalisiert sind. Da diese beiden Organellen hauptsächlich an der Entgiftung von H_2O_2 beteiligt sind, erklärt das die erhöhte Empfindlichkeit der Neuriten. Eine mögliche Erklärung für den geringeren

zytotoxischen Effekt von H_2O_2 auf die hTau40-Zellen kann von den Befunden der Gruppe um Wei *et al.* abgeleitet werden. Diese Gruppe fand heraus, dass humanes Tau an DNA binden und diese vor Schäden durch Hydroxylradikale schützen kann (Wei *et al.*, 2008). Eine andere mögliche Erklärung liegt in der Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle. Interessanterweise entspricht die morphologische Veränderung der hTau40-überexprimierenden ausdifferenzierten N2a-Zellen der mitochondrialen Verteilung der TauP301L-Zellen der vorliegenden Arbeit. Diese reagieren auf den oxidativem Stress ebenfalls wesentlich sensitiver mit einem signifikant stärkerem Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel und des mitochondrialen Membranpotentials (Abb.: 3-49 A-C Seite 160). Auch wenn die beiden Untersuchungen nicht verglichen werden können, da in der vorliegenden Arbeit die mitochondriale Funktion und in der Publikation von Stamer *et al.* die Anzahl der Neuriten nach oxidativem Stress untersucht worden sind, so kann man doch folgern, dass eine Umverteilung der Mitochondrien in der Zelle von der Peripherie hin zum Nukleus mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress einhergeht.

4.3.2 Einfluss von $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsformen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen

Die Pathogenese der Alzheimer Demenz ist neben den neurofibrillären Bündeln durch eine Akkumulation von toxischen Amyloid-Spezies charakterisiert. Extrazelluläres, sezerniertes $A\beta$ 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 zusammenlagern, welche die Vorstufe der neuritischen Plaques darstellen (Finder *et al.*, 2007; Jarrett *et al.*, 1993). Nach der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ ist der Beginn sowie die Progression der Erkrankung eine Folge der vermehrten Produktion von $A\beta$ -Peptiden und ihrer progressiven Akkumulation in senilen Plaques (Selkoe, 1998). Allerdings beginnt die $A\beta$ -Oligomerisierung in Neuronen vermutlich schon intrazellulär (Walsh *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Anreicherung von $A\beta$ wurde bereits in transgenen Mäusen

und in humanen Gehirnen nachgewiesen (Oddo et al., 2003; Takahashi et al., 2002). Weiterhin wird dies in Zusammenhang mit synaptischer Dysfunktion, einem sehr 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 (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999).

Eine Vielzahl von Studien weisen zudem 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). Die Gruppe um Lewis *et al.* konnte in doppel-transgenen Mäusen (FDTP-17-Tau/FAD-APP), die Plaques und NFTs aufweisen, ein stärkeres Ausmaß an NFT-Bildung im Vergleich zu einzel-transgenen FTDP-17 Tau-Mäusen nachweisen. Zusätzlich wurden NFTs in Regionen beobachtet, die in einzel-transgenen Tieren nicht betroffen sind (Lewis et al., 2001). Ebenso konnte die Gruppe von Götz *et al.* durch die Injektion von fibrillärem A β eine erhöhte Tau-Aggregation zu NFTs in transgenen FDTP-17 Tau-Mäusen nachweisen (Götz et al., 2001). Auch eine 5-tägige Inkubation der in dieser Arbeit verwendeten SY5Y Zellen mit A β ₁₋₄₂ führte zur Ausbildung von neurofibrillären Bündeln in den hTau40- und TauP301L-Zellen (Ferrari et al., 2003). Allerdings konnten keine veränderten A β ₁₋₄₀-Spiegel in den Tau überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb.: 3-53 Seite 167). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine Ausdifferenzierung der Zellen schließlich zu einem Effekt auf die A β -Spiegel führen würde. Hierdurch würden sich vermutlich die Auswirkungen durch die Tau-Überexpression auf die Zellen verstärken, obwohl die Ausbildung von neurofibrillären Bündeln nach A β -Inkubation auch in undifferenzierten Zellen stattfand (Ferrari et al., 2003).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass APP und A β über den Proteinimportweg der TOM-Maschinerie in die Mitochondrien transportiert werden können und dort Dysfunktion auslösen (Anandatheerthavarada et al., 2003; Anandatheerthavarada et al., 2007; Hansson Petersen et al., 2008). Dies konnte nicht nur in Zellen nachgewiesen werden die mit A β inkubiert oder transfiziert wurden, sondern auch

im Gehirn von Alzheimer Patienten (Devi et al., 2006). Daher wurden die Auswirkungen von oligomerem und fibrillärem A β auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen untersucht. Obwohl A β zur Hemmung von Komplex IV an isolierten Mitochondrien führt und vermutlich dadurch eine Erniedrigung der *State 3* und *State 4*-Atmung bewirkt (Casley et al., 2002; Hauptmann et al., 2009) hat die Inkubation mit A β nur sehr geringe Effekte auf die ATP-Spiegel der SH-SY5Y Zellen (Abb.: 3-54 Seite 169). Zudem konnte kein konzentrationsabhängiger Effekt gemessen werden. Nach 3-stündiger Inkubationsdauer führten die Oligomere in den vct-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der ATP-Spiegel, wohingegen die Tau überexprimierenden Zellen keine Reaktion zeigten. Auch nach 24-stündiger Inkubation kam es nur in den hTau40-Zellen unabhängig vom Aggregationszustand des Abetas zu einer tendenziellen Erhöhung der ATP-Spiegel. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass entweder eine längere Inkubation mit oligomeren oder fibrillärem A β , die das Zusammenspiel von A β und Tau im Verlauf der Erkrankung besser nachstellen würde, nicht doch Auswirkungen auf die mitochondriale Atmungskette der SH-SY5Y Zellen gehabt hätte oder das ein Effekt an isolierten Mitochondrien detektierbar gewesen wäre. Ebenso führte die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials nicht zu eindeutigen Ergebnissen (Abb.: 3-56 Seite 174). Während fibrilläres A β ₁₋₄₂ nur in der höchsten Konzentration und erst nach 24 Stunden in den vct- und TauP301L-Zellen zu einer signifikanten Hyperpolarisation führt, haben die Oligomere bereits in niedrigeren Konzentrationen und auch nach kürzerer Inkubationsdauer Auswirkungen auf das MMP der SH-SY5Y Zellen, die allerdings Zelltyp-spezifisch sind. Während die vct-Zellen jeweils mit einer leichten Hyperpolarisation auf die Oligomere reagieren, führen diese bei den hTau40-Zellen zunächst zu einer Hyperpolarisation des MMPs, wohingegen eine längere Inkubationsdauer unabhängig von der verwendeten Konzentration zu einer leichten Depolarisation führt. Im Gegensatz dazu weisen die TauP301L-Zellen zunächst (nach 3 Stunden) und in der geringsten Konzentration auch nach 24 Stunden ein depolarisiertes MMP auf, wobei die längere Inkubationsdauer sonst nur in der höchsten Konzentration zu einer Hyperpolarisation führt. Damit konnten die Ergebnisse an kortikalen Neuronen von P301L-Mäusen nicht reproduziert werden, wo die Inkubation von oligomerem und

fibrillärem A β ₁₋₄₂ in analogen Konzentrationen zu einem Abfall des Membranpotentials führte (Eckert et al., 2008a). An dieser Stelle muss eben doch darauf verwiesen werden, dass Zellmodelle ihre Grenzen haben. Vielleicht hätten höhere Konzentrationen und eine längere Inkubationsdauer einen deutlicheren Effekt auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen gehabt, da die Fibrillenbildung von Tau auch erst nach 5 Tagen Inkubation mit 10 μ M A β ₁₋₄₂ beobachtet werden konnte (Ferrari et al., 2003). Einen deutlichen Effekt von oligomerem und fibrillärem A β konnte man allerdings anhand der metabolische Aktivität der SH-SY5Y Zellen beobachten (Abb.: 3-57 Seite 177). Es konnten zwar zwischen den einzelnen Zelltypen kaum Unterschiede detektiert werden, allerdings waren die Oligomere nach kürzerer Inkubationsdauer deutlich toxischer als die Fibrillen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Gruppe um Chafekar *et al.* Sie konnten eine Internalisierung von oligomerem A β bereits nach 15 Minuten detektieren, wohingegen sich fibrilläres A β selbst nach längerer Inkubationsdauer noch an der Außenseite der Zelle befand (Chafekar et al., 2008). Nach längerer Inkubationsdauer mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ war das Ausmaß der Abnahme der metabolischen Aktivität in den SH-SY5Y Zellen fast gleich, wobei die hTau40-Zellen etwas weniger sensitiv auf die A β ₁₋₄₂-Oligomere reagierten. Somit könnte ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus die Toxizität der verschiedenen Aggregationsformen von A β begründen. Allerdings ist bei der Interpretation der MTT-Daten Vorsicht geboten. Die Gruppe um Rönicke *et al.* konnte zeigen, dass primäre Neuronen und Astrozyten in Kultur zwar eine deutliche Abnahme der MTT-Reduktion nach Inkubation mit oligomerem und fibrillärem A β aufweisen, wobei dieses Ergebnis an hippokampalen *Slice*-Kulturen nicht reproduzierbar war (Rönicke et al., 2008). Da die anderen gemessenen Parameter in den SH-SY5Y Zellen auch nur geringe Veränderungen nach Behandlung der Zellen mit A β aufwiesen, ist die deutlich Abnahme der metabolischen Aktivität mit Vorsicht zu betrachten. Für einen Effekt durch die Inkubation mit A β spricht allerdings, dass die Oligomere schon in der geringsten Konzentration von 10 nM einen zytotoxischen Effekt vorwiegend auf die P301L-Zellen hatten (Abb.: 3-58 Seite 179). Dieser ist zwar aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant, aber doch eindeutig. Hierfür spricht auch, dass die Gruppe um Resende *et al.* vor allem nach Behandlung mit

oligomerem A β einen Ca²⁺-induzierten Zelltod in primären kortikalen Neuronen beobachten konnten (Resende et al., 2008).

Insgesamt hat die Behandlung mit oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ nur geringe Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen gezeigt. Trotzdem waren die Effekte durch Oligomere auffälliger im Gegensatz zu denen der Fibrillen. Dies steht zum Einen im Widerspruch mit den Ergebnissen an den TauP301L-Mäusen, bei denen kein Unterschied in den toxischen Effekten der verschiedenen Aggregationsformen festzustellen war (Eckert et al., 2008a) und zum Anderen im Gegensatz zur der vor einigen Jahren aufgestellten These von Oda *et al.*, dass nur oligomeres A β für die Neuronen- bzw. Synapsenschädigung bei AD verantwortlich ist (Oda et al., 1994; Oda et al., 1995). Von den vorliegenden Daten dieser Arbeit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* nicht doch ein Teufelskreislauf besteht, sodass sich die Toxizität von A β und Tau potenziert.

5. Zusammenfassung

Tauopathien sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen zu denen auch die Alzheimer Demenz zählt, die als gemeinsames pathologisches Merkmal die intrazelluläre Akkumulation von neurofibrillären Bündeln (NFTs) aufweisen. Diese bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein, das hierdurch seine physiologische Funktion, die Assemblierung von Mikrotubuli zu fördern und diese zu stabilisieren, verliert. Der genaue Mechanismus, der bei diesen Erkrankungen zur Neurodegeneration führt und mit Demenz, Parkinsonismus und motorischen Störungen einhergehen kann, ist bisher weitgehend ungeklärt. Da mitochondriale Dysfunktion bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines Zellmodells der Einfluss der Tau-Pathologie auf die mitochondriale Funktion untersucht.

Die grundlegende Charakterisierung deckte eine weitreichende Einflussnahme von Tau auf den Energiestoffwechsel der Zellen auf. Die Überexpression von Tau führt zu einer verminderten Expression der Komplexe I, II und IV sowie einer veränderten Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I-III. Zudem weist die verminderte Aktivität der Citrat-Synthase auf eine Beeinträchtigung des Citratzyklus hin. Der maßgebliche Unterschied zwischen den Tau überexprimierenden Zellen besteht in dem deutlich erniedrigtem Gehalt und der drastisch erniedrigten Aktivität von Komplex I in den TauP301L-Zellen, wohingegen die hTau40-Zellen trotz eines vermindertem Gehalts im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eine deutlich erhöhte Aktivität aufweisen. Diese gegensätzliche Aktivität von Komplex I führt zu weitreichenden Veränderungen der Zellphysiologie, was sich am deutlichsten in der daraus resultierenden metabolischen Aktivität, den ATP-Spiegeln und dem mitochondrialen Membranpotential zeigt. Diese Parameter sind in den hTau40-Zellen aufgrund der hohen Komplex I-Aktivität erhöht und entsprechend in den TauP301L-Zellen erniedrigt. Ebenso spiegeln sich diese funktionellen Parameter in der veränderten Morphologie, Dynamik sowie der Ultrastruktur der Mitochondrien wieder. Die Cristae-Struktur sowie die Dichte der Matrix lassen eindeutige Rückschlüsse auf die aus den unterschiedlichen Komplex I-Aktivitäten

resultierenden ATP-Spiegel zu. Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise, dass zum Einen die Transportrichtung der Mitochondrien von der Affinität der Motormoleküle von dem ATP-Gehalt der Mitochondrien abhängig zu sein scheint und zum Anderen, dass die Hemmung von Komplex I zu einem retrograden Transport und perinukleären Morphologie der Mitochondrien führt. Dies konnte ebenfalls in den TauP301L-Zellen gezeigt werden. Zusätzlich sind hier die mitochondriale Bewegung sowie die Dynamik (*Fusion* und *Fission*) verringert. Interessanterweise spiegeln viele der funktionellen und strukturellen Veränderungen der TauP301L-Zellen den Alterungsprozess wieder, da es im Alter zu einer erhöhten Rate an oxidativen mtDNA-Schäden, einer verminderten Aktivität von Komplex I sowie zu einer verringerten Effektivität und Kapazität der oxidativen Phosphorylierung kommt, die in niedrigeren ATP-Spiegeln resultiert. Anhaltspunkte aus der Literatur bringen auch die morphologischen und dynamischen Veränderungen der Mitochondrien mit dem Alterungsprozess in Verbindung, wodurch das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell anscheinend den Alterungsprozess widerspiegelt, der bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen den Hauptrisikofaktor für die Erkrankung darstellt.

Die Mutation P301L führt weiterhin dazu, dass die Zellen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber sekundären Insulten aufweisen. Obwohl die Toxizität der einzelnen Stimuli – seien es nun die Inhibitoren der einzelnen Atmungskettenkomplexe oder oxidativer sowie nitrosativer Stress – sich unterschiedlich auf die gemessenen physiologischen Parameter der Zellen auswirkte, so zeigt sich durchgängig ein stärkerer Abfall der metabolischen Aktivität und der ATP-Spiegel bei den TauP301L-Zellen. Zudem führte die Überexpression von hTau40 zu einer geringeren Vulnerabilität gegenüber den sekundären Insulten. Trotz der geringen Auswirkungen von oligomerem und fibrillärem A β ₁₋₄₂ auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* nicht doch ein Teufelskreislauf besteht, sodass sich die Toxizität von A β und Tau potenziert.

Insgesamt machen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass mitochondriale Dysfunktion auch bei Tauopathien eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt und sich hierdurch neue Aspekte zur therapeutischen Intervention ergeben.

6. Literaturverzeichnis

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schagger, H., Kerscher, S. und Brandt, U., **Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica***, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1658 (1-2) 148-156
- Aberg, F., Appelkvist, E. L., Dallner, G. und Ernster, L., **Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 295 (2) 230-234
- Aksenov, M. Y., Tucker, H. M., Nair, P., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Estus, S. und Markesbery, W. R., **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**, *Neurochem. Res.*, 1999, 24 (6) 767-774
- Aleardi, A. M., Benard, G., Augereau, O., Malgat, M., Talbot, J. C., Mazat, J. P., Letellier, T., Dachary-Prigent, J., Solaini, G. C. und Rossignol, R., **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.*, 2005, 37 (4) 207-225
- Alonso, A. C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. und Iqbal, K., **Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations**, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (33) 34873-34881
- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M. A. und Avadhani, N. G., **Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells**, *J. Cell Biol.*, 2003, 161 (1) 41-54
- Anandatheerthavarada, H. K. und Devi, L., **Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease**, *Neuroscientist.*, 2007, 13 (6) 626-638
- 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. und Young, I. G., **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**, *Nature*, 1981, 290 (5806) 457-465
- Aoyagi, H., Hasegawa, M. und Tamaoka, A., **Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau but not wild-type tau**, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282 (28) 20309-20318
- Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L., Lee, M. und Hart, G. W., **The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine**, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271 (46) 28741-28744
- Arriagada, P. V., Marzloff, K. und Hyman, B. T., **Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease**, *Neurology*, 1992, 42 (9) 1681-1688
- Askanas, V., McFerrin, J., Baque, S., Alvarez, R. B., Sarkozi, E. und Engel, W. K., **Transfer of beta-amyloid precursor protein gene using adenovirus vector causes mitochondrial abnormalities in cultured normal human muscle**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, 93 (3) 1314-1319

- Babbs, C. F. und Steiner, M. G., **Simulation of free radical reactions in biology and medicine: a new two-compartment kinetic model of intracellular lipid peroxidation**, *Free Radic. Biol. Med.*, 1990, 8 (5) 471-485
- Bai, R. K., Perng, C. L., Hsu, C. H. und Wong, L. J., **Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004a, 1011 304-309
- Bai, R. K., Perng, C. L., Hsu, C. H. und Wong, L. J., **Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004b, 1011 304-309
- Baloh, R. H., Schmidt, R. E., Pestronk, A. und Milbrandt, J., **Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations**, *J. Neurosci.*, 2007, 27 (2) 422-430
- Baloyannis, S. J., **Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease**, *J. Alzheimers. Dis.*, 2006, 9 (2) 119-126
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G. und Lenaz, G., **Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1606 (1-3) 137-146
- Barrientos, A. und Moraes, C. T., **Titration of the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology**, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (23) 16188-16197
- Bates, T. E., Loesch, A., Burnstock, G. und Clark, J. B., **Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 213 (3) 896-900
- Bates, T. E., Loesch, A., Burnstock, G. und Clark, J. B., **Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation?**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 218 (1) 40-44
- Baudier, J. und Cole, R. D., **Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids**, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262 (36) 17577-17583
- Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H. und Mandelkow, E., **Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5**, *FEBS Lett.*, 1993, 336 (3) 417-424
- Beckman, K. B. und Ames, B. N., **The free radical theory of aging matures**, *Physiol Rev.*, 1998, 78 (2) 547-581
- Ben-Yoseph, O., Boxer, P. A. und Ross, B. D., **Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress**, *J. Neurochem.*, 1996, 66 (6) 2329-2337
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. und Rossignol, R., **Mitochondrial bioenergetics and structural network organization**, *J. Cell Sci.*, 2007, 120 (Pt 5) 838-848
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M. C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J. M., Hirsch, E., Hantraye, P., Deglon, N. und Brouillet, E., **Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin**, *Mol. Biol. Cell*, 2006, 17 (4) 1652-1663
- Bereiter-Hahn J und Voeth M., **Metabolic control of shape and structure of mitochondria *in situ***, *Biol. Cell*, 1983, 47 309-322

- Bereiter-Hahn J. und Morawe G., **Stoffwechselabhängige mitochondriale Bewegung in epithelialen Kaulquappenherzzellen in Gewebekulturen**, *Cytobiology*, 1972, 6 447-467
- Bereiter-Hahn, J., Voth, M., Mai, S. und Jendrach, M., **Structural implications of mitochondrial dynamics**, *Biotechnol. J.*, 2008, 3 (6) 765-780
- Berman, D. E., Dall'Armi, C., Voronov, S. V., McIntire, L. B., Zhang, H., Moore, A. Z., Staniszewski, A., Arancio, O., Kim, T. W. und Di, P. G., **Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism**, *Nat. Neurosci.*, 2008a, 11 (5) 547-554
- Berman, S. B., Pineda, F. J. und Hardwick, J. M., **Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it**, *Cell Death. Differ.*, 2008b, 15 (7) 1147-1152
- Berridge, M. V., Herst, P. M. und Tan, A. S., **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction**, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, 11 127-152
- Berridge, M. V. und Tan, A. S., **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 303 (2) 474-482
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. und Greenamyre, J. T., **Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease**, *Nat. Neurosci.*, 2000, 3 (12) 1301-1306
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding**, *Neuron*, 1993, 11 (1) 153-163
- Billingsley, M. L. und Kincaid, R. L., **Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration**, *Biochem. J.*, 1997, 323 (Pt 3) 577-591
- Biskup, S., Moore, D. J., Celsi, F., Higashi, S., West, A. B., Andrabai, S. A., Kurkinen, K., Yu, S. W., Savitt, J. M., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., Emson, P. C., Torp, R., Ottersen, O. P., Dawson, T. M. und Dawson, V. L., **Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain**, *Ann. Neurol.*, 2006, 60 (5) 557-569
- Blalock, E. M., Geddes, J. W., Chen, K. C., Porter, N. M., Markesbery, W. R. und Landfield, P. W., **Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101 (7) 2173-2178
- Bolanos, J. P., Delgado-Esteban, M., Herrero-Mendez, A., Fernandez-Fernandez, S. und Almeida, A., **Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1777 (7-8) 789-793
- Bowling, A. C., Mutisya, E. M., Walker, L. C., Price, D. L., Cork, L. C. und Beal, M. F., **Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain**, *J. Neurochem.*, 1993, 60 (5) 1964-1967
- Boyer, P. D., **ATP synthase--past and future**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1365 (1-2) 3-9
- Braak, H. und Braak, E., **Neuropathological staging of Alzheimer-related changes**, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 1991, 82 (4) 239-259
- Bracco, L., Gallato, R., Grigoletto, F., Lippi, A., Lepore, V., Bino, G., Lazzaro, M. P., Carella, F., Piccolo, T., Pozzilli, C. und ., **Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study**, *Arch. Neurol.*, 1994, 51 (12) 1213-1219

- Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M., **Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding**, *Neuron*, 1993, 10 (6) 1089-1099
- Brandon, M. C., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Navathe, S. B., Baldi, P. und Wallace, D. C., **MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update**, *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 (Database issue) D611-D613
- Brandt, R., **The tau proteins in neuronal growth and development**, *Front Biosci.*, 1996, 1 d118-d130
- Brandt, R., Lee, G., Teplow, D. B., Shalloway, D. und Abdel-Ghany, M., **Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation**, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (16) 11776-11782
- Brandt, R., Leger, J. und Lee, G., **Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain**, *J. Cell Biol.*, 1995, 131 (5) 1327-1340
- Brandt, U., **Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)**, *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75 69-92
- Bredt, D. S., **Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology**, *Free Radic. Res.*, 1999, 31 (6) 577-596
- Brennan, J. P., Berry, R. G., Baghai, M., Duchen, M. R. und Shattock, M. J., **FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation**, *Cardiovasc. Res.*, 2006, 72 (2) 322-330
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z. J. und Dong, Z., **Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007a, 104 (28) 11649-11654
- Brooks, W. M., Lynch, P. J., Ingle, C. C., Hatton, A., Emson, P. C., Faull, R. L. und Starkey, M. P., **Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease**, *Brain Res.*, 2007b, 1127 (1) 127-135
- Brorson, J. R., Schumacker, P. T. und Zhang, H., **Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. The Committees on Neurobiology and Cell Physiology**, *J. Neurosci.*, 1999, 19 (1) 147-158
- Brown, G. C. und Cooper, C. E., **Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase**, *FEBS Lett.*, 1994a, 356 (2-3) 295-298
- Brown, G. C. und Cooper, C. E., **Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase**, *FEBS Lett.*, 1994b, 356 (2-3) 295-298
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P. und Gibson, G. E., **Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications**, *Ann. Neurol.*, 2005a, 57 (5) 695-703
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P. und Gibson, G. E., **Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications**, *Ann. Neurol.*, 2005b, 57 (5) 695-703
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. und Hof, P. R., **Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders**, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2000, 33 (1) 95-130

- Buee, S., V, Hof, P. R., Buee, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D. P., Olanow, C. W. und Delacourte, A., **Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease**, *Acta Neuropathol.*, 1996, 91 (4) 351-359
- Bunker, J. M., Kamath, K., Wilson, L., Jordan, M. A. und Feinstein, S. C., **FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells**, *J. Biol. Chem.*, 2006a, 281 (17) 11856-11863
- Bunker, J. M., Kamath, K., Wilson, L., Jordan, M. A. und Feinstein, S. C., **FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells**, *J. Biol. Chem.*, 2006b, 281 (17) 11856-11863
- Busch, K. B., Bereiter-Hahn, J., Wittig, I., Schagger, H. und Jendrach, M., **Mitochondrial dynamics generate equal distribution but patchwork localization of respiratory Complex I**, *Mol. Membr. Biol.*, 2006, 23 (6) 509-520
- Butner, K. A. und Kirschner, M. W., **Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites**, *J. Cell Biol.*, 1991, 115 (3) 717-730
- Byun, H. O., Kim, H. Y., Lim, J. J., Seo, Y. H. und Yoon, G., **Mitochondrial dysfunction by complex II inhibition delays overall cell cycle progression via reactive oxygen species production**, *J. Cell Biochem.*, 2008, 104 (5) 1747-1759
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I. und Stoppani, A. O., **Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 180 (2) 248-257
- Canevari, L., Clark, J. B. und Bates, T. E., **beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria**, *FEBS Lett.*, 1999, 457 (1) 131-134
- Capaldi, R. A., **Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 694 (3) 291-306
- Cardoso, S. M., Proenca, M. T., Santos, S., Santana, I. und Oliveira, C. R., **Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets**, *Neurobiol. Aging*, 2004, 25 (1) 105-110
- Cardoso, S. M., Santos, S., Swerdlow, R. H. und Oliveira, C. R., **Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity**, *FASEB J.*, 2001, 15 (8) 1439-1441
- Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B. und Sharpe, M. A., **Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities**, *J. Neurochem.*, 2002, 80 (1) 91-100
- Cecchini, G., **Function and structure of complex II of the respiratory chain**, *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72 77-109
- Chafekar, S. M., Baas, F. und Scheper, W., **Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1782 (9) 523-531
- Chagnon, P., Betard, C., Robitaille, Y., Cholette, A. und Gauvreau, D., **Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases**, *Neuroreport*, 1995, 6 (5) 711-715
- Chambers, C. B., Lee, J. M., Troncoso, J. C., Reich, S. und Muma, N. A., **Overexpression of four-repeat tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in Alzheimer's disease**, *Ann. Neurol.*, 1999, 46 (3) 325-332

- Chance, B., WILLIAMS, G. R. und HOLLUNGER, G., **Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. I. Effects of Amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol**, *J. Biol. Chem.*, 1963, 238 418-431
- Chandrasekaran, K., Hatanpaa, K., Rapoport, S. I. und Brady, D. R., **Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease**, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1997, 44 (1) 99-104
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. und Chan, D. C., **Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development**, *J. Cell Biol.*, 2003a, 160 (2) 189-200
- Chen, H., McCaffery, J. M. und Chan, D. C., **Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum**, *Cell*, 2007a, 130 (3) 548-562
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. und Hirokawa, N., **Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons**, *Nature*, 1992, 360 (6405) 674-677
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. und Lesnefsky, E. J., **Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III**, *J. Biol. Chem.*, 2003b, 278 (38) 36027-36031
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J. und Gibson, S. B., **Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species**, *J. Cell Sci.*, 2007b, 120 (Pt 23) 4155-4166
- Cheng, G., Polito, C. C., Haines, J. K., Shafizadeh, S. F., Fiorini, R. N., Zhou, X., Schmidt, M. G. und Chavin, K. D., **Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 308 (3) 573-580
- Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. und Frohman, M. A., **A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis**, *Nat. Cell Biol.*, 2006, 8 (11) 1255-1262
- Chomczynski, P. und Sacchi, N., **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**, *Anal. Biochem.*, 1987, 162 (1) 156-159
- Chou, C. F., Smith, A. J. und Omary, M. B., **Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18**, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267 (6) 3901-3906
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. und De, S. B., **Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling**, *Cell*, 2006, 126 (1) 163-175
- Clark, L. N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D. H., Nasreddine, Z. S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., Andreadis, A., D'Souza, I., Lee, V. M., Reed, L., Trojanowski, J. Q., Zhukareva, V., Bird, T., Schellenberg, G. und Wilhelmsen, K. C., **Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, 95 (22) 13103-13107
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. und Ashe, K. H., **Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function**, *Nat. Neurosci.*, 2005, 8 (1) 79-84
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. und Kirschner, M. W., **Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly**, *J. Mol. Biol.*, 1977, 116 (2) 227-247

- Comer, F. I. und Hart, G. W., **O-GlcNAc and the control of gene expression**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1473 (1) 161-171
- 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. und ., **Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease**, *Nat. Genet.*, 1994, 7 (2) 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. und Pericak-Vance, M. A., **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families**, *Science*, 1993, 261 (5123) 921-923
- Correas, I., Padilla, R. und Avila, J., **The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding**, *Biochem. J.*, 1990, 269 (1) 61-64
- Coskun, P. E., Beal, M. F. und Wallace, D. C., **Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101 (29) 10726-10731
- Cote, H. C., Brumme, Z. L., Craib, K. J., Alexander, C. S., Wynhoven, B., Ting, L., Wong, H., Harris, M., Harrigan, P. R., O'Shaughnessy, M. V. und Montaner, J. S., **Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients**, *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346 (11) 811-820
- Cottrell, D. A., Blakely, E. L., Johnson, M. A., Ince, P. G. und Turnbull, D. M., **Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD**, *Neurology*, 2001, 57 (2) 260-264
- Crouch, P. J., Blake, R., Duce, J. A., Ciccotosto, G. D., Li, Q. X., Barnham, K. J., Curtain, C. C., Cherny, R. A., Cappai, R., Dyrks, T., Masters, C. L. und Trounce, I. A., **Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42**, *J. Neurosci.*, 2005, 25 (3) 672-679
- Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. und Fletcher, J., **The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity**, *J. Immunol. Methods*, 1993, 160 (1) 81-88
- Cuddeback, S. M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S. und Wang, H. G., **Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax**, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (23) 20559-20565
- Cui, L., Jeong, H., Brovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N. und Krainc, D., **Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration**, *Cell*, 2006, 127 (1) 59-69
- Cunningham, C. C., Leclerc, N., Flanagan, L. A., Lu, M., Janmey, P. A. und Kosik, K. S., **Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line**, *J. Cell Biol.*, 1997, 136 (4) 845-857
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V. M., Bird, T. D. und Schellenberg, G. D., **Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96 (10) 5598-5603
- D'Souza, I. und Schellenberg, G. D., **Regulation of tau isoform expression and dementia**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1739 (2-3) 104-115

- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint, B. M. und Manfredi, G., **Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice**, *J. Neurochem.*, 2006, 96 (5) 1349-1361
- David, D. C., Hauptmann, S., Scherping, I., Schuessel, K., Keil, U., Rizzu, P., Ravid, R., Drose, S., Brandt, U., Muller, W. E., Eckert, A. und Gotz, J., **Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice**, *J. Biol. Chem.*, 2005a, 280 (25) 23802-23814
- David, D. C., Hauptmann, S., Scherping, I., Schuessel, K., Keil, U., Rizzu, P., Ravid, R., Drose, S., Brandt, U., Muller, W. E., Eckert, A. und Gotz, J., **Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice**, *J. Biol. Chem.*, 2005b, 280 (25) 23802-23814
- de Brito, O. M. und Scorrano, L., **Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion**, *Antioxid. Redox. Signal.*, 2008, 10 (3) 621-633
- De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J. und Sheetz, M. P., **Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission**, *Curr. Biol.*, 2005, 15 (7) 678-683
- Delacourte, A., Robitaille, Y., Sergeant, N., Buee, L., Hof, P. R., Wattez, A., Laroche-Chollette, A., Mathieu, J., Chagnon, P. und Gauvreau, D., **Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55 (2) 159-168
- Delacourte, A., Sergeant, N., Wattez, A., Gauvreau, D. und Robitaille, Y., **Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation**, *Ann. Neurol.*, 1998, 43 (2) 193-204
- Delettre, C., Griffoin, J. M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. und Hamel, C. P., **Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene**, *Hum. Genet.*, 2001, 109 (6) 584-591
- Delisle, M. B., Murrell, J. R., Richardson, R., Trofatter, J. A., Rascol, O., Soulages, X., Mohr, M., Calvas, P. und Ghetti, B., **A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy**, *Acta Neuropathol.*, 1999, 98 (1) 62-77
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R. C., Duriez, P. J. und Martin, S. J., **Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics**, *Mol. Cell*, 2006, 21 (6) 761-773
- Demongeot, J., Glade, N., Hansen, O. und Moreira, A., **An open issue: the inner mitochondrial membrane (IMM) as a free boundary problem**, *Biochimie*, 2007, 89 (9) 1049-1057
- Detmer, S. A. und Chan, D. C., **Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, 8 (11) 870-879
- Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G. und Anandatheerthavarada, H. K., **Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction**, *J. Neurosci.*, 2006, 26 (35) 9057-9068
- DiMauro, S. und Schon, E. A., **Mitochondrial respiratory-chain diseases**, *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348 (26) 2656-2668
- Ding, M. und Vandre, D. D., **High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine**, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271 (21) 12555-12561

- Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schagger, H. und Brandt, U., **Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica***, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1459 (1) 230-238
- Dohm, J. A., Lee, S. J., Hardwick, J. M., Hill, R. B. und Gittis, A. G., **Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold**, *Proteins*, 2004, 54 (1) 153-156
- Dong, D. L., Xu, Z. S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W. und Hart, G. W., **Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M**, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268 (22) 16679-16687
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M. und Mandelkow, E., **Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state**, *EMBO J.*, 1992, 11 (6) 2131-2138
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262**, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (13) 7679-7688
- Drubin, D. G. und Kirschner, M. W., **Tau protein function in living cells**, *J. Cell Biol.*, 1986, 103 (6 Pt 2) 2739-2746
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N. G., Neupert, W. und Reichert, A. S., **Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology**, *J. Biol. Chem.*, 2006, 281 (49) 37972-37979
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. und Mandelkow, E., **Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease**, *J. Cell Biol.*, 1998, 143 (3) 777-794
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Meinhardt, J., Rhein, V., Drose, S., Brandt, U., Fandrich, M., Muller, W. E. und Gotz, J., **Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (Abeta42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice**, *J. Mol. Med.*, 2008a, 86 (11) 1255-1267
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Rhein, V., Muller-Spahn, F., Gotz, J. und Muller, W. E., **Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice**, *Neurodegener. Dis.*, 2008b, 5 (3-4) 157-159
- Elston, T., Wang, H. und Oster, G., **Energy transduction in ATP synthase**, *Nature*, 1998, 391 (6666) 510-513
- Escobar-Khondiker, M., Hollerhage, M., Muriel, M. P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E. S., Lannuzel, A., Yagi, T., Hirsch, E. C., Oertel, W. H., Jacob, R., Michel, P. P., Ruberg, M. und Hoglinger, G. U., **Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons**, *J. Neurosci.*, 2007, 27 (29) 7827-7837
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. und Mihara, K., **Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function**, *J. Cell Sci.*, 2006, 119 (Pt 23) 4913-4925

- Farias, G. A., Munoz, J. P., Garrido, J. und Maccioni, R. B., **Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies**, *J. Cell Biochem.*, 2002, 85 (2) 315-324
- Feany, M. B. und Dickson, D. W., **Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration**, *Am. J. Pathol.*, 1995, 146 (6) 1388-1396
- Feany, M. B., Mattiace, L. A. und Dickson, D. W., **Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, Pick's disease and corticobasal degeneration**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55 (1) 53-67
- Fernandes, H. B., Baimbridge, K. G., Church, J., Hayden, M. R. und Raymond, L. A., **Mitochondrial sensitivity and altered calcium handling underlie enhanced NMDA-induced apoptosis in YAC128 model of Huntington's disease**, *J. Neurosci.*, 2007, 27 (50) 13614-13623
- Ferrari, A., Hoernkli, F., Baechli, T., Nitsch, R. M. und Gotz, J., **beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture**, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 (41) 40162-40168
- Finder, V. H. und Glockshuber, R., **Amyloid-beta aggregation**, *Neurodegener. Dis.*, 2007, 4 (1) 13-27
- Flament, S., Delacourte, A., Verny, M., Hauw, J. J. und Javoy-Agid, F., **Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type**, *Acta Neuropathol.*, 1991, 81 (6) 591-596
- Flanagan, L. A., Cunningham, C. C., Chen, J., Prestwich, G. D., Kosik, K. S. und Janmey, P. A., **The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP2 and their alteration by gelsolin and tau**, *Biophys. J.*, 1997, 73 (3) 1440-1447
- Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A. und Sudhof, T. C., **Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102 (9) 3413-3418
- Forsmark-Andree, P., Dallner, G. und Ernster, L., **Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles**, *Free Radic. Biol. Med.*, 1995, 19 (6) 749-757
- Forsmark-Andree, P., Lee, C. P., Dallner, G. und Ernster, L., **Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles**, *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, 22 (3) 391-400
- Frey, T. G. und Mannella, C. A., **The internal structure of mitochondria**, *Trends Biochem. Sci.*, 2000, 25 (7) 319-324
- Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution**, *Biochemistry*, 1998a, 37 (28) 10223-10230
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Davies, P. und Mandelkow, E., **A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998b, 95 (26) 15712-15717
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1502 (1) 122-132
- Friedrich, T. und Bottcher, B., **The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1608 (1) 1-9

- Fukui, H., Diaz, F., Garcia, S. und Moraes, C. T., **Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104 (35) 14163-14168
- Fukuyama, R., Hatanpaa, K., Rapoport, S. I. und Chandrasekaran, K., **Gene expression of ND4, a subunit of complex I of oxidative phosphorylation in mitochondria, is decreased in temporal cortex of brains of Alzheimer's disease patients**, *Brain Res.*, 1996, 713 (1-2) 290-293
- Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L. B., Matsudaira, P. und Yankner, B. A., **Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative**, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (18) 13623-13628
- Gandhi, S., Muqit, M. M., Stanyer, L., Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Hargreaves, I., Heales, S., Ganguly, M., Parsons, L., Lees, A. J., Latchman, D. S., Holton, J. L., Wood, N. W. und Revesz, T., **PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease**, *Brain*, 2006, 129 (Pt 7) 1720-1731
- Garcia, M. L. und Cleveland, D. W., **Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease**, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001, 13 (1) 41-48
- Gendron, T. F. und Petrucelli, L., **The role of tau in neurodegeneration**, *Mol. Neurodegener.*, 2009, 4 13-
- Gibson, G. E., Sheu, K. F., Blass, J. P., Baker, A., Carlson, K. C., Harding, B. und Perrino, P., **Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease**, *Arch. Neurol.*, 1988, 45 (8) 836-840
- Ginsberg, S. D., Crino, P. B., Lee, V. M., Eberwine, J. H. und Trojanowski, J. Q., **Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques**, *Ann. Neurol.*, 1997, 41 (2) 200-209
- Glenner, G. G. und Wong, C. W., **Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 120 (3) 885-890
- Goedert, M., **Neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other tauopathies**, *Prog. Brain Res.*, 1998, 117 287-306
- Goedert, M., Cohen, E. S., Jakes, R. und Cohen, P., **p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease [corrected]**, *FEBS Lett.*, 1992a, 312 (1) 95-99
- Goedert, M. und Jakes, R., **Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization**, *EMBO J.*, 1990, 9 (13) 4225-4230
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J. und Crowther, R. A., **Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans**, *Nature*, 1996, 383 (6600) 550-553
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J. und Crowther, R. A., **Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms**, *Neuron*, 1992b, 8 (1) 159-168
- Goedert, M., Spillantini, M. G. und Crowther, R. A., **Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992c, 89 (5) 1983-1987

- Goedert, M., Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Chen, S. G., Parchi, P., Tabaton, M., Lanska, D. J., Markesbery, W. R., Wilhelmsen, K. C., Dickson, D. W., Petersen, R. B. und Gambetti, P., **Tau gene mutation in familial progressive subcortical gliosis**, *Nat. Med.*, 1999, 5 (4) 454-457
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E. und Klug, A., **Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, 85 (11) 4051-4055
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J. und Nitsch, R. M., **Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils**, *Science*, 2001, 293 (5534) 1491-1495
- Grant, S. M., Shankar, S. L., Chalmers-Redman, R. M., Tatton, W. G., Szyf, M. und Cuello, A. C., **Mitochondrial abnormalities in neuroectodermal cells stably expressing human amyloid precursor protein (hAPP751)**, *Neuroreport*, 1999, 10 (1) 41-46
- Greco, M., Villani, G., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Papa, S. und Attardi, G., **Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts**, *FASEB J.*, 2003, 17 (12) 1706-1708
- Greenberg, S. G. und Davies, P., **A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990, 87 (15) 5827-5831
- Griffiths, E. J. und Halestrap, A. P., **Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion**, *Biochem. J.*, 1995, 307 (Pt 1) 93-98
- Griparic, L., Kanazawa, T. und van der Blik, A. M., **Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage**, *J. Cell Biol.*, 2007, 178 (5) 757-764
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. und van der Blik, A. M., **Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria**, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (18) 18792-18798
- Grover, A., Houlden, H., Baker, M., Adamson, J., Lewis, J., Prihar, G., Pickering-Brown, S., Duff, K. und Hutton, M., **5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10**, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (21) 15134-15143
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. und Aebersold, R., **Correlation between protein and mRNA abundance in yeast**, *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19 (3) 1720-1730
- Hackenbrock, C. R., **Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria**, *J. Cell Biol.*, 1966, 30 (2) 269-297
- Hackenbrock, C. R., **Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1968, 61 (2) 598-605
- Hajek, P., Chomyn, A. und Attardi, G., **Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2**, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282 (8) 5670-5681
- Hales, K. G. und Fuller, M. T., **Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase**, *Cell*, 1997, 90 (1) 121-129
- Hamblet, N. S., Ragland, B., Ali, M., Conyers, B. und Castora, F. J., **Mutations in mitochondrial-encoded cytochrome c oxidase subunits I, II, and III genes detected in Alzheimer's disease using single-strand conformation polymorphism**, *Electrophoresis*, 2006, 27 (2) 398-408

- Hanger, D. P., Betts, J. C., Loviny, T. L., Blackstock, W. P. und Anderton, B. H., **New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry**, *J. Neurochem.*, 1998, 71 (6) 2465-2476
- Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E. und Ankarcróna, M., **The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, 105 (35) 13145-13150
- Hardy, J. und Selkoe, D. J., **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics**, *Science*, 2002, 297 (5580) 353-356
- Hardy, J. A. und Higgins, G. A., **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis**, *Science*, 1992, 256 (5054) 184-185
- Harman, D., **Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, 1067 454-460
- Hasegawa, M., Smith, M. J. und Goedert, M., **Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly**, *FEBS Lett.*, 1998, 437 (3) 207-210
- Hatefi, Y., **The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system**, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, 54 1015-1069
- Hauptmann, S., Scherping, I., Drose, S., Brandt, U., Schulz, K. L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A. und Müller, W. E., **Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice**, *Neurobiol. Aging*, 2009, 30 (10) 1574-1586
- Hauw, J. J., Daniel, S. E., Dickson, D., Horoupian, D. S., Jellinger, K., Lantos, P. L., McKee, A., Tabaton, M. und Litvan, I., **Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy)**, *Neurology*, 1994, 44 (11) 2015-2019
- Hauw, J. J., Verny, M., Delaere, P., Cervera, P., He, Y. und Duyckaerts, C., **Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging**, *Neurosci. Lett.*, 1990, 119 (2) 182-186
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A. und Flaherty, D. M., **Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123**, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27 (1-2) 146-159
- Herholz, K., **PET studies in dementia**, *Ann. Nucl. Med.*, 2003, 17 (2) 79-89
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. und Reichert, A. S., **Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA**, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 (30) 27781-27788
- Hinchliffe, P. und Sazanov, L. A., **Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I**, *Science*, 2005, 309 (5735) 771-774
- 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. und Smith, M. A., **Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease**, *J. Neurosci.*, 2001, 21 (9) 3017-3023
- Hirokawa, N., Shiomura, Y. und Okabe, S., **Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules**, *J. Cell Biol.*, 1988, 107 (4) 1449-1459

- Hoglinger, G. U., Lannuzel, A., Khondiker, M. E., Michel, P. P., Duyckaerts, C., Feger, J., Champy, P., Prigent, A., Medja, F., Lombes, A., Oertel, W. H., Ruberg, M. und Hirsch, E. C., **The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy**, *J. Neurochem.*, 2005, 95 (4) 930-939
- Holmsen, H. und Robkin, L., **Effects of antimycin A and 2-deoxyglucose on energy metabolism in washed human platelets**, *Thromb. Haemost.*, 1980, 42 (5) 1460-1472
- Honda, S. und Hirose, S., **Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion and fission factors during spermatogenesis in rat testis**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 311 (2) 424-432
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen, K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M., **Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17**, *Science*, 1998a, 282 (5395) 1914-1917
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen, K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M., **Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17**, *Science*, 1998b, 282 (5395) 1914-1917
- Hoppins, S., Lackner, L. und Nunnari, J., **The machines that divide and fuse mitochondria**, *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, 76 751-780
- HUIJING, F. und Slater, E. C., **The use of oligomycin as an inhibitor of oxidative phosphorylation**, *J. Biochem.*, 1961, 49 493-501
- Hunt, A., Schonknecht, P., Henze, M., Seidl, U., Haberkorn, U. und Schroder, J., **Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease**, *Psychiatry Res.*, 2007, 155 (2) 147-154
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Heutink, P. und ., **Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17**, *Nature*, 1998, 393 (6686) 702-705
- Hyslop, P. A., Zhang, Z., Pearson, D. V. und Phebus, L. A., **Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro**, *Brain Res.*, 1995, 671 (2) 181-186
- Irizarry, M. C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K. J., Schenk, D., Games, D. und Hyman, B. T., **Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse**, *J. Neurosci.*, 1997, 17 (18) 7053-7059
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. und Mihara, K., **Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1**, *EMBO J.*, 2006, 25 (13) 2966-2977
- Iwatsubo, T., Hasegawa, M. und Ihara, Y., **Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics**, *Acta Neuropathol.*, 1994, 88 (2) 129-136
- Jacobs, H. T., **The mitochondrial theory of aging: dead or alive?**, *Aging Cell*, 2003, 2 (1) 11-17

- Jameson, L., Frey, T., Zeeberg, B., Dalldorf, F. und Caplow, M., **Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins**, *Biochemistry*, 1980, 19 (11) 2472-2479
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. und Lansbury, P. T., Jr., **The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease**, *Biochemistry*, 1993, 32 (18) 4693-4697
- Jendrach, M., Pohl, S., Voth, M., Kowald, A., Hammerstein, P. und Bereiter-Hahn, J., **Morphodynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells**, *Mech. Ageing Dev.*, 2005, 126 (6-7) 813-821
- Jenkins, S. M. und Johnson, G. V., **Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ**, *Neuroreport*, 1998, 9 (1) 67-71
- Kahlert, S., Zundorf, G. und Reiser, G., **Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123**, *J. Neurosci. Methods*, 2008, 171 (1) 87-92
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments**, *FEBS Lett.*, 1996, 399 (3) 344-349
- Kanai, A. J., Pearce, L. L., Clemens, P. R., Birder, L. A., VanBibber, M. M., Choi, S. Y., de Groat, W. C. und Peterson, J., **Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98 (24) 14126-14131
- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. und Youle, R. J., **Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis**, *J. Cell Biol.*, 2004, 164 (4) 493-499
- Katayama, M., Zhong, Z., Lai, L., Sutovsky, P., Prather, R. S. und Schatten, H., **Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: implications for developmental potential**, *Dev. Biol.*, 2006, 299 (1) 206-220
- Kato, T., **The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder**, *Drug News Perspect.*, 2006, 19 (10) 597-602
- Katzman, R., **Alzheimer's disease**, *N. Engl. J. Med.*, 1986, 314 (15) 964-973
- Katzman, R. und Saitoh, T., **Advances in Alzheimer's disease**, *FASEB J.*, 1991, 5 (3) 278-286
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J. B., Muller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Muller, W. E. und Eckert, A., **Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis**, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (48) 50310-50320
- Kim, S. H., Vlkolinsky, R., Cairns, N. und Lubec, G., **Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome**, *Cell Mol. Life Sci.*, 2000, 57 (12) 1810-1816
- Kish, S. J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiacomo, F., Chang, L. J., Wilson, J. M., DiStefano, L. M. und Nobrega, J. N., **Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease**, *J. Neurochem.*, 1992, 59 (2) 776-779

- Kish, S. J., Mastrogiacomo, F., Guttman, M., Furukawa, Y., Taanman, J. W., Dozic, S., Pandolfo, M., Lamarche, J., DiStefano, L. und Chang, L. J., **Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change?**, *J. Neurochem.*, 1999, 72 (2) 700-707
- Kletzien, R. F., Harris, P. K. und Foellmi, L. A., **Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress**, *FASEB J.*, 1994, 8 (2) 174-181
- Knott, A. B. und Bossy-Wetzel, E., **Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, 1147 283-292
- Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K. und Uchida, T., **A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule**, *FEBS Lett.*, 1993, 335 (2) 171-175
- Kojima, H., Hirotani, M., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., Hirata, Y. und Nagano, T., **Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore**, *Anal. Chem.*, 2001, 73 (9) 1967-1973
- Komori, T., **Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease**, *Brain Pathol.*, 1999, 9 (4) 663-679
- Komori, T., Arai, N., Oda, M., Nakayama, H., Mori, H., Yagishita, S., Takahashi, T., Amano, N., Murayama, S., Murakami, S., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S. und Iwata, M., **Astrocytic plaques and tufts of abnormal fibers do not coexist in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy**, *Acta Neuropathol.*, 1998, 96 (4) 401-408
- Korlipara, L. V., Cooper, J. M. und Schapira, A. H., **Differences in toxicity of the catechol-O-methyl transferase inhibitors, tolcapone and entacapone to cultured human neuroblastoma cells**, *Neuropharmacology*, 2004, 46 (4) 562-569
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. und Starkov, A. A., **High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria**, *FEBS Lett.*, 1997, 416 (1) 15-18
- Koshiha, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. und Chan, D. C., **Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes**, *Science*, 2004, 305 (5685) 858-862
- Krahenbuhl, S., Chang, M., Brass, E. P. und Hoppel, C. L., **Decreased activities of ubiquinol:ferricytochrome c oxidoreductase (complex III) and ferrocycytochrome c: oxygen oxidoreductase (complex IV) in liver mitochondria from rats with hydroxycobalamin[γ -lactam]-induced methylmalonic aciduria**, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266 (31) 20998-21003
- Ksiezak-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L. A., Davies, P., Liu, W. K., Yen, S. H., Weidenheim, K. und Dickson, D. W., **Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration**, *Am. J. Pathol.*, 1994, 145 (6) 1496-1508
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. und Klein, W. L., **Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, 95 (11) 6448-6453
- Ledesma, M. D., Medina, M. und Avila, J., **The in vitro formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation**, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1996, 27 (3) 249-258
- Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H. und Panchamoorthy, G., **Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases**, *J. Cell Sci.*, 1998, 111 (Pt 21) 3167-3177

- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van, H. G. und Ksiezak-Reding, H., **Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease**, *J. Neurosci.*, 2004a, 24 (9) 2304-2312
- Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., Jr. und Trojanowski, J. Q., **A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau**, *Science*, 1991, 251 (4994) 675-678
- Lee, V. M., Goedert, M. und Trojanowski, J. Q., **Neurodegenerative tauopathies**, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001a, 24 1121-1159
- Lee, V. M. und Trojanowski, J. Q., **Transgenic mouse models of tauopathies: prospects for animal models of Pick's disease**, *Neurology*, 2001b, 56 (11 Suppl 4) S26-S30
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. und Youle, R. J., **Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis**, *Mol. Biol. Cell*, 2004b, 15 (11) 5001-5011
- Lenaz, G., D'Aurelio, M., Merlo, P. M., Genova, M. L., Ventura, B., Bovina, C., Formiggini, G. und Parenti, C. G., **Mitochondrial bioenergetics in aging**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1459 (2-3) 397-404
- Leonard, J. V. und Schapira, A. H., **Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects**, *Lancet*, 2000, 355 (9200) 299-304
- Letellier, T., Durrieu, G., Malgat, M., Rossignol, R., Antoch, J., Deshouillers, J. M., Coquet, M., Lacombe, D., Netter, J. C., Pedespan, J. M., Redonnet-Vernhet, I. und Mazat, J. P., **Statistical analysis of mitochondrial pathologies in childhood: identification of deficiencies using principal component analysis**, *Lab Invest*, 2000, 80 (7) 1019-1030
- 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. und McGowan, E., **Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP**, *Science*, 2001, 293 (5534) 1487-1491
- Li, W. W., Yang, R., Guo, J. C., Ren, H. M., Zha, X. L., Cheng, J. S. und Cai, D. F., **Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice**, *Neuroreport*, 2007, 18 (15) 1543-1546
- Liao, H., Li, Y., Brautigan, D. L. und Gundersen, G. G., **Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau**, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 (34) 21901-21908
- Lin, M. T. und Beal, M. F., **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases**, *Nature*, 2006, 443 (7113) 787-795
- Lin, M. T., Simon, D. K., Ahn, C. H., Kim, L. M. und Beal, M. F., **High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain**, *Hum. Mol. Genet.*, 2002, 11 (2) 133-145
- Lin, W. L., Lewis, J., Yen, S. H., Hutton, M. und Dickson, D. W., **Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau**, *J. Neurocytol.*, 2003, 32 (9) 1091-1105
- Lindwall, G. und Cole, R. D., **Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly**, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259 (8) 5301-5305
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T. und Tanaka, M., **Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases**, *Lancet*, 1989, 1 (8639) 642-645

- Lippa, C. F., Zhukareva, V., Kawarai, T., Uryu, K., Shafiq, M., Nee, L. E., Grafman, J., Liang, Y., St George-Hyslop, P. H., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M., **Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation**, *Ann. Neurol.*, 2000, 48 (6) 850-858
- Littauer, U. Z., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. und Ponstingl, H., **Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986, 83 (19) 7162-7166
- Litvan, I., Campbell, G., Mangone, C. A., Verny, M., McKee, A., Chaudhuri, K. R., Jellinger, K., Pearce, R. K. und D'Olhaberriague, L., **Which clinical features differentiate progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) from related disorders? A clinicopathological study**, *Brain*, 1997, 120 (Pt 1) 65-74
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Vande, V. C., Ward, C. M., Miller, T. M., Subramaniam, J. R., Rothstein, J. D., Marklund, S., Andersen, P. M., Brannstrom, T., Gredal, O., Wong, P. C., Williams, D. S. und Cleveland, D. W., **Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria**, *Neuron*, 2004, 43 (1) 5-17
- Lloreta-Trull, J. und Serrano, S., **Biology and pathology of the mitochondrion**, *Ultrastruct. Pathol.*, 1998, 22 (5) 357-367
- Logan, D. C., **The mitochondrial compartment**, *J. Exp. Bot.*, 2007, 58 (1) 1225-1243
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M. und Markesbery, W. R., **Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease**, *Neurology*, 1995, 45 (8) 1594-1601
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. und RANDALL, R. J., **Protein measurement with the Folin phenol reagent**, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193 (1) 265-275
- Ludolph, A. C., Kassubek, J., Landwehrmeyer, B. G., Mandelkow, E., Mandelkow, E. M., Burn, D. J., Caparros-Lefebvre, D., Frey, K. A., de Yébenes, J. G., Gasser, T., Heutink, P., Hoglinger, G., Jamrozik, Z., Jellinger, K. A., Kazantsev, A., Kretschmar, H., Lang, A. E., Litvan, I., Lucas, J. J., McGeer, P. L., Melquist, S., Oertel, W., Otto, M., Paviour, D., Reum, T., Saint-Raymond, A., Steele, J. C., Tolnay, M., Tumani, H., van Swieten, J. C., Vanier, M. T., Vonsattel, J. P., Wagner, S. und Wszolek, Z. K., **Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options**, *Eur. J. Neurol.*, 2009, 16 (3) 297-309
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E. und Rogers, J., **Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease**, *Am. J. Pathol.*, 1999, 155 (3) 853-862
- Luthi, T., Haltiwanger, R. S., Greengard, P. und Bahler, M., **Synapsins contain O-linked N-acetylglucosamine**, *J. Neurochem.*, 1991, 56 (5) 1493-1498
- Maas, T., Eidenmuller, J. und Brandt, R., **Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments**, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 (21) 15733-15740
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L. A. und Spillantini, M. G., **Interaction of tau protein with the dynactin complex**, *EMBO J.*, 2007, 26 (21) 4546-4554
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J. und Reddy, P. H., **Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression**, *Hum. Mol. Genet.*, 2006, 15 (9) 1437-1449

- Manczak, M., Park, B. S., Jung, Y. und Reddy, P. H., **Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage**, *Neuromolecular. Med.*, 2004, 5 (2) 147-162
- Mandell, J. W. und Banker, G. A., **A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons**, *J. Neurosci.*, 1996, 16 (18) 5727-5740
- Maneiro, E., Lopez-Armada, M. J., de Andres, M. C., Carames, B., Martin, M. A., Bonilla, A., Del, H. P., Galdo, F., Arenas, J. und Blanco, F. J., **Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes**, *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 64 (3) 388-395
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Schapira, A. H. und Marsden, C. D., **Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease**, *Brain*, 1992, 115 (Pt 2) 333-342
- Mastrogiacoma, F., Lindsay, J. G., Bettendorff, L., Rice, J. und Kish, S. J., **Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease**, *Ann. Neurol.*, 1996, 39 (5) 592-598
- Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. und Hatefi, Y., **Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation: effects of specific F0 modifiers on ligand-induced conformation changes of F1**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985, 82 (22) 7550-7554
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F. und Manfredi, G., **Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice**, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (33) 29626-29633
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Begley, J. G. und Mark, R. J., **Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture**, *Methods Cell Biol.*, 1995, 46 187-216
- Maurer, I., Zierz, S. und Moller, H. J., **A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients**, *Neurobiol. Aging*, 2000, 21 (3) 455-462
- Mawal-Dewan, M., Henley, J., Van, d., V, Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M., **The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases**, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (49) 30981-30987
- McBride, H. M., Neuspiel, M. und Wasiaik, S., **Mitochondria: more than just a powerhouse**, *Curr. Biol.*, 2006, 16 (14) R551-R560
- McGonigal, G., McQuade, C. A., Thomas, B. M. und Whalley, L. J., **Survival in presenile Alzheimer's and multi-infarct dementias**, *Neuroepidemiology*, 1992, 11 (3) 121-126
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I. und Masters, C. L., **Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease**, *Ann. Neurol.*, 1999, 46 (6) 860-866
- McQuibban, G. A., Saurya, S. und Freeman, M., **Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease**, *Nature*, 2003, 423 (6939) 537-541
- Meeusen, S., Devay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M. und Nunnari, J., **Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1**, *Cell*, 2006, 127 (2) 383-395
- Meeusen, S., McCaffery, J. M. und Nunnari, J., **Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro**, *Science*, 2004, 305 (5691) 1747-1752
- Meissner, C., **Mutations of mitochondrial**, *Z. Gerontol. Geriatr.*, 2007, 40 (5) 325-333

- Merriwether, D. A., Clark, A. G., Ballinger, S. W., Schurr, T. G., Soodyall, H., Jenkins, T., Sherry, S. T. und Wallace, D. C., **The structure of human mitochondrial DNA variation**, *J. Mol. Evol.*, 1991, 33 (6) 543-555
- Migheli, A., Butler, M., Brown, K. und Shelanski, M. L., **Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain**, *J. Neurosci.*, 1988, 8 (6) 1846-1851
- Milakovic, T. und Johnson, G. V., **Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin**, *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (35) 30773-30782
- Miquel, J., Economos, A. C., Fleming, J. und Johnson, J. E., Jr., **Mitochondrial role in cell aging**, *Exp. Gerontol.*, 1980, 15 (6) 575-591
- Miret, S., De Groene, E. M. und Klaffke, W., **Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2**, *J. Biomol. Screen.*, 2006, 11 (2) 184-193
- Miyasaka, T., Morishima-Kawashima, M., Ravid, R., Kamphorst, W., Nagashima, K. und Ihara, Y., **Selective deposition of mutant tau in the FTDP-17 brain affected by the P301L mutation**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001, 60 (9) 872-884
- Miyata, Y., Hoshi, M., Nishida, E., Minami, Y. und Sakai, H., **Binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70-kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin**, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261 (28) 13026-13030
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T. und Kagawa, Y., **Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163 (3) 1450-1455
- Mori, H., Nishimura, M., Namba, Y. und Oda, M., **Corticobasal degeneration: a disease with widespread appearance of abnormal tau and neurofibrillary tangles, and its relation to progressive supranuclear palsy**, *Acta Neuropathol.*, 1994, 88 (2) 113-121
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K. und Ihara, Y., **Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau**, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (2) 823-829
- Morishima-Kawashima, M. und Ihara, Y., **Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau**, *J. Neurosci. Res.*, 2002, 70 (3) 392-401
- Morishima-Kawashima, M. und Kosik, K. S., **The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active**, *Mol. Biol. Cell*, 1996, 7 (6) 893-905
- Mouatt-Prigent, A., Muriel, M. P., Gu, W. J., El Hachimi, K. H., Lucking, C. B., Brice, A. und Hirsch, E. C., **Ultrastructural localization of parkin in the rat brainstem, thalamus and basal ganglia**, *J. Neural Transm.*, 2004, 111 (10-11) 1209-1218
- Muller-Hocker, J., Schneiderbanger, K., Stefani, F. H. und Kadenbach, B., **Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing—a cytochemical-immunohistochemical study**, *Mutat. Res.*, 1992, 275 (3-6) 115-124
- Munn, E. A., **Topography of mitochondrial membranes in relation to metabolism**, *Biochem. J.*, 1970, 116 (4) 1P-2P
- Munoz-Garcia, D. und Ludwin, S. K., **Classic and generalized variants of Pick's disease: a clinicopathological, ultrastructural, and immunocytochemical comparative study**, *Ann. Neurol.*, 1984, 16 (4) 467-480

- Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y. und Tomonaga, M., **Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease**, *Ann. Neurol.*, 1990, 27 (4) 394-405
- Murrell, J. R., Spillantini, M. G., Zolo, P., Guazzelli, M., Smith, M. J., Hasegawa, M., Redi, F., Crowther, R. A., Pietrini, P., Ghetti, B. und Goedert, M., **Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999, 58 (12) 1207-1226
- Navarro, A., **Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging**, *Mol. Aspects Med.*, 2004, 25 (1-2) 37-48
- Neve, R. L. und Robakis, N. K., **Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis**, *Trends Neurosci.*, 1998, 21 (1) 15-19
- Nunomura, A., Moreira, P. I., Lee, H. G., Zhu, X., Castellani, R. J., Smith, M. A. und Perry, G., **Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases**, *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.*, 2007, 6 (6) 411-423
- 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. und Smith, M. A., **Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001, 60 (8) 759-767
- Oda, T., Pasinetti, G. M., Osterburg, H. H., Anderson, C., Johnson, S. A. und Finch, C. E., **Purification and characterization of brain clusterin**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 204 (3) 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. und ., **Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress**, *Exp. Neurol.*, 1995, 136 (1) 22-31
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. und LaFerla, F. M., **Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction**, *Neuron*, 2003, 39 (3) 409-421
- Ohnishi, T., **Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1364 (2) 186-206
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G. und Belenguer, P., **The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space**, *FEBS Lett.*, 2002, 523 (1-3) 171-176
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J. I., **Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria**, *Nat. Genet.*, 2001, 28 (3) 272-275
- Oshino, N. und Chance, B., **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.*, 1977, 162 (3) 509-525
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W. und Shaw, J. M., **The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast**, *J. Cell Biol.*, 1998, 143 (2) 333-349

- PALADE, G. E., **An electron microscope study of the mitochondrial structure**, *J. Histochem. Cytochem.*, 1953, 1 (4) 188-211
- Panda, D., Goode, B. L., Feinstein, S. C. und Wilson, L., **Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau**, *Biochemistry*, 1995, 34 (35) 11117-11127
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T. und Greenamyre, J. T., **Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication**, *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (51) 42026-42035
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. und Greenamyre, J. T., **Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines**, *Nat. Neurosci.*, 2002, 5 (8) 731-736
- Park, L. C., Zhang, H., Sheu, K. F., Calingasan, N. Y., Kristal, B. S., Lindsay, J. G. und Gibson, G. E., **Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia**, *J. Neurochem.*, 1999, 72 (5) 1948-1958
- Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J., Luder, A. S. und Parks, J. K., **Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease**, *Neurology*, 1990, 40 (8) 1231-1234
- Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Trotti, D. und Brown, R. H., Jr., **Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria**, *Neuron*, 2004, 43 (1) 19-30
- Patterson, G. H. und Lippincott-Schwartz, J., **A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells**, *Science*, 2002, 297 (5588) 1873-1877
- Pauwels, P. J., Opperdoes, F. R. und Trouet, A., **Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells**, *J. Neurochem.*, 1985, 44 (1) 143-148
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M. E. und Palau, F., **GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria**, *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14 (8) 1087-1094
- Perez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo, d. G. und Avila, J., **Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction**, *J. Neurochem.*, 1996, 67 (3) 1183-1190
- Perry, G., Siedlak, S. L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R. N., Galloway, P. G., Scardina, J. M., Cordell, B., Greenberg, B. D. und ., **Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease**, *J. Neurosci.*, 1991, 11 (11) 3679-3683
- Pick, A., **Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie**, *Prager Medizinische Wochenschrift*, 1892, 17 165-167
- Pierrat, B., Simonen, M., Cueto, M., Mestan, J., Ferrigno, P. und Heim, J., **SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain**, *Genomics*, 2001, 71 (2) 222-234
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. und Cotman, C. W., **Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures**, *Eur. J. Pharmacol.*, 1991, 207 (4) 367-368
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. und Gauthier, S., **Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease**, *Lancet*, 1993, 342 (8873) 697-699

- Pollock, N. J., Mirra, S. S., Binder, L. I., Hansen, L. A. und Wood, J. G., **Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau**, *Lancet*, 1986, 2 (8517) 1211-
- Porteous, W. K., James, A. M., Sheard, P. W., Porteous, C. M., Packer, M. A., Hyslop, S. J., Melton, J. V., Pang, C. Y., Wei, Y. H. und Murphy, M. P., **Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion**, *Eur. J. Biochem.*, 1998, 257 (1) 192-201
- Probst, A., Tolnay, M., Langui, D., Goedert, M. und Spillantini, M. G., **Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment**, *Acta Neuropathol.*, 1996, 92 (6) 588-596
- Radi, R., Cassina, A. und Hodara, R., **Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria**, *Biol. Chem.*, 2002, 383 (3-4) 401-409
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. und Ferreira, A., **Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99 (9) 6364-6369
- Rasmussen, U. F. und Rasmussen, H. N., **Human quadriceps muscle mitochondria: a functional characterization**, *Mol. Cell Biochem.*, 2000, 208 (1-2) 37-44
- Rebeiz, J. J., Kolodny, E. H. und Richardson, E. P., Jr., **Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia**, *Arch. Neurol.*, 1968, 18 (1) 20-33
- Rego, A. C., Monteiro, N. M., Silva, A. P., Gil, J., Malva, J. O. und Oliveira, C. R., **Mitochondrial apoptotic cell death and moderate superoxide generation upon selective activation of non-desensitizing AMPA receptors in hippocampal cultures**, *J. Neurochem.*, 2003, 86 (4) 792-804
- Resende, R., Ferreira, E., Pereira, C. und Resende de, O. C., **Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death**, *Neuroscience*, 2008, 155 (3) 725-737
- REVEL, J. P., FAWCETT, D. W. und PHILPOTT, C. W., **Observations on mitochondrial structure angular configurations of the cristae**, *J. Cell Biol.*, 1963, 16 187-195
- Richter, C., Park, J. W. und Ames, B. N., **Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, 85 (17) 6465-6467
- Rinne, J. O., Lee, M. S., Thompson, P. D. und Marsden, C. D., **Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases**, *Brain*, 1994, 117 (Pt 5) 1183-1196
- Rizzini, C., Goedert, M., Hodges, J. R., Smith, M. J., Jakes, R., Hills, R., Xuereb, J. H., Crowther, R. A. und Spillantini, M. G., **Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2000, 59 (11) 990-1001
- Robinson, N. C., **Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase**, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1993, 25 (2) 153-163
- Rocca, W. A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M. M., Clarke, M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T. J. und ., **Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group**, *Ann. Neurol.*, 1991, 30 (3) 381-390
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. und Lombes, A., **Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo**, *J. Cell Sci.*, 2002, 115 (Pt 8) 1663-1674

- Rönicke, R., Klemm, A., Meinhardt, J., Schroder, U. H., Fandrich, M. und Reymann, K. G., **Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture?**, *PLoS. ONE.*, 2008, 3 (9) e3236-
- Rothe, G. und Valet, G., **Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin**, *J. Leukoc. Biol.*, 1990, 47 (5) 440-448
- Roy, S., Datta, C. K., Hirano, A., Ghatak, N. R. und Zimmerman, H. M., **Electron microscopic study of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome**, *Acta Neuropathol.*, 1974, 29 (2) 175-179
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. und Trojanowski, J. Q., **Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases**, *Acta Neuropathol.*, 2005, 109 (1) 5-13
- Royall, J. A. und Ischiropoulos, H., **Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 302 (2) 348-355
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. und Cossarizza, A., **JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis**, *FEBS Lett.*, 1997, 411 (1) 77-82
- Santos, J. H., Mandavilli, B. S. und Van, H. B., **Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR**, *Methods Mol. Biol.*, 2002, 197 159-176
- 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. und ., **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease**, *Neurology*, 1993, 43 (8) 1467-1472
- Schmidt, M. L., Huang, R., Martin, J. A., Henley, J., Mawal-Dewan, M., Hurtig, H. I., Lee, V. M. und Trojanowski, J. Q., **Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy contain the same tau epitopes identified in Alzheimer's disease PHFtau**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55 (5) 534-539
- SCHNEIDER, W. C. und HOGEBOM, G. H., **Cytochemical studies of mammalian tissues; the isolation of cell components by differential centrifugation: a review**, *Cancer Res.*, 1951, 11 (1) 1-22
- Schuessel, K., Leutner, S., Cairns, N. J., Muller, W. E. und Eckert, A., **Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain**, *J. Neural Transm.*, 2004, 111 (9) 1167-1182
- Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J. und Mandelkow, E., **Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, 92 (18) 8463-8467
- Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A. und Mandelkow, E., **Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure**, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (39) 24290-24297
- Selden, S. C. und Pollard, T. D., **Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments**, *J. Biol. Chem.*, 1983, 258 (11) 7064-7071
- Selkoe, D. J., **Cell biology of the beta-amyloid precursor protein and the genetics of Alzheimer's disease**, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1996, 61 587-596

- Selkoe, D. J., **The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease**, *Trends Cell Biol.*, 1998, 8 (11) 447-453
- Selkoe, D. J., **Alzheimer's disease is a synaptic failure**, *Science*, 2002, 298 (5594) 789-791
- Sergeant, N., Watzek, A. und Delacourte, A., **Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms**, *J. Neurochem.*, 1999, 72 (3) 1243-1249
- Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. und Jensen, R. E., **Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 308 (2) 276-283
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G. V., Litsky, J. M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J. Q. und ., **Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau**, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (32) 18917-18922
- Shang, T., Joseph, J., Hillard, C. J. und Kalyanaraman, B., **Death-associated protein kinase as a sensor of mitochondrial membrane potential: role of lysosome in mitochondrial toxin-induced cell death**, *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (41) 34644-34653
- Shelton, R. C., **The molecular neurobiology of depression**, *Psychiatr. Clin. North Am.*, 2007, 30 (1) 1-11
- Sherer, T. B., Richardson, J. R., Testa, C. M., Seo, B. B., Panov, A. V., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Miller, G. W. und Greenamyre, J. T., **Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease**, *J. Neurochem.*, 2007, 100 (6) 1469-1479
- Shirazi, S. K. und Wood, J. G., **The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology**, *Neuroreport*, 1993, 4 (4) 435-437
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. und John, V., **Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain**, *Nature*, 1999, 402 (6761) 537-540
- Skulachev, V. P., **Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables**, *Trends Biochem. Sci.*, 2001, 26 (1) 23-29
- Slater, E. C., **The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 301 (2) 129-154
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. und van der Bliek, A. M., **Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells**, *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12 (8) 2245-2256
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C., **Measurement of protein using bicinchoninic acid**, *Anal. Biochem.*, 1985, 150 (1) 76-85
- Snow, A. D., Lara, S., Nochlin, D. und Wight, T. N., **Cationic dyes reveal proteoglycans structurally integrated within the characteristic lesions of Alzheimer's disease**, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 1989, 78 (2) 113-123

- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. und Chan, D. C., **OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L**, *J. Cell Biol.*, 2007, 178 (5) 749-755
- Soulie, C., Lepagnol, J., Delacourte, A. und Caillet-Boudin, M. L., **Dephosphorylation studies of SKNSH-SY 5Y cell Tau proteins by endogenous phosphatase activity**, *Neurosci. Lett.*, 1996, 206 (2-3) 189-192
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Kamphorst, W., Heutink, P. und van Swieten, J. C., **Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau**, *Am. J. Pathol.*, 1998a, 153 (5) 1359-1363
- Spillantini, M. G., Goedert, M., Crowther, R. A., Murrell, J. R., Farlow, M. R. und Ghetti, B., **Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94 (8) 4113-4118
- Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A. und Ghetti, B., **Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998b, 95 (13) 7737-7741
- Spillantini, M. G., van Swieten, J. C. und Goedert, M., **Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)**, *Neurogenetics.*, 2000, 2 (4) 193-205
- Squitieri, F., Cannella, M., Sgarbi, G., Maglione, V., Falleni, A., Lenzi, P., Baracca, A., Cislighi, G., Saft, C., Ragona, G., Russo, M. A., Thompson, L. M., Solaini, G. und Fornai, F., **Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation**, *Mech. Ageing Dev.*, 2006, 127 (2) 217-220
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R. und Spiegelman, B. M., **Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators**, *Cell*, 2006, 127 (2) 397-408
- Stadtman, E. R., **Protein oxidation and aging**, *Science*, 1992, 257 (5074) 1220-1224
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. und Mandelkow, E. M., **Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress**, *J. Cell Biol.*, 2002, 156 (6) 1051-1063
- Steele, J. C., RICHARDSON, J. C. und OLSZEWSKI, J., **PROGRESSIVE SUPRANUCLEAR PALSY. A HETEROGENEOUS DEGENERATION INVOLVING THE BRAIN STEM, BASAL GANGLIA AND CEREBELLUM WITH VERTICAL GAZE AND PSEUDBULBAR PALSY, NUCHAL DYSTONIA AND DEMENTIA**, *Arch. Neurol.*, 1964, 10 333-359
- Steiner, H., Capell, A., Leimer, U. und Haass, C., **Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease**, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 1999, 249 (6) 266-270
- Steiner, H. und Haass, C., **Intramembrane proteolysis by presenilins**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1 (3) 217-224
- Stine, W. B., Jr., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. und LaDu, M. J., **In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis**, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 (13) 11612-11622
- Stoscheck, C. M., **Quantitation of protein**, *Methods Enzymol.*, 1990, 182 50-68

- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J. B. und Kruger, R., **Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease**, *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14 (15) 2099-2111
- Suen, D. F., Norris, K. L. und Youle, R. J., **Mitochondrial dynamics and apoptosis**, *Genes Dev.*, 2008, 22 (12) 1577-1590
- Sugioka, K., Nakano, M., Totsune-Nakano, H., Minakami, H., Tero-Kubota, S. und Ikegami, Y., **Mechanism of O₂- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 936 (3) 377-385
- Sumpter, P. Q., Mann, D. M., Davies, C. A., Yates, P. O., Snowden, J. S. und Neary, D., **An ultrastructural analysis of the effects of accumulation of neurofibrillary tangle in pyramidal neurons of the cerebral cortex in Alzheimer's disease**, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1986, 12 (3) 305-319
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. und Rao, Z., **Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II**, *Cell*, 2005, 121 (7) 1043-1057
- Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J. und Tjandra, N., **The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle**, *J. Mol. Biol.*, 2003, 334 (3) 445-458
- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., Beal, M. F., Xu, H., Greengard, P. und Gouras, G. K., **Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology**, *Am. J. Pathol.*, 2002, 161 (5) 1869-1879
- Tellez-Nagel, I. und Wisniewski, H. M., **Ultrastructure of neurofibrillary tangles in Steele-Richardson-Olszewski syndrome**, *Arch. Neurol.*, 1973, 29 (5) 324-327
- Testa, C. M., Sherer, T. B. und Greenamyre, J. T., **Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures**, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2005, 134 (1) 109-118
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. und Santel, A., **The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells**, *J. Cell Sci.*, 2005, 118 (Pt 14) 3049-3059
- Tondera, D., Santel, A., Schwarzer, R., Dames, S., Giese, K., Klippel, A. und Kaufmann, J., **Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis**, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (30) 31544-31555
- Torres, C. R. und Hart, G. W., **Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc**, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259 (5) 3308-3317
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H. T. und Larsson, N. G., **Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase**, *Nature*, 2004, 429 (6990) 417-423
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules**, *Mol. Biol. Cell*, 1995, 6 (12) 1887-1902

- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles**, *J. Cell Sci.*, 1999, 112 (Pt 14) 2355-2367
- Turrens, J. F. und Boveris, A., **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria**, *Biochem. J.*, 1980a, 191 (2) 421-427
- Turrens, J. F. und Boveris, A., **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria**, *Biochem. J.*, 1980b, 191 (2) 421-427
- Utton, M. A., Connell, J., Asuni, A. A., van, S. M., Hutton, M., de, S. R., Lees, A. J., Miller, C. C. und Anderton, B. H., **The slow axonal transport of the microtubule-associated protein tau and the transport rates of different isoforms and mutants in cultured neurons**, *J. Neurosci.*, 2002, 22 (15) 6394-6400
- van Raam, B. J., Sluiter, W., de, W. E., Roos, D., Verhoeven, A. J. und Kuijpers, T. W., **Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation**, *PLoS. ONE.*, 2008, 3 (4) e2013-
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L. I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V. J. und Rutter, G. A., **Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1**, *J. Cell Sci.*, 2004, 117 (Pt 19) 4389-4400
- 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. und Citron, M., **Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE**, *Science*, 1999, 286 (5440) 735-741
- Vatassery, G. T., Angerhofer, C. K. und Knox, C. A., **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.*, 1984, 43 (2) 409-412
- Verkaart, S., Koopman, W. J., van Emst-de Vries SE, Nijtmans, L. G., van den Heuvel, L. W., Smeitink, J. A. und Willems, P. H., **Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency**, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1772 (3) 373-381
- Vermersch, P., Robitaille, Y., Bernier, L., Watzel, A., Gauvreau, D. und Delacourte, A., **Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement**, *Acta Neuropathol.*, 1994, 87 (6) 572-577
- Vigo-Pelfrey, C., Seubert, P., Barbour, R., Blomquist, C., Lee, M., Lee, D., Coria, F., Chang, L., Miller, B., Lieberburg, I. und ., **Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease**, *Neurology*, 1995, 45 (4) 788-793
- von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure**, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (51) 48165-48174
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97 (10) 5129-5134

- Wada, H., Nakajoh, K., Satoh-Nakagawa, T., Suzuki, T., Ohru, T., Arai, H. und Sasaki, H., **Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients**, *Gerontology*, 2001, 47 (5) 271-276
- Wallace, D. C., **A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine**, *Annu. Rev. Genet.*, 2005, 39 359-407
- Wallace, D. C., Shoffner, J. M., Trounce, I., Brown, M. D., Ballinger, S. W., Corral-Debrinski, M., Horton, T., Jun, A. S. und Lott, M. T., **Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1271 (1) 141-151
- Wallace, D. C., Ye, J. H., Neckelmann, S. N., Singh, G., Webster, K. A. und Greenberg, B. D., **Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations**, *Curr. Genet.*, 1987, 12 (2) 81-90
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J. und Vasson, M. P., **Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes**, *Clin. Chim. Acta*, 2003, 331 (1-2) 103-110
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. und Selkoe, D. J., **Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo**, *Nature*, 2002, 416 (6880) 535-539
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. und Selkoe, D. J., **The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain**, *Biochemistry*, 2000, 39 (35) 10831-10839
- Wang, X., Su, B., Fujioka, H. und Zhu, X., **Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients**, *Am. J. Pathol.*, 2008a, 173 (2) 470-482
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S. L., Moreira, P. I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G. und Zhu, X., **Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 2008b, 105 (49) 19318-19323
- Wasiak, S., Zunino, R. und McBride, H. M., **Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death**, *J. Cell Biol.*, 2007, 177 (3) 439-450
- Watabe, M. und Nakaki, T., **ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells**, *Neuropharmacology*, 2007, 52 (2) 536-541
- Wei, Y., Qu, M. H., Wang, X. S., Chen, L., Wang, D. L., Liu, Y., Hua, Q. und He, R. Q., **Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation**, *PLoS. ONE.*, 2008, 3 (7) e2600-
- Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H. und Weiss, H., **The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in Escherichia coli. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I**, *J. Mol. Biol.*, 1993, 233 (1) 109-122
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. und Kirschner, M. W., **A protein factor essential for microtubule assembly**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1975, 72 (5) 1858-1862
- Westermann, B., **Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission**, *J. Biol. Chem.*, 2008, 283 (20) 13501-13505

- Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E., Libby, R. T., Satterfield, T. F., Lazarowski, E. R., Gilbert, M. L., Morton, G. J., Bammler, T. K., Strand, A. D., Cui, L., Beyer, R. P., Easley, C. N., Smith, A. C., Krainc, D., Luquet, S., Sweet, I. R., Schwartz, M. W. und La Spada, A. R., **Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration**, *Cell Metab*, 2006, 4 (5) 349-362
- Wilhelmsen, K. C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M. und Nygaard, T. G., **Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22**, *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55 (6) 1159-1165
- Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E., **Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro**, *J. Cell Biol.*, 1992, 118 (3) 573-584
- Wischik, C. M., Novak, M., Thogersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., Roth, M. und Klug, A., **Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, 85 (12) 4506-4510
- Witman, G. B., Cleveland, D. W., Weingarten, M. D. und Kirschner, M. W., **Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73 (11) 4070-4074
- Xiong, J., Camello, P. J., Verkhatsky, A. und Toescu, E. C., **Mitochondrial polarisation status and [Ca²⁺]_i signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro**, *Neurobiol. Aging*, 2004, 25 (3) 349-359
- Yarian, C. S., Torosier, D. und Sohal, R. S., **Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice**, *Mech. Ageing Dev.*, 2006, 127 (1) 79-84
- Yasuda, M., Kawamata, T., Komure, O., Kuno, S., D'Souza, I., Poorkaj, P., Kawai, J., Tanimukai, S., Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Sasahara, M., Hazama, F., Schellenberg, G. D. und Tanaka, C., **A mutation in the microtubule-associated protein tau in pallido-nigro-lusian degeneration**, *Neurology*, 1999, 53 (4) 864-868
- Yasuda, M., Takamatsu, J., D'Souza, I., Crowther, R. A., Kawamata, T., Hasegawa, M., Hasegawa, H., Spillantini, M. G., Tanimukai, S., Poorkaj, P., Varani, L., Varani, G., Iwatsubo, T., Goedert, M., Schellenberg, D. G. und Tanaka, C., **A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto)**, *Ann. Neurol.*, 2000, 47 (4) 422-429
- Youle, R. J. und Karbowski, M., **Mitochondrial fission in apoptosis**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6 (8) 657-663
- Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D. J., Yu, S. W., Marupudi, N. I., Torp, R., Torgner, I. A., Ottersen, O. P., Dawson, T. M. und Dawson, V. L., **Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis**, *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14 (14) 2063-2073
- Zickermann, V., Drose, S., Tocilescu, M. A., Zwicker, K., Kersch, S. und Brandt, U., **Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)**, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2008, 40 (5) 475-483
- Zingsheim, H. P., Herzog, W. und Weber, K., **Differences in surface morphology of microtubules reconstituted from pure brain tubulin using two different microtubule-associated proteins: the high molecular weight MAP 2 proteins and tau proteins**, *Eur. J. Cell Biol.*, 1979, 19 (2) 175-183

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1- 1 Schematische Darstellung des humanen Tau-Gens und die durch alternatives Spleißen im ZNS exprimierte Isoformen	2
Abb.: 1- 2 Konzept der pathophysiologischen Prozesse der Tauopathien	9
Abb.: 1-3 Schematische Darstellung des Westernblot-Bandenmusters von löslichem und unlöslichem Tau-Protein bei verschiedenen Tauopathien.....	10
Abb.: 1- 4 Schematische Darstellung aller bisher bekannten pathogenen Mutationen im Tau-Gen.....	19
Abb.: 1- 5 Schematischer Aufbau eines Mitochondriums und seine Grundfunktionen.....	21
Abb.: 1- 6 Mitochondriale DNA	26
Abb.: 1- 7 Mitochondriale <i>Fusion</i> und <i>Fission</i>	27
Abb.: 1- 8 Die mitochondriale <i>Fusion</i> -Maschinerie.....	30
Abb.: 1- 9 Die mitochondriale <i>Fission</i> -Maschinerie	32
Abb.: 1- 10 Mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	35
Abb.: 2- 1 Schematische Darstellung der längsten Tau-Isoform	50
Abb.: 2- 2 Tau-Färbung mit dem HT7-Antikörper	51
Abb.: 2- 3 Biolumineszenzreaktion des ATP-Assays	57
Abb.: 2- 4 Beispiel einer typischen ATP-Standardgeraden	58
Abb.: 2- 5 Metabolisierung von MTT zum Formazansalz.....	59
Abb.: 2- 6 Zytotoxizitätsassay	60
Abb.: 2- 7 Strukturformel von Rhodamin 123	61
Abb.: 2- 8 Strukturformel von DAF-2DA und Reaktionsmechanismus.....	63
Abb.: 2- 9 Strukturformel von DHE.....	64
Abb.: 2- 10 Strukturformel von DHR und Reaktionsmechanismus	65
Abb.: 2- 11 Strukturformel von MitoTracker CMXRos.....	67
Abb.: 2- 12 Strukturformel von MitoTracker Deep Red	68
Abb.: 2- 13 Standardgerade und Verdünnungsreihe der genomischen DNA der SH-SY5Y Zellen	72

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.: 3-1 Der Einfluss von überexprimiertem Tau auf das mitochondriale Netzwerk der SH-SY5Y-Zellen	88
Abb.: 3-2 Der Einfluss von überexprimiertem Tau auf die Morphologie der SH-SY5Y-Zellen.....	89
Abb.: 3- 3 Das Überexprimieren von Tau hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Masse.....	90
Abb.: 3- 4 Beweglichkeit der Mitochondrien.....	91
Abb.: 3- 5 Mitochondriale Beweglichkeit der SH-SY5Y Zellen.....	92
Abb.: 3-6 Beispiel für die Verteilung von photoaktivierbarem mitoGFP	94
Abb.: 3-7 Zeitlicher Verlauf nach Aktivierung von pA-GFP	95
Abb.: 3- 8 Abnahme der Fluoreszenzintensität zwischen 15 und 30 min nach der Aktivierung von pA-GFP.....	96
Abb.: 3- 9 Repräsentative Darstellung der Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid.....	97
Abb.: 3- 10 Veränderte Transkription von an <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> beteiligten Faktoren.....	97
Abb.: 3- 11 Basale ATP- , Lactat- und NO-Spiegel sowie das mitochondriale Membranpotential der SH-SY5Y Zellen	100
Abb.: 3- 12 Basale metabolische Aktivität und Zytotoxizität der SY5Y-Zellen.....	102
Abb.: 3- 13 Veränderte ROS-Spiegel in den SY5Y-Zellen.....	103
Abb.: 3- 14 Oxidative mtDNA-Schäden führen zu einer verminderten Amplifikation des großen mitochondrialen Fragments	104
Abb.: 3- 15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mitochondrien der SY5Y-Zellen.....	106
Abb.: 3- 16 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf die metabolische Aktivität.....	107
Abb.: 3- 17 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf die ATP-Spiegel.....	109
Abb.: 3- 18 Zeitabhängige Effekte von FCCP auf das MMP	110
Abb.: 3- 19 Effekte von FCCP auf die metabolische Aktivität nach 24h Inkubation.	113
Abb.: 3- 20 Effekte von FCCP auf die ATP-Spiegel nach 24h Inkubation.....	114
Abb.: 3-21 Effekte von FCCP nach 24-stündiger Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential.....	115
Abb.: 3- 22 Lactat-Spiegel nach 24-stündiger Inkubation mit FCCP	117

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.: 3- 23 Zytotoxizität nach 24h Inkubation mit FCCP.....	118
Abb.: 3- 24 Lactat-Spiegel nach 24h Inkubation mit verschiedenen Komplex-Inhibitoren.....	121
Abb.: 3- 25 Zytotoxizität nach 24h Inkubation mit Komplex-Inhibitoren.....	123
Abb.: 3-26 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 µM Rotenon für 24h.....	126
Abb.: 3- 27 Viabilität nach Rotenon-Inkubation	127
Abb.: 3- 28 Veränderte Expression der 20 kDa-Untereinheit von Komplex I in den SY5Y-Zellen.....	128
Abb.: 3- 29 Veränderter Komplex I-Gehalt und DBQ:HAR-Aktivitäten.....	130
Abb.: 3- 30 Veränderte Komplex I-Aktivität bezogen auf die Citratsynthase-Aktivität.....	132
Abb.: 3-31 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit TTFA für 24h	134
Abb.: 3- 32 Viabilität nach TTFA-Inkubation	135
Abb.: 3- 33 Veränderte Expression der 30 kDa-Untereinheit von Komplex II in den SY5Y-Zellen.....	136
Abb.: 3- 34 Veränderte Komplex II-Aktivität	137
Abb.: 3-35 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 µM Antimycin für 24h.....	139
Abb.: 3- 36 Viabilität nach Antimycin-Inkubation	140
Abb.: 3- 37 Veränderte Expression der Core II-Untereinheit von Komplex III in den SY5Y-Zellen.....	141
Abb.: 3- 38 Veränderte Komplex III-Aktivität.....	142
Abb.: 3-39 Veränderungen der ATP-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 mM Natriumazid für 24h.....	144
Abb.: 3- 40 Viabilität nach Inkubation mit Natriumazid.....	145
Abb.: 3- 41 Veränderte Expression der COX II-Untereinheit von Komplex IV in den SY5Y-Zellen.....	146
Abb.: 3-42 COX-Aktivität ist nicht verändert.....	147
Abb.: 3-43 Veränderungen der ATP- und Lactat-Spiegel sowie des MMPs nach Inkubation mit 10 µM Oligomycin für 24h.....	149

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.: 3-44 Abnahme der metabolischen Aktivität und erhöhte Zytotoxizität nach 24-stündiger Hemmung von Komplex V mit 10 μ M Oligomycin	150
Abb.: 3-45 Die Expression der F1 α -Untereinheit von Komplex V ist in den SH-SY5Y-Zellen nicht verändert	152
Abb.: 3-46 Lactat-Spiegel nach zusätzlichem oxidativen, nitrosativen und A β -Stress für 24 Stunden.....	154
Abb.: 3-47 Zytotoxizität in den SH-SY5Y Zellen nach zusätzlichem oxidativen, nitrosativen und A β -Stress für 24 Stunden	156
Abb.: 3-48 ROS-Bildung wird durch zusätzlichen oxidativen Stress erhöht.....	158
Abb.: 3-49 Oxidativer Stress führt zum Abfall der metabolischen Aktivität, der ATP-Spiegel sowie des MMPs und hat nur geringe Auswirkungen auf die Glykolyserate	160
Abb.: 3-50 Anstieg der NO- und Abfall der ATP-Spiegel nach akuter SNP-Stimulation	162
Abb.: 3-51 Inkubation mit SNP zeigt geringe Effekte auf die ATP-Spiegel und das MMP in den TauP301L-Zellen	164
Abb.: 3-52 Zytotoxizität von nitrosativem Stress und dessen Einfluss auf die Viabilität.....	165
Abb.: 3-53 Die A β ₁₋₄₀ -Spiegel der SH-SY5Y Zellen.....	167
Abb.: 3-54 Die verschiedenen Aggregationsformen von A β ₁₋₄₂ haben geringe, aber unterschiedliche Wirkungen auf die ATP-Spiegel.....	169
Abb.: 3-55 A β ₁₋₄₂ Oligomere und Fibrillen haben kaum Einfluss auf die Lactat-Spiegel.....	172
Abb.: 3-56 Geringfügige Änderungen des MMP nach Inkubation mit A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen.....	174
Abb.: 3-57 Abnahme der metabolischen Aktivität durch Inkubation mit A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen.....	177
Abb.: 3-58 Zytotoxizität von A β ₁₋₄₂ Oligomeren und Fibrillen.....	179
Abb.: 4-1 Funktionelle Effekte durch die Expression von hTau40 in den SH-SY5Y Zellen.....	189
Abb.: 4-2 Funktionelle Effekte durch die Expression von TauP301L in den SH-SY5Y Zellen.....	198

Abb.: 4-3 Zusammenfassung der funktionelle Effekte auf die mitochondriale Funktion der SH-SY5Y Zellen	205
---	-----

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab.: 1-1 Wichtigsten vererbte Erkrankungen durch Veränderung der mitochondrialen Dynamik.....	29
Tab.: 2-1 Zielstrukturen und verwendete Konzentrationen der Inhibitoren.....	55
Tab.: 3-1 Zusammenfassung der Veränderungen der <i>Fusion</i> und <i>Fission</i> Faktoren....	98
Tab.: 3-2 Zusammenfassung der zeitabhängigen Effekte von 2,5 μ M FCCP auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP der SY5Y-Zellen.....	112
Tab.: 3-3 Zusammenfassung der Effekte von FCCP nach 24h Inkubation auf die metabolische Aktivität, die ATP-Spiegel und das MMP der SY5Y-Zellen.....	116
Tab.: 3-4 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 3-stündigen $A\beta_{1-42}$ - Inkubation auf die ATP-Spiegel	170
Tab.: 3-5 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 24-stündigen $A\beta_{1-42}$ - Inkubation auf die ATP-Spiegel.....	171
Tab.: 3-6 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 3-stündigen $A\beta_{1-42}$ - Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential.....	175
Tab.: 3-7 Zusammenfassung der Auswirkungen einer 24-stündigen $A\beta_{1-42}$ - Inkubation auf das mitochondriale Membranpotential	176
Tab.: 4-1 Expression der Atmungskettenkomplexe	199
Tab.: 4-2 Komplexaktivitäten der SH-SY5Y Zellen	201
Tab.: 4-3 Auswirkungen von Tau auf die Physiologie der SH-SY5Y Zellen	203
Tab.: 4-3 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Rotenon.....	213
Tab.: 4-4 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit TTFA	215
Tab.: 4-5 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Antimycin.....	217
Tab.: 4-6 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Natriumazid.....	218
Tab.: 4-7 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit SNP.....	220
Tab.: 4-8 Mitochondriale Funktion nach Inkubation mit Oligomycin.....	221

8. Abkürzungen

<u>Abkürzung</u>	<u>Ausformulierung</u>
Abb.	<u>Abbildung</u>
ACO	<u>Acotinase</u>
AD	<u>Alzheimer</u> <u>Demenz</u>
ADAM	<u>A Disintegrin</u> <u>And Metalloprotease Family</u>
ADAS	<u>Alzheimer's Disease</u> <u>Assesment</u> <u>Scale</u>
AICD	<u>APP Intracellular</u> <u>Domain</u>
AK	<u>Antikörper</u>
AK	<u>Adenylat</u> <u>kinase</u>
ALS	<u>Amiotrophe</u> <u>Lateral</u> <u>s</u> <u>klerose</u>
ANOVA	<u>Analysis</u> <u>Of</u> <u>Variance</u>
APO E	<u>Apolipoprotein</u> <u>E</u>
APP	<u>Amyloid</u> <u>Precursor</u> <u>Protein</u>
APPsw	<u>Amyloid</u> <u>Precursor</u> <u>Protein</u> Mit <u>Swedischer</u> <u>Mutaion</u>
APPwt	<u>Amyloid</u> <u>Precursor</u> <u>Protein</u> , <u>Wildtyp</u>
AS	<u>Aminosäure</u>
A β	<u>Amyloid-</u> β <u>Peptid</u>
α -Syn	α <u>-Synuclein</u>
ATP	<u>Adenosin-</u> <u>Triphosphat</u>
BACE	β - <u>Site</u> <u>APP</u> <u>Cleaving</u> <u>Enzyme</u>
bp	<u>Basenpaare</u>
BSA	<u>Bovine</u> <u>Serum</u> <u>Albumin</u>
CamKII	<u>Ca</u> ²⁺ - <u>Calmodulin</u> - <u>abhängige</u> <u>Proteinkinase</u> <u>II</u>
CBD	<u>Cortico-</u> <u>Basal</u> <u>Degeneration</u>
Cdk2	<u>Cylin-</u> <u>dependent</u> <u>Proteinkinase</u>
cDNA	<u>Copy</u> <u>DNA</u>
CHO	<u>Chinese</u> <u>Hamster</u> <u>Ovar</u> <u>Cells</u>
CLSM	<u>Confocal</u> <u>Laser</u> <u>scan</u> <u>Microscopy</u>
cm	<u>Zentimeter</u>
CO ₂	<u>Kohlendioxid</u>
CoA	<u>Coenzym</u> <u>A</u>
COX	<u>Cytochrom</u> <u>C</u> <u>Oxidase</u>
CS	<u>Citrat-</u> <u>Synthase</u>
DBQ	<u>n-Decylubichinon</u>
DEPC	<u>Diethylpyro</u> <u>carbonat</u>
DHE	<u>Dihydroethidium</u>
DHODH	<u>Dihydro</u> <u>rotat</u> <u>Dehydrogenase</u>
DHR	<u>Dihydro</u> <u>rhodamin</u> 123
DMSO	<u>Dimethyl</u> <u>sulfoxid</u>
DNA	<u>Desoxyribo</u> <u>Nucleotide</u> <u>Acid</u>
dNTPs	<u>Desoxy</u> <u>Ribonukleotide</u> <u>Triphosphates</u>
Drp1	<u>Dynam</u> <u>in-related</u> <u>Protein</u> <u>1</u>
DTT	<u>Dithio</u> <u>threitol</u>
EDTA	<u>Ethylendiamin</u> <u>tetraessigsäure</u>
eNOS	<u>Endotheliale</u> <u>NO-</u> <u>Synthase</u>
ER	<u>Endoplasmatisches</u> <u>Retikulum</u>
Evtl.	<u>Eventuell</u>
FAD	<u>Familiäre</u> <u>Alzheimer</u> <u>Demenz</u>

FADH	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
FALS	<u>F</u> amiliäre <u>A</u> LS
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> ow <u>S</u> erum
FDG	18F-2- <u>F</u> luor-2- <u>D</u> esoxy- <u>D</u> - <u>G</u> lukose
Fis1	<u>F</u> ission <u>1</u>
FMN	<u>F</u> lavin <u>m</u> onon <u>u</u> keotid
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>R</u> ecovery <u>A</u> fter <u>P</u> hoto <u>b</u> leaching
FTDP-17	<u>F</u> rontotemporele <u>D</u> emenz Mit <u>P</u> arkinsonismus Auf Chromosom <u>17</u>
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GPDH	<u>G</u> lycerol-3- <u>P</u> hosphat <u>D</u> ehydrogenase
GSH	<u>G</u> lutathion
GSK-3 β	<u>G</u> lykogen- <u>S</u> ynthase- <u>K</u> inase-3 β
GSSG	<u>G</u> lutathion- <u>D</u> isulfid
GTP	<u>G</u> uanosin- <u>T</u> riphosphat
HAR	<u>H</u> exa- <u>A</u> mmin- <u>R</u> uthenium (III)
HD	<u>H</u> untington's <u>D</u> isease
HEPES	<u>H</u> ydroxyethylpiperazinethansulfat
HFIP	<u>H</u> exafluoroisopropanol
HNE	4- <u>H</u> ydroxy-2,3- <u>N</u> onenal
HS	<u>H</u> orse <u>S</u> erum
hTau40	Längste Isoform des <u>h</u> umanen <u>T</u> au Proteins, Wildtyp
ICDH	<u>I</u> so <u>c</u> itrat <u>D</u> ehydrogenase
IMM	<u>I</u> nnere <u>M</u> itochondriale <u>M</u> embran
kb	<u>K</u> ilo <u>B</u> asen
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
KGDHC	α - <u>K</u> etoglutarat Dehydrogenase
MAO	<u>M</u> onoaminoxidase
MAP	<u>M</u> ikrotubuli-assoziertes <u>P</u> rotein
MAPK	<u>M</u> itogen-aktivierte <u>P</u> roteinkinase
MDH	<u>M</u> alat- <u>D</u> ehydrogenase
Mfn	<u>M</u> itofusin
mg	<u>M</u> illigramm
min	<u>M</u> inuten
mitoPLD	<u>m</u> itochondriale <u>P</u> hospholipase <u>D</u>
ml	<u>M</u> illiliter
μ M	<u>M</u> ikromolar
mM	<u>M</u> illimolar
MMP	<u>M</u> itochondriales <u>M</u> embranpotential
MMST	<u>M</u> ini <u>M</u> ental <u>S</u> tatus <u>T</u> est
MPTP	<u>M</u> itochondrial <u>P</u> ermeability <u>T</u> ransition <u>P</u> ore
mRNA	<u>M</u> essenger <u>R</u> NA
mtDNA	<u>M</u> itochondriale <u>D</u> NA
mtHtt	<u>M</u> utiertes <u>H</u> untingtin
MTP18	<u>M</u> itochondriales <u>P</u> rotein, <u>18</u> kDa
mtSOD1	<u>M</u> itochondriale <u>S</u> OD <u>1</u>
MTT	3-(4,5- <u>D</u> imethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.s.	<u>N</u> icht <u>S</u> ignifikant
NADH	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
nDNA	<u>N</u> ukleäre <u>D</u> NA
NFT	<u>N</u> eurofibrillary <u>T</u> angles
ng	<u>N</u> anogramm
nM	<u>N</u> anomolar

nm	<u>N</u> anometer
NMDA	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
nNOS	<u>N</u> euronale <u>NO</u> - <u>S</u> ynthase
NO	<u>S</u> tickstoffmonoxid
NOS	<u>NO</u> - <u>S</u> ynthase
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
OMM	<u>O</u> uter <u>M</u> itochondrial <u>M</u> embrane
Opa1	<u>O</u> ptic <u>a</u> trophy 1
PBS	<u>P</u> hosphat <u>B</u> uffert <u>S</u> aline
PC12	<u>P</u> heochromocytoma Zellen
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PD	<u>P</u> arkinson's <u>D</u> isease
PDH	<u>P</u> yruvat <u>D</u> ehydrogenase
PET	<u>P</u> ositron <u>E</u> missions <u>T</u> omographie
PHF	<u>P</u> aired <u>H</u> elical <u>F</u> ilaments
PI3K	<u>P</u> hosphoinositol-3- <u>K</u> inase
PiD	<u>P</u> ics's <u>D</u> isease
PINK1	<u>P</u> TEN- <u>i</u> nduzierte Putative <u>K</u> inase 1
pM	<u>P</u> icomolar
Pro	<u>P</u> rolin
PS	<u>P</u> räseneline
PSP	<u>P</u> rogressive <u>s</u> upranukleäre Blickparese
PVDF	<u>P</u> olyvinylidendifluorid
RCR	Respiratorischer Kontrollindex
RNA	<u>R</u> ibo <u>N</u> ucleotide <u>A</u> cid
ROI	<u>R</u> egion <u>O</u> f <u>I</u> nterest
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
rpm	<u>R</u> ounds <u>P</u> er <u>M</u> inute
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase <u>P</u> olymerase <u>K</u> ettenreaktion
sAPP	<u>S</u> olubel/Lösliche <u>A</u> PP- Ektodomäne
SDH	<u>S</u> uccinat <u>D</u> ehydrogenase
SDS	<u>S</u> odiumdodecylsulfat
SEM	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror <u>O</u> f <u>M</u> eans
Ser	<u>S</u> erin
SF	<u>S</u> traight <u>F</u> ilaments
SH-SY5Y	Humane Neuroblastoma Zellen
SNP	Natriumnitroprussid
SOD	<u>S</u> uperoxiddismutase
STMD	<u>S</u> ingle <u>T</u> ransmembrane <u>D</u> omain
TauP301L	h <u>T</u> au40 mit Mutation <u>P</u> → <u>L</u>
TCA	<u>T</u> richloressigsäure
Thr	<u>T</u> hreonin
TPI	<u>T</u> riosephosphat- <u>I</u> somerase
TTFA	<u>T</u> henoyltrifluoroaceton
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	<u>V</u> olt
vct	SH-SY5Y Zellen transfiziert mit dem Leervector
YFP	<u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem

9. Publikationen

9.1 Publikationen

- Eckert A, Schulz KL, Rhein V, Götz J
Convergence of amyloid- β and tau pathologies on mitochondria in vivo
Mol Neurobiol. 2010 Mar 9. [Epub ahead of print]. Review
- Schulz KL, Rhein V, Mai S, Jendrach M, Haase W, Kühlbrandt W, Eckert A, Reichert AS, Müller WE, Leuner K
A Novel Mechanism of Mitochondrial Impairment in Tauopathies
Bereit zur Submission
- Schulz et al.,
Mitochondrial Dysfunction in Lymphocytes from MCI and AD Patients
In Vorbereitung
- Hauptmann S, Scherping I, Dröse S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, Leuner K, Eckert A, Müller WE.
Mitochondrial dysfunction: An early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice.
Neurobiol Aging. 2009 Oct; 30(10):1574-86
- Leuner K, Pantel J, Frey C, Schindowski K, Schulz K, Wegat T, Maurer K, Eckert A, Müller WE.
Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease.
J Neural Transm Suppl. 2007; (72):207-15. Review
- Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakała M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Müller WE, Strosznajder JB.
Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A(2) level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells.
Acta Biochim Pol. 2007; 54(3):611-23.
- Schulz K und Müller WE
Opioidanalgetika - In der Schmerztherapie nicht mehr wegzudenken
Der Hausarzt (2006) Ausgabe 20/2006: 54-56

9.2 Poster

- EBEC (European Bioenergetics Conference) - Dublin, Irland (2008) (EBEC Student Travel Grant Committee)
- Neuroscience Meeting - San Diego, USA (2007) (Reisestipendium des Vereins Freunde und Förderer der Goethe-Universität)
- ISAO (Internationale Alzheimer Stichting Onderzoek = International Foundation Alzheimer's Research) Workshop - Bad Honnef, Deutschland (2007)
- DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Doktorandentagung - Heroldsberg, Deutschland (2006)
- MIP (Mitochondrial Physiology) - Schröcken, Österreich (2005)

10. Lebenslauf

Persönliche Information

Name: Kathrin Lydia Schulz

Geburtsdatum: 22.01.1980 in Frankfurt am Main

Wissenschaftliche Laufbahn

März 2009 – November 2009

Postdoc/Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Neurobiologisches Labor für Brain Aging and Mental Health, Associated Research Group
Dept. Biomedicine, University of Basel
UPKBS – Universitäre Psychiatrische Kliniken Basel

Februar 2005 – August 2008

Promotion

im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler
der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
„Funktionelle und strukturelle Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei Tauopathien“
Betreuer: Herr Prof. W.E. Müller

Bildungsweg

Oktober 1999 – August 2004

Studium der Biologie (Diplom)

an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Gesamtnote: sehr gut (1,1)

Diplomarbeit im Fach Zell- und Entwicklungsbiologie:
„Einfluss von Alzheimer-relevanten Faktoren auf die intrazelluläre Ca²⁺-Regulation von Zellkulturzellen“ Note: 1,0

Betreuer: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

Schwerpunktfächer:

Zell- und Entwicklungsbiologie, Note: 1,0

Neurobiologie, Note: 1,7

Toxikologie, Note: 1,0

August 1990 – Juni 1999

Abitur

an der Freiherr-vom-Stein Schule, Gymnasium, Frankfurt am Main

Prüfungsfächer: Biologie, Kunst, Geschichte und Mathematik

Gesamtnote: 1,9

Weiterbildung

‘How to write a competitive proposal for framework 7’ (2009)

ZAFES-Curriculum on Drug Research and Development for Postgraduates and Graduates (2007)

‘Current Aspects in the field of Alzheimer Research’ Workshop (2007)

General English Course – Post Intermediate Level – OLT, Oxford Language School, Oxford, England (1999)