

Aus der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel

**Annonacin, ein natürlicher Komplex-I Inhibitor,
erhöht die Tau-Phosphorylierung im Gehirn von
FTDP-17 transgenen Mäusen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Gesine Respondek

aus Montgomery County, Maryland (USA)

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 13.05.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Dr. W.H. Oertel

Korreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung | 5 |
| Summary | 6 |
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau..... | 7 |
| 1.1.1. Aufbau | 7 |
| 1.1.2. Abbau | 8 |
| 1.1.3. Funktion | 9 |
| 1.1.4. Tau Phosphorylierung | 10 |
| 1.1.4.1. Tau Phosphatasen | 10 |
| 1.1.4.2. Tau-Kinasen..... | 11 |
| 1.1.4.2.1. Glykogen-Synthetase-Kinase 3..... | 12 |
| 1.1.4.2.2. Cyclin-abhängige Kinase 5 | 13 |
| 1.1.4.2.3. Mitogen-aktivierte Protein Kinasen | 14 |
| 1.1.5. Tau-Fehlfunktion..... | 15 |
| 1.2. Tauopathien | 16 |
| a) Pathologie..... | 17 |
| b) Klinik..... | 18 |
| 1.2.1. Alzheimer Demenz..... | 18 |
| 1.2.2. Progressive Supranukleäre Blickparese | 19 |
| 1.2.3. Corticobasale Degeneration | 20 |
| 1.2.4. Frontotemporale Demenz..... | 21 |
| 1.2.5. Atypisches Parkinson-Syndrom von Guadeloupe..... | 22 |
| 1.3. Ätiologie der Tauopathien | 23 |
| 1.3.1. Genetik | 23 |
| 1.3.2. Umweltfaktoren..... | 27 |
| 1.3.3. Interaktion von Genetik und Umwelt..... | 28 |
| 1.4. Ziel der Arbeit | 29 |
| 2. Materialien und Methoden | 30 |
| 2.1. Tiermodell | 30 |
| 2.1.1. Herstellung des transgenen R406W ^{+/+} -Mausmodelles..... | 30 |
| 2.1.2. Aufzucht der Versuchsmäuse..... | 30 |
| 2.2. Komplex-I-Inhibitor | 31 |
| 2.2.1. Annonacin-Gewinnung | 31 |
| 2.2.2. Annonacin-Exposition..... | 31 |
| 2.3. Gewebegewinnung | 32 |
| 2.4. Western-Blot-Analyse | 32 |
| Probenvorbereitung | 32 |
| Elektrophorese..... | 33 |
| Proteintransfer | 34 |
| Detektion von Tau und Tau-Kinasen | 34 |

| | |
|--|----|
| Auswertung | 36 |
| 2.4. Quantitative PCR | 36 |
| 2.5. Proteasomale Aktivitätsmessung | 37 |
| 2.6. Statistische Auswertung | 37 |
| 3. Ergebnisse | 38 |
| 3.1. Annonacin Toxizität | 38 |
| 3.2. Annonacin-Exposition führt zu erhöhter Menge an humanem und murinen Tau-Protein und zu einer Hemmung der proteasomalen Aktivität im Gehirn von R406W ^{+/+} transgenen Mäusen | 38 |
| 3.3. Annonacin-Exposition führt zu einem signifikanten Anstieg von unlöslichem und phosphoryliertem Tau-Protein im Hirngewebe von R406W ^{+/+} transgenen Mäusen..... | 41 |
| 3.4. Annonacin-Exposition führt zu einem Anstieg von Tau-Kinasen in R406W ^{+/+} -Mäusen..... | 43 |
| 4. Diskussion | 45 |
| 4.1.: Die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau und proteasomale Hemmung im Hirngewebe der R406W ^{+/+} -Mäuse | 45 |
| 4.2. Akkumulation von unlöslichem Tau-Protein und vermehrte Phosphorylierung von Tau durch Kinasen im Hirngewebe der R406W ^{+/+} -Mäuse nach Annonacin-Exposition..... | 47 |
| 4.3. Synergistischer Effekt von Mutation und Umweltfaktor | 50 |
| 4.4. Relevanz der Ergebnisse und Ausblick | 51 |
| 5. Zusammenfassung | 52 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 54 |
| 7. Verzeichnis der akademischen Lehrer | 80 |
| 8. Danksagung | 81 |
| 9. Ehrenwörtliche Erklärung | 82 |

Zusammenfassung

Tauopathien sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch die Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, gekennzeichnet sind. Sie stellen in Hinblick auf ihre Klinik und Ätiologie ein heterogenes Krankheitsbild dar. Die genauen Mechanismen, die zu der Entstehung der Erkrankungen führen, sind noch ungeklärt.

Eine Tauopathie, die als vorwiegend umweltbedingt gilt, kommt auf der karibischen Inselgruppe Guadeloupe vor und konnte Einblicke in die Entstehung von Tau-Pathologie zugrunde liegenden Pathomechanismen liefern. Es gibt Hinweise, dass die Entstehung dieser Tauopathie mit dem Konsum der Früchte und Blätter des dort beheimateten Baumes *Annona muricata* und dem enthaltenen Toxin Annonacin in Zusammenhang steht (Caparros-Lefebvre und Elbaz *et al.*, 1999; Champy *et al.*, 2005; Lannuzel *et al.*, 2007). Annonacin ist ein Inhibitor von Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette, der experimentell *in vitro* und *in vivo* zu neuronalem Untergang und Tau-Pathologie führt (Lannuzel *et al.*, 2003; Champy *et al.*, 2004; Escobar-Khondiker *et al.*, 2007).

Auf der anderen Seite gibt es hereditäre Tauopathien, wie die Frontotemporalen Demenzen mit Parkinsonismus und Kopplung an das Chromosom 17 (FTDP-17). Verschiedene Mutationen im *MAPT* Gen, die meist durch ein autosomal-dominantes Muster vererbt werden, führen bei dieser Gruppe zur Entstehung der typischen Tau-Pathologie.

Die bislang durchgeführten Untersuchungen konnten nicht klären, ob Annonacin die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, wie sie in Tauopathien anzutreffen ist, reproduziert und inwieweit eine genetische Veränderung des Tau-Proteins diesen Effekt begünstigt. In der vorliegenden Studie bedienen wir uns zur Lösung dieser Fragestellung des Komplex-1-Inhibitors Annonacin und eines transgenen Mausmodelles, das humanes Tau mit der R406W-Mutation überexprimiert.

Summary

Tauopathies are a pathologically defined group of neurodegenerative diseases whose hallmark is the aggregation of hyperphosphorylated tau, a microtubule-associated protein. Tauopathies represent a very heterogeneous entity with regard to their clinical picture and their etiology. The exact mechanisms that lead to the development of these diseases are unclear.

An example of an environmentally caused tauopathy is the atypical Parkinson syndrome endemic in the Caribbean island of Guadeloupe, linked to high consumption of fruits or infusion of leaves of Annonaceae species (Caparros-Lefèbvre and Elbaz *et al.*, 1999; Champy *et al.*, 2005; Lannuzel *et al.*, 2007).

Annonacin is a natural mitochondrial toxin that inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain, that was shown to cause neuronal death and tau pathology in *in vitro* and *in vivo* experiments (Lannuzel *et al.*, 2003; Champy *et al.*, 2004; Escobar-Khondiker *et al.*, 2007).

On the other hand, many mutations in the tau gene have been associated with familial cases of tauopathies, such as the frontotemporal dementias with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

Although it is widely accepted that both genetic and environmental factors are likely to contribute to the observed neurodegenerative lesions, it remains unclear how specific genetic backgrounds affect the susceptibility towards the exposure to environmental toxins. We aimed to investigate gene-environment interactions using experimental models of tau-associated neurodegeneration. We proposed to determine whether there was a pathogenic synergy between annonacin intoxication and a mutation in the tau gene that leads to FTDP-17. We used transgenic mice bearing the R406W FTDP-17 mutation to study the effects of annonacin on the tau protein.

1. Einleitung

1.1. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau

Zum Verständnis der Tauopathien soll zunächst auf die physiologischen Funktionen des Tau-Proteins eingegangen werden. Obwohl das Tau-Protein nicht ausschließlich im Hirngewebe zu finden ist, kommt es dort in hohen Konzentrationen vor und wurde zum ersten Mal aus diesem Organ isoliert (Cleveland *et al.*, 1977). Vorwiegend wird Tau dort in den Neuronen exprimiert. Es gehört zu der Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine und wird von dem Gen *MAPT* (microtubule-associated protein tau) kodiert, welches auf Chromosom 17q21 liegt. In physiologischer Form übernimmt das Tau-Protein eine Reihe an wichtigen Aufgaben. Auf der anderen Seite ist es das Protein, das durch seine pathologische Akkumulation die häufigste Ursache für neurodegenerative Erkrankungen im Menschen ist (Goedert *et al.*, 2011).

1.1.1. Aufbau

Das Tau-Protein kann in sechs verschiedenen Isoformen mit einer Länge zwischen 352 und 441 Aminosäuren vorliegen, welche durch alternatives Spleißen von insgesamt elf der 16 vorhandenen Exons entstehen (Neve *et al.*, 1986). Die Tau-Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der durch die Exons 2, 3 und 10 kodierten *Inserts* und *Repeats* (Lee *et al.*, 2001). Exon 10 kodiert für ein *Repeat* aus 31 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Tau-Proteins. In Abhängigkeit davon, ob Exon 10 durch Spleißen entfernt wird oder nicht, entstehen aus der mRNA jeweils Isoformen mit drei *Repeats* oder Isoformen mit vier *Repeats* (3R oder 4R Tau). Durch das alternative Spleißen von Exons 2 und 3 entstehen Isoformen ohne, mit einem oder mit zwei *Inserts* aus 29 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Tau-Proteins (0N, 1N, und 2N Tau). Zwischen dem N-terminalen und dem C-terminalen Ende befindet sich eine Prolin-reiche Region, die Ansatzpunkt vieler Tau-Kinasen ist (Hanger und Noble, 2011). Die Tau-Isoformen werden nach ihrer Anzahl an Aminosäure-*Repeats* (R) und *Inserts* (N) benannt: R3N0, R3N1, R3N2, R4N0, R4N1, und R4N2 (Himmler *et al.*, 1989; Kosik *et al.*, 1989; Goedert *et al.*, 1989). Im Hirngewebe eines gesunden erwachsenen Menschen besteht normalerweise ein ausgeglichenes Verhältnis der 3R zu den 4R Tau-Isoformen von 1:1. Etwa 54% machen dabei die Isoformen mit einem Aminosäure-*Insert* (1N), 37% mit keinem Insert (0N), und 9% mit zwei Inserts (2N) aus (Goedert und Jakes; 1990). Das Tau-Protein ist normalerweise ein im hohen Maße lösliches Protein, das in Lösung eine ungefaltete Konformation annimmt (von Bergen *et al.*, 2000). Es ist

hydrophil und hitzestabil (Goedert *et al.*, 1991). In der nachfolgenden Abbildung 1 ist der Aufbau von Tau auf mRNA- und auf Protein-Ebene grafisch dargestellt.

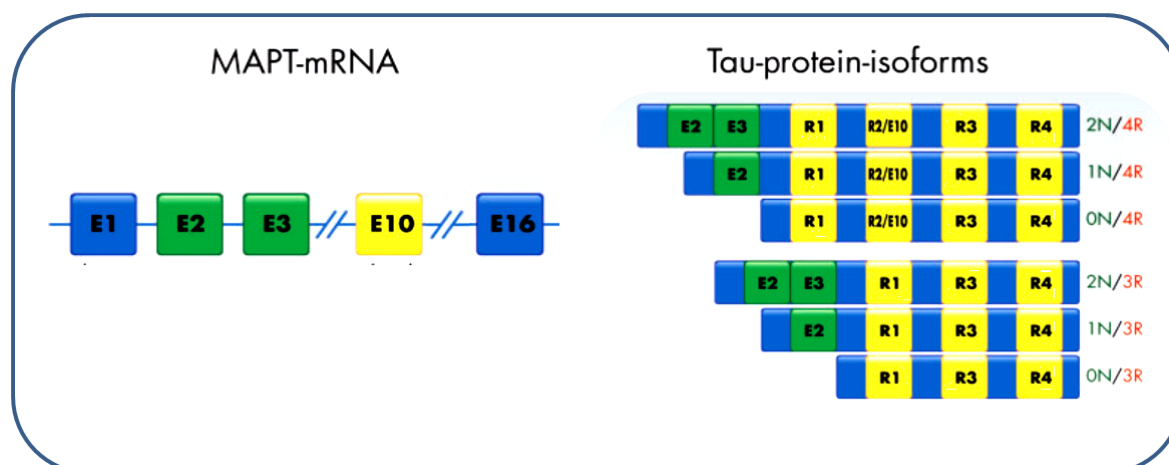


Abbildung 1: Darstellung der Tau mRNA und der sechs Tau-Isoformen. Die linke Graphik zeigt die Struktur der mRNA von Tau: die konstitutiven Exons sind als blaue, die alternativ gespleißten Exons als grüne und gelbe Kästen abgebildet. Die rechte Graphik zeigt die sechs Tau-Isoformen des menschlichen Gehirns, die durch das alternative Spleißen der Exons 2,3 und 10 entstehen. Sie unterscheiden sich u.a. durch ihre Anzahl an Repeats R1-4 (gelb). Das alternative Spleißen von Exon 10 bestimmt, ob eine 3R (E10-) oder eine 4R (E10+) Isoform entsteht. Durch das alternative Spleißen der Exons 2 und 3 wird die Anzahl von Aminosäuresequenzen N0, N1 oder N2 (grün) bestimmt (aus: Stamelou *et al.*, 2010).

1.1.2. Abbau

Für den Erhalt einer Zelle ist das Gleichgewicht zwischen Synthese- und Abbauprozessen von entscheidender Bedeutung. Um überschüssige oder beschädigte Proteine abzubauen, benutzen Zellen zwei Hauptmechanismen: Die Verdauung durch proteolytische Enzyme innerhalb von Lysosomen und den Abbau über das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System. Beim Abbau von Tau scheint der lysosomale Weg untergeordnet zu sein und das Ubiquitin-System im Vordergrund zu stehen (David *et al.*, 2002; Goldbaum *et al.*, 2003; Oddo *et al.*, 2004).

Die post-translationale Konjugation von Proteinen mit Ubiquitinketten wird als Ubiquitinierung bezeichnet. Je nach Anzahl der verbundenen Ubiquitin-Moleküle unterscheidet man zwischen einer Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung. Am besten bekannt ist Ubiquitin in der Rolle eines Degradationssignals. Durch die Ubiquitinierung werden normalerweise fehlgefaltete

oder beschädigte Proteine für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System markiert. Das Proteasom ist ein Multi-Protein-Komplex und enthält einen katalytisch aktiven Kern-Komplex, das 20S-Proteasom. Hier werden ubiquinierte Proteine durch Chymotrypsin (CT)-ähnliche Aktivität, Trypsin (T)-ähnliche Aktivität und Peptidylglutamyl-Peptid Hydrolase (PGPH)-Aktivität prozessiert (Orlowski und Wilk, 2000; Groll *et al.*, 1997). Viele Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass das Ubiquitin-Proteasom-System bei der Degradation von Tau eine wichtige Rolle spielt. *In vitro* konnte der Abbau des Tau-Proteins durch das 20S-Proteasom gezeigt werden (David *et al.*, 2002; Poppek *et al.*, 2006). Es gibt Hinweise, dass die Hemmung des proteasomalen Abbaus in der Entstehung von manchen Tau-Pathologien involviert ist und die Akkumulation von Tau Protein durch einen Defekt oder eine Hemmung des Proteasoms verursacht wird. So konnte nachgewiesen werden, dass die Proteasom-Aktivität im post-mortem Gehirn von Patienten mit Alzheimer Demenz (AD) im Vergleich zu gesunden Patienten reduziert ist (Keller *et al.*, 2000; Keck *et al.*, 2003) und dass das aggregiertes Tau *in vitro* die proteasomale Funktion hemmt. Weiterhin (Keck *et al.*, 2003; Poppek *et al.*, 2006) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Tau-Phosphorylierung den Abbauprozess durch das 20S-Proteasom signifikant vermindert. Aber auch nicht-proteasomale Proteasen wie Cathepsin-D (Kenessey *et al.*, 1997) und Caspasen (Canu *et al.*, 1998) sowie Calpain 1 (Yen *et al.*, 1999) führten *in vitro* zu einer Degradierung des Tau-Proteins.

1.1.3. Funktion

Tau spielt als häufigster Vertreter der Mikrotubuli-assoziierten Proteine eine wichtige Rolle bei dem Auf- und Abbau und bei der Stabilisierung der Mikrotubuli, den intrazellulären „Schienen“ für insbesondere axonale Transportprozesse (Fellous *et al.*, 1977). Der dynamische Auf- und Abbau der Mikrotubuli aus Tubulin-Monomeren ist für die Entwicklung und Funktion von Nervenzellen unabdingbar. Hierdurch wird das axonale Wachstum während der Entwicklung gefördert, die axonale Struktur bewahrt, sowie der axonale Transport in der reifen Nervenzelle unterhalten (Esmaeli-Asad *et al.*, 1994). Durch die Expression der verschiedenen Tau-Isoformen und durch den Grad der Phosphorylierung des Proteins wird Tau in seiner Funktion und seiner Bindeaffinität zu den Mikrotubuli reguliert. Physiologischerweise befindet sich das Tau-Protein vor allem in den Axonen der Nervenzelle und nur zu einem kleinen Anteil auch im Somabereich oder den Dendriten (Binder *et al.*, 1985). Die *Repeat*-Regionen des Tau-Proteins binden zusammen mit einigen benachbarten Sequenzen an β -Tubulin und fungieren so als Mikrotubuli-

bindende Domänen. Die Tau-Isoformen mit vier *Repeats* haben eine höhere Affinität zu den Mikrotubuli als diejenigen mit nur drei *Repeats* (Lee *et al.*, 1989; Hutton *et al.*, 1998). Die Funktion der *Inserts* des Tau-Proteins ist bislang unbekannt.

1.1.4. Tau Phosphorylierung

Das Tau-Protein kann posttranslational modifiziert werden. Dabei spielen Vorgänge wie Ubiquitinierung, Polyaminierung, Nitrierung, Proteolyse, Glykosylierung und die Phosphorylierung eine Rolle. Auf die Phosphorylierung soll hier näher eingegangen werden, da dieser Vorgang mit der Entstehung von Taupathologien in Zusammenhang gebracht wurde.

Durch die Phosphorylierung von Tau wird dessen Funktion in hohem Maße beeinflusst. Tau ist ein Phospho-Protein, das normalerweise 2-3 Mol Phosphat pro Mol Tau-Protein enthält (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992; Köpke *et al.*, 1993; Kenessey und Yen, 1993). Das Tau-Protein kann an mindestens 80 Stellen phosphoryliert werden, wobei die Aminosäuren Serin und Threonin die spezifischen Bindungspartner sind (Hanger und Noble, 2011). Einige dieser Stellen konnten nur in pathologischen Tau-Aggregaten, nicht aber in gesunden Nervenzellen im phosphorylierten Zustand gefunden werden. Dazu gehören z.B. die Aminosäurestellen Thr212/Ser214, Thr231/Ser235 (Hoffmann *et al.*, 1997) und Ser422 (Bussiere *et al.*, 1999). Der Phosphorylierungsstatus des Tau Proteins ist das Ergebnis eines gemeinsamen Wirkens von Kinasen und Phosphatasen (Iqbal *et al.*, 2009).

1.1.4.1. Tau Phosphatasen

Dephosphoryliert werden kann das Tau-Protein von den meisten Protein-Phosphatasen (Avila *et al.*, 2004; Buée *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2002). Im Gehirn kommen die Protein-Phosphatasen (PP) 1, 2A, 2B und 2C vor. Die Phosphatase PP2A scheint bei der Dephosphorylierung von Tau die wichtigste Rolle zu spielen (Goedert *et al.*, 1995; Kins *et al.*, 2001). Die Hemmung der PP1 und PP2A und PP2B konnte in Mäusen eine Phosphorylierung von Tau an bestimmten Aminosäuresequenzen in Mäusen hervorrufen (Sun *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung von Tau findet größtenteils an Aminosäuren im Bereich der *Repeat*-Domänen des Tau-Proteins statt (Mandelkow *et al.*, 1995) und hat einen negativen Einfluss auf die Bindungs-Affinität von Tau zu den Mikrotubuli (Lee *et al.*, 2001). Eine Hyperphosphorylierung bezeichnet eine über das normale Maß hinausgehende Phosphorylierung des Tau-Proteins. In bestimmten physiologischen Konstellationen kann eine reversible Hyperphosphorylierung

auftreten. Beispiele sind die neuronale Differenzierung und die axonale Ausbildung (Combs *et al.*, 1998; Pope *et al.*, 1993). Aber auch durch einen verminderten Stoffwechsel, etwa bei Hypothermie während einer Anästhesie sowie während des Winterschlafes konnte eine reversible Tau-Hyperphosphorylierung im Tiermodell beobachtet werden. Hier wird eine kurzzeitige Reduktion der PP2A vermutet (Planel *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2008).

1.1.4.2. Tau-Kinasen

Das Tau Protein besitzt Phosphorylierungs-Stellen für eine große Anzahl von Protein-Kinasen. Dazu gehören u.a. die Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3), die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5), die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK/ERK), die Stress-aktivierten Protein Kinasen (SAPK/JNK), p38 Kinasen, Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaM Kinase II) und Casein Kinasen. Alle diese Kinasen können Tau *in vitro* phosphorylieren (Ferrer *et al.*, 2003). An der Phosphorylierung von Tau sind vor allem Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen beteiligt, die Tau an bestimmten Serin- und Threonin-Stellen v.a. im Bereich der Repeat-Region mit den Mikrotubuli-Bindungsstellen am C-terminalen Ende des Proteins phosphorylieren können. Tau-Kinasen wurden auch in Tau-Aggregaten von Patienten mit Tauopathien immunhistochemisch nachgewiesen (Ferrer *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 1998; Pei *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Daher wird davon ausgegangen, dass Tau-Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tauopathien spielen (Ferrer *et al.*, 2003). Leider finden sich bislang wenige Studien, die sich mit der Rolle der Tau-Kinasen *in vivo* beschäftigen haben. Die Erforschung der Tau Kinasen mittels *in vitro* Modellen kann das komplexe Zusammenspiel der Kinasen *in vivo* nicht widerspiegeln. Angenommen werden hierarchisch geordnete Phosphorylierungs-Prozesse, während derer Tau von einer Kinase für die jeweils folgende Kinase markiert wird (Li *et al.*, 2006). Zudem wurden viele *in vitro* Experimente in nicht-neuronalen Zellen durchgeführt. Kinase-Inhibitoren sind derzeit ein Ansatzpunkt klinischer Studien für Tauopathien (Medina und Castro, 2008; Höglinger *et al.*, eingereicht). Tabelle 1 verschafft einen Überblick über einige Tau-Kinasen und ihre Phosphorylierungsstellen. In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigsten Tau-Kinasen vorgestellt werden.

| | T | S | T | T | T | T | S | S | S | S | S | S | T | S | S | T | S | T | T | S | T | S | S | S | S | S | S | S | S | T | T | S | S | S | S | S | S | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|--|---|--|--|
| | 39 | 46 | 50 | 69 | 63 | 175 | 181 | 184 | 185 | 185 | 188 | 189 | 202 | 205 | 208 | 210 | 212 | 214 | 217 | 231 | 235 | 237 | 245 | 268 | 262 | 285 | 283 | 305 | 320 | 324 | 352 | 356 | 361 | 377 | 396 | 400 | 403 | 404 | 409 | 412 | 413 | 416 | | | | | | | |
| PHFs Tau | | | | | | X | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X | | | | | | | | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| CaMkII | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | X | | | | |
| Casein kinase I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | |
| Casein kinase II | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| Cdc2 | | | X | | | | | | X | | | | X | X | | X | | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| Cdk2 | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | |
| Cdk5 | | | | | X | | | | X | | | X | X | | | X | X | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| DYRK | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MAPK (Erk1/2) | | X | X | X | X | X | | | | | | X | X | | | X | | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | |
| GSK3 α | | | | | | | X | | | | X | X | | | X | | X | X | X | | | | | X | | | | | X | X | | | | | | X | | | | | | | | | | | X | | |
| GSK3 β | | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | | | | | | | |
| MARK | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | X | X | X | X | | | | | X | | | | | | | | | | | | | |
| PKA | | | | | | | | X | X | | X | X | | | X | X | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | X | | | | X | | |
| PKB/AKT | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PKC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | X | X | X | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| PKN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | |
| pk35/41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | X | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | | |
| Phosphorylase kinase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | X | X | | X | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SAPK1g/JNK | | | | | X | X | X | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | | | | | | | | |
| SAPK2a/P38 α | | X | | X | X | X | X | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | | | | | | | | |
| SAPK2b/P38 β | | X | | X | X | X | X | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | | | | | | | | |
| SAPK3P38 δ | | X | | X | X | X | X | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | | | | | | | | |
| SAPK4 | | | | | X | X | | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | X | | | | | | | | |
| Tau tubulin kinase | | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHFs Kinase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 1: Tau-Kinasen und ihre jeweiligen Phosphorylierungsstellen. Die aufgeführten Kinasen phosphorylieren Tau an einer oder mehreren durch ein ‚X‘ gekennzeichneten Threonin (T) oder Serin (S)-Stellen, deren Position in der Aminosäure-Sequenz des Tau Proteins (längste Isoform) mit der entsprechenden Zahl angegeben ist (aus: <http://www.alzheimer-adna.com/Images/TablePhosphoTau.gif>)

1.1.4.2.1. Glykogen-Synthetase-Kinase 3

Vor allem die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) scheint in der physiologischen Phosphorylierung von Tau, aber auch in der Pathogenese vieler Tauopathien eine wichtige Rolle zu spielen (Ishiguro *et al.*, 1993). Sie gehört, wie die meisten Tau-Kinasen, zu den Prolin-gerichteten Serin/Threonin Kinasen. Es existieren zwei Isoformen, die GSK-3alpha und GSK-3beta. Sie werden durch verschiedene Gene auf unterschiedlichen Chromosom (Chromosom 19 und 3) kodiert. Ihre Funktionen sind von ihrem spezifischen Phosphorylierungsstatus an Threonin- und Serin-Residuen abhängig. GSK-3alpha wird durch Phosphorylierung an Serin 21 (Ser21), GSK-3beta durch eine Phosphorylierung an Serin 9 (Ser9) inaktiviert. Die Phosphorylierung von GSK-3alpha und beta an den Tyrosin-Stellen Tyr279 und Tyr216 dient der Aktivierung (Hanger und Noble, 2011).

Mehrere Studiendaten lassen vermuten, dass die Isoform GSK-3beta eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Tauopathien spielt:

- Mehrere Studien konnten zeigen, dass GSK-3beta in Neuronen exprimiert wird und *in vitro* eine Tau-Phosphorylierung hervorrufen kann (Cohen und Frames, 2001; Flaherty *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003).
- Die von der GSK-3beta bedienten Tau-Epitope finden sich im aggregierten Tau in Alzheimer Demenz (AD), Pick Krankheit (PiD), Progressiver Supranukleärer Blickparese (PSP) und Corticobasaler Degeneration (CBD) phosphoryliert (Hanger *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 2001).
- Die aktivierte Form der GSK-3beta(Tyr216) konnte in Assoziation mit Tau-Pathologie im Gehirn von AD Patienten vermehrt nachgewiesen werden (Leroy *et al.*, 2002).
- Erhöhte GSK-3beta-Spiegel konnten in Neuronen und Gliazellen mit intrazellulären Tau-Aggregaten in AD, PiD, PSP und CBD beobachtet werden (Ferrer *et al.*, 2001).
- In transgenen Mäusen, die GSK-3beta überexprimieren, konnte eine Tau-Hyperphosphorylierung und eine somato-dendritische Lokalisation von Tau reproduziert werden, wie sie für Tauopathien typisch ist (Lucas *et al.*, 2001).
- Die Hemmung von GSK-3beta konnte im Tiermodell eine Hyperphosphorylierung von Tau verhindern (Serenio *et al.*, 2009; Muñoz-Montano *et al.*, 1997).
- Der GSK-3beta-Inhibitor Tideglusib führte im Rahmen einer klinischen Phase II Studie in PSP-Patienten - über ein Jahr angewendet - zu einer verminderten zerebralen Atrophierate im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten (Höglinger *et al.*, eingereicht).

1.1.4.2.2. Cyclin-abhängige Kinase 5

Für die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) wird aufgrund einer Reihe von Studienergebnissen ebenfalls vermutet, an der Entstehung von Tau-Pathologie beteiligt zu sein. Cdk5 wird vornehmlich in Nervenzellen exprimiert. Die Aktivität von Cdk5 wird durch die Abundanz seiner Regulatoren, insbesondere p35 und dessen Spaltprodukt p25, bestimmt. p35 wirkt als physiologischer Aktivator der Cdk5 (Hallows *et al.*, 2003). Eine vermehrte Bereitstellung von p25 führt zu einer Überaktivierung von Cdk5 und wurde mit einer pathologischen Hyperphosphorylierung von Tau in Verbindung gebracht (Lee *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2004;

Noble *et al.*, 2003; Cheung und Ip, 2012). P35 wird dafür durch Calpain proteolytisch zu p25 gespalten. Ein erhöhtes Verhältnis von p25 zu p35 führt zur Cdk5 Aktivierung und wird mit neuronalem Zelltod und Neuropathologie assoziiert gefunden (Patrick *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2000; Plattner *et al.*, 2006). Die Cdk5 steht, ebenso wie die GSK-3, im Zentrum mehrerer *in vitro* und *in vivo* Studien zu Tauopathien. Es konnten bisher folgende Zusammenhänge gezeigt werden:

- Die Epitope, an denen Cdk5 das Tau-Protein phosphoryliert, überschneiden sich größtenteils mit denen der GSK-3 und sind demnach ebenso in aggregiertem Tau von AD-, PiD-, PSP- und CBD-Patienten phosphoryliert (Hanger *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 2001).
- Cdk5 führt zu einer Tau-Phosphorylierung *in vitro* (Baumann *et al.*, 1993).
- Im Maus-Modell konnte eine Überexpression von p25 zu einer vermehrten Aktivität von Cdk5 und die Hyperphosphorylierung von Tau führen (Cruz *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2003; Cheung und Ip, 2012).
- Im Hirngewebe von AD-Patienten konnte ein erhöhter p25/p35-Quotient nachgewiesen werden (Tseng *et al.*, 2002).
- Eine Phosphorylierung durch Cdk5 kann eine anschließende Phosphorylierung von Tau durch GSK-3beta verstärken (Sengupta *et al.*, 1997).

1.1.4.2.3. Mitogen-aktivierte Protein Kinasen

Zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPKs) gehören u.a. die *extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1 und ERK2)*. Diese können ebenfalls Tau phosphorylieren (Reynolds *et al.*, 2000) und sind mit Tau-Aggregaten in Tauopathien assoziiert (Ferrer *et al.*, 2001). MAPKs werden durch Phosphorylierung aktiviert. In bestimmten pathologischen Bedingungen unterscheidet sich die Menge an nicht phosphorylierten MAPKs nicht von Kontrollen, während die Spiegel von aktivierten MAPK/ERK1 und MAPK/ERK2 (Tyr204-phosphoryliert) in AD, PiD, PSP und CBD deutlich erhöht sind (Ferrer *et al.*, 2001). Ebenfalls zu den MAPKs ist die *Stress-aktivierte Protein Kinase/Jun-Amino-terminale Kinase (SAPK/JNK)* zu rechnen. *In vitro* kann SAPK/JNK das Tau-Protein an vielen Epitopen phosphorylieren (Goedert *et al.* 1997; Reynolds *et al.* 1997). Die aktivierte Form SAPK/JNK-P (Tyr183/185-

phosphoryliert) konnte in Tau-Aggregaten von Tauopathie-Hirngewebe vermehrt nachgewiesen werden (Zhu *et al.* 2001; Ferrer *et al.* 2001). Die SAPK/JNKs sollen insbesondere durch oxidativen Stress, UV-Strahlung, pro-inflammatorische Zytokine und bestimmte Mitogene aktiviert werden (Su und Karin 1996; Minden und Karin 1997).

1.1.5. Tau-Fehlfunktion

Unter physiologischen Bedingungen bindet Tau an die Mikrotubuli, reguliert ihre Wachstumsdynamik, stabilisiert sie und organisiert sie zu Mikrotubuli-Bündeln. In den Nervenzellen trägt Tau durch seine Interaktion mit den Mikrotubuli daher wesentlich zu der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und des axonalen Transports bei (s. Kapitel 1.1.3). Eine pathologische Hyperphosphorylierung von Tau durch Kinasen (Alonso *et al.*, 1994; Lindwall und Cole, 1984) oder bestimmte Mutationen im *MAPT* Gen (Hong *et al.*, 1998; Gasparini *et al.*, 2007) führen zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit des Tau-Proteins an die Mikrotubuli. Es kommt zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli und damit zu ihrem Funktionsverlust. Das ungebundene, hyperphosphorylierte Tau neigt zur Bildung von unlöslichen Polymeren. So entstehen unlösliche Tau-Aggregate, die sich im Zytoplasma ablagern. Untersuchungen in neuronaler Zellkultur und im Mausmodell konnten zeigen, dass Tau-Aggregate unmittelbar zytotoxisch wirken, wobei insbesondere ein apoptotischer Mechanismus durch Caspase-Aktivierung diskutiert wird (Khlistunova *et al.*, 2006; Messing *et al.*, 2012; Mocanu *et al.*, 2008). Sowohl der Funktionsverlust der Mikrotubuli durch die Ablösung des Tau-Proteins als auch die direkte Toxizität der Tau-Aggregate werden für die neuronale Dysfunktion und den Zelltod in Tauopathien verantwortlich gemacht (Stamelou *et al.*, 2010). Basierend auf diesen pathophysiologischen Mechanismen lassen sich kausale Therapiestrategien für Tauopathien entwickeln. So werden derzeit Kinase-Inhibitoren, Mikrotubuli-Stabilisatoren und Inhibitoren der Tau-Aggregation im Mausmodell und zum Teil bereits in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft (Mullane und Williams, 2013). Abbildung 2 gibt eine schematische Übersicht über das beschriebene Konzept der Tau-Fehlfunktion.

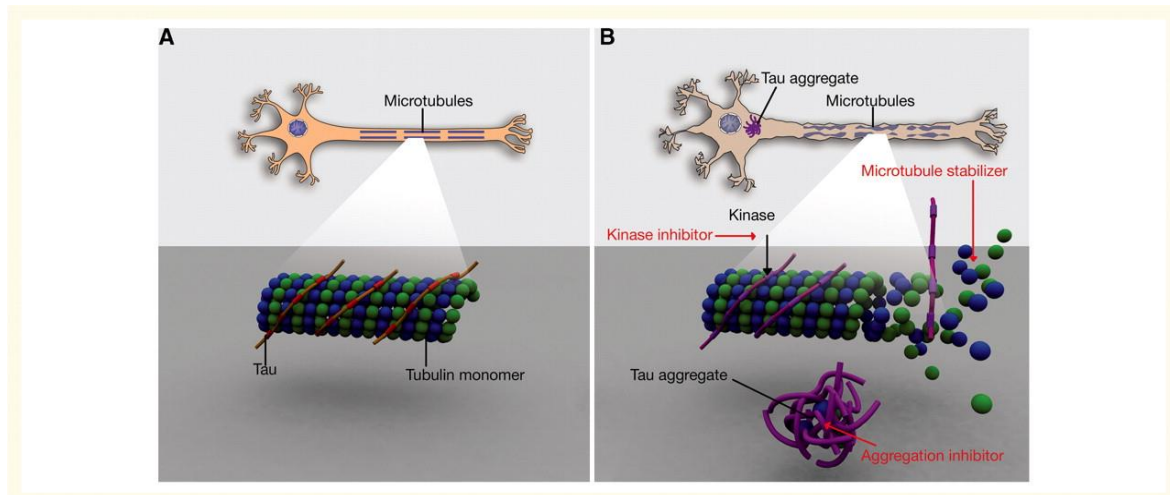


Abbildung 2: Das pathophysiologische Konzept der Tau-Fehlfunktion:

A) Unter physiologischen Bedingungen bindet das nicht-phosphorylierte Tau (rot) an die Mikrotubuli (blau und grün) und stabilisiert sie.

B) Unter pathologischen Bedingungen wird Tau durch Kinasen hyperphosphoryliert (lila) und löst sich von den Mikrotubuli. Das ungebundene Tau bildet toxische Aggregate. Mikrotubuli depolymerisieren zu Tubulin-Monomeren und verlieren ihre Funktion. Mikrotubuli-Stabilisatoren, Kinase-Inhibitoren und Inhibitoren der Tau-Aggregation sind mögliche therapeutische Ansatzpunkte.

Aus Stamelou *et al.*, 2010.

1.2. Tauopathien

Als Tauopathien werden neurodegenerative Erkrankungen bezeichnet, die durch intrazelluläre Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein gekennzeichnet sind (Lee *et al.*, 2001; Ballatore *et al.*, 2007). Sie sind in Bezug auf ihre klinische Manifestation, Degenerationsmuster, und Ätiologie eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Erkrankungen, die mit Ablagerungen von Tau-Protein assoziiert sind. Die wichtigsten Tauopathien sollen in der Folge kurz vorgestellt werden, um einen Überblick über die klinische und pathologische Variabilität zu geben.

| |
|--|
| Alzheimer Demenz |
| Amyotrophe Lateralsklerose/Parkinson-Demenz Komplex |
| Silberkornkrankheit |
| Chronische traumatische Enzephalopathie |
| Corticobasale Degeneration |
| Diffuse Alzheimer-Fibrillen mit Kalzifizierung |
| Down-Syndrom |
| Familiäre Britische Demenz |
| Familiäre Dänische Demenz |
| Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus und Kopplung an das Chromosom 17 und Assoziation mit Tau |
| Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrom |
| Atypisches Parkinson-Syndrom auf Guadeloupe |
| Myotone Dystrophie |
| Niemann–Pick-Krankheit Typ C |
| Motoneuronerkrankung mit Neurofibrillen außerhalb von Guam |
| Pantothen-Kinase assoziierte Neurodegeneration |
| Pick Krankheit |
| Postenzephalitisches Parkinson-Syndrom |
| Spongiforme Enzephalopathie |
| Progressive subcorticale Gliose |
| Progressive Supranukleäre Blickparese |
| X-chromosomale mentale Retardierung Typ Christianson |
| Subakute sklerosierende Panenzephalitis |
| Senile Demenz mit tangles |
| Tauopathie der weißen Substanz mit globulären Einschlüssen |

Tabelle 2: Erkrankungen mit pathologischen Ablagerungen von Tau-Protein (aus: Goedert *et al.*, 2011).

a) Pathologie

Allen Tauopathien gemeinsam sind die prominenten intrazerebralen Tau-Aggregate, die in verschiedenen Zell-Typen vorkommen und sich im biochemischen Aufbau unterscheiden können. Die Tau-Aggregate werden nach ihrer Lokalisation und ihrem Erscheinungsbild unterschiedlich benannt (Lee *et al.*, 2001). Neurofibrilläre Tangles (NFTs) finden sich intraneuronal im Perikaryon und in den proximalen Neuriten. Sie sind irregulär begrenzt und färben sich unterschiedlich intensiv mit Silber. Zudem finden sich Vorstufen der NFTs, die „Pre-Tangles“ genannt werden und ein somato-dendritisches Verteilungsmuster in der Nervenzelle zeigen (Baner *et al.*, 1989). „Pick bodies“ sind runde oder ovale Einschlüsse mit homogener und intensiver Agrophilie. „Neuropil Threads“ sind Tau-Ablagerungen in Neuriten. Als „Coiled

bodies“ werden Komma-förmige Tau-Aggregate bezeichnet, die typischerweise in Oligodendrozyten zu finden sind. „Astrozytäre Tuffs“ sind durch eine intensive, den gesamten Astrozyten betreffende Tau-positive Färbung gekennzeichnet. Alle Ablagerungen bestehen aus Tau-Filamenten, die entweder aus „straight filaments“ (SF) oder aus „paired helical filaments“ (PHF) aufgebaut sind. Das akkumulierte Tau-Protein unterscheidet sich je nach Tauopathie zusätzlich durch die vorherrschenden Tau-Isoformen (s.u.). Das topographische Verteilungsmuster der von der Neurodegeneration betroffenen Hirnareale variiert ebenfalls (Hanger *et al.*, 2009).

b) Klinik

Die klinische Symptomatik von Tauopathien ist sehr variabel. Es treten sowohl kognitive als auch motorische Defizite auf. Gemeinsam sind ihnen der progrediente Verlauf und der Mangel an kausalen und meist auch an symptomatischen Therapiemöglichkeiten. Nachfolgend werden die Charakteristika der für das Verständnis dieser Arbeit relevanten Tauopathien zusammengefasst.

1.2.1. Alzheimer Demenz

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste Ursache für Demenz bei Menschen älter als 65 Jahre (Rocca *et al.*, 1991). Sie ist durch fortschreitende mnestiche Defizite sowie neuropsychiatrische Veränderungen und Verhaltens- und Sprachstörungen gekennzeichnet (Cummings *et al.*, 2004). Die klinische Diagnose wird üblicherweise mit Hilfe der durch die National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) erarbeiteten Kriterien gestellt (McKhann *et al.*, 2011). Die Prävalenz steigt mit dem Lebensalter und liegt in Westeuropa bei 5-6/100 Einwohnern über dem 65. Lebensjahr (Ferri *et al.*, 2005).

Im Hirngewebe von AD-Patienten kommt Tau sowohl als PHF- als auch SF-Tau vor, welches größtenteils intraneuronal, aber auch in Gliazellen zu finden ist (Berry *et al.*, 2001). Die 3R und 4R Tau-Isoformen kommen in der AD in etwa gleichen Anteilen vor (Goedert *et al.*, 1994). Zudem finden sich „senile Plaques“, die aus extrazellulären Ablagerungen des Proteins beta-Amyloid bestehen. Das Vorkommen von intrazerebralen Aggregaten beider Proteine ist Voraussetzung für die neuropathologische Diagnosestellung der AD (Hyman und Trojanowski, 1997). Makroskopisch zeigt sich eine temporo-parietal betonte Hirnatrophie (Hyman und Trojanowski, 1997). Die funktionelle Beziehung zwischen beta-Amyloid und Tau ist bislang ungeklärt. Jedoch wird angenommen, dass bei der AD die intrazelluläre Ablagerung von beta-

Amyloid den ersten Schritt in der Pathogenese darstellt, während die Tau-Pathologie durch Störungen in Bildung und Abtransport von Amyloid erklärt wird (Agorogiannis *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2004). Daher wird die AD auch häufig als sekundäre Tauopathie bezeichnet. AD stellt die am intensivsten erforschte Tauopathie dar.

1.2.2. Progressive Supranukleäre Blickparese

Die Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP) wird zu den atypischen Parkinson-Syndromen gerechnet. Klinisch zeigt sich typischerweise ein akinetisch-rigides Syndrom, begleitet von prominenter posturaler Instabilität mit Stürzen und Störungen der Okulomotorik. Desweiteren kommt es häufig zu Veränderungen der Persönlichkeit und des Verhaltens (Richardson *et al.*, 1963). Die klassische Verlaufsform der PSP wird mittlerweile nach dem Erstbeschreiber als Richardson-Syndrom (PSP-RS) bezeichnet im Gegensatz zu den kürzlich beschriebenen atypischen Manifestationen von PSP (Williams *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007; Donker Kaat *et al.*, 2007; Josephs und Duffy, 2008).

Die klinische Diagnose wird gemeinhin anhand der sog. NINDS-SPSP Kriterien (National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Society for PSP) gestellt (Litvan *et al.*, 1996; Respondek *et al.*, 2013).

Die Prävalenz liegt bei 5 – 6/100.000 Einwohner, das mittlere Erkrankungsalter bei 63 Jahren und die mittlere Lebenserwartung bei 5,6 Jahren (Schrag *et al.*, 1999; Nath *et al.*, 2001).

PSP ist neuropathologisch gekennzeichnet durch intraneuronale und intragliale Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau in Form von SFs. Sie sind als NFTs und „Neuropil Threads“ meist in den Basalganglien, dem Pons, dem oculomotorischen Komplex, sowie in der Medulla oblongata zu finden (Hauw *et al.* 1994). Glia-Zell-Pathologien, insbesondere die „astrozytären Tuffs“, in Abwesenheit von beta-Amyloid Plaques sind ein pathognomonisches neuropathologisches Merkmal der PSP (Bergeron *et al.*, 1997). Assoziiert mit der Tau-Pathologie findet sich Gliose und Nervenzellverlust sowie gelegentlich granulo-vakuoläre oder ballonierete argyrophile neuronale Degeneration (Hauw *et al.*, 1994; Jellinger *et al.*, 1995). In der PSP akkumuliert vorwiegend das sogenannte 4-Repeat-Tau, welches im Western-Blot Proteinbanden bei 64 und 68 kD verursacht (Flament *et al.*, 1991; Vermersch *et al.*, 1994). Die neuropathologische Diagnose wird anhand der NINDS-Kriterien gestellt (Hauw *et al.* 1994).

1.2.3. Corticobasale Degeneration

Bei der Corticobasalen Degeneration (CBD) zeigen sich klinisch meist eine akinetisch-rigide Symptomatik in Kombination mit anderen extrapyramidalen Bewegungsstörungen wie Dystonie und Aktions-Myoklonus mit einer markant asymmetrischen Manifestation, sowie Zeichen einer fokal-akzentuierten kortikalen Dysfunktion (v.a. Apraxie (ca. 80%), Alien-Limb Phänomen (ca. 40%), kortikaler Sensibilitätsverlust (ca. 30%)) und Pyramidenbahnschädigung. Des Weiteren kann es zu Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen kommen (Kompoliti *et al.*, 1998; Mahapatra *et al.*, 2004). Nach den kürzlich veröffentlichten Konsensuskriterien (Armstrong *et al.*, 2013) erfordert die klinische Diagnose einer wahrscheinlichen CBD die asymmetrische Präsentation von mindestens zwei der folgenden Symptome: a) Extremitäten-Rigor oder -Akinese, b) Extremitäten-Dystonie und c) Extremitäten-Myoklonus sowie die Anwesenheit von mindestens zwei der folgenden Symptome: d) orobuccale oder Extremitäten-Apraxie, e) kortikaler Sensibilitätsverlust, f) „Alien limb“-Phänomen. Zusätzlich ist die Diagnose einer wahrscheinlichen CBD bei Anwesenheit mindestens einer der letzteren Symptome (a-f) und einer Primär-progressiven nicht-flüssigen Aphasie oder einem Frontalhirnsyndrom möglich.

Die CBD ist eine sehr seltene Erkrankung. Es wird eine Prävalenz von unter 1/100.000 vermutet (Togasaki und Tanner 2000).

Wie auch die PSP, weist die CBD pathologisch intraneuronale und intragliale Aggregate bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau in Abwesenheit von beta-Amyloid Plaques auf. Die Tau-Aggregate bestehen sowohl aus PHFs als auch aus SFs. Sie sind in großer Anzahl in der grauen und weißen Substanz zu finden (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994, Komori, 1999). Charakteristisch sind die sogenannten astrozytären Plaques und oligodendroglialen „coiled bodies“. Hauptsächlich findet sich die Tau-Pathologie kortikal im Gyrus frontalis superior, Gyrus parietalis superior, im Gyrus prä- und postcentralis sowie im Nucleus caudatus und Putamen. Es kommt zum Zellverlust im Kortex und in der Substantia nigra. Makroskopisch zeigt sich dabei meist eine markant asymmetrisches Atrophiemuster (Dickson *et al.*, 2002). In der CBD akkumuliert vorwiegend das sogenannte 4-Repeat-Tau (Flament *et al.*, 1991; Vermersch *et al.*, 1994). Die neuropathologische Diagnosestellung erfolgt anhand der durch das „Office of Rare Diseases“ aufgestellten diagnostischen Kriterien für die Corticobasale Degeneration (Dickson *et al.*, 2002).

1.2.4. Frontotemporale Demenz

Der Überbegriff Frontotemporale Demenz (FTD) fasst eine Gruppe von heterogenen klinischen und neuropathologischen Phänotypen zusammen, welche jedoch alle durch Veränderungen im Verhalten und der Persönlichkeit sowie Sprachstörungen gekennzeichnet sind. Die klinische Diagnosestellung der FTD erfolgt anhand der Lund-Manchester-Kriterien (Brun *et al.*, 1994). Diese unterscheiden drei phänotypische Varianten der FTD, die heute als behavioral variant FTD (bvFTD), semantische Demenz (SD) und primär progressive Aphasie (PPA) bezeichnet werden. Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit der in Vordergrund stehenden Symptomatik. Das Erkrankungsalter ist sehr variabel. Die Prävalenz der FTD wird unterschiedlich beschrieben und variiert zwischen 2-3/100.000 Einwohnern in einer niederländischen Studie (Rosso *et al.*, 2003) und 15/100.000 Einwohnern <65. Lebensjahr in einer britischen Studie (Mercy *et al.*, 2008).

Der Begriff FTD steht auch pathologisch für eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen. Namensgebend sind der prominente Nervenzell-Untergang und die Gliose in der frontalen und temporalen Hirnrinde. Der Zusammenhang der vorherrschenden klinischen Symptomatik mit dem zugrunde liegenden neuropathologischen Muster ist nicht eindeutig (Hodges *et al.*, 2004). Manchen, nicht aber allen FTDs liegt eine Tauopathie zugrunde. Zu den Tau-positiven FTDs gehören u.a. die Pick Krankheit (PiD) und die Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus und Kopplung. Letztere ist an das Chromosom 17 assoziiert und weist eine Tau Gen Mutation (FTDP-17T) auf. Bei der PiD finden sich vorwiegend die kleineren Tau-Isoformen mit 3-Repeats, die ein Molekulargewicht von 60 und 64 kDA aufweisen. Typisch sind intrazytoplasmatische agryophile Tau-positive Einschlüsse, die sogenannten Pick bodies (Kersaitis *et al.*, 2004). Die FTDP-17T ist eine meist autosomal-dominant vererbte Tauopathie und macht etwa 5% aller FTDs aus (Goedert *et al.*, 2011). Sie zeigt sich klinisch in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Mutation, ist aber auch innerhalb eines Mutationstypus und sogar innerhalb einer Familie klinisch sehr variabel (Van Swieten *et al.*, 2004). Häufig sind Veränderungen der Persönlichkeit und des Verhaltens, Sprachstörungen und das Auftreten von extrapyramidalen Störungen (Reed *et al.*, 2001). Es sind bis heute 44 unterschiedliche, mit der FTDP-17T assoziierte Mutationen im *MAPT* Gen identifiziert worden (Goedert *et al.*, 2011). Bei der FTDP-17T überwiegt entweder das 4-R-Tau oder es zeigt sich wie bei der AD ein ausgewogenes Verhältnis der 3- und 4 R-Isoformen, je nach zugrunde liegender Mutation. Mutationen, die in einer kodierenden Region außerhalb des Exons 10 liegen, führen i.d.R. zu einer pathologischen Akkumulation von sowohl 3-Repeat als auch 4-Repeat Tau-Isoformen.

Dagegen führen Mutationen innerhalb des Exons 10 bzw. innerhalb der Spleiß-Region von Exon 10 i.d.R. zu einer Akkumulation von 4R-Tau (Hutton *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; Varani *et al.*, 1999; Rohrer *et al.*, 2011). Die neuropathologische Diagnose der FTDs und ihrer Subtypen erfolgt anhand der Kriterien der „Lund and Manchester Groups“ (Brun *et al.*, 1994). Sie wurden in 2001 im Hinblick auf molekulare Charakteristika der Tau-Pathologie erweitert (Mc Khann *et al.*, 2001).

1.2.4.1. Die FTDP-17 Tau-Mutation R406W

Die R406W Mutation des MAPT Gens wurde in Familien aus verschiedenen Ländern beschrieben, zuerst in einer nordamerikanischen Familie (Reed *et al.*, 1997; Hutton *et al.*, 1998), gefolgt von Familien in den Niederlanden (Rizzu *et al.*, 1999; van Swieten *et al.*, 1999), in Belgien (Rademaker *et al.*, 2003), Schweden (Ostojic *et al.*, 2004; Passant *et al.*, 2004), Dänemark (Lindquist *et al.*, 2008 und 2009) und Japan (Ikeuchi *et al.*, 2008 und 2011). Der klinische Phänotyp zeigt sich sehr variabel und unterscheidet sich nicht nur zwischen den einzelnen Familien, sondern auch innerhalb einer Familie. Bei der Mehrzahl der Fälle entspricht das klinische Bild zunächst dem einer Demenz vom Alzheimer-Typ mit frühen kognitiven Beeinträchtigungen (Ikeuchi *et al.*, 2011; Lindquist *et al.*, 2008). Manche Fälle zeigen das typische Bild einer FTD mit prädominanten Verhaltensauffälligkeiten (Saito *et al.*, 2002, Ikeuchi *et al.*, 2008, Lindquist *et al.*, 2008). Das Erkrankungsalter für die R406W-Mutation wurde bislang mit einer Spanne zwischen 47 und 68 Jahren dokumentiert (Ikeuchi *et al.*, 2011). Für die R406W-Mutation wird eine vergleichsweise lange Überlebenszeit von bis zu 25 Jahren beschrieben (Kobayashi *et al.*, 2003; Murrell *et al.*, 1999), aber auch Fälle mit schnell progressivem Verlauf unter kurzer Überlebenszeit kommen vor (Saito *et al.*, 2002; Ikeuchi *et al.*, 2011).

1.2.5. Atypisches Parkinson-Syndrom von Guadeloupe

Auf der karibischen Insel Guadeloupe wurde zum ersten Mal im Jahre 1999 ein außergewöhnlich häufiges Vorkommen eines atypischen Parkinson-Syndroms auf standardisierte Weise untersucht und beschrieben. Gleichzeitig konnte eine Assoziation mit dem Verzehr von den Bestandteilen der auf Guadeloupe beheimateten Pflanze *Annona muricata* hergestellt werden (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Lannuzel *et al.*, 2007). Von den 87 untersuchten Patienten mit klinischer Parkinson-Symptomatik erfüllten 75% der Patienten nicht die Kriterien für die

klinische Diagnose eines Morbus Parkinson. 36% der Patienten erfüllten die Diagnosekriterien für das Vorliegen einer “wahrscheinlichen” PSP, ein kleiner Anteil der Patienten zeigte zusätzlich Symptome einer Amyotrophen Lateral Sklerose (ALS), während die übrigen Patienten keinem bestimmten Parkinson-Syndrom zugeordnet werden konnten. Fast alle Patienten hatten eine ausgeprägte Dysphagie sowie Atemprobleme (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999). Der kausale Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Bestandteilen der Pflanze *Annona*, insbesondere dem enthaltenen *Annonacin*, einem Inhibitor von Komplex-I der Atmungskette, und dem Auftreten dieses atypischen Parkinson-Syndroms konnte durch weitere experimentelle Studien untermauert werden (siehe Kapitel 1.3.2). Der Verzehr von Pflanzenprodukten aus der *Annona* wurde ebenfalls mit der Entstehung des Parkinson-Demenz Komplexes auf der Insel Guam (Steele *et al.*, 2002; Caparros-Lefevre *et al.*, 2005) und dem atypischen Parkinson-Syndrom auf Neu Kaledonien (Angibaud *et al.*, 2004; Caparros-Lefevre *et al.*, 2004) in hypothetischen Zusammenhang gebracht.

In 2002 konnte anhand einer neuropathologischen Kohorte gezeigt werden, dass es sich bei dem atypischen Parkinson-Syndrom von Guadeloupe um eine Tauopathie handelt (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). Neuropathologisch zeigt sich bei dem atypischen Parkinson-Syndrom von Guadeloupe ein der PSP sehr ähnliches Bild. Die Akkumulation von Tau-Protein ist insbesondere im Mittelhirn zu finden, welches biochemisch hauptsächlich die 4R-Tau-Isoformen beinhaltet (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002).

1.3. Ätiologie der Tauopathien

Epidemiologische, klinische und experimentelle Daten suggerieren ein ätiologisches Spektrum der Tauopathien, das von rein monogen vererbten Formen bis zu überwiegend durch Umwelt-Toxine verursachte Formen reicht. In der Mitte des Spektrums sind die Formen anzusiedeln, für deren Entstehung eine genetische Prädisposition im Zusammenspiel mit Auslöse-Faktoren aus der Umwelt verantwortlich gemacht wird.

1.3.1. Genetik

Die seltenen nach Mendelschem Erbgang vererbten Tauopathien sind mit einer Mutation des *MAPT* Gens, meist mit autosomal-dominantem Vererbungsmuster, assoziiert (Lee *et al.*, 2001). Ein genetisch determiniertes Risiko, an einer neuropathologisch definierten PSP oder CBD zu erkranken, ergibt sich aber auch aus der homozygoten Vererbung der Haplotyp-Variante 1 des

MAPT Gens (Houlden *et al.*, 2001; Höglinger *et al.*, 2011; Sundar *et al.*, 2007). Neben der Assoziation von PSP und CBD zu dem H1-Haplotyp des *MAPT* Gens konnten in einer Genomweiten Assoziationsstudie genetische Veränderungen in Proteinen, die u.a. am vesikulären Transport, am Myelinaufbau und an einer Rückkopplungsfunktion des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt sind, mit PSP assoziiert werden (Höglinger *et al.*, 2011).

Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus und Kopplung an das Chromosom 17 und Assoziation mit Tau

Im Jahre 1998 gelang die Identifikation von Tau-Mutationen als einem möglichen Auslöser einer Gruppe von klinischen Syndromen, deren Gemeinsamkeit eine Mutation im *MAPT* Gen mit meist autosomal-dominantem Vererbungsmuster ist. Sie werden Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus und Kopplung an das Chromosom 17 und Assoziation mit Tau (FTDP-17T) genannt (Poorkaj *et al.*, 1998; Hutton *et al.* 1998; Spillantini *et al.* 1998). Dies stellte einen Meilenstein in der Erforschung der Tauopathien dar, da demonstriert werden konnte, dass eine primäre Fehlfunktion des Tau-Proteins ausreicht, eine Neurodegeneration auszulösen. Bis heute konnten 44 unterschiedliche, mit der FTDP-17 assoziierte Mutationen im *MAPT* Gen identifiziert worden (Goedert *et al.*, 2011). Die identifizierten Mutationen liegen in den *Exons* 1, 9, 10, 11, 12, und 13 des *MAPT* Gens, vornehmlich in den Mikrotubuli-bindenden *Repeat*-Regionen. Sie verursachen entweder ein fehlerhaftes Spleißen von Exon10 der mRNA mit nachfolgender Verschiebung des Verhältnisses von 3R zu 4R Tau-Isoformen (Hutton *et al.*, 1998; Varani *et al.*, 1999; Spillantini *et al.*, 2000), verändern die Tau-Mikrotubuli-Interaktion, oder steigern Tau-Aggregationsneigung (Hasegawa *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1998). Auch haben einige Mutationen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Tau, insbesondere die Mutation R406W, und fördern damit die Tau-Aggregation (Lee *et al.*, 2005; Crowther und Goedert, 2000; Delobel *et al.*, 2002). Einige Mutationen wirken sich über mehrere der oben genannten Mechanismen aus. Einen Überblick über die wichtigsten identifizierten FTDP-17-Mutationen verschafft die Tabelle 3.

| Mutation | Lokalisation | Mikrotubuli-Bindung <i>in vitro</i> | Tau-Aggregation <i>in vitro</i> | Effekt auf das Spleißen von Exon 10 |
|----------|--------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| R5H | E1 | Vermindert | stimuliert | kein Effekt |
| R5L | E1 | Vermindert | n.b. | kein Effekt |
| K257T | E9 | Vermindert | stimuliert | kein Effekt |
| I260V | E9 | Vermindert | stimuliert | n.b. |
| L266V | E9 | Vermindert | stimuliert | verstärkt |
| G272V | E9 | Vermindert | stimuliert | n.b. |
| N279K | E10 | Unverändert | n.b. | verstärkt |
| ΔK280 | E10 | Vermindert | stimuliert nur 4R-Tau | vermindert |
| L284L | E10 | n.b. | n.b. | verstärkt |
| ΔN296 | E10 | Vermindert | stimuliert/unverändert | verstärkt |
| N296H | E10 | Vermindert | stimuliert | verstärkt |
| N296N | E10 | n.b. | n.b. | verstärkt |
| P301L | E10 | Vermindert | stimuliert 4R-Tau | kein Effekt |
| P301S | E10 | Vermindert | stimuliert 4R-Tau | n.b. |
| G303V | E10 | n.b. | n.b. | verstärkt |
| S305N | E10 | Verstärkt | n.b. | verstärkt |
| S305S | E10 | n.b. | n.b. | verstärkt |
| L315R | E11 | Vermindert | n.b. | n.b. |
| K317M | E11 | Vermindert | n.b. | n.b. |
| S320F | E11 | Vermindert | n.b. | n.b. |
| G335V | E12 | Vermindert | stimuliert | n.b. |
| Q336R | E12 | Verstärkt | stimuliert | n.b. |
| V337M | E12 | Vermindert | stimuliert nur 3R Tau | n.b. |
| E342V | E12 | Vermindert | n.b. | verstärkt |
| S352L | E12 | Vermindert | stimuliert | n.b. |
| K369I | E12 | Vermindert | stimuliert | n.b. |
| G389R | E13 | Vermindert | n.b. | n.b. |
| R406W | E13 | Vermindert | unverändert | n.b. |
| T427M | E13 | n.b. | n.b. | n.b. |

Tabelle 3: Übersicht über FTDP-17 assoziierte Tau-Mutationen, ihre Lokalisation (E = Exon, n.b.= nicht bestimmt), ihren Einfluss auf die Bindefähigkeit des Tau-Proteins auf die Mikrotubuli, auf die Tau-Aggregation und auf das Spleißen von Exon 10.

Aus: Gasparini *et al.*, 2007

Die R406W-Mutation

Die R406W-Mutation ist eine Punktmutation des *MAPT* Gens an der Position 406, bei der die Aminosäure Arginin (R) gegen Tryptophan (W) ausgetauscht wird. Sie soll hier hervorgehoben werden, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit R406W-Tau-transgene Mäuse untersucht wurden. Die R406W-Mutation liegt im Bereich des Exons 13 innerhalb der Mikrotubuli-Bindungsregion (Ingram und Spillantini, 2002). Sie betrifft, im Gegensatz zu Mutationen im Exon 10, alle 6 Tau-Isoformen (Ingram und Spillantini, 2002; Tsuboi *et al.*, 2002). Während durch diese Mutation die Tau-Aggregationsneigung nicht gesteigert ist, so ist die Bindefähigkeit des Tau-Proteins an die Mikrotubuli reduziert (Hong *et al.*, 1998). Dies führt zu einer

fehlerhaften Anordnung und Instabilität der Mikrotubuli *in vitro* (Rizzu *et al.*, 1999; Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2000). Die Auswirkung dieser Mutation auf den Grad der Phosphorylierung ist noch nicht eindeutig geklärt. *In vitro*-Experimente konnten zeigen, dass die R406W-Mutation die Tau-Phosphorylierung speziell an der sog. PHF-1-Bindungsstelle (phospho-Ser396 und phospho-Ser404) reduziert (Zhang *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 1998; Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2000). Dennoch zeigten sich in autopsierten R406W-FTDP-17 Gehirnen das Wildtyp-Tau und das mutierte Tau gleichermaßen an der PHF-1 Stelle hyperphosphoryliert (Miyasaka *et al.*, 2001). Auch konnten Alonso *et al.* (2004) nachweisen, dass aus *E. coli*-Stämmen isoliertes humanes R406W-mutiertes Tau durch zugeführte Tau-Kinasen *in vitro* an den PHF-1-Epitopen phosphoryliert wird. Möglicherweise ist also die Phosphorylierung an dieser Stelle in R406W Tau von den gewählten Bedingungen abhängig.

Der H1-Haplotyp des *MAPT* Gens

Als Haplotypen bezeichnet man typische Nuklidsequenzen an bestimmten Allelen auf einem Chromosom. Das *MAPT* Gen kommt in zwei Haplotypen vor, dem H1- und dem H2-Haplotyp, welche sich durch einen 900-KB-Inversions-Polymorphismus unterscheiden (Stefansson *et al.*, 2005). Der homozygote H1-Haplotyp für Tau ist in PSP- und CBD-Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung mit etwa 90% im Vergleich zu 60% deutlich überrepräsentiert (Houlden *et al.*, 2001; Höglinger *et al.*, 2011; Sundar *et al.*, 2007). Es wird diskutiert, ob der H1-Haplotyp die Transkription und Inkorporation des Exons 10 in das Tau-Protein fördert und so ein erhöhtes Verhältnis von 4R zu 3R Tau und schließlich die PSP- und CBD-typische Tau-Pathologie erzeugt (Myers *et al.* 2007). Da jedoch der H1-Haplotyp auch häufig in der gesunden kaukasischen Bevölkerung vorkommt, müssen zusätzlich andere Faktoren in der Entstehung von CBD und PSP involviert sein.

Andere genetische Risikofaktoren

In einer Genom-weiten Assoziationsstudie mit sporadischen Patienten der primären Tauopathie PSP konnten genetische Varianten in den Genen *EIF2AK*, *STX6* und *MOBP* mit einem signifikant gesteigerten Erkrankungsrisiko in Zusammenhang gebracht werden. *EIF2AK* kodiert das Protein *PERK* als Bestandteil des *unfolded protein response* (UPR) des Endoplasmatischen Retikulums. *STX6* kodiert das Protein Syntaxin 6, welches sich im *trans*-Golgi-Netzwerk und auf endosomalen Strukturen befindet. *MOBP*, kodiert das Myelin-assoziierte basische Protein,

welches von Oligodendrozyten produziert wird und Bestandteil des Myelins im zentralen Nervensystem ist (Höglinger *et al.*, 2011). Welche Funktionen diese Veränderungen bei der Entstehung einer Tauopathie haben, ist noch ungeklärt.

1.3.2. Umweltfaktoren

Das unverhältnismäßig häufige Auftreten einer klinisch und pathologisch der PSP sehr ähnlichen Tauopathie auf der karibischen Inselgruppe Guadeloupe konnte in Zusammenhang mit dem regelmäßigen Verzehr von Bestandteilen des dort beheimateten Baumes *Annona muricata* gebracht werden (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre, *et al.* 2002; Lannuzel *et al.*, 2007). Auch auf Neu-Kaledonien, Guam und den Marianen, einer Inselgruppe im Pazifik, wurde das Auftreten von atypischen Parkinson-Syndromen mit dem Konsum von Pflanzenprodukten aus der *Annonaceae*-Familie assoziiert (Angibaud *et al.*, 2004; Steele *et al.*, 2002). Insbesondere die Sorte *Annona muricata* wird auf Guadeloupe als Nahrungsmittel und Heilpflanze geschätzt (Longuefosse und Nossin, 1996). Zwei Inhaltsstoffe erregten den Verdacht neurotoxisch zu sein, die Alkaloide und Acetogenine (Champy *et al.*, 2004; Collins, 1999). Beide Substanzen können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften mittels passiver Diffusion die Zellmembranen durchdringen (Champy *et al.*, 2004). Die Acetogenine sind wie die ebenfalls pflanzliche Substanz Rotenon lipophile Inhibitoren von Komplex-I der Atmungskette und bereits *in vivo* und *in vitro* im nanomolaren Bereich toxisch (Lannuzel *et al.*, 2003; Champy *et al.*, 2004; Escobar-Khondiker *et al.*, 2007; Höllerhage *et al.*, 2009). Das Acetogenin *Annonacin* ist in der Spezies *Annona muricata* mengenmäßig am meisten vertreten (Champy *et al.*, 2005). *Annonacin* ist 50-fach toxischer für dopaminerge Neuronen und 2000-fach toxischer für nicht-dopaminerge Neuronen als der klassische Komplex-I-Inhibitor MPP⁺ (Lannuzel *et al.*, 2003). In neuronalen Primärkulturen führt die Intoxikation mit *Annonacin* im nanomolaren Bereich zu einer ATP-Depletion, einer somatodendritischen Umverteilung des Tau-Proteins sowie zu Zelluntergang (Escobar-Khondiker *et al.*, 2007; Höllerhage *et al.*, 2009). *In vivo*-Experimente mit Ratten konnten nach chronischer systemischer Administration von *Annonacin* eine ATP-Depletion und ein PSP-ähnliches Neurodegenerationsmuster zeigen (Champy *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass *Annonacin* bei peripherer Administration die Blut-Hirnschranke überwindet (Champy *et al.*, 2004). *In vitro* konnte konklusiv ein

Zusammenhang von Komplex-I-Inhibition durch Annonacin mit Tau-Pathologie hergestellt werden (Escobar-Khondiker *et al.*, 2007).

Auch andere Toxine konnten durch experimentelle Untersuchungen in den Zusammenhang mit der Entstehung einer neurodegenerativen Tau-Pathologie gebracht werden. Das Pestizid Rotenon, ebenfalls ein Hemmer von Komplex-1 der mitochondrialen Atmungskette, verteilt sich relativ homogen im Hirngewebe und ruft ein der PSP ähnliches Neurodegenerationsmuster hervor (Höglinger *et al.*, 2003; Champy *et al.*, 2004). Durch Rotenon-Intoxikation konnte *in vivo* bei Nagetieren eine zerebrale Tau-Pathologie hervorgerufen werden (Höglinger *et al.*, 2005). Kürzlich konnte die Induktion von Tau-Pathologie durch eine Reihe weiterer, global verbreiteter natürlicher Komplex-I-Inhibitoren in Zellkultur nachgewiesen werden (Höllerhage *et al.*, 2009).

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die Bereitstellung von energiereichen Phosphaten, insbesondere von ATP, durch die Atmungskette. Bei der sporadischen PSP konnte *in vivo* ein verminderter Glukose-Metabolismus (Foster *et al.*, 1988), ein erhöhter ADP-Spiegel (Martinelli *et al.*, 2000) sowie ein verminderter ATP-Spiegel (Stamelou *et al.*, 2009) als Hinweis auf eine mitochondriale Dysfunktion gezeigt werden. Auch konnten *in vitro*-Experimente mit Cybrid-Zellen, die Mitochondrien aus PSP-Patienten enthielten, eine Dysfunktion des Komplex-I der Atmungskette und eine Verminderung der ATP-Spiegel nachweisen (Swerdlow *et al.*, 2000; Albers und Beal, 2002; Chirichigno *et al.*, 2002).

Somit scheinen Komplex I Inhibitoren mögliche Umweltfaktoren zu sein, welche an der Entstehung einer Tau-Pathologie beteiligt sein können.

1.3.3. Interaktion von Genetik und Umwelt

Die Vermutung, dass das Zusammenspiel von Genetik und Umwelt bei der Entstehung von Tauopathien eine Rolle spielen könnte, ergibt sich insbesondere aus dem Erkenntnisgewinn im Bereich der Genetik.

So sind im Rahmen sogenannter Genom-weiter Assoziationsstudien (GWAS) sogenannte Suszeptibilitäts-Polymorphismen in bestimmten Genen in Assoziation mit bestimmten Tauopathien gebracht worden (Harold *et al.*, 2009; Höglinger *et al.*, 2011), von denen angenommen wird, dass sie auf multifaktorielle Weise das Krankheitsrisiko erhöhen, ohne dass anamnestisch eine familiäre Häufung auffällt. Ein weiterer Ko-Faktor, möglicherweise aus der Umwelt des betroffenen Patienten einwirkend, scheint als zusätzlicher Auslösefaktor nötig zu sein. Insbesondere der Tau-Haplotyp H1 stellt eine klassische Risiko-erhöhende genetische

Prädisposition für die PSP und CBD dar, die aber auch bei ca. 60% der gesunden Allgemeinbevölkerung gefunden wird. Aus diesem Grund scheint das zusätzliche Einwirken von Umweltfaktoren für die Pathogenese essentiell zu sein.

Auch die große phänotypische Varianz bei Patienten mit einer R406W Mutation auf dem *MAPT* Gen, wie in Abschnitt 1.2.4.1 beschrieben, lässt sogar bei den autosomal-dominant vererbten Tauopathien eine zusätzliche Beeinflussung des klinischen Phänotyps durch Umweltfaktoren vermuten.

Einige der Suszeptibilitäts-Polymorphismen oder Mutationen im *MAPT* Gen könnten insbesondere dazu führen, dass Nervenzellen vulnerabler auf bereits mit Tauopathien in Zusammenhang gebrachte Toxine, wie etwa mitochondriale Komplex-I-Inhibitoren, reagieren.

1.4. Ziel der Arbeit

Basierend auf den oben beschriebenen Erkenntnissen, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass die R406W Mutation im *MAPT* Gen zu einer gesteigerten Vulnerabilität gegenüber dem prototypischen Tauopathie-assoziierten Komplex I Inhibitor Annonacin führt.

Im Speziellen war das Ziel dieser Arbeit die Klärung der folgenden Fragen:

1. Führt Annonacin *in vivo* zu einer somatodendritischen Akkumulation und Hyperphosphorylierung von Tau?
2. Verstärkt die Expression von R406W-mutiertem Tau als genetische Prädisposition den Effekt von Annonacin?
3. Führt Annonacin *in vivo* in Abwesenheit oder Anwesenheit von R406W-mutiertem Tau zu einer differentiellen Aktivierung von Tau-Kinasen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung bedienten wir uns eines

- transgenen Mausmodelles, das humanes Tau mit der R406W-Mutation exprimiert, und der
- *in vivo*-Intoxikation mit Annonacin.

Die Effekte der Komplex-I-Hemmung, der Mutation und von deren Interaktion (Kombination) auf das Tau-Protein und auf Tau-Kinasen im Gehirn lebender Mäuse im Vergleich zu Placebo-

und Wildtyp-Kontrollgruppen wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Weiterhin wurde die Tau Expression auf der mRNA Ebene durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und der Tau-Abbau durch proteasomale Aktivitätsmessung untersucht.

2. Materialien und Methoden

Für die Durchführung der Tierversuche lag die Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Ordnungsnummer V54-19c20/15(1)MR20/15-Nr03/2005).

2.1. Tiermodell

Unsere Experimente führten wir mit Wildtyp-Mäusen und mit transgenen Mäusen durch, welche die längste Isoform des humanen Tau-Proteins (4R2N) mit einer zusätzlich eingefügten Punktmutation an der Position 406, die zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) gegen Tryptophan (W) führt, überexprimierten (Zhang *et al.*, 2004). Es kamen ausschließlich homozygote (R406W^{+/+} und R406W^{-/-}) und männliche Mäuse zum Einsatz.

2.1.1. Herstellung des transgenen R406W^{+/+}-Mausmodelles

Die Herstellung der transgenen Tiere erfolgte im Labor von Virginia M.-Y. Lee, University of Pennsylvania School of Medicine (Philadelphia, USA). Hierzu wurde ein cDNA Konstrukt mit der längsten humanen Tau-Isoform (T40) mit Mutation (R406W) unter der Kontrolle des Maus-Prion-Protein-Promotors in den Expressionsvektor geklont (MoPrP.Xho). Ein 15,3 KB großes Fragment mit der mutierten T40-Isoform wurde zusammen mit dem Promotor und seinen 3' sowie 5'untranslatierten Sequenzen in eine fertilisierte Mauseizelle (C57BL6 x C3H (B6C3/F1)) mikroinjiziert und anschließend in ein pseudo-trächtiges Weibchen implantiert.

2.1.2. Aufzucht der Versuchsmäuse

Die Zuchtpaare der transgenen Mäuse dienten uns zum Aufbau einer eigenen Zucht in der geschlossenen Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps Universität Marburg. Homozygote R406W^{+/+} und nicht-transgene Wildtyp (R406W^{-/-}) Mäuse aus heterozygoter Zucht wurden für die Versuchsdurchführung im homozygoten Zustand vermehrt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte anhand von DNA-Proben aus dem Ohrgewebe der Mäuse und wurde post mortem durch DNA-Proben aus dem Schwanzgewebe der Mäuse erneut durch

Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) verifiziert. Für die Isolierung der DNA-Proben verwendeten wir den „pekGold tissue DNA extraction kit“ (PEKLAB, Erlangen, Germany). Die zerebrale Expression des mutierten humanen Tau-Proteins wurde mittels Western-Blot-Analyse verifiziert. Als Kontrolltiere benutzten wir Wildtyp-Mäuse (R406W^{-/-}), die ausschließlich Maus-Tau exprimierten.

2.2. Komplex-I-Inhibitor

2.2.1. Annonacin-Gewinnung

Als mitochondrialen Komplex-I-Hemmer benutzten wir Annonacin, das wie beschrieben aus Früchten der *Annona muricata* mittels Chromatographie isoliert und auf ihre Reinheit geprüft wurde (Champy *et al.*, 2004).

2.2.2. Annonacin-Exposition

Wir verwendeten insgesamt N=41 R406W^{-/-} und N=42 R406W^{+/+} Mäuse für die Versuchsdurchführung. Jeweils vier bis sechs Mäuse des gleichen Genotyps wurden zusammen in einem Käfig bei 26°C unter einem 12-h/12-h Hell-/Dunkel-Zyklus und mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten. Sowohl Wildtyp- als auch transgene Mäuse waren zum Zeitpunkt der Operation 16-18 Wochen alt und wogen 30-40 g. Die Versuchsmäuse erhielten entweder eine Annonacin- oder Placebo-Lösung über eine dreitägige Infusionsperiode mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpen. Die Annonacin-Infusionslösung wurde mit Dimethylsulphoxid (DMSO) und Polyethyleneglycol 400 (PEG) in einem Mischungsverhältnis von 1:1 hergestellt. Die Placebo-Infusionslösung enthielt lediglich DMSO und PEG in einem Mischungsverhältnis von 1:1. Die osmotischen Minipumpen (Alzet 1003, 100µl, 1.04µl/h) wurden mit dieser Annonacin- oder Placebo-Flüssigkeit gefüllt und für mindestens vier Stunden vor der Implantation in steriler 0,9% (wt/vol) NaCl-Lösung inkubiert. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit 0,1 mL/10g Ketamin:Xylazin in steriler 0,9% NaCl-Lösung (1:1:8) entsprechend einer Dosis von 10 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin betäubt. Die Pumpen wurden unter Anästhesie subkutan paravertebral implantiert. Für die Bemessung der Infusionsrate von 6 oder 9 mg/kg Körpergewicht pro Tag richteten wir uns nach dem durchschnittlichen Körpergewicht der Versuchsmäuse. Die Mäuse wurden vor und nach der dreitägigen Infusionsperiode gewogen.

2.3. Gewebebegewinnung

Nach Abschluss der dreitägigen Infusionsperiode wurde den Versuchsmäusen zunächst intraperitoneal 200 mg/kg Pentobarbital als letale Dosis verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse zwei Minuten transkardial mit eiskalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert. Das Gehirn wurde sofort entnommen und die Hirnhemisphären durch einen midsagittalen Schnitt getrennt. Eine Hemisphäre wurde sofort in jeweils vier Hirnregionen (a: frontaler Kortex, b: parietaler Kortex und Striatum, c: Mittelhirn, d: occipitaler Kortex und Cerebellum) zertrennt, in -30°C Isopentan tiefgefroren und bei -80°C für die Western-Blot-Analyse, die proteasomale Aktivitätsmessung und die quantitative PCR aufbewahrt. Die andere Hemisphäre wurde für die histologische Untersuchung vorbereitet, welche Gegenstand einer anderen Promotionsarbeit ist.

2.4. Western-Blot-Analyse

Probenvorbereitung

Für die Western-Blot-Analyse verwendeten wir die frontalen Kortexhälften der Versuchsmäuse. Diese wurden auf Eis mit Hilfe einer 1000 μl Pipette in kommerziellem Lyse-Puffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Waltham, USA, Produktnummer: 78510) aufgeschlossen. Wir wählten dabei ein Verhältnis von 1 μg Gewebe auf 10 μl Lysepuffer. Dem Lysepuffer wurde zuvor 1% Protease-Inhibitor (Halt Protease Inhibitor Cocktail (100x), Thermo Scientific, Waltham, USA, Produktnummer: 78429) und 1% Phosphatase-Inhibitor (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x), Thermo Scientific, Waltham, USA, Produktnummer: 78420) zugegeben. Im Anschluss wurden die aufgelösten Gewebeprobe bei 10.000 g und 4°C über 5 Minuten zentrifugiert (Biofuge Stratos von Heraeus, Wehrheim, Deutschland) und das Pellet verworfen oder für die Isolierung der unlöslichen Tau-Fraktion aufbewahrt. Die Proteinkonzentration im Überstand ermittelten wir mit Hilfe eines kommerziellen Kits nach der Bicinchoninsäure-Methode (BCA assay kit, Thermo Scientific, Waltham, USA, Produktnummer: 23225). Die Proben wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ standardisiert, wofür sie gegebenenfalls mit dem Phosphataseinhibitor- und Proteaseinhibitor-versetzten Lysepuffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Waltham, USA, Produktnummer: 78510) verdünnt wurden. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei

95°C in PCR-Behältern mit 25% Ladepuffer (LDS Sample Buffer, Non-Reducing (4X), Thermo Scientific, Waltham, USA, 84788) und 1% Reduktions-Reagenz (NuPage Reducing Agent (10x), Invitrogen, Carlsbad, USA, NP0004) erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die Isolierung der unlöslichen Tau-Fractionen verwendeten wir die Sarkosyl-Extraktions-Methode nach Delobel *et al.*, 2008. Die durch die erste Zentrifugierung gewonnenen Pellets wurden für diesen Zweck zunächst erneut in dem kommerziellen Lysepuffer mit 1% Protease- und 1% Phosphatase-Inhibitor homogenisiert und in einer Ultrazentrifuge (Tegimenta Centrikon, Milan, Italien, T-2070) mit 40.000 g bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 1% Sarkosyl versetzt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut in einer Ultrazentrifuge mit 80.000 g bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4 gelöst. Dabei verwendeten wir 0,5 µl Tris-HCl für jedes mg der Ursprungsmasse der jeweiligen Gewebeprobe. Diese Proben wurden nun ebenfalls für 10 Minuten bei 95°C in PCR-Behältern mit 25% Ladepuffer (LDS Sample Buffer, Non-Reducing (4X), Thermo Scientific, Waltham, USA, 84788) und 1% Reduktions-Reagenz (NuPage Reducing Agent (10x), Invitrogen, Carlsbad, USA, NP0004) erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

Elektrophorese

Die Elektrophorese führten wir mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAG) durch. Dafür fertigten wir ein 10%-iges Polyacrylamid-Trenngel und ein 5%-iges Polyacrylamid-Sammelgel an.

| | Sammelgel 5% | Trenngel 10% |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1.5M Tris pH 8.8 | - | 5 ml |
| 1,0M Tris pH 6,8 | 0,63 ml | - |
| 30% Acrylamid-Mix | 0,84 ml | 6,7 ml |
| dH₂O | 3,4 ml | 7,9 ml |
| 10% SDS | 50 µl | 200 µl |
| 10% Ammonium-Persulfat | 50 µl | 200 µl |
| TEMED | 5 µl | 20 µl |

Jeweils 25 µg der zu analysierenden Proben bzw. 20 µl der Tris-HCl-Lösung mit den Sarkosyl-unlöslichen Fractionen wurde in separate Taschen auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen. Eine

vorgefärbte Protein-Molekulargewichts-Leiter (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, SM0671) und eine Tau-Protein-Leiter (Tau Protein Ladder, rPeptide, T-1007-1) wurden ebenfalls auf die Gele aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem 12-Kammer-Elektrophoresesystem (Mini Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer-Standard TV 100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Y001.1) bei einer Spannung von 120 V für circa 90 Minuten getrennt. Wir verwendeten dafür einen kommerziellen Elektrophorese-Laufpuffer (Rotiphorese® 10x SDS-PAGE, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, 3060.1).

Proteintransfer

Im Anschluss wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Nitrocellulose membrane filter paper sandwich; 0.45µm pore size, Invitrogen, Carlsbad, USA, LC2001) bei einer Stromstärke von 160 mA (circa 25 V) für drei Stunden auf Eis in einem Tankblot-System (MINI Tank-Blot-System, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, AE 20.1) übertragen. Den Transfer-Puffer fertigten wir mit 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 20% Methanol ad Aqua bidest (pH 8,3) an. Die Effizienz des Protein-Transfers überprüften wir mit einer reversiblen Protein-Färbung (MemCode™ Reversible Protein Stain Kit for Nitrocellulose Membranes, Thermo Scientific, Waltham, USA, 2458).

Detektion von Tau und Tau-Kinasen

Die unspezifischen Bindungsstellen auf den Nitrozellulose-Membranen blockierten wir zunächst mittels einer einstündigen Inkubation in kommerzieller Blockierungslösung (Roti®-Block, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, A151.1). Im Anschluss wurden die Membranen über Nacht mit den jeweiligen Primär-Antikörpern in Roti®-Block inkubiert. Dafür verwendeten wir folgende kommerzielle Antikörper und Konzentrationen:

| Antikörper | Firma, Produktnummer | Konzentration |
|--------------------|--|---------------|
| Anti-Tau5 | Chemicon (Billerica, USA), # MAB361 | 1:10.000 |
| Anti-Human Tau T14 | Zymed Laboratories (San Francisco, USA) # 13-1400 | 1:1000 |
| Anti-Human Tau HT7 | Thermo Scientific (Waltham, USA), # MN1000 | 1:1000 |
| Anti- PHF-Tau AT8 | Thermo Scientific (Waltham, | 1:1000 |

| | | |
|----------------------------------|--|----------|
| | USA), # MN1020 | |
| Anti-PHF-Tau AT180 | Thermo Scientific (Waltham, USA), # MN1040 | 1:1000 |
| Phospho-SAPK/JNK [Thr183/Tyr185] | Cell Signaling (Danvers, USA), # 9251 | 1:1000 |
| p44/42 MAPK [Erk1/2] | Cell Signaling (Danvers, USA), # 4348 | 1:1000 |
| GSK-3alpha | Santa Cruz (Santa Cruz, USA), # sc-7879 | 1:1000 |
| GSK-3beta | Santa Cruz (Santa Cruz, USA), # sc-9166 | 1:1000 |
| Phospho-GSK-3beta [Ser9] | Cell Signaling (Danvers, USA), # 9336 | 1:1000 |
| GSK-3beta [pY216] | BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, USA), # 612313 | 1:500 |
| Cdk5 | Santa Cruz (Santa Cruz, USA), # sc-173 | 1:50.000 |
| anti-p35/p25 | Santa Cruz (Santa Cruz, USA), # sc-820 | 1:1000 |
| Anti-alpha-Synuclein | Chemicon (Billerica, USA), # AB5038P | 1:1000 |
| Anti-β-Actin, HRP-conjugated | Santa Cruz (Santa Cruz, USA), # sc-4778 | 1:1000 |

Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0.1% Tween für jeweils 10 Minuten inkubierten die Membranen für zwei Stunden mit den korrespondierenden Sekundär-Antikörpern mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) 1:1000 in Roti®-Block (Goat anti-Mouse IgG sc-2005; Goat anti-Rabbit IgG sc-2004; Goat anti-Chicken IgG sc-2428; Santa Cruz). Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS/1% Tween für jeweils 10 Minuten wurde die Reaktion mit Hilfe von Chemolumineszenz entwickelt (Pierce, ECL substrate kit, Thermo Scientific, 32106) und auf Röntgen-Filmen exponiert (Amersham Hyperfilm TM ECL, GD Healthcare, Pollards Wood, UK). Die Filme wurden danach mittels Entwicklungslösung, Stop-Bad und Fixierer entwickelt. Für die Wiederbenutzung der Membranen wurden die Primär- und Sekundärantikörper mit einem milden Stripping-Puffer (15 g Glycin, 1 g SDS, 10 ml Tween 20

ad 1 l Reinstwasser, pH 2,2) entfernt und nach einstündigem Blockieren erneut mit Primär- und Sekundär-Antikörpern inkubiert.

Auswertung

Für die Quantifizierung der Protein-Banden wurde das Auswertungsprogramm Image-J (U.S. National Institutes of Health, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) benutzt. Die entwickelten Filme wurden dafür mit einem V33 Flatbed Scanner (Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan) gescannt und die spezifischen Grauwerte der Proteinbanden ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die Antikörper-Signale mit den auf der gleichen Membran gefärbten entsprechenden Aktin-Banden normalisiert.

2.4. Quantitative PCR

Für die Genexpressionsanalyse auf der mRNA-Ebene wurde die reverse Transkription mit anschließender real-time PCR (rtPCR) eingesetzt. Zunächst wurde aus dem parietalen Hirngewebe der mit Placebo oder 9mg/kg/Tag Annonacin behandelten Wildtyp- und R406W^{+/+}-Mäuse die gesamte RNA mittels Qiagen RNeasy Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) isoliert. Die RNA-Integrität wurde durch den 2100 Bioanalyzer (Agilent) kontrolliert. Mittels SuperScript III First-Strand Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde jeweils der erste Strang von 100 ng der gesamten RNA in cDNA umgeschrieben (reverse Transkriptase). Die rtPCR Experimente wurden mit jeweils 5 µl der 1:20 verdünnten Produkte aus der reversen Transkriptase, 0.4 µM von jedem Primer und 12.5 µl von Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Zwei Primer-Paare wurden mittels Primer-Express Version 1.0 hergestellt: ein Primer spezifisch für humane Tau cDNA (Vorwärts: GCTCAAAGACACCACCCA; Rückwärts: GCTGTAGCCGCTGCGATC) und ein Primer für humane und murine Tau cDNA (Vorwärts: GGCTCCACTGAGAACCTGAA; Rückwärts: CCGGGACGTGTTTGATATT). Als Kontroll-Primer wurde β-Aktin benutzt (Vorwärts: CTGTGTGGATCGGTGGCTC; Rückwärts: CTGCTTGCTGATCCACATCTG). Jede Probe durchlief als Triplet die rtPCR. Das Fluoreszenz-Signal wurde mittels ABI PRISM 7500 Detektions-System (Applied Biosystems) gemessen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und erlaubt so die Berechnung des DNA-Gehaltes und so des ursprünglichen mRNA-Gehaltes in jeder Probe. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Durchläufen wurden für die finale Quantifizierung herangezogen. Die so ermittelte respektive

Tau-mRNA-Startmenge wurde im Anschluss mit der des β -Aktins mit der Formel $r = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Tau}} - Ct_{\text{beta-actin}})_{\text{sample}} - (Ct_{\text{Tau}} - Ct_{\text{beta-actin}})_{\text{R1 (first sample)}}$ normalisiert.

2.5. Proteasomale Aktivitätsmessung

Für die Messung der proteasomalen Aktivität wurden die parietalen Kortexhälften der mit Placebo oder 9 mg/kg/Tag Annonacin behandelten Wildtyp- und R406W^{+/+}-Mäuse verwendet. Diese wurden bei 4°C durch Sonikation in einem Extraktions-Puffer (25 mM Tris, pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) gelöst und im Anschluss bei 4°C und 20.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand ermittelt (BioRad-Protein-Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Der Abbau von 25 μ M Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), 40 μ M N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-Amino-4-Methylcoumarin (Trypsin-ähnliche Aktivität), und 150 μ M N-Cbz-Leu-Leu-Glu-beta-Naphthylamid (Peptidylglutamyl-Peptid Hydrolase (PGPH)-Aktivität) wurde über 30 Minuten in einer Lösung aus 20 μ g Protein in 200 μ l Tris-HCl bei 37°C mittels Spektrofluorimetrie gemessen (alle Substrate von Sigma). Dafür wurden Exzitations-/Emissions-Wellenlängen von 350/440 nm für Aminomethylcoumarin und 333/410 nm für beta-Naphtylamin verwendet. Aus dem resultierenden Abfall der Peptidkonzentrationen konnten die gesamten Peptidase-Aktivitäten in den Proben berechnet werden. Um die Proteasom-spezifische Peptidase-Aktivität zu erhalten, wurde der obige Versuch unter Beifügung von jeweils 20 μ l des Proteasom-Inhibitors MG-132 wiederholt. Die Differenz zwischen gesamter Peptidase-Aktivität und der verbliebenen Peptidase-Aktivität nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors, das heißt der MG-132-sensitiven Peptidase-Aktivität, wurde den proteasomalen Peptidasen zugeschrieben.

2.6. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung benutzten wir GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) ausgedrückt. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Gruppenvergleiche erfolgten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) oder mit zweifaktorieller (R406W^{-/-} und R406W^{+/+}, Placebo und Annonacin) Varianzanalyse gefolgt von einem Post-hoc LSD („Least Significant Difference“) Test.

3. Ergebnisse

3.1. Annonacin Toxizität

Annonacin-Dosen von 6 und 9 mg/kg/Tag über drei Tage führten zu Mortalitätsraten zwischen 6-13% bei Wildtyp- und R406W^{+/+}-Mäusen. Eine höhere Annonacin-Dosis von 12 mg/kg/Tag bewirkte eine 100%ige Mortalitätsrate innerhalb von drei Tagen und wurde daher nicht weiter verfolgt. Auch eine längere Expositionsphase über 7 Tage mit 6 mg/kg/Tag Annonacin führte in Wildtyp-Mäusen zu einer Mortalitätsrate von 84%, so dass wir eine Expositionszeit von 3 Tagen beibehielten.

Die Annonacin-Toxizität zeigte sich auch durch eine verminderte Mobilität und einen Gewichtsverlust von durchschnittlich 8.7% in den Wildtyp- und 6.6% in den R406W^{+/+}-Mäusen bei 6 und 9 mg/kg/Tag Annonacin über 3 Tage. Die Placebo-behandelten Mäuse zeigten keinen signifikanten Gewichtsverlust und hatten eine Mortalitätsrate von 0%.

3.2. Annonacin-Exposition führt zu erhöhter Menge an humanem und murinen Tau-Protein und zu einer Hemmung der proteasomalen Aktivität im Gehirn von R406W^{+/+} transgenen Mäusen

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 3 grafisch dargestellt. Die Western-Blot-Analyse des frontalen Kortex der R406W^{-/-}- und R406W^{+/+}-Mäuse konnte zeigen, dass der Tau-Protein-Spiegel in den R406W^{+/+}-Mäusen nach einer *in vivo*-Behandlung mit Annonacin über 3 Tage signifikant ansteigt, nicht jedoch in R406W^{-/-}-Mäusen. Dabei kam es im Vergleich zur Placebo-Behandlung bei einer Annonacin-Dosis von 6 und 9 mg/kg/Tag zu einem Anstieg des humanen Tau-Proteins, d.h. des R406W-transgenen Tau-Proteins, welcher im Western-Blot durch die Antikörper T14 und HT7 dargestellt wird. Die Antikörper T14 und HT7 binden spezifisch an die Epitope des humanen Tau-Proteins und markierten in der Western-Blot-Analyse eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von etwa ~69kDa in den R406W^{+/+}-Mäusen. Diese Bande entspricht der längsten Isoform des humanen Tau-Proteins (4R2N). In den R406W^{-/-}-Mäusen wurde erwartungsgemäß keine Bande mit diesen Antikörpern detektiert. Der Protein-Spiegel des murinen und humanen Tau-Proteins, der durch den Tau5 Antikörper detektiert wird, markierte in den R406W^{+/+}-Mäusen eine lange Tau-Isoform (~69 kDa), die dem humanen transgenen R406W-Tau, und eine kurze Tau-Isoform (~55 kDa), die dem endogenen Maus-Tau entspricht. Beide Isoformen waren nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin in

den R406W^{+/+}-Mäusen im Vergleich zur Placebo-Behandlung erhöht. In den R406W^{-/-}-Mäusen markierte der Tau5-Antikörper lediglich die kurze Tau-Isoform. Der Spiegel der kurzen Isoform wurde in den R406W^{-/-}-Mäusen durch die Behandlung mit Annonacin nicht beeinflusst. Als Kontrolle untersuchten wir die Spiegel des Proteins alpha-Synuclein im Hirngewebe der R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäuse, welche sich nach Annonacin-Behandlung nicht veränderten.

Der Anstieg des Tau-Proteins wird nicht auf der transkriptionalen Ebene reguliert

Um zu überprüfen, ob der Annonacin-induzierte Anstieg des humanen und murinen Tau-Proteins in den R406W^{+/+}-Mäusen durch eine erhöhte Expression von Tau auf mRNA-Ebene verursacht wird, ermittelten wir mittels quantitativer Echtzeit-PCR die entsprechenden mRNA-Spiegel in den R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäusen. Die Spiegel der gesamten, d.h. der murinen und der humanen Tau-mRNA, und der humanen Tau-mRNA zeigten weder in den R406W^{+/+}- noch in den R406W^{-/-}-Mäusen einen Anstieg nach Behandlung mit 9 mg/kg/Tag Annonacin im Vergleich zur Placebo-Behandlung. Somit konnte, wie in Abbildung 3 grafisch dargestellt, keine Hochregulation der Tau-Expression auf transkriptioneller Ebene nach Annonacin-Exposition gezeigt werden. Dieser Befund legt nahe, dass der in der Western-Blot-Analyse gezeigte Anstieg des gesamten Tau-Proteins nach Annonacin-Exposition in den R406W^{+/+}-Mäusen seine Ursache auf post-transkriptioneller Ebene hat.

Annonacin inhibiert die proteasomale Aktivität in den R406W^{+/+}-Mäusen.

Auf post-transkriptioneller Ebene könnte ein gestörter Protein-Abbau zu einer Akkumulation des Tau-Proteins führen. Da Tau hauptsächlich durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird (s. Abschnitt 1.2.1) untersuchten wir die proteolytische Aktivität des Proteasoms im kortikalen Gewebe der R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäuse. In den R406W^{+/+}-Mäusen fanden wir eine signifikant verminderte Chymotrypsin-ähnliche (LLVY) und Caspase-artige (LLE) Aktivität des Proteasoms nach Annonacin-Behandlung mit 9 mg/kg/Tag im Vergleich zu 0 mg/kg/Tag. In den R406W^{-/-}-Mäusen war die proteasomale proteolytische Aktivität nach Annonacin-Behandlung unverändert. Ein verminderter Abbau des Tau-Proteins durch die Inhibition des Proteasoms könnte somit zu der Akkumulation von Tau in den Annonacin-intoxikierten transgenen Mäusen beitragen. Nachfolgende Abbildung 3 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

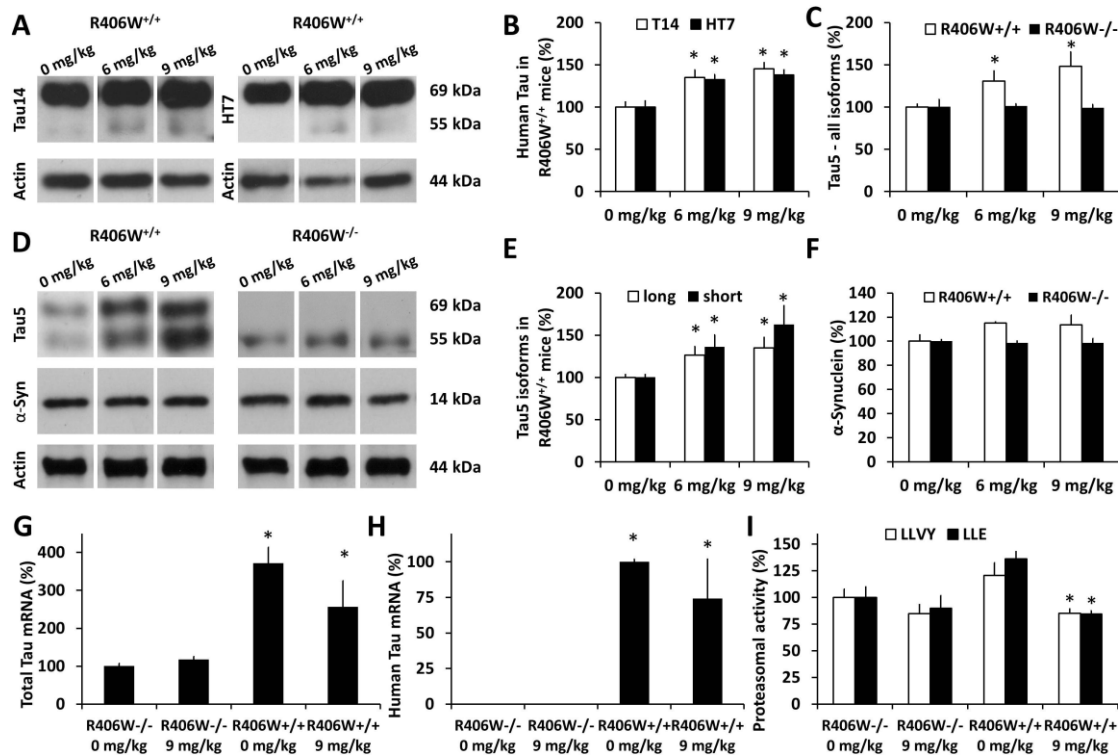


Abbildung 3: Der Tau-Protein-Spiegel ist in den Gehirnen der R406W^{+/+}-Mäuse nach Annonacin-Exposition erhöht (0, 6 oder 9 mg/kg/d), nicht jedoch in den R406W^{-/-}-Mäusen.

A, B: Der Spiegel des humanen Tau-Proteins (Antikörper T14 und HT7) ist in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin im Vergleich zum Placebo (0 mg/kg Annonacin) erhöht.

D, E: Der Antikörper Tau5 markiert eine lange Tau-Isoform bei ~69 kDa (humanes transgenes R406W-Tau) und eine kurze Tau-Isoform bei ~55 kDa (endogenes Maus-Tau). Die Spiegel beider Isoformen sind nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin in den R406W^{+/+}-Mäusen erhöht (**D,E**); in den R406W^{-/-}-Mäusen wird nur die kurze Isoform detektiert. In den R406W^{-/-} Mäusen zeigt sich keine Veränderung des Tau-Spiegels nach Behandlung mit Annonacin (**D**).

D,F: Die Proteinspiegel von α-Synuclein zeigten sich nach Behandlung der R406W^{-/-}- und R406W^{+/+}-Mäuse mit Annonacin nicht erhöht.

A-D: Die Protein-Spiegel von β-Aktin sind als Ladekontrolle abgebildet.

G, H: Die mittels quantitativer PCR ermittelten Spiegel der gesamten, d.h. der murinen und der humanen Tau-mRNA (**G**) und der human Tau-mRNA (**H**) zeigten weder in den R406W^{+/+}- noch in den R406W^{-/-}-Mäusen einen Anstieg nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin.

I: Die Chymotrypsin-ähnliche (LLVY) und die Caspase-artige (LLE) proteolytische Aktivität war jedoch nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin in den R406W^{+/+}-Mäusen, nicht aber in den R406W^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert.

* $p < 0.05$, zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Post-hoc LSD Test, Annonacin vs. Placebo (A-E,I); * $p < 0.05$, R406W^{+/+} vs. R406W^{-/-} (G-H).

3.3. Annonacin-Exposition führt zu einem signifikanten Anstieg von unlöslichem und phosphoryliertem Tau-Protein im Hirngewebe von R406W^{+/+} transgenen Mäusen

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Wir überprüften, ob eine Annonacin-Exposition zu einer veränderten Löslichkeit des Tau-Proteins führt. Dafür untersuchten wir im Western-Blot die Sarkosyl-unlösliche Gewebefraktion der R406W^{+/+}- und der R406W^{-/-}-Mäuse auf das Vorhandensein von Tau und Phospho-Tau. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass eine Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin über drei Tage zu erhöhten Protein-Spiegeln von humanem Tau (HT7), gesamt-Tau (Tau5) und phosphoryliertem Tau-Protein (AT8 und AT180) in der Sarkosyl-unlöslichen Fraktion der Gehirnproben der R406W^{+/+}-Mäuse führt. Im Hirngewebe Annonacin-behandelter R406W^{-/-}-Mäuse konnte weder ein Anstieg des gesamten Tau-Proteins noch des phosphorylierten Tau-Proteins in der Sarkosyl-unlöslichen Gewebefraktion beobachtet werden.

Auch in der löslichen Fraktion des R406W^{+/+}-Hirngewebes verursachte eine dreitägige Annonacin-Exposition eine dosisabhängige Zunahme des durch die Antikörper AT8- und AT180-markierten phosphorylierten Tau-Proteins sowohl in der langen als auch in der kurzen Isoform. Es ist also davon auszugehen, dass Annonacin sowohl zu einem Anstieg des phosphorylierten humanen Tau-Proteins, als auch des phosphorylierten endogenen murinen Tau-Proteins führt. Im hohen Maße stieg auch der Quotient von AT180/Tau5 und AT8/Tau5 in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition an. Die über den Anstieg des gesamten Tau-Proteins hinausgehende Annonacin-induzierte Zunahme des phosphorylierten Tau-Proteins in den R406W^{+/+}-Mäusen suggeriert, dass Annonacin nicht nur eine Tau-Akkumulation, sondern auch eine Tau-Phosphorylierung bewirkt. Im Hirngewebe Annonacin-behandelter R406W^{-/-}-Mäuse kam es zu keiner Alteration der phosphorylierten Tau-Spiegel. Die β -Aktin-Spiegel, die als Ladekontrolle dienten, veränderten sich weder in den R406W^{+/+}- noch in den R406W^{-/-}-Mäusen nach Behandlung mit Annonacin.

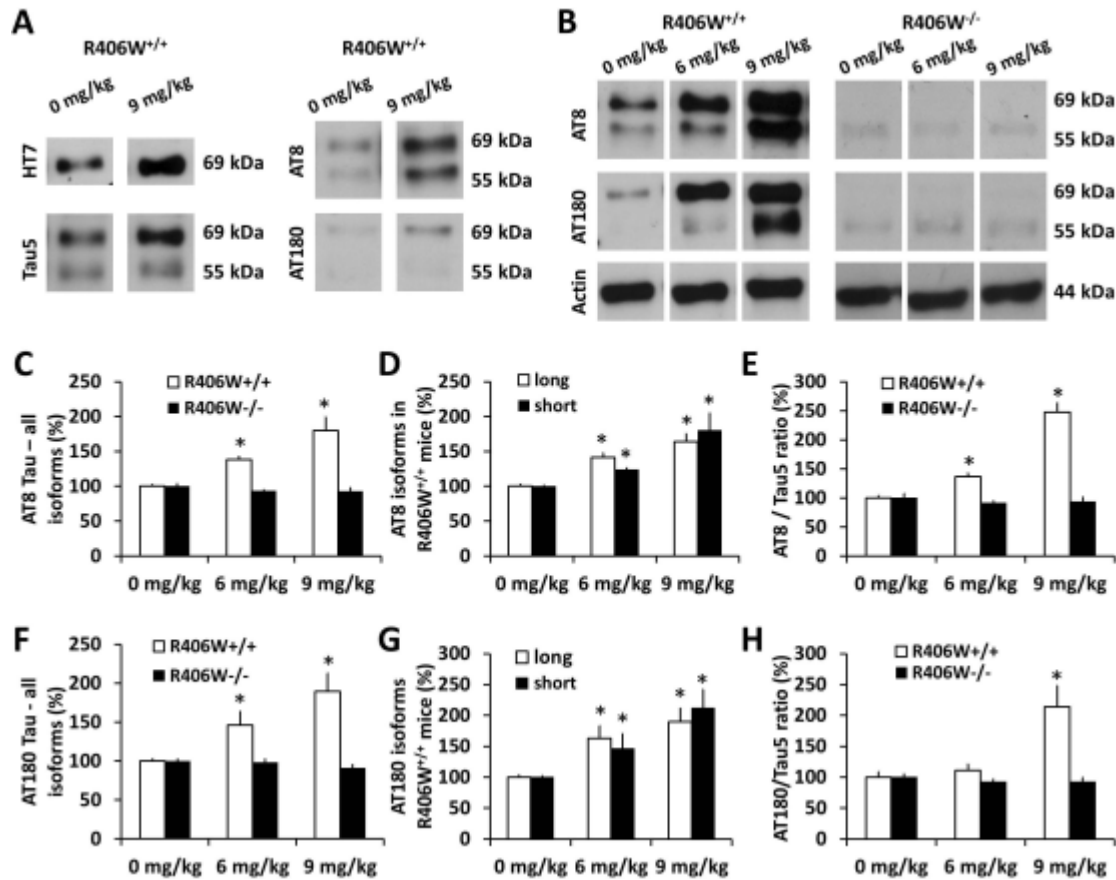


Abbildung 4: Unlösliches und phosphoryliertes Tau-Protein tritt im Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse nach Behandlung mit Annonacin (0, 6 oder 9 mg/kg/d) vermehrt auf, nicht aber im Hirngewebe der R406W^{-/-}-Mäuse.

A: Die Western-Blot-Analyse zeigt erhöhte Protein-Spiegel von humanem Tau (HT7), Gesamt-Tau (Tau5) und Phospho-Tau (AT8 und AT180) in der Sarkosyl-unlöslichen Fraktion der Gehirnproben nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin in den R406W^{+/+}-Mäusen (A), aber nicht in den R406W^{-/-}-Mäusen (nicht abgebildet).

B-D: In der löslichen Fraktion aus Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse verursacht Annonacin eine Dosisabhängige Zunahme des AT8-markierten Phospho-Taus sowohl in der langen als auch in der kurzen Isoform (B, C), jedoch nicht in den R406W^{-/-}-Mäusen; die β -Aktin-Spiegel als Ladekontrolle sind abgebildet.

F: Der AT8/Tau5-Quotient ist in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition ebenfalls signifikant erhöht, im Unterschied zu den R406W^{-/-}-Mäusen.

B, F-H: Der Phospho-Tau Antikörper AT180 zeigt ähnliche Ergebnisse.

* $p < 0.05$, zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Post-hoc LSD Test, Annonacin vs. Placebo.

3.4. Annonacin-Exposition führt zu einem Anstieg von Tau-Kinasen in R406W^{+/+}-Mäusen

Eine Zunahme der Tau-Phosphorylierung nach Annonacin-Behandlung ließe sich durch eine Aktivierung von Kinasen erklären. Zur Prüfung dieser Hypothese untersuchten wir daher im Western-Blot die Protein-Spiegel einiger Tau-Kinasen, die Tau an den durch die Antikörper AT8- und AT180-markierten Serin- und Threonin-Epitopen phosphorylieren können. Diese stellen gleichzeitig die am häufigsten mit Tauopathien assoziierten Kinasen dar (s. Kapitel 1.3). Dazu gehören GSK-3beta, ERK1/2, SAPK/JNK und Cdk5 sowie die Regulatorproteine p35 und p25. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Die Protein-Spiegel der Tau-Kinasen im Hirngewebe der R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäuse zeigten sich nach Annonacin-Exposition (0, 6 oder 9 mg/kg/d) im Western-Blot variabel verändert. Sowohl in den R406W^{+/+}- als auch in den R406W^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der SAPK/JNK-Spiegel die positiv mit der verabreichten Annonacin-Dosis von 6 bzw. 9mg/kg/Tag korrelierte. Die Erk1/2-Spiegel waren ausschließlich in den R406W^{+/+}-Mäusen und nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin erhöht. Ebenfalls nur in den transgenen Mäusen und nur mit einer Annonacin-Dosis von 9 mg/kg/Tag kam es zu einem erhöhten Spiegel der Gesamt-GSK-3beta. Die phosphorylierten Formen der GSK-3beta, sowohl die aktivierte (Tyr216) als auch die inaktivierte Form (Ser9), zeigten sich nach Annonacin-Intoxikation nur in den R406W^{+/+}-Mäusen und nur nach Behandlung mit 6 mg/kg Annonacin erhöht. Die Cdk5-Spiegel zeigten sich sowohl in den R406W^{+/+}- als auch in den R406W^{-/-}-Mäusen in positiver Korrelation zu der Annonacin-Dosis erhöht. Cdk5 benötigt die Interaktion mit p35 oder p39 für ihre Aktivierung. P25, das Spaltprodukt des p35, gilt als pathologischer Aktivator von Cdk5 (s. Abschnitt 1.1.4.2.2.). Interessanterweise zeigte sich ausschließlich in den transgenen Mäusen nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin ein Abfall der p35-Spiegel bei gleichzeitigem Anstieg der p25-Spiegel. Dies hat eine ausgeprägte Erhöhung des p25/p35-Quotienten von 10-fach bei einer Annonacin-Dosis von 6 mg/kg/Tag und 20-fach bei 9 mg/kg/Tag zur Folge.

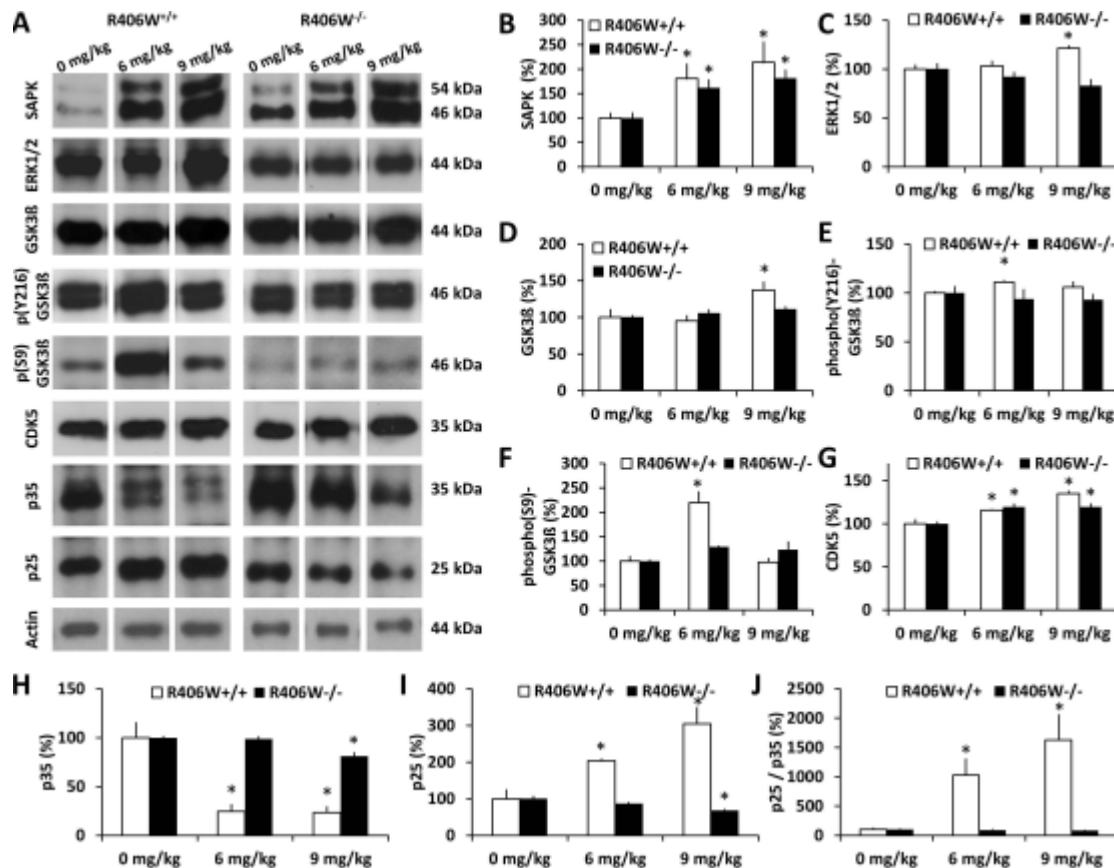


Abbildung 5: Die Protein-Spiegel der Tau Kinasen sind im Hirngewebe der R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäuse nach Annonacin-Exposition (0, 6 oder 9 mg/kg/d) variabel verändert.

A, B: SAPK-Spiegel sind sowohl in R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäusen nach Exposition mit 6 und 9 mg/kg erhöht.

A, C: Erk1/2-Spiegel sind nur in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin erhöht.

A, D-F: Die Spiegel der Gesamt-GSK-3beta sind nur in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Behandlung mit 9 mg/kg Annonacin erhöht. Die Spiegel der phosphorylierten GSK-3beta sind sowohl in der aktivierten (E), als auch die der inaktivierten Form (F) nur in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Behandlung mit 6 mg/kg Annonacin erhöht.

A, G: Cdk5-Spiegel sind sowohl in R406W^{+/+}- als auch in den R406W^{-/-}-Mäusen nach Exposition mit 6 und 9 mg/kg erhöht.

A, H-J: In den R406W^{+/+}-Mäusen, nicht aber in den R406W^{-/-}-Mäusen kommt es nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin zu einem Abfall der p35-Spiegel (H) bei gleichzeitigem Anstieg der p25-Spiegel (I), was zu einem etwa 10-fachen bzw. 20-fachen Anstieg des p25/p35-Quotienten bei 6 mg/kg bzw. 9 mg/kg Annonacin führt (J).

* p<0.05, zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Post-hoc LSD Test, Annonacin vs. Placebo.

4. Diskussion

4.1.: Die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau und proteasomale Hemmung im Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine Annonacin-Exposition über drei Tage in einer Dosis von 6 und 9 mg/kg/Tag den Gehalt sowohl des humanen als auch des murinen Tau-Proteins im frontalen Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse erhöht. In den R406W^{-/-}-Mäusen kam es hingegen zu keiner Erhöhung des Tau-Protein-Spiegels nach Annonacin-Exposition.

Unser gewähltes R406W^{+/+}-Mausmodell exprimiert neben dem endogenen murinen Tau zusätzlich die längste humane Tau-Isoform (4R2N) mit einer R406W-Mutation. In diesem transgenen Mausmodell kommt es im Alter von 12 Monaten zu einer vermehrten Akkumulation von Tau, einer reduzierten Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli und *NFT*-artigen Ablagerungen im Hippocampus (Zhang *et al.*, 2004). Dieser altersabhängige Prozess war jedoch nicht Thema dieser Arbeit. Wir verwendeten R406W^{+/+}-Mäuse im Alter von 16-18 Wochen, bevor sich also die beschriebene Tau-Pathologie ausbilden konnte. Das Mausmodell erlaubte uns die Erforschung des Einflusses von Annonacin unter Erhalt der natürlichen zellulären Netzwerke und der Blut-Hirnschranke *in vivo*. Die Beziehungen der Gliazellen zu den Neuronen, denen sowohl neuroprotektive als auch schädliche Effekte in Maus-Modellen für FTDP-17T zugeschrieben werden (Yoshiyama *et al.*, 2007, Yata *et al.*, 2011), konnten somit in unsere Untersuchungen mit einbezogen werden. Die von uns gewählten Kontroll-Mäuse (R406W^{-/-}) exprimieren lediglich endogenes Maus-Tau. Zudem exprimieren die R406W^{+/+}-Mäuse 8- bis 10-mal mehr Tau als die R406W^{-/-}-Mäuse, die nur endogenes Maus-Tau exprimieren (Zhang *et al.*, 2004). Ein besserer Vergleich von Annonacin-induzierten Veränderungen zwischen mutiertem Tau und Wildtyp-Tau wäre mit einem transgenen Maus-Modell gelungen, welches ebenfalls die längste humane Tau-Isoform, allerdings als Wildtyp-Form exprimiert und ebenfalls ein 8 bis 10-faches Expressionsniveau des humanen Tau-Proteins besitzt. Ein solches Modell stellt z.B. die sogenannte hwT^{+/+} (human wildtype Tau)-Maus dar (Zhang *et al.*, 2004), die aber für unsere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand.

Zur Überprüfung des Einflusses von Umweltfaktoren auf die Entstehung einer Tauopathie wählten wir den mitochondrialen Komplex-I Inhibitor Annonacin. Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass eine Annonacin-Exposition in mesencephaler Zellkultur aus Rattenembryos auch ohne das Vorhandensein einer Tau-Mutation bereits im nanomolaren Bereich nach 48

Stunden zu einer Umverteilung des Tau-Proteins in das Soma der Nervenzellen, zu einem Funktionsverlust der Mikrotubuli sowie zu neuronalem Zelltod führt (Escobar-Khondiker *et al.*, 2007; Höllerhage *et al.*, 2009). In Anlehnung an bereits durchgeführte Studien zur *in vivo*-Intoxikation mit Annonacin und Rotenon von Ratten (Champy *et al.*, 2004, Höglinger *et al.* 2003) wählten wir für unseren Versuch subkutan implantierte osmotische Mini-Pumpen und entschieden uns dabei für eine Expositionszeit von drei Tagen und für die Annonacin-Dosen von 6 mg/kg/Tag und 9 mg/kg/Tag. Für die Kontrollgruppen benutzten wir osmotische Mini-Pumpen, die mit Placebo gefüllt waren. In Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass Annonacin bei systemischer Administration durch osmotische Mini-Pumpen in einer Dosis von 3,8 mg/kg/Tag und 7,7 mg/kg/Tag über 28 Tage die Blut-Hirnschranke überwindet, über die Komplex-I-Inhibition der Atmungskette eine ATP-Reduktion verursacht und ein PSP-artiges Neurodegenerationsmuster erzeugt (Champy *et al.*, 2004). Die Mortalität der Annonacin-behandelten Mäuse zeigte sich in unserer Studie mit 6-13% bei 6 mg/kg/Tag und 9 mg/kg/Tag und der Expositionsdauer von drei Tagen als vertretbar. Eine längere Expositionsdauer von 7 Tagen mit einer Dosis von 6 mg/kg/Tag führte hingegen zu einer Mortalität von 84%. Eine höhere Infusionsrate von 12 mg/kg/Tag Annonacin führte innerhalb von drei Tagen zu einer Mortalität von 100%.

Die Western-Blot-Analyse stellte eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der zerebralen Tau-Protein-Spiegel dar. Durch eine Normalisierung mit Aktin konnten Fehler bei der Auftragung der Proben auf das Gel detektiert werden. Wir verwendeten bewährte kommerzielle Tau-Antikörper, die spezifisch Gesamt-Tau (Tau5) bzw. humanes Tau (T14 und HT7) nachweisen. Die Auswertung erfolgte mittels Dichtemessung der Antikörper-markierten Banden mit Hilfe eines kommerziellen Programmes. Das Auftreten von Fehlerquellen ließ sich somit gering halten.

Eine erhöhte Expression des Tau-Proteins auf der mRNA-Ebene nach Annonacin-Intoxikation konnten wir weder in den R406W^{+/+}-Mäusen noch in den R406W^{-/-}-Mäusen nachweisen. Die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau-Protein in den R406W^{+/+}-Mäusen ging also nicht mit einer vermehrten Expression von Tau einher. Zu diesem Ergebnis kam auch eine vorausgegangene Studie, bei der es in mesencephaler Zellkultur zu einem Annonacin-induzierten Anstieg des Tau-Protein-Spiegels, jedoch nicht zu einem Anstieg des Tau-mRNA-Spiegels kam (Escobar-Khondiker *et al.*, 2007). Wir untersuchten daher, ob die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau-Protein in unserem R406W^{+/+}-Modell durch einen gestörten Abbau von

Tau-Protein verursacht wird. Tau wird intrazellulär hauptsächlich durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut (David et al., 2002; Goldbaum et al., 2003; Oddo et al., 2004). Die Aktivitätsmessung der proteasomalen proteolytischen Aktivität in dieser Arbeit zeigte eine Annonacin-induzierte Hemmung der Chymotrypsin-artigen und Peptidylglutamyl-Peptid Hydrolase Aktivität ausschließlich im Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse.

Anzunehmen ist daher, dass ein verminderter Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau-Protein in den R406W^{+/+}-Mäusen hervorruft. Interessanterweise kam es in den R406W^{-/-}-Mäusen weder zu einer Tau-Akkumulation noch zu einer Hemmung des Proteasoms nach Annonacin-Exposition. Ein möglicher Pathomechanismus, der die Annonacin-induzierte Hemmung des Proteasoms in den transgenen Mäusen erklären könnte, wäre die bereits durch die Überexpression des mutierten Tau-Proteins verursachte Auslastung des UPS. Die Herbeiführung von oxidativem Stress durch die Hemmung des mitochondrialen Komplex-I bewirkt eine zusätzliche Belastung für das UPS, wie es bereits im Rotenon-Modell gezeigt werden konnte (Höglinger *et al.*, 2005). Eine Kombination dieser beiden Mechanismen könnte zu einer Überforderung des UPS und in der Folge zu einer Tau-Akkumulation führen. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass die proteasomale Aktivität alleine durch die Phosphorylierung von Tau (Poppek *et al.*, 2006) und die Interaktion mit PHF-Tau (Keck *et al.*, 2003) gehemmt wird. Die in unserer Studie beobachtete Annonacin-induzierte Zunahme von phosphoryliertem Tau und Sarkosyl-unlöslichem Tau in den R406W^{+/+}-Mäusen könnten also erklären, warum in den R406W^{+/+}-Mäusen, nicht aber in den R406W^{-/-}-Mäusen eine Annonacin-induzierte Hemmung des Proteasoms stattfand. Im Gegensatz zu Tau wird alpha-Synuclein vornehmlich durch Autophagie abgebaut (Winslow *et al.*, 2010). Wir fanden weder in den R406W^{+/+}- noch den R406W^{-/-}-Mäusen eine Veränderung der alpha-Synuclein-Spiegel nach Annonacin-Intoxikation.

4.2. Akkumulation von unlöslichem Tau-Protein und vermehrte Phosphorylierung von Tau durch Kinasen im Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse nach Annonacin-Exposition

Neben der Akkumulation von löslichem Tau-Protein konnten wir einen Annonacin-induzierten Anstieg von Sarkosyl-unlöslichem Tau-Protein in den R406W^{+/+}-Mäusen beobachten. Sowohl das humane als auch das murine sowie phosphorylierte Tau-Protein zeigte sich in der Sarkosyl-unlöslichen Fraktion des Hirngewebes der R406W^{+/+}-Mäuse nach Annonacin-Exposition erhöht,

hingegen nicht so in den R406W^{-/-}-Mäusen. Die Ablagerung von unlöslichem Tau ist eine bereits fortgeschrittene Stufe der Tau-Fehlfunktion (s. Abschnitt 1.1.5.) und stellt das gemeinsame Charakteristikum der Tauopathien dar. Da sich in der histopathologischen Analyse des Hirngewebes der R406W^{+/+}-Mäuse keine unlöslichen Tau-Strukturen im Sinne von NFTs nachweisen ließen, handelt es sich bei der unlöslichen Tau-Fraktion im Western-Blot möglicherweise um Vorstufen der NFTs, die sogenannten „Pre-Tangles“. Hier sei aber betont, dass die histologische Aufarbeitung und deren Diskussion Gegenstand einer weiteren Dissertation ist.

In den R406W^{+/+}-Mäusen bewirkte die Annonacin-Exposition einen Anstieg des phosphorylierten murinen und humanen Tau-Proteins an den Epitopen Ser202/Thr205 (AT8) und Thr231 (AT180), und zwar in einem noch größeren Ausmaß, als es für das gesamte Tau-Protein (Antikörper Tau5, T14, HT7) der Fall war. So waren die Quotienten AT8/Tau5 und AT180/Tau5 in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition signifikant erhöht. In den R406W^{-/-}-Mäusen kam es hingegen zu keiner Zunahme des phosphorylierten Tau-Proteins.

Erstmals konnte mit dieser Arbeit eine Zunahme der Tau-Phosphorylierung nach Annonacin-Exposition gezeigt werden. Vorausgegangene Studien über den Effekt von Annonacin auf das Tau-Protein in neuronalen Zellen bedienten sich *in vitro*-Modellen mit fetalen mesencephalen Zellen, in denen zwar eine Umverteilung, jedoch keine Zunahme von phosphoryliertem Tau beobachtet werden konnte (Escobar-Khondiker *et al.*, 2007). Da Tau in fetalen Neuronen physiologisch hyperphosphoryliert ist (Goedert *et al.*, 1994), ließen sich aus diesem Modell keine Schlüsse über die Auswirkung von Annonacin auf die Tau-Phosphorylierung ziehen.

Die Zunahme der Tau-Phosphorylierung in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition ließ eine Aktivierung von Tau-Kinasen vermuten. Wir überprüften daher mittels Western-Blot die Protein-Spiegel der Kinasen, die Tau an den durch die Antikörper AT8- und AT180-markierten Epitope phosphorylieren können. Dabei wählten wir diejenigen, die am häufigsten mit Tauopathien assoziiert wurden (s. Kapitel 1.3). Dies waren GSK-3beta, ERK1/2, SAPK/JNK und Cdk5 mit ihren Regulatoren p35 und p25. Die Protein-Spiegel der SAPK/JNK und ERK1/2 waren nach Behandlung mit 6 und 9 mg/kg Annonacin sowohl in den R406W^{+/+}- als auch in den R406W^{-/-}-Mäusen erhöht. Ein unmittelbarer Zusammenhang mit der Zunahme des phosphorylierten Tau-Proteins nach Annonacin-Exposition ist unwahrscheinlich, da diese nur in den R406W^{+/+}-Mäusen auftrat. Der GSK-3beta-Spiegel war hingegen nur in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition erhöht. Der Effekt trat nur in einer Annonacin-Dosis von 9

mg/kg auf, in Übereinstimmung mit einem erhöhten AT180/Tau5-Quotienten in den R406W^{+/+}-Mäusen bei Exposition mit 9 mg/kg Annonacin. Eine vermehrte Phosphorylierung von Tau an dem AT180-markierten Epitop Thr231 könnte daher durch eine Aktivierung der GSK-3beta hervorgerufen sein. Bei einer Annonacin-Dosis von 6 mg/kg blieb der Effekt auf die GSK-3beta unklar. Es kam zwar zu keiner Veränderung des GSK-3beta-Spiegel, aber sowohl zu einem Anstieg der aktivierten pGSK-3beta(Y216) als auch der inaktivierten pGSK-3beta(Ser9). Die Cdk5-Spiegel zeigten sich in den R406W^{+/+}- und in den R406W^{-/-}-Mäusen nach 6 und 9 mg/kg Annonacin erhöht. Jedoch kam es ausschließlich in den R406W^{+/+}-Mäusen zu einer eindrucklichen Erhöhung des p35/p25-Quotienten, um das 10-fache bei einer Annonacin-Dosis von 6 mg/kg und um das 20-fache bei einer Annonacin-Dosis von 9 mg/kg. Die vermehrte Spaltung des Cdk5-Aktivators p35 zu p25 wird mit einer Überaktivierung der Cdk5 assoziiert (s. Abschnitt 1.1.4.2.2). Der Anstieg des p35/p25-Quotienten nach Annonacin-Exposition in den R406W^{+/+}-Mäusen korreliert mit dem beobachteten AT8/Tau5-Quotienten, so dass sich eine Cdk5-induzierte Tau-Phosphorylierung an den AT8-Epitopen S202/T205 implizieren lässt. Zusammenfassend können daher GSK-3beta und Cdk5 in unserem Modell mit einer Schlüsselrolle für die Annonacin-induzierten Tau-Phosphorylierung in den R406W^{+/+}-Mäusen bedacht werden. GSK-3beta und Cdk5 wurden bereits vielfach mit Tau-Hyperphosphorylierung in Tauopathien in Verbindung gebracht. Interessanterweise scheint es ein enges Zusammenspiel von GSK-3beta und Cdk5 bei der pathologischen Phosphorylierung von Tau zu geben (s. auch Abschnitt 1.2.3.2). So scheint Cdk5 durch Phosphorylierung von Tau-Protein eine nachfolgende Phosphorylierung durch GSK-3beta zu katalysieren. Das durch den Antikörper AT180 markierte Epitop T231 wird durch GSK-3beta phosphoryliert. Kommt es jedoch zuvor zu einer Phosphorylierung des Epitops S235 durch Cdk5, fällt die GSK-3beta-vermittelte Phosphorylierung von T231 schneller und intensiver aus (Sengupta *et al.*, 1997; Sengupta *et al.*, 2006). Aber auch eine inhibitorische Wirkung von Cdk5 auf GSK-3beta wurde beschrieben (Hallows *et al.*, 2003; Vandebroek *et al.*, 2005; Plattner *et al.*, 2006). Für die Hyperphosphorylierung von Tau wurde der Verlust der inhibitorischen Kontrolle von Cdk5 über GSK-3beta verantwortlich gemacht, der mit einem erhöhten p25-Spiegel einherging (Plattner *et al.*, 2006). Basierend auf der Hypothese der zuletzt zitierten Untersuchung könnte der erhöhte p25-Spiegel in den R406W^{+/+}-Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Hemmung von GSK-3beta durch Cdk5 führen und zu einer vermehrten Phosphorylierung sowohl der AT80- als auch der AT8-Epitope durch GSK-3beta. Eine endgültige Aussage über den Mechanismus der Kinasen in

der Annonacin-induzierten Phosphorylierung von Tau lässt sich aus vorliegender Arbeit nicht entnehmen. Vielmehr bedarf es weiterer Studien, um das Zusammenspiel der Tau-Kinasen in diesem Modell aufzuklären. Für den Nachweis von Kinasen benutzten wir kommerzielle Kinase-Antikörper. Die Western-Blot-Ergebnisse gaben das Expressionsniveau der jeweiligen Tau-Kinasen auf der Protein-Ebene bzw. ihren Phosphorylierungsstatus oder den Spiegel ihrer Aktivatoren (p35, p25) wieder, so dass sich nur indirekte Rückschlüsse auf die Aktivität der Tau-Kinasen treffen lassen. Unser Modell lässt keine Rückschlüsse auf die genauen Wirkweisen und Phosphorylierungs-Abfolgen der Tau-Kinasen zu, sondern erlaubt lediglich einen Blick im Querschnitt. Unsere Auswahl der Antikörper stellt in Anbetracht der Vielzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen von Tau sowie der bereits bekannten Tau-Kinasen nur eine Auswahl dar, die sich auf die jeweils bekanntesten beschränken sollte. Das *in vivo*-System lässt unter anderem die natürliche Interaktion mehrerer Tau-Kinasen zu. Bislang finden sich wenige Studien, die sich mit der Rolle der Tau-Kinasen außerhalb von begrenzten *in vitro*-Modellen beschäftigt haben.

4.3. Synergistischer Effekt von Mutation und Umweltfaktor

Eine *in vivo*-Intoxikation mit Annonacin bewirkte bei einer Dosis von 6 mg/kg/Tag und 9 mg/kg/Tag über drei Tage bereits einen Anstieg des humanen und murinen Tau-Proteins sowie in einem noch größeren Ausmaß einen Anstieg des phosphorylierten Tau-Proteins in den R406W^{+/+}-transgenen Mäusen. Diese Effekte zeigten sich ausschließlich in transgenen Mäusen, die humanes R406W-mutiertes Tau exprimierten, und nicht in den Mäusen, die nur endogenes Maus-Tau exprimierten (R406W^{-/-}). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Umweltfaktor Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer genetisch determinierten Tauopathie nehmen kann.

Zu prüfen bleibt, ob eine längere *in vivo*-Intoxikation auch bei den Wildtyp-Mäusen zu einer Tau-Pathologie führen kann. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass in dem von uns verwendeten transgenen Mausmodell die R406W^{+/+}-Mutation alleine zu einer Tau-Pathologie führt. Unter dem Aspekt, dass es zu einer Hochregulation einiger Tau-Kinasen nach Annonacin-Exposition in den R406W^{-/-}-Mäusen kam, wäre die Ausbildung von Tau-Pathologie auch in den nicht-transgenen Mäusen bei einer längeren Annonacin-Expositionszeit denkbar.

4.4. Relevanz der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine systemische Exposition mit Annonacin über nur drei Tage bereits eine Tau-Pathologie *in vivo* erzeugen kann, wenn es in einem Maus-Modell angewendet wird, das eine R406W-mutierte Form des humanen Tau-Proteins exprimiert. Auch war es uns durch das gewählte Modell erstmals möglich, eine Hyperphosphorylierung von Tau durch Annonacin-Exposition nachzuweisen. Wie bereits unter Kapitel 1.4.2. erläutert, scheint es eine Reihe von genetischen Prädispositionen für sogenannte sporadische Tauopathien zu geben. Am bekanntesten ist dabei der Tau-Haplotyp H1. Ebenso lassen die unterschiedliche phänotypische Ausprägung und Krankheitsdauer der autosomal-dominant vererbten FTDP-17T annehmen, dass Umwelteinflüsse die Ausprägung der Pathologie und Klinik der FTDP-17T mitbestimmen. Annonacin ist ein mitochondrialer Komplex-I-Hemmer, der mit dem Auftreten eines atypischen Parkinson-Syndroms auf der karibischen Insel Guadeloupe in Zusammenhang gebracht wurde (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre, *et al.* 2002; Lannuzel *et al.*, 2007). Obwohl Annonacea-Gewächse geographisch eine begrenzte Verbreitung haben, diente uns Annonacin als Modell für eine Reihe anderer mitochondrialer Komplex-I Inhibitoren von globalerem Vorkommen (Höllerrhage *et al.*, 2009; Schapira, 2010). Unsere Ergebnisse sind nicht nur im Zusammenhang mit dem atypischen Parkinson-Syndrom von Guadeloupe und Neukaledonien relevant. Sie zeigen auch beispielhaft, in welchem Ausmaß Umweltfaktoren die Ausprägung der Tau-Pathologie in FTDP-17T beeinflussen könnten und, andersherum, wie genetische Prädispositionen im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren das Auftreten sogenannter sporadischer Tauopathien beeinflussen könnten.

Gleichzeitig stellt diese Studie ein Modell vor, mit dem die molekularen Mechanismen untersucht werden können, die durch die Interaktion von Umweltgiften und Tau-Mutationen zu der Entstehung von Tau-Pathologie führen. So konnten wir zeigen, dass die Annonacin-Exposition in den R406W^{+/+}-Mäusen zu einer erhöhten Expression von Tau-Kinasen und zu einer Hemmung des Proteasoms führt. Insbesondere die Beteiligung von Tau-Kinasen in der Entstehung von Tauopathien stellt einen wertvollen Ansatzpunkt für kausale Therapien dar. Inhibitoren der GSK-3beta wie Lithium, Valproat und Tideglusib sind bereits in klinischen Studien untersucht worden (www.clinicaltrials.gov). In der kürzlich abgeschlossenen multizentrischen Phase II-Studie von Tideglusib in Patienten mit PSP konnte gezeigt werden, dass eine einjährige Behandlung mit dem GSK-3beta-Inhibitor zu einer Reduktion der Hirnatrophie im Vergleich zum Placebo-Arm führte (Höglinger *et al.*, eingereicht). Es bleibt zu prüfen, ob die Inhibition von GSK-3beta, Cdk5 oder

ihr Aktivator p25 in unserem *in vivo*-Modell die Entstehung von Annonacin-induzierter Tau-Pathologie verhindern kann und ob Inhibitoren von Cdk5 und p25 in der Anwendung an Patienten Erfolg bringen.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die Effekte der *in vivo*-Exposition durch dem natürlichen mitochondrialen Komplex-I-Hemmer Annonacin in einem transgenen Mausmodell mit einer FTDP-17T-Mutation des Tau Proteins (R406W^{+/+}) verglichen mit einem Wildtyp-Mausmodell (R406W^{-/-}). Es sollte untersucht werden, ob und über welche Pathomechanismen Annonacin *in vivo* zu einer Akkumulation und Hyperphosphorylierung von Tau führt und inwieweit eine genetische Veränderung des Tau-Proteins den Effekt von Annonacin verstärkt. Dazu wurden transgene R406W^{+/+}- und R406W^{-/-}-Mäuse über drei Tage mit Annonacin-Dosen von 6 mg/kg/Tag und 9 mg/kg/Tag oder Placebo mittels subcutaner osmotischer Pumpe behandelt. Mittels Western-Blot-Analyse untersuchten wir die die Effekte der Annonacin-Exposition auf das Tau-Protein im Hirngewebe beiden Maus-Gruppen.

Wir konnten zeigen, dass Annonacin zu einem Anstieg sowohl des humanen als auch des murinen Tau-Proteins im frontalen Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse führt. In den R406W^{-/-}-Mäusen kam es hingegen zu keiner Erhöhung des Tau-Protein-Spiegels nach Annonacin-Exposition. Wir verglichen daraufhin die Tau-Expression auf mRNA-Ebene und die Aktivität des Proteasoms unter den oben genannten Gruppen. Dazu bedienten wir uns der DNA-Quantifizierung mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und eines Essays für die proteasomale Aktivitätsmessung. Die Akkumulation von Tau-Protein in den R406W^{+/+}-Mäusen nach Annonacin-Exposition ging nicht mit einer vermehrten Expression von Tau-mRNA einher. Doch führte Annonacin im Hirngewebe der R406W^{+/+}-Mäuse zu einer Hemmung der proteasomalen proeolytischen Aktivität. Anzunehmen war daher, dass ein verminderter Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System die Annonacin-induzierte Akkumulation von Tau-Protein in den R406W^{+/+}-Mäusen hervorrief. Mittels Western-Blot-Analyse untersuchten wir den Effekt von Annonacin auf die Expression der wichtigsten Tau-Kinasen im Hirngewebe der Versuchsmäuse und fanden in den R406W^{+/+}-Mäusen eine mit dem Anstieg der Tau-Phosphorylierung korrelierende erhöhte Expression von GSK-3beta, Cdk5 und dem pathologischen Cdk5-Aktivator p25. Diese Befunde sind insbesondere vor dem Hintergrund der Entwicklung von

Therapiestrategien von Tauopathien mittels Kinase-Inhibitoren relevant. Das R406W^{+/+}-Mausmodell sowie die kontinuierliche *in vivo*-Intoxikation mit Annonacin über eine subcutan-implantierte Pumpe stellen aufschlussreiche Instrumente für die Erforschung von Tauopathien dar, waren in ihrer Kombination hilfreich für die Beantwortung unserer Frage nach der Interaktion zwischen Umwelt und Genetik und konnten zusätzliche Hinweise auf die zugrunde liegenden Pathomechanismen erbringen.

Auf diese Weise konnten wir neue Einblicke in die der Tau-Akkumulation und Tau-Hyperphosphorylierung zu Grunde liegenden Pathomechanismen gewinnen.

Mit vorliegender Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass es zu einem synergistischen Effekt von genetischer Prädisposition und Umwelt kommt, indem ein Umweltfaktor Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer genetisch determinierten Tauopathie nehmen kann. Der Umweltfaktor Annonacin lässt sich dabei als Prototyp für weitere, global vorkommende mitochondrialen Komplex-I-Inhibitoren verstehen. Auch lässt sich möglicherweise das von uns eingesetzte FTDP-17T-Modell für die R406W Mutation auf andere hereditäre sowie „sporadische“ Tauopathien mit genetischer Prädisposition übertragen.

6. Literaturverzeichnis

- Agorogiannis EI, Agorogiannis GI, Papadimitriou A, Hadjigeorgiou GM (2004). *Protein misfolding in neurodegenerative diseases*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30 (3): 215–224.
- Albers DS, Beal MF (2002). *Mitochondrial dysfunction in progressive supranuclear palsy*. *Neurochemistry International*, 40 (6): 559-564.
- Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994). *Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91 (12): 5562-5566.
- Alonso AD, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004). *Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations*. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (33): 34873–34881
- Angibaud G, Gaultier C, Rascol O (2004). *Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia*. *Movement Disorders*, 19 (5): 603-604.
- Armstrong MJ, Lang AE, Bak TH, Bhatia KP, Borroni B, Boxer AL, Dickson DW, Grossman M, Hallett M, Josephs KA, Kertesz A, Lee SE, Miller BL, Reich SG, Riley DE, Tolosa E, Tröster AI, Vidailhet M, Weiner WJ (2013). *Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration*. *Neurology*, 80 (5): 496–508.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004). *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. *Physiological Reviews*, 84 (2): 361–384.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007). *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. *Nature Reviews Neuroscience*, 8 (9): 663-672.

Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM (1989). *Accumulation of abnormally phosphorylated Tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Brain Research*, 477 (1-2): 90–99.

Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993). *Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of Tau-protein by cyclin-dependent kinases Cdk2 and Cdk5*. *FEBS Letters*, 336 (3): 417–424.

Bergeron C, Pollanen MS, Weyer L, Lang AE (1997). *Cortical degeneration in progressive supranuclear palsy. A comparison with cortical-basal ganglionic degeneration*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56 (6): 726-734.

Quinn B, Johnson N, Cochran EJ, Ghoshal N, Binder LI (2001). *Pathological glial tau accumulations in neurodegenerative disease: review and case report*. *Neurochemistry International*, 39 (5-6): 469-479.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985). *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. *Journal of Cell Biology*, 101 (4): 1371–1378.

Brun A, Englund B, Gustofson L, Passant U, Mann D, Neary D, Snowden J (1994). *Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 57 (4): 416–418.

Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000). *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative diseases*. *Brain Research Reviews*, 33 (1): 95–130.

Bussiere T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP, Buee L, Delacourte A (1999). *Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration*. *Acta Neuropathologica*, 97 (3): 221–230.

Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P (1998). *Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis*. Journal of Neuroscience, 18 (18), 7061–7074.

Caparros-Lefebvre D, Elbaz A (1999). *Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study*. Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet, 354 (9175): 281-286.

Caparros-Lefebvre D, Sergeant N, Lees A, Camuzat A, Daniel S, Lannuzel A, Brice A, Tolosa E, Delacourte A, Duyckaerts C (2002). *Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy*. Brain, 125 (4): 801-811.

Caparros-Lefebvre D (2004). *Atypical parkinsonism in New Caledonia: comparison with Guadeloupe and association with Annonaceae consumption*. Movement Disorders, 19 (5): 604.

Caparros-Lefebvre D, Steele J (2005). *Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses*. Environmental Toxicology & Pharmacology, 19 (3): 407-413.

Champy P, Höglinger GU, Feger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurens A, Guerineau V, Laprevote O, Medja F, Lombes A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC, Ruberg M (2004). *Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe*. Journal of Neurochemistry, 88 (1): 63-69.

Champy P, Melot A, Guerineau Eng V, Gleye C, Fall D, Höglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprevote O, Laurens A, Hocquemiller R (2005). *Quantification of acetogenins in Annona muricata linked to atypical parkinsonism in guadeloupe*. Movement Disorders, 20 (12): 1629-1633.

Cheung ZH, Ip NY (2012). *Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases*. Trends in Cell Biology, 22 (3): 169-175.

Chirichigno JW, Manfredi G, Beal MF, Albers DS (2002). *Stress-induced mitochondrial depolarization and oxidative damage in PSP cybrids*. Brain Research, 951 (1): 31–35.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977). *Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin*. Journal of Molecular Biology, 116 (2): 207–225.

Cohen P, Frame S (2001). *The renaissance of GSK3*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2 (10): 769-776.

Collins MA (1999). *Atypical parkinsonism in the French West Indies*. Lancet, 354 (9188): 1473-1474.

Combs CK, Coleman PD, O'Banion MK (1998). *Developmental regulation and PKC dependence of Alzheimer's type tau phosphorylations in cultured fetal rat hippocampal Neurons*. Developmental Brain Research, 107 (1): 143–158.

Cummings JL (2004). *Drug Therapy: Alzheimer's Disease*. New England Journal of Medicine, 351 (1): 56–67.

Crowther RA, Goedert M (2000). *Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases*. Journal of Structural Biology, 130 (2-3): 271-279.

Cruz JC, Tsai LH (2004). *A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease*. Current Opinion in Neurobiology, 14 (3): 390–394.

David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG (2002). *Proteasomal degradation of tau protein*. Journal of Neurochemistry, 83 (1):176-85.

Delobel P, Flament S, Hamdane M, Jakes R, Rousseau A, Delacourte A, Vilain JP, Goedert M, Buée L (2002). *Functional characterization of FTDP-17 tau gene mutations through their effects on Xenopus oocyte maturation*. Journal of Biological Chemistry, 277 (11): 9199-9205.

Delobel P, Lavenir I, Fraser G, Ingram E, Holzer M, Ghetti B, Spillantini MG, Crowther RA, Goedert M (2008). *Analysis of Tau Phosphorylation and Truncation in a Mouse Model of Human Tauopathy*. The American Journal of Pathology, 172 (1): 123-131.

Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, Duyckaerts C, Horoupian D, Ikeda K, Jellinger K, Lantos PL, Lippa CF, Mirra SS, Tabaton M, Vonsattel JP, Wakabayashi K, Litvan I (2002). *Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 61 (11): 935-946.

Donker Kaat L, Boon AJ, Kamphorst W, Ravid R, Duivenvoorden HJ, van Swieten JC (2007). *Frontal presentation in progressive supranuclear palsy*. Neurology, 69 (8):723-729.

Escobar-Khondiker ME, Höllerhage M, Michel PP, Muriel MP, Champy P, Respondek G, Yagi T, Lannuzel A, Hirsch EC, Oertel WH, Jacob R, Ruberg M, Höglinger GU (2007). *Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons*. Journal of Neuroscience, 27 (29): 7827-7837.

Esmaeli-Azad B, McCarty JH, Feinstein SC (1994). *Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability*. Journal of Cell Science, 107 (4): 869– 979.

Fellous A, Francon J, Lennon AM, Nunez J (1977). *Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors*. European Journal of Biochemistry, 78 (1), 167–174.

Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Ribera R, Goutan E, Puig B, Rey MJ, Cardozo A, Viñals F, Ribalta T (2001). *Phosphorylated MAP kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration*. Brain Pathology, 11 (2): 144-158.

Ferrer I, Pastor P, Rey MJ, Muñoz E, Puig B, Pastor E, Oliva R, Tolosa E (2003). *Tau phosphorylation and kinase activation in familial tauopathy linked to deln296 mutation*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29 (1): 23–34.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M; Alzheimer's Disease International (2005). *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. *Lancet*, 366 (9503): 2012-2017.

Flaherty DB, Soria JP, Tomasiewicz HG, Wood JG (2000). *Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants*. *Journal of Neuroscience Research*, 62 (3): 463-472.

Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F (1991). *Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type*. *Acta Neuropathologica*, 81 (6): 591-596.

Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004). *Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs*. *Nature Medicine*, 10 (10): 1055–1063.

Foster NL, Gilman S, Berent S, Morin EM, Brown MB, Koeppe RA (1988). *Cerebral hypometabolism in progressive supranuclear palsy studied with positron emission tomography*. *Annals of Neurology*, 24 (3): 399-406.

Gasparini L, Terni B, Spillantini MG (2007). *Frontotemporal dementia with tau pathology*. *Neurodegenerative Diseases*, 4 (2-3): 236-253.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989). *Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain*. *EMBO Journal*, 8 (2): 393-399.

Goedert M, Jakes R (1990). *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. EMBO Journal, 9 (13): 4225–4230.

Goedert M, Crowther RA, Garner CC (1991). *Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2*. Trends in Neurosciences, 14 (5): 193- 199.

Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994). *Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein*. Biochemical Journal, 301 (3): 871-877.

Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P (1995). *Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase*. Journal of Neurochemistry, 65 (6): 2804-2807.

Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997). *Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases*. FEBS Letters, 409 (1): 57–62.

Goedert M, Spillantini MG (2011). *Pathogenesis of tauopathies*. Journal of Molecular Neuroscience, 45 (3): 425-431.

Goldbaum O, Oppermann M, Handschuh M, Dabir D, Zhang B, Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM, Richter-Landsberg C (2003). *Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid*. Journal of Neuroscience, 23 (26): 8872-8880.

Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997). *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 386 (6624): 463-471.

Hallows JL, Chen K, DePinho RA, Vincent I (2003). *Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased*

cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. Journal of Neuroscience, 23 (33):10633-10644.

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion J-P, Anderton BH (1992). *Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localization of the kinase*. Neuroscience Letters, 147 (1): 58-62.

Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009). *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. Trends in Molecular Medicine, 15 (3): 112-119.

Hanger DP, Noble W (2011). *Functional implications of Glycogen Synthase Kinase-3-mediated tau phosphorylation*. International Journal of Alzheimer's Disease, 2011: 352805.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J (2009). *Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease*. Nature Genetics, 41 (10): 1088-1093.

Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M (1998). *Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly*. FEBS Letters, 437 (3): 207-210.

Hauw JJ, Daniel SE, Dickson D, Horoupian DS, Jellinger K, Lantos PL, McKee A, Tabaton M, Litvan I (1994). *Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy)*. *Neurology*, 44 (11): 2015–2019.

Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW Jr. (1989). *Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains*. *Molecular Cell Biology*, 9 (4): 1381-1388.

Höglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003). *Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats*. *Journal of Neurochemistry*, 84 (3): 491-502.

Höglinger GU, Lannuzel A, Khondiker ME, Michel PP, Duyckaerts C, Feger J, Champy P, Prigent A, Medja F, Lombes A, Oertel WH, Ruberg M, Hirsch EC (2005). *The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy*. *Journal of Neurochemistry*, 95 (4): 930-930.

Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PM, Wang LS, Klei L, Rademakers R, de Silva R, Litvan I, Riley DE, van Swieten JC, Heutink P, Wszolek ZK, Uitti RJ, Vandrovcova J, Hurtig HI, Gross RG, Maetzler W, Goldwurm S, Tolosa E, Borroni B, Pastor P; PSP Genetics Study Group, Cantwell LB, Han MR, Dillman A, van der Brug MP, Gibbs JR, Cookson MR, Hernandez DG, Singleton AB, Farrer MJ, Yu CE, Golbe LI, Revesz T, Hardy J, Lees AJ, Devlin B, Hakonarson H, Müller U, Schellenberg GD (2011). *Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy*. *Nature Genetics*, 43 (7): 699-705.

Höglinger GU, Huppertz H-J, Wagenpfeil S, Vinas Andrés M, Belloch V, León, T, del Ser, T for the TAUROS MRI investigators. *Tideglusib reduces progression of brain atrophy in progressive supranuclear palsy in a randomized trial*. Unter Review bei *Movement Disorders Journal*.

Höllerhage M, Matusch A, Champy P, Lombès A, Ruberg M, Oertel WH, Höglinger GU (2009). *Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies*. *Experimental Neurology*, 220 (1): 133-142.

Hoffmann R, Lee VM, Leight S, Varga I, Otvos L Jr (1997). *Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites*. *Biochemistry*, 36 (26): 8114–8124

Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, Casey B, Broe M, Bak TH, Kril JJ, Halliday GM (2004). *Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia*. *Annals of Neurology*, 56 (3): 399–406.

Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L (1998). *Mutationspecific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17*. *Science*, 282 (5395): 1914–1917

Hutton M, Lendon CL, 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 RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998). *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. *Nature*, 393 (6686):702-705.

Hyman BT, Trojanowski JQ (1997). *Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56 (10): 1095-1097.

Houlden H, Baker M, Morris HR, MacDonald N, Pickering-Brown S, Adamson J, Lees AJ, Rossor MN, Quinn NP, Kertesz A, Khan MN, Hardy J, Lantos PL, St George-Hyslop P, Munoz

DG, Mann D, Lang AE, Bergeron C, Bigio EH, Litvan I, Bhatia KP, Dickson D, Wood NW, Hutton M (2001). *Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype*. *Neurology*, 56 (12): 1702-1706.

Hutton M, Lendon CL, 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 RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998). *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. *Nature*, 393 (6686): 702-705.

Ikeuchi T, Kaneko H, Miyashita A, Nozaki H, Kasuga K, Tsukie T, Tsuchiya M, Imamura T, Ishizu H, Aoki K, Ishikawa A, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M (2008). *Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations*. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 26 (1): 43-49.

Ikeuchi T, Imamura T, Kawase Y, Kitade Y, Tsuchiya M, Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Tsukie T, Miyashita A, Sugishita M, Kuwano R, Nishizawa M (2011). *Evidence for a common founder and clinical characteristics of Japanese families with the MAPT R406W mutation*. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 1 (1): 267–275

Ingram E, Spillantini M (2002). *Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17*. *Trends in Molecular Medicine*, 8 (12): 555-562.

Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K (1993). *Glycogen synthase kinase 3b is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments*. *FEBS Letters*, 325 (3): 167–172.

Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Alonso AC, Grundke-Iqbal I (2009). *Mechanisms of tau-induced neurodegeneration*. *Acta Neuropathologica*, 118 (1): 53–69.

Jellinger KA, Bancher C, Hauw JJ, Verny M (1995). *Progressive supranuclear palsy: neuropathologically based diagnostic clinical criteria*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 59 (1): 106.

Josephs KA, Duffy JR (2008). *Apraxia of speech and nonfluent aphasia: a new clinical marker for corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy*. Current Opinion in Neurology, 21 (6): 688–692.

Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003). *Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease*. Journal of Neurochemistry, 85 (1): 115–122.

Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000). *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. Journal of Neurochemistry, 75 (1): 436-439.

Kenessey A, Yen SH (1993). *The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments*. Brain Research, 629 (1): 40-46.

Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH (1997). *Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration*. Journal of Neurochemistry, 69 (5): 2026-2038.

Kersaitis C, Halliday GM, Kril JJ (2004). *Regional and cellular pathology in frontotemporal dementia: relationship to stage of disease in cases with and without Pick bodies*. Acta Neuropathologica, 108 (6): 515–523.

Kins S, Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J (2001). *Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice*. Journal of Biological Chemistry, 276 (41): 38193-38200.

Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow EM (2006). *Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy*:

aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. Journal of Biological Chemistry, 281 (2):1205-1214.

Ksiezak-Reding H, Morgan K, Mattiace LA, Davies P, Liu WK, Yen SH, Weidenheim K, Dickson DW (1994). *Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration.* American Journal of Pathology, 145 (6): 1496-1508.

Knowles RB, Chin J, Ruff CT, Hyman BT (1999). *Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer disease.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 58 (10): 1090-1098.

Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993). *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease.* Journal of Biological Chemistry, 268 (32): 24374-24384.

Kobayashi K, Kidani T, Ujike H, Hayashi M, Ishihara T, Miyazu K, Kuroda S, Koshino Y (2003). *Another phenotype of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome-17 (FTDP-17) with a missense mutation of S305N closely resembling Pick's disease.* Journal of Neurology, 250 (8): 990-992.

Komori T (1999). *Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease.* Brain Pathology, 9 (4):663-79.

Kompoliti K, Goetz CG, Boeve BF, Maraganore DM, Ahlskog JE, Marsden CD, Bhatia KP, Greene PE, Przedborski S, Seal EC, Burns RS, Hauser RA, Gauger LL, Factor SA, Molho ES, Riley DE (1998). *Clinical presentation and pharmacological therapy in corticobasal degeneration.* Archives of Neurology, 55 (7): 957-961.

Kosik K, Orecchio L, Bakalis S, Neve R (1989). *Developmentally regulated expression of specific tau sequences.* Neuron, 2 (4):1389-1397.

Lannuzel A, Michel PP, Höglinger GU, Champy P, Jousset A, Medja F, Lombes A, Darios F, Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R, Hirsch EC, Ruberg M (2003). *The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism*. *Neuroscience*, 121 (2): 287-296.

Lannuzel A, Höglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, Poullain P, Oertel WH, Hirsch EC, Dubois B, Ruberg M (2007). *Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes?* *Brain*, 130 (3): 816-827.

Lau LF, Schachter JB, Seymour PA, Sanner MA (2002). *Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2 (4): 395–415.

Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989). *The microtubule binding domain of tau protein*. *Neuron*, 2 (6): 1615–1624.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001). *Neurodegenerative tauopathies*. *Annual Review of Neuroscience*, 24: 1121-1159.

Lee VM, Kenyon TK, Trojanowski JQ (2005). *Transgenic animal models of tauopathies*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739 (2-3): 251-259.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000). *Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain*. *Nature*, 405 (6784): 360–364.

Lee CW, Lau, KF, Miller CC, Shaw PC (2003). *Glycogen synthase kinase 3 α -mediated tau phosphorylation in cultured cell lines*. *NeuroReport*, 14 (2): 257-260.

Leroy K, Boutajangout A, Authelet M, Woodgett JR, Anderton BH, Brion JP (2002). *The active form of glycogen synthase kinase-3 β is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathologica*, 103 (2): 91–99.

Li T, Hawkes C, Qureshi HY, Kar S, Paudel HK (2006). *Cyclin-Dependent Protein Kinase 5 Primes Microtubule-Associated Protein Tau Site-Specifically for Glycogen Synthase Kinase 3b*. *Biochemistry*, 45 (10): 3134 - 3145.

Lindwall G, Cole RD (1984). *Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly*. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (8): 5301-5305.

Lindquist SG, Holm IE, Schwartz M, Law I, Stokholm J, Batbayli M, Waldemar G, Nielsen JE (2008). *Alzheimer disease-like clinical phenotype in a family with FTDP-17 caused by a MAPT R406W mutation*. *European Journal of Neurology*, 15 (4): 377-385.

Lindquist SG, Schwartz M, Batbayli M, Waldemar G, Nielsen JE (2009). *Genetic testing in familial AD and FTD: mutation and phenotype spectrum in a Danish cohort*. *Clinical Genetics*, 76 (2): 205-209.

Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, Goetz CG, Golbe LI, Grafman J, Growdon JH, Hallett M, Jankovic J, Quinn NP, Tolosa E, Zee DS (1996). *Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop*. *Neurology*, 47 (1): 1-9.

Litvan I, Agid Y, Goetz C, Jankovic J, Wenning GK, Brandel JP, Lai EC, Verny M, Ray-Chaudhuri K, McKee A, Jellinger K, Pearce RKB, Bartko J (1997). *Accuracy of the clinical diagnosis of corticobasal degeneration: A clinicopathologic study*. *Neurology*, 48 (1): 119-125.

Longuefosse JL, Nossin E (1996). *Medical ethnobotany survey in Martinique*. *J Ethnopharmacology*, 53 (3): 117-142.

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J (2001). *Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice*. *EMBO Journal*, 20 (1-2): 27-39

Mahapatra RK, Edwards MJ, Schott JM, Bhatia KP (2004). *Corticobasal degeneration*. *Lancet Neurology*, 3 (12): 736–743.

Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1995). *Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules*. *Neurobiology of Aging*, 16 (3): 355-362. Review.

Martinelli P, Scaglione C, Lodi R, Iotti S, Barbiroli B (2000). Deficit of brain and skeletal muscle bioenergetics in progressive supranuclear palsy shown in vivo by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Movement Disorders*, 15 (5): 889-893.

McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ; Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease (2001). *Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease*. *Archives of Neurology*, 58 (11): 1803-1809.

McKhann G, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011). *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease. Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimer's & Dementia*, 7 (3): 263-269.

Martinelli P, Scaglione C, Lodi R, Iotti S, Barbiroli B (2000). *Deficit of brain and skeletal muscle bioenergetics in progressive supranuclear palsy shown in vivo by phosphorus magnetic resonance spectroscopy*. *Movement Disorders*, 15 (5): 889-893.

Medina M, Castro A (2008). *Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors reach the clinic*. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 11 (4): 533-543. Review.

Mercy L, Hodges JR, Dawson K, Barker RA, Brayne C (2008). *Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom*. *Neurology*, 71(19): 1496-1499.

Messing L, Decker JM, Joseph M, Mandelkow E, Mandelkow EM (2012). *Cascade of tau toxicity in inducible hippocampal brain slices and prevention by aggregation inhibitors*. *Neurobiology of Aging*, 34 (5): 1343-1354.

Minden A, Karin M (1997). *Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333 (2): 85-104. Review.

Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K, Ihara Y (2001). *Molecular analysis of mutant and wild-Type tau deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation*. *American Journal of Pathology*, 158 (2), 373–379.

Mocanu MM, Nissen A, Eckermann K, Khlistunova I, Biernat J, Drexler D, Petrova O, Schönig K, Bujard H, Mandelkow E, Zhou L, Rune G, Mandelkow EM (2008). *The potential for betastructure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy*. *Journal of Neuroscience*, 28 (3): 737–748.

Mullane K, Williams M (2013). *Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis—but what lies beyond?* *Biochemical Pharmacology*, 85 (39); 289–305.

Muñoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1997). *Lithium inhibits Alzheimers disease-like tau protein phosphorylation in neurons*. *FEBS Letters*, 411 (2-3): 183–188.

Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P, Guazzelli M, Smith MJ, Hasegawa M, Redi F, Crowther RA, Pietrini P, Ghetti B, Goedert M (1999). *Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58 (12): 1207-1226.

Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, Rohrer K, Kaleem M, Marlowe L, Lees A, Leung D, McKeith IG, Perry RH, Morris CM, Trojanowski JQ, Clark C, Karlawish J, Arnold S, Forman MS, Van Deerlin V, de Silva R, Hardy J (2007). *The MAPT H1c risk haplotype is associated with*

increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. Neurobiology of Disease, 25 (3): 561-570.

Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, Morris HR, Wood NW, Lees AJ, Burn DJ (2001). *The prevalence of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) in the UK.* Brain, 124 (7):1438–1449.

Neve RL, Harris P, Keneth S, Kosik S, Kurnit DM, Donlon TA (1986). *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2.* Molecular Brain Research, 1 (3): 271-280.

Noble W, Olm V, Takata, K, Casey E, Mary O, Meyerson, J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahljianian M, Lau LF, Duff K (2003). *Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo.* Neuron, 38 (4): 555-565.

Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004). *A-beta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome.* Neuron, 43 (3): 321-32.

Ono T, Yamamoto H, Tashima K, Nakashima H, Okumura E, Yamada K, Hisanaga S, Kishimoto T, Miyakawa T, Miyamoto E (1995). *Dephosphorylation of abnormal sites of tau factor by protein phosphatases and its implication for Alzheimer's disease.* Neurochemistry International, 26 (3): 205-215.

Orlowski M, Wilk S (2000). *Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex.* Archives of Biochemistry & Biophysics, 383 (1): 1-16. Review.

Ostojic J, Elfgren C, Passant U, Nilsson K, Gustafson L, Lannfelt L, Froelich Fabre S (2004). *The tau R406W mutation causes progressive presenile dementia with bitemporal atrophy.* Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 17 (4): 298-301.

Passant U, Ostojic J, Froelich Fabre S, Gustafson L, Lannfelt L, Larsson EM, Nilsson K, Rosen I, Elfgren C (2004). *Familial presenile dementia with bitemporal atrophy*. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 17 (4): 287-292.

Patrick GN, Zuckerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999). *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. *Nature*, 402 (6762): 615-622.

Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B, Cowburn RF (1998). *Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration*. *Brain Research*, 797 (2): 267-277.

Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999). *Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58 (9): 1010-1019.

Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X, Raina AK, Holbrook N, Siedlak SL, Harris PL, Smith MA (1999). *Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation*. *Neuroreport*, 10 (11): 2411-2415

Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, Yu WH, Luchsinger JA, Wadzinski B, Duff KE, Takashima A (2007). *Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms*. *Journal of Neuroscience*, 27 (50): 13635-13648.

Plattner F, Angelo M, Giese KP (2006). *The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35):25457-2565.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD (1998). *Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia*. *Annals of Neurology*, 44 (3): 428.

Pope WB, Enam SA, Bawa N, Miller BE, Ghanbari HA, Klein WL (1993). *Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system*. *Experimental Neurology*, 120 (1): 106–113.

Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, Davies KJA, Grune T (2006). *Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress*. *Biochemical Journal*, 400 (3): 511–520

Rademakers R, Dermaut B, Peeters K, Cruts M, Heutink P, Goate A, Van Broeckhoven C (2003). *Tau (MAPT) mutation Arg406Trp presenting clinically with Alzheimer disease does not share a common founder in Western Europe*. *Human Mutations*, 22 (5): 409-411.

Reed LA, Grabowski TJ, Schmidt ML, Morris JC, Goate A, Solodkin A, Van Hoesen GW, Schelper RL, Talbot CJ, Wragg MA, Trojanowski JQ (1997). *Autosomal dominant dementia with widespread neurofibrillary tangles*. *Annals of Neurology*, 42 (4): 564-572.

Reed LA, Wszolek ZK, Hutton M (2001). *Phenotypic correlations in FTDP-17*. *Neurobiology of Aging*, 22 (1): 89-107.

Respondek G, Roeber S, Kretschmar H, Troakes C, Al-Sarraj S, Gelpi E, Gaig C, Chiu WZ, van Swieten JC, Oertel WH, Höglinger GU (2013). *Accuracy of the national institute for neurological disorders and stroke/society for progressive supranuclear palsy and neuroprotection and natural history in Parkinson plus syndromes criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy*. *Movement Disorders*, 28 (4): 504–509.

Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yale A, Anderton BH (1997). *Stress- activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein*. *Journal of Neurochemistry*, 68 (4): 1736–1744.

Reynolds CH, Betts JC, Blastock WP, Nebreda AR, Anderton BH (2000). *Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: Differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and p38, and glycogen synthase kinase-3beta*. *Journal of Neurochemistry*, 74 (4): 1587–1595.

Richardson JC, Steele J, Olszewski J (1963). *Supranuclear ophthalmoplegia, pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. A clinical report on eight cases of 'heterogenous system degeneration'*. *Transactions of the American Neurological Association*, 88: 25–29.

Rizzu P, Van Swieten JC, Joosse M, Hasegawa M, Stevens M, Tibben A, Niermeijer MF, Hillebrand M, Ravid R, Oostra BA, Goedert M, van Duijn CM, Heutink P (1999). *High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands*. *American Journal of Human Genetics*, 64 (2): 414-421.

Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, et al. (1991). *Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings*. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Annals of Neurology*, 30 (3): 381-90.

Rohrer JD, Lashley T, Schott JM, Warren JE, Mead S, Isaacs AM, Beck J, Hardy J, de Silva R, Warrington E, Troakes C, Al-Sarraj S, King A, Borroni B, Clarkson MJ, Ourselin S, Holton JL, Fox NC, Revesz T, Rossor MN, Warren JD (2011). *Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration*. *Brain*, 134 (9):2565-81.

Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer MF, Verheij F, Kremer HP, Scheltens P, van Duijn CM, Heutink P, van Swieten JC (2003). *Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study*. *Brain*, 126 (9): 2016-2022.

Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S. (2002). *Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation*. *Neurology*, 58 (5): 811-813.

Schapira, AHV (2010). *Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration*. *Experimental Neurology*, 224 (2): 331-35.

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP (1999). *Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study*. *Lancet*, 354 (9192): 1771–1775.

Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997). *Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimerlike phosphorylation of human tau by cdk5*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 167 (1-2): 99–105.

Sengupta A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006). *Regulation of phosphorylation of tau by cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase-3 at substrate level*. *FEBS Letters*, 580 (25): 5925-5933.

Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T (2009). *A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo*. *Neurobiology of Disease*, 35 (3): 359-367.

Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B (1998). *Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies*. *Brain Pathology*, 8 (2): 387-402.

Spillantini MG, Van Swieten JC, Goedert M (2000). *Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)*. *Neurogenetics*, 2 (4): 193-205.

Stamelou M, Pilatus U, Reuss A, Magerkurth J, Eggert KM, Knake S, Ruberg M, Schade-Brittinger C, Oertel WH, Höglinger GU (2009). *In vivo evidence for cerebral depletion in high-*

energy phosphates in progressive supranuclear palsy. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 29 (4): 861-870.

Stamelou M, Silva R, Arias-Carrión O, Boura E, Höllerhage M, Oertel WH, Müller U, Höglinger GU (2010). *Rational therapeutic approaches to progressive supranuclear palsy*. Brain, 133 (6):1578–1590.

Steele JC, Caparros-Lefebvre D, Lees AJ, Sacks OW (2002). *Progressive supranuclear palsy and its relation to pacific foci of the parkinsonism-dementia complex and Guadeloupean parkinsonism*. Parkinsonism & Related Disorders, 9 (1): 39-54. Review.

Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K (2005). *A common inversion under selection in Europeans*. Nature Genetics, 37 (2): 129-37.

Su B, Wang X, Drew KL, Perry G, Smith MA, Zhu X (2008). *Physiological regulation of tau phosphorylation during hibernation*. Journal of Neurochemistry, 105 (6): 2098-2108.

Su B, Karin M (1996). *Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression*. Current Opinion in Immunology, 8 (3): 402–411.

Sun L, Liu SY, Zhou XW, Wang XC, Liu R, Wang Q, Wang JZ (2003). *Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats*. Neuroscience, 118 (4): 1175–1182.

Sundar PD, Yu CE, Sieh W, Steinbart E, Garruto RM, Oyanagi K, Craig UK, Bird TD, Wijsman EM, Galasko DR, Schellenberg GD (2007). *Two sites in the MAPT region confer genetic risk for Guam ALS/PDC and dementia*. Human Molecular Genetics, 16 (3): 295-306.

Swerdlow RH, Golbe LI, Parks JK, Cassarino DS, Binder DR, Grawey AE, Litvan I, Bennett JP Jr, Wooten GF, Parker WD (2000). *Mitochondrial dysfunction in cybrid lines expressing mitochondrial genes from patients with progressive supranuclear palsy*. Journal of Neurochemistry, 75 (4):1681-1684.

Togasaki DM, Tanner CM (2000). *Epidemiologic aspects*. Advances in Neurology, 82: 53-59.

Tseng HC, Zhou Y, Shen Y, Tsai LH (2002). *A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains*. FEBS Letters, 523 (1-3): 58-62.

Tsuboi Y, Baker M, Hutton M, Uitti RJ, Rascol O, Delisle MB, Soulagés X, Murrell JR, Ghetti B, Yasuda M, Komure O, Kuno S, Arima K, Sunohara N, Kobayashi T, Mizuno Y, Wszolek ZK (2002). *Clinical and genetic studies of families with the tau N279K mutation (FTDP-17)*. Neurology, 59 (11): 1791-1793.

Vandebroek T, Vanhelmont T, Terwel D, Borghgraef P, Lemaire K, Snauwaert J, Wera S, Van Leuven F, Winderickx J (2005). *Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast*. Biochemistry, 44 (34): 11466-11475.

Van Swieten JC, Stevens M, Rosso SM, Rizzu P, Joosse M, de Koning I, Kamphorst W, Ravid R, Spillantini MG, Niermeijer, Heutink P (1999). *Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations*. Annals of Neurology, 46 (4): 617-626.

Van Swieten JC, Rosso SM, van Herpen E, Kamphorst W, Ravid R, Heutink P (2004). *Phenotypic variation in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 17 (4): 261-264. Review.

Varani L, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Murrell JR, Ghetti B, Klug A, Goedert M, Varani G (1999). *Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96 (14): 8229-8234.

Vermersch P, Robitaille Y, Bernier L, Wattez A, Gauvreau D, Delacourte A (1994). *Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement*. *Acta Neuropathologica*, 87 (6): 572-577.

Von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000). *Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97 (10): 5129-5134.

Vogelsberg-Ragaglia V, Bruce J, Richter-Landsberg C, Zhang B, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2000). *Distinct FTDP-17 missense mutations in tau produce tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells*. *Molecular Biology of the Cell*, 11 (12): 4093–4104.

Williams D.R., de Silva R., Paviour DC, Pittman A, Watt HC, Kilford L, Holton JL, Revesz T, Lees AJ (2005). *Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism*. *Brain*, 128 (6): 1247–1258.

Williams DR, Holton JL, Strand K, Revesz T, Lees AJ (2007). *Pure akinesia with gait freezing: A third clinical phenotype of progressive supranuclear palsy*. *Movement Disorders*, 22 (15): 2235–2241.

Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2010). *α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease*. *Journal of Cell Biology*, 190 (6): 1023-1037.

Yamada ES, Respondek G, Müssner S, de Andrade ACF, Höllerhage M, Depienne C, Tarze A, Friguet B, Salama M, Lee VM-Y, Champy P, Oertel WH, Höglinger GU. *Annonacin, a natural*

lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. Unter Review bei Neurobiology of Ageing.

Yata K, Oikawa S, Sasaki R, Shindo A, Yang R, Murata M, Kanamaru K, Tomimoto H (2011). *Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse.* Brain Research, 1410: 12-23.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007). *Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model.* Neuron, 53 (3): 337-351.

Yen S, Easson C, Nacharaju P, Hutton M, Yen SH (1999). *FTDP-17 tau mutations decrease the susceptibility of tau to calpain I digestion.* FEBS Letters, 461 (1-2): 91-95.

Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, Joyce S, Trojanowski JQ, Lee VM (2004). *Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy.* Journal of Neuroscience, 24 (19): 4657-4667.

Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA (2000). *Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 59 (10): 880–888.

Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA (2001). *Activation and redistribution of c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease.* Journal of Neurochemistry, 76 (2): 435–441.

7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg und während der Ausbildung in meinem Praktischen Jahr in Houston (USA) waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

In Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Baum, Berger, Bertalanffy, Cetin, Culmsee, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Eilers, Feuser, Funck, Gerdes, Görg C., Görg K., Grau, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Hermann-Lingen, Hilt, Hofmann, Holst, Klenk, Klaus, Klose, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Richter, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Sesterhenn, Renz, Rothmund, Seitz, Steiniger, Vogt, Voigt, von Löw, Wagner, Weihe, Weiler, Wennemuth, Werner, Westermann, Wulf, Wündisch, Zemlin.

In Houston:

Butler, Grotta, Mancias, Sadighi, Schiess.

8. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. H. Oertel möchte ich für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seiner Klinik durchführen zu können, für alle Kenntnisse, die ich unter seiner Leitung sowohl im Labor als auch in der Klinik sammeln durfte, sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. G. U. Höglinger gilt für die Bereitstellung des Themas und die stets hilfsbereite und wissenschaftlich herausragende Unterstützung bei der Umsetzung ein ganz besonderer Dank. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können.

Der Postdoktorandin Frau Dr. Elizabeth Yamada danke ich sehr für die erfahrene Mitwirkung an dieser Arbeit, für die guten Ratschläge, die vielfältige Hilfe und die freundschaftliche Begleitung.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Agathe Tarze und Herrn Prof. Dr. Bertrand Friguet an der Université Paris 7 – Denis Diderot in Paris, Frankreich, für die Messungen der proteasomalen Aktivitäten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Christel Depienne aus der Abteilung „Experimental Neurology and Therapeutics“ am Hôpital de la Salpêtrière in Paris, Frankreich für die Durchführung der quantitativen real-time PCR bedanken.

Zuletzt und von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich stets in der Verwirklichung meiner Pläne und Wünsche mit Rat und Tat unterstützt haben.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Annonacin, ein natürlicher Komplex-I Inhibitor, erhöht die Tau-Phosphorylierung im Gehirn von FTDP-17 transgenen Mäusen“ in der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W.H. Oertel, der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. G.U. Höglinger und der Unterstützung durch Frau Dr. Elizabeth Yamada, Frau Dr. Agathe Tarze, Herrn Prof. Dr. Bertrand Friguet und Frau Dr. Christel Depienne ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in dieser Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, den 28.06.2013