ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ·`⁄⁄¶i« ‡ł§i

…¸ fl»beta⁄ o,£ƒ ” ⁄”¥ † ›M› ⁄ ‘⁄§⁄ ⁄l ¤ –· Q(1/3)

›p e^ §¡G ª ¥«»p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC92-2321-B-038-002-

ıƒ ·`¶¡¡G92 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ Ø 93 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙´ ¤ § ‡N¤t

›p e¥ D ø⁄¡HG“ L «•

ƒ ¶P¥ D ø⁄¡HG‡ \ «,q

›p e »P⁄H›ß¡G‡\» ° ⁄ fl ¡ ¶fl‹ –– ‘

‡ł§i^ «‹¡G” °†‡ł§i

‡ B † zŁ¡fG¡¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹ d,

⁄⁄ ¥` Œ 93 ƒ~5 ⁄°31 ⁄Ø

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 □ 成 果 報 告 ■期中進度報告

樣澱粉β引發腦血管內皮細胞凋亡之分子機制探討(1/3)

Molecular mechanism of amyloid β-induced cerebral endothelial cell apoptosis (1/3)

計畫類別：□ 個別型計畫　　■ 整合型計畫
計畫編號：NSC　92－2321－B－038－002
執行期間：　92 年　8 月　1 日至 93 年　7 月 31 日

計畫主持人：林建煌
共同主持人：許重義
計畫參與人員：陳炳常¡B許銘仁

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告　□完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
□赴國外出差或研習心得報告一份
□赴大陸地區出差或研習心得報告一份
□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學醫事技術學系

中　華　民　國　93　年　5　月　31　日

英文摘要。

關鍵字：Alzheimer's disease (AD); **amyloid β peptide (Aβ)**; cerebral amyloid angiopathy, (CAA); cerebral endothelial cells (CECs); apoptosis; Apoptosis Signal-Regulating Kinase1(ASK1)¡C

The amyloid β peptide (Aβ) has been linked to both neuronal and vascular degeneration in Alzheimer's disease (AD). Amyloid deposition in cerebral vessels (cerebral amyloid angiopathy, CAA) is also a major cause of hemorrhagic and ischemic stroke in the elderly with or without AD. Recent studies have found that cerebral endothelial cells (CECs) exposed to Aβ die with features suggestive of apoptosis. However, the molecular mechanism through which Aβ exerts its apoptotic effect remains to be elucidated. Here, we investigated the molecular mechanisms underlying Aβ-induced cell death in cerebral endothelial cells.

Using MTT assay, we show here that Aβ decreased cell viability in a dose-dependent manner. Selective p38 MAPK inhibitor, SB203580, and JNK inhibitor SP600125 blocked Aβ-induced cell cycle accumulation on the sub-G1 phase as determined by flowcytometry. This indicated that activation of p38 MAPK and JNK might be critical in Aβ-induced cell death. Moreover, Aβ treatment significantly resulted in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosing cells. An important role for apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in Aβ apoptotic effect was also demonstrated by ASK1 kinase activity assay using MBP as substrate. We showed the ASK1 kinase activity was transient increased upon Aβ treatment and then declined to basal level after 1 hour. The increased ASK1 activity was correlated with the decrease of Akt activity which play an inhibitory role in ASK1 regulation. In the other hand, p53 might lay downstream of ASK1 signaling pathway since cells transfected with dominant-negative ASK1 (dn-ASK1) significantly diminished Aβ-induced p53 phosphorylation at Ser15 and Aβ-increased p53 protein level. We also found that the upregulation of p53-target gene, Bax was suppressed by dn-ASK1 in Aβ-treated cells. However, activation of ASK1 has been reported might occur upstream of p38MAPK signaling pathway leading to cell apoptosis. Taken together, these findings suggest that Aβ might induce cell apoptosis through ASK1/p38MAPK/p53/Bax signaling cascade.

中文摘要。

關鍵字：阿茲海默式症(Alzheimer's disease, AD); 樣澱粉β 胜肽(amyloid β peptide, Aβ); 腦血管樣澱粉病變(cerebral amyloid angiopathy, CAA); 腦內皮細胞(cerebral endothelial cells, CECs); 細胞凋亡(apoptosis); Apoptosis Signal-Regulating Kinase1(ASK1)¡C

樣澱粉β 胜肽 (amyloid β peptide) 與阿茲海默症的神經及血管退化具有相當的關連性。樣澱粉沈積在腦部血管稱為腦血管樣澱粉病變 (cerebral amyloid angiopathy, CAA)，而無論是否為阿茲海默症的病患，腦血管樣澱粉病變皆是老年人出血性中風及缺血性中風的重要原因之一。最近的研究發現，樣澱粉β 會誘導腦血管內皮細胞產生細胞凋亡，然而其作用機制則尚未研究清楚。因此我們將探討樣澱粉引發腦內皮細胞凋亡的機制。希望此計劃的完成可進一步瞭解樣澱粉β 調控腦內皮細胞凋亡的機轉，並且發展出治療樣澱粉β 誘發腦血管疾病的治療方針。

利用MTT測分析，我們發現樣澱粉β 會濃度依賴性的降低腦內皮細胞的細胞存活率。而進一步利用流式細胞儀分析發現選擇性的p38MAPK和JNK抑制劑， SB203580及SP600125可以抑制樣澱粉β所引起的腦部內皮細胞凋亡。這結果指出澱粉β可能是透過活化p38 MAPK和JNK而使得腦部內皮細胞進行細胞凋亡。再者，樣澱粉β會顯著增加p38MAPK和JNK的活性。利用ＭBP當作受質，我們發現樣澱粉β可以在短時間內增加apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)的活性而後回復到基礎值(basal level)，相對地，可負向調控ASK1的蛋白激酶Akt的活性在樣澱粉刺激下而降低，這意味著樣澱粉β可能透過抑制Akt而活化ASK1使得腦部細胞凋亡。再者，當細胞轉殖不活化態的dominant-negative ASK1 (dn-ASK1)會顯著的阻斷樣澱粉β所增加p53在胺基酸殘基ser15位置的磷酸化以及增加p53蛋白的安定性。在p53所調控的基因中，我們發現樣澱粉β會增加bax表現，而這增加的現象會被dn-ASK1所抑制。已有報導指出ASK1可以透過p38訊息傳遞路徑促使細胞凋亡，因此在本年度的研究中我們推測樣澱粉β可能是透過活化ASK1/p38MAPK/p53/Bax訊息傳遞路徑而引起細胞凋亡。

報告內容[前言及文獻探討、研究目的、研究方法、結果與討論(含結論與建議)]

前言及文獻探討

細胞凋亡(apoptosis)的機制

細胞凋亡在多細胞有機體的發育過程及維持組織恆定上是一個相當重要的調控機制；例如中樞神經正常的發育中，減數分裂後的細胞(postmitotic cell)數目及突觸的接合必須在時間及空間上嚴格的控制，才會有正確的細胞數量來構成中樞神經系統(Nijhawan *et al*., 2000)。當細胞凋亡機轉失去平衡則會導致許多疾病的發生；其中包括神經退化性疾病、癌症及中風等(Arends *et al*., 1991；Thompson *et al*., 1995)。和細胞壞死相比較；當細胞進行凋亡時並不會引起發炎反應；且凋亡的細胞可以經由巨噬細胞的辨認進行非發炎性的吞噬作用(Kerr *et al*., 1972; Taylor *et al*., 2003)；細胞凋亡又稱做程序性的細胞死亡；其特徵有細胞質縮小且有細胞小體的出現；細胞核濃染、DNA 階梯斷片的產生以及細胞膜上磷脂質的再分佈即 Phosphotidylserine 外翻至細胞膜外等現象(Fadok *et al*., 1992; Jacobson *et al*., 1997; Nagata *et al*., 1997)。這些型態的變化主要是進行細胞自然凋亡時，因活化 caspase (cysteine aspartate-specific protease)而進一步切割細胞內的受質所致。細胞凋亡進行與否則取決於細胞所接受外來的訊息而影響生存或死亡間的平衡所調控(Musci *et al*., 1997)；

在哺乳類的細胞中，將死亡訊息由細胞膜傳達至細胞內可以經由許多不同的路徑；大致可分為兩種不同的訊息傳遞路徑來造成細胞的凋亡，一種是由細胞表面的死亡受體所引起的路徑(death receptor-mediated pathway)； 另一種則是由粒腺體所媒介的死亡路徑(mitochondria-mediated pathway)。

1. 受體媒介的路徑：

經由受體導致細胞自然凋亡的現象最常見的是 TNF 受體家族，其中包括 Fas。Fas 是一種已知的死亡受體，當其活化會促進細胞進行細胞凋亡。當 Fas 受體與其接合子(ligand)結合後，會變成活化的狀態，並引起 FADD 及 procaspase 8 的聚合，使得 procaspase 8 經過自我催化後，變成具有活性的 caspase 8，再進一步活化 caspase 3 及 Bid，最後造成細胞的死亡(Ashkenazi *et al*., 1998；Budihardjo *et al*., 1999)。

2. 粒線體媒介的路徑：

粒線體媒介的路徑又分為 caspase-dependent 及 caspase-independent 的訊息傳遞路徑：

(1) Caspase-dependent 的訊息傳遞路徑：

Cytochrome c 原本是存在於粒腺體內外膜之間(intermembrane space)，為電子傳遞鏈的成份之一。當細胞進行凋亡時，因粒腺體膜電位的喪失會造成粒腺體的膨脹；損害及通透性增加，此時 cytochrome c 會被釋放至細胞質中，並做為活化 caspase 9 的輔助因子(Hu *et al*., 1999)。而釋放到細胞質的 cytochome c 會與 dATP 一起結合到 Apaf-1 上，並轉變為巨分子的 caspase 活化複合物，這個複合物會吸引 pro-caspase 9 形成 apoptosome (Newmeyer *et al*., 2003; Tsujimoto *et al*., 2003)，而 apoptosome 活化產生的 caspase 9 會繼續活化 caspase 3 及 7，之後再一步活化 caspase 2，6，8 及 10 (Acehan *et al*., 2002 ; Slee *et al*., 1999；Zou *et al*.,1999)。在細胞凋亡時，粒線體除了釋放出 cytochrome 之外，也會釋放出 Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspase)來促使 caspase 的活化。在細胞處於存活狀態下，IAP (inhibitor of apoptosis proteins)會藉由 BIR (baculovirus inhibitor repeat) domain 與具有活性的 caspase 3，7，9 結合，並且抑制它們的活性。一旦細胞釋放出 Smac/DIABLO 時，它會利用碳端的 AVPI 胺基酸序列，與 IAP 的 BIR domain 結合，而與 caspase 競爭 BIR domain，因此可以阻礙 IAP 抑制 caspase 活化的功能，所以可以確保 apoptosis 的進行(Du *et al*., 2000；Verhagen *et al*., 2000；Huang *et al*., 2001)。

(2) Caspase-independent 的訊息傳遞路徑：

apoptosome 活化的 caspase 3 會經由蛋白降解作用而使得細胞凋亡特徵出現；caspase 3 也會經由活化核酸分解酶來使得細胞 DNA 斷裂成特定大小(Ha *et al*., 2003; Tibbetts *et al*., 2003)；但是

caspase 並不是細胞凋亡的唯一媒介分子，serine 蛋白分解酶也被認為參與細胞死亡反應中，只是其與活化 caspase 的相關性仍有正反兩面不同的論點(Stefanis *et al*., 1997; Gray *et al*., 2001)。此外，也有報告指出粒線體膜間存有 AIF (apoptosis-inducing factor)蛋白質參與細胞凋亡的過程(Susin *et al.,* 1999；Joza *et al*., 2001)。例如在 Rat-1 纖維細胞投與 staurosporine，發現 AIF 會由由細胞質轉位到細胞核中，而誘導細胞的死亡。在膠瘤細胞給予廣效性 caspase 的抑制劑 z-VAD-fmk，雖然 caspase 的活性被抑制，但並無法抑制細胞凋亡的作用，而給予 AIF 的抗體，則會抑制細胞凋亡的作用(Braun *et al*., 2001)。由此可見，在 caspase 沒有被活化的情況下，單獨活化 AIF 也可能會導致細胞的死亡，即走 caspase-independent 的路徑。

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)與 apoptosis

ASK1 是 mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase 家族成員之一(Ichijo *et al*., 1997)。它可活化 SEK1/JNK 訊號傳遞路徑(Ichijo *et al*., 1997；Hoeflich *et al*., 1999；Kanamoto *et al*., 2000；Tobiume *et al*., 2001)。在發炎細胞激素及許多種壓力(例如：serum 或 trophic factor 的去除，TNF-α，reactive oxygen species (ROS)，microtuble interfering agent，genotoxic stress 及 FasL)皆會造成 ASK1 的活化(Ichijo *et al*., 1997；Chang *et al,* 1998；Gotoh *et al*., 1998)。在許多種細胞過度表現持續活化的 ASK1，則會促使細胞走向死亡，而給予 dominant negative ASK1，則會明顯下降 TNF-α，Fas 及氧化壓力 (oxidative stress) 所造成的細胞死亡(Chang *et al*., 1998；Gotoh *et al*., 1998；Hoeflich *et al*., 1999；Takeda *et al*., 2000；Morita *et al*., 2001)。更進一步發現在 $ASK^{+/+}$ MEF cell 中可以看到 endoplasmic reticulum (ER) stress 所誘發的 JNK 活化及細胞的死亡，但在 $ASK^{-/-}$MEF cell 則失去此一現象，進一步導致細胞死亡(Nishitoh *et al*., 2002)。顯示，ASK1/JNK/AP-1 在細胞的死亡扮演重要的角色。最近也發現 Akt 可以負向調控 ASK1 的活性，使得細胞得以存活下去。例如在 293 細胞中，持續活化態的 Akt 可以抑制 H_2O_2 所誘導 ASK1 的活性而抑制細胞的死亡。同時亦發現 L293 細胞在去除血清的狀態下，內生性 ASK1 活性增加，而如果給予 IGF-1 使得 PI3K-Akt pathway 活化的情況下，則會在 serine 83 上將 ASK1 磷酸化，進而抑制 ASK1 的活性，使得細胞存活下來(Kim et al., 2001)。因此，在本計劃中，老鼠腦內皮細胞給予樣澱粉(amyloid)是否會抑制 Akt 的活性，使得 ASK1 活性增加並進一步誘導細胞的死亡，這也是我們研究的重點之一。

Bcl-2 家族與細胞凋亡

細胞在自然凋亡的過程中，有許多的死亡蛋白基因會表現出來，其中包括 Bcl-2 家族。Bcl-2 家族成員都具有一到四個 Bcl-2 homology (BH) domain (分別為 BH 1-4)。Bcl-2 家族可利用碳端的 transmembrane tail 將 Bcl-2 固定在細胞內膜上，其中也包括粒線體外膜 (Krajewski *et al*., 1993)。Bcl-2 家族依功能及結構主要區分成三大類，第一類是具有對抗細胞死亡的成員(anti-apoptotic member)，包括 Bcl-2, $Bcl\text{-}_{XL}$, Bcl-w, Mcl-1 及 Bfl-1/A1。第二類是具有導致細胞死亡的成員(pro-apoptotic member)，包括 Bax、Bak 及 Bok。第三類則是只具有 BH3 domai 的死亡蛋白成員(pro-apoptotic BH3-only protein)，其中包括 Bad, Bid, Bim, Bik, Blk, Hrk 及 Noxa (Adams *et al*., 1998)。Bcl-2 家族的成員具有和同族成員相互拮抗的能力，即當細胞受到刺激的時候，具有導致細胞死亡的成員例如: Bims 會轉移至粒線體外膜上與抗細胞死亡成員的 Bcl-2 (例如 Bcl-2、Bcl_{XL} 及 Bax) 結合，使粒線體釋放出 cytochrome c、Smac、AIF 及 endonuclease G (endo G)，接著活化下游的死亡路徑，而導致細胞的死亡(Van *et al*., 2002)。

樣澱粉(amyloid)與腦血管疾病

年齡的增長是影響腦血管病變的重要因子，許多研究證據顯示，腦部血管的功能會隨著老化的過程而逐漸降低，其中樣澱粉大量堆積則是造成腦血管功能退化的主要原因。樣澱粉 (amyloid) 的沉積除了在老年人的大腦中可以發現外，也會出現在阿滋海默症 (Alzheimer's disease) 病人大腦特有的老人斑及微血管當中。目前的報告，指出沉積在大腦實質及阿滋海默症病人腦中老人斑的樣澱

粉是一種較小段的胜肽稱為樣澱粉β (amyloid β, Aβ)，其主要是由樣澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein，APP) 分解而成的碳端片段 (Glenner *et al*., 1984)。到目前為止 Aβ最主要有兩個片段分別為 $Aβ_{1-40}$ 及 $Aβ_{1-42}$。$Aβ_{1-40}$ 主要存在於腦脊髓液當中，而 $Aβ_{1-42}$ 則為阿滋海默症老年斑中沉積的主要成份 (Younkin *et al*., 1995)。最近也有報告指出阿滋海默症病人腦中 Aβ大量的沉積主要是位於第 21 對染色體上控制 APP 的基因產生突變(Neve *et al*., 2000)。突變態的 APP 會刺激內質網上的分泌酵素 (secretase) 活化，因而導致 Aβ大量分泌，特別是 $Aβ_{1-42}$，而它可進一步促進本身或別種異構態胜肽 $Aβ_{1-40}$ 的糾結沉澱，進而引發神經的退化 (Scheuner *et al*., 1996, Wisniewski *et al*., 1997)。在阿滋海默症病人腦中老人斑主要具有兩種幫助樣澱粉β糾結的因子，分別為 acetylcholinesterase 及 perlecan (Alvarez *et al*., 1998)。當 Aβ 在神經細胞外受到此兩種酵素作用而糾結，此糾結後的 Aβ 可以和不同的受體結合，其中包含 scavenger 及 RAGE 受體。有報告指出 scavenger 及 RAGE 受體主要存在於神經膠細胞，一旦和 Aβ 結合後可釋放出過氧化物而造成毒殺細胞的作用 (Liu *et al*., 1997)。此外，Aβ 本身也可直接結合在神經細胞的細胞膜上，導致膜上形成離子孔洞，使 Aβ 更易進入細胞內而產生神經細胞自然凋亡(Drouet *et al*., 2000)。

Aβ 與神經細胞的死亡

目前 Aβ 造成神經細胞死亡的分子機制研究的比較多，且比較清楚，其中包括增加細胞內鈣離子的濃度、一氧化氮及過氧化物的製造、細胞膜脂質的過度氧化及細胞骨架的改變，這些情況皆可造成細胞的死亡(Drouet *et al*., 2000)。例如在初級培養的神經細胞中，Aβ 會導致神經細胞自然凋亡，其中包括活化引發細胞凋亡的蛋白，如 Bax、c-fos、c-jun、p53、Fas 等(Estus et *al*., 1997, Parodis *et al*., 1996)。在大鼠神經元細胞，Aβ 會經由活化 caspase 3 造成細胞凋亡 (Marin *et al*., 2000)；而在小白鼠端腦部位的神經元細胞，Aβ 則會活化 Bax 的路徑來造成細胞的凋亡 (Selznick *et al*., 2000)。由此得知 Aβ 可經由不同的路徑導致神經細胞的凋亡，

Aβ 與腦內皮細胞(cerebral endothelial cells；CECs)

Aβ 已經被公認是阿滋海默症致病原中最重要的神經毒性因子，而在最近的研究也發現 Aβ 對於血管內皮細胞同樣具有傷害性(Thomas *et al*., 1996)，其中包含了腦部的血管內皮細胞 (CECs) (Preston *et al*., 1998)。在衆多種的 Aβ當中，其中以 $Aβ_{1-40}$ 具有較大的傷害性，然而 $Aβ_{25-35}$ 為 Aβ 中疏水性的一段，同樣也會聚集而形成神經纖維糾纏來破壞腦部血管的內皮細胞(Yanker *et al*., 1990；Harkany *et al*., 2000)。但是 Aβ 造成大腦內皮細胞毒性詳細的分子作用機制到目前還不清楚，目前有文獻指出 Aβ 所產生的細胞毒性與過氧化物的形成、抑制一氧化氮的產生及破壞細胞內鈣離子恆定有關 (Tomas *et al*., 1996；Sutton *et al*., 1997； Suo *et al*., 1997)。而在我們之前的研究報告中，老鼠大腦血管內皮細胞及牛的大腦血管內皮細胞中，發現 $Aβ_{25-35}$ 及 $Aβ_{1-40}$ 會分別誘導這兩種細胞走向自然凋亡，其原因主要是經由增加氧化自由基的產生及活化 caspase 3、8 及經由活化 AP-1 來增加 Bcl-2 家族中 Bim 的大量表現(Xu *et al*., 2001; Yin *et al*., 2002)。而 Bim 會進一步轉移至粒腺體的細胞膜上造成細胞膜的損毀，進而使 Smac 這個自然凋亡調控因子釋放，導致大腦內皮細胞的死亡 (Yin *et al*., 2002)。我們都知道存在於大腦微血管的內皮細胞，主要扮演著維持大腦血流恆定的角色，另外它還可形成一道血腦障壁 (blood-brain-barrier; BBB)來阻隔異物進入大腦 (Gobbel *et al*., 1994)。但是當大腦內皮細胞因缺血性損傷而產生自然凋亡後，會導致血腦障壁的崩解，此結果會使大腦缺血性損傷更加的嚴重(Zhang *et al*., 2000)。如此，Aβ 可經由造成血腦障壁內皮細胞的死亡，而入侵沈積在大腦中，對大腦進行更深層的傷害。因此，在阿滋海默症病人的大腦中會常常見到血腦障壁功能的退化，但 Aβ 是如何造成大腦內皮細胞的死亡，其詳細的的分子機制的確值得詳細探討。最近有報告指出，PI3K/Akt 在內皮細胞的存活扮演著舉足輕重的角色。於是在本研究計畫中，我們將深入探討 Aβ 是否經由影響 PI3K/Akt 的路徑來誘導大腦血管內皮細胞的凋亡。

研究目的

在我們之前的研究顯示，在老鼠腦血管內皮細胞及牛的大腦血管內皮細胞中，發現 $Aβ_{25-35}$ 及

$A\beta_{1\text{-}40}$ 會增加氧化自由基的產生及活化 caspase 3、8，且經由活化 AP-1 來增加 Bcl-2 家族中 Bim 的大量表現，使粒腺體細胞釋放出 Smac，導致大腦內皮細胞的死亡 (Xu *et al*., 2001; Yin *et al*., 2002)。而在我們的初步的數據中也發現 Aβ可以抑制 Akt 的活性，且 PI3K 抑制劑 wortmannin 也會誘導老鼠腦內皮細胞的死亡，顯示 Akt 在腦皮細胞中確實扮演著存活因子的角色，但是 Aβ抑制 Akt 的活性之後，會活化何種下游的死亡傳遞路徑則需要更進一步的釐清。因此我們將探討樣澱粉經由抑制 Akt 的作用，使 ASK1 的活性增加，並進而促進腦內皮細胞凋亡的分子機制。

研究方法

1. 細胞培養: 小鼠腦內皮細胞株使其生長在 DMEM 含有 10% 的胎牛血清的培養液中，並將其置於 37°C 含 5% CO_2 之培養箱中，每兩天換一次新鮮的生長培養液，等到細胞長滿後即可進行細胞次培養與實驗。2. 流式細胞儀分析: 測定細胞週期。3. MTT 測定: 測定細胞存活率。4. 西方點墨法: 測定 Akt-p、GAPDH、p38-p、JNK-p 及 Bax 蛋白的變化。5. 免疫沈澱法及蛋白激酶活性測定: 測定 ASK1 的活性。6. dn-ASK1 轉染實驗 7. 統計方法: 所有實驗數據皆以平均值±標準差(mean ± S.E.M)表示，並以 Analysis of Variance (ANOVA)配合 Dunnet's test 分析比較各組間是否有顯著差異。$p < 0.05$ 視為有統計上的意義。

結果

樣澱粉β降低腦內皮細胞存活率

首先我們以不同濃度的樣澱粉β (10-50 μM) 刺激腦內皮細胞 48 小時後，觀察腦內皮細胞存活率。發現腦內皮細胞存活率會隨著樣澱粉β劑量增高而降低 (Fig. 1)。而同時給予 wortmannin (100 nM) 會使得腦內皮細胞存活率更進一步降低(Fig. 1)。

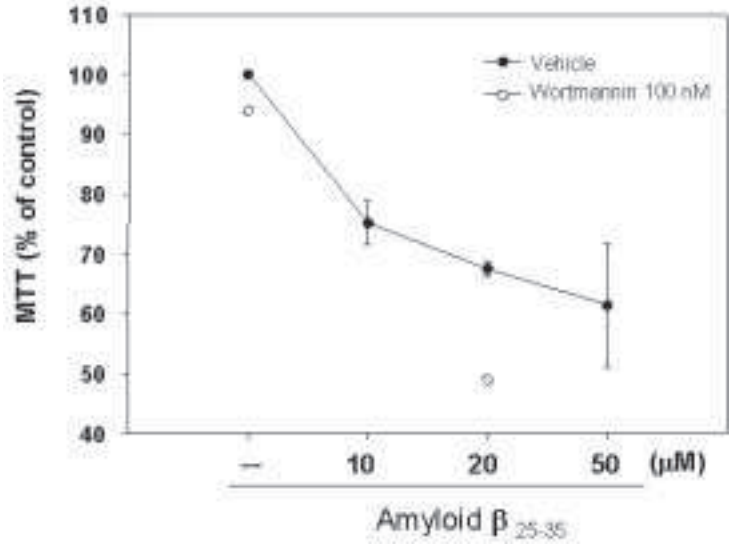

Fig.1

樣澱粉β引起腦內皮細胞凋亡

我們更進一步利用流式細胞儀分析樣澱粉β所引起的腦內皮細胞凋亡；A發現腦內皮細胞在樣澱粉β刺激下會增加細胞在細胞週期 sub-G1 的數目也就是引起細胞凋亡 (Fig. 2)；C接著我們將探討是否樣澱粉β誘導腦內皮細胞凋亡經由 p38MAP 或是 JNK 而來。將細胞以 p38MAP 或是 JNK 抑制劑，SB203580 及 SP600125 前處理 30 分鐘，再以樣澱粉β(20 μM)刺激 48 小時，發現這些抑制劑皆可抑制澱粉β誘導腦內皮細胞凋亡(Fig. 2)，由此可見，樣澱粉β可能經由 p38MAPK 及 JNK 來誘導腦內皮細胞凋亡。

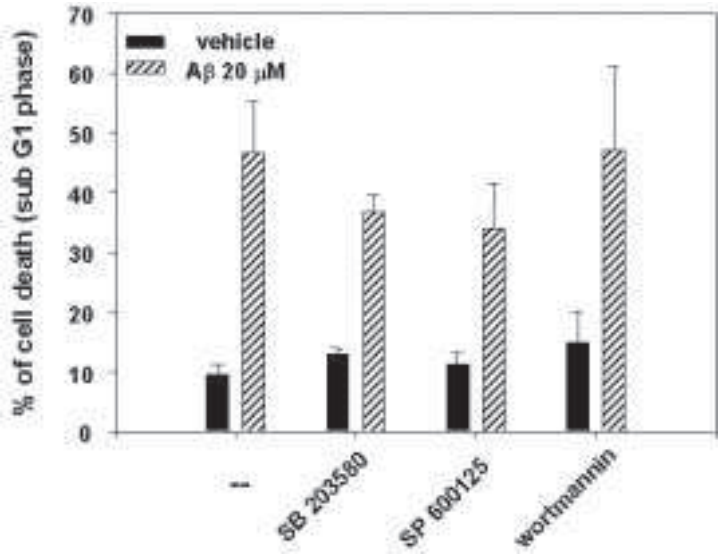

Fig.2

樣澱粉β引發 JNK 及 p38MAPK 磷酸化

由前面實驗證實了樣澱粉β誘導腦內皮細胞凋亡可能經由 p38MAPK 及 JNK 的調控。接下來我們將觀察樣澱粉β是否可活化 p38MAPK 及 JNK。細胞給予樣澱粉β刺激不同時間(0-120 min)刺激，觀察到 p38MAPK 及 JNK 磷酸化的程度在兩小時達到最大(Fig.3)¡A顯示樣澱粉β可活化 p38MAPK 及 JNK。

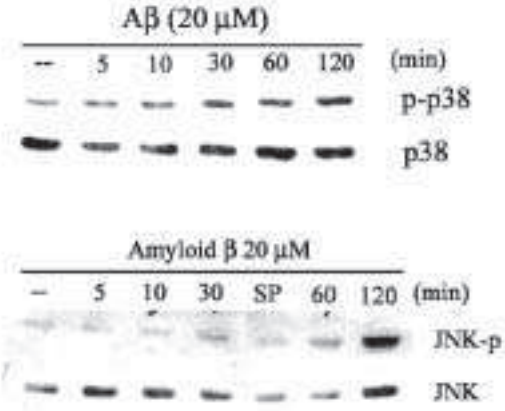

Fig. 3

樣澱粉β 增加 ASK1 激酶的活性及抑制 Akt 的磷酸化

有學者指出抑制 Akt 的活性會進一步使下游 ASK1 磷酸化減少而活化 ASK1。接著我們將進一步探討 ASK1 是否會因樣澱粉β的刺激而活化，我們首先利用特異性磷酸化 Akt 抗體及 ASK1 激酶活性分析的方法來偵測 Akt 及 ASK1 活化的情形。將腦內皮細胞給予樣澱粉β刺激不同的時間(0-120 分鐘)，發現 Akt 磷酸化的程度會隨著處理樣澱粉β的時間增加而減少(Fig. 4A)¡C此外¡A由蛋白激酶活性測定結果可知樣澱粉β會使 ASK1 激酶的活性增加(Fig. 4B)。顯示樣澱粉β可能透過抑制 Akt 活性而活化其下游的 ASK1 激酶。

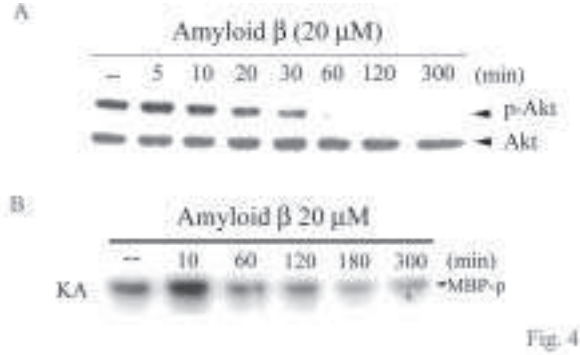

Fig. 4

樣澱粉β增加 p53 的磷酸化及安定性

之前研究發現 p53 在胺基酸殘基 ser15 的位置會被 p38MAPK 磷酸化並增加其安定性¡A我們之前的結果顯示樣澱粉β可以活化 p38MAPK¡A接著我們將測試樣澱粉β是否可以增加 p53 的磷酸化¡C腦內皮細胞給予樣澱粉β(20 μM)刺激不同的時間(0-120 分鐘)，發現 p53 的磷酸化隨著樣澱粉β刺激的時間增加而增加，在一小時後回復到基礎值(Fig.5)。

接著我們將測定 Bax 的表現，已有報導指出 Bax 的表現會受 p53 所調控¡A我們發現樣澱粉β會明顯誘導 Bax 的表現(Fig 6)¡C綜合以上的結果發現樣澱粉β可能經由活化 p53 來進一步促進 Bax 的表現使得腦內皮細胞凋亡。

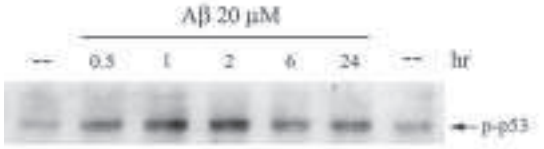

Fig.5

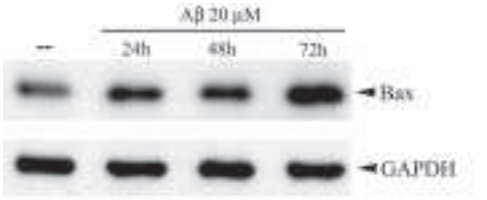

Fig.6

樣澱粉β經由活化 ASK1 來調控 p53 的磷酸化及 Bax 的表現

我們進一步探討樣澱粉β活化 p53 及 Bax 是否經由活化 ASK1 而來。腦內皮細胞轉殖不活化態的 ASK1(dn-ASK1)後，再加入樣澱粉β刺激不同時間，發現樣澱粉β誘導 p53 的活性會被 dn-ASK1 所抑制(Fig. 7)。此外，dn-ASK1 也會抑制樣澱粉β誘導 Bax 的表現(Fig. 8)。

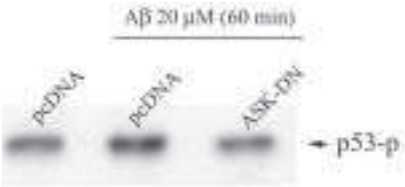

Fig. 7

Fig. 8

討論(含結論與建議)

綜合以上的實驗證明顯示，在腦內皮細胞中，樣澱粉β可能經由抑制 Akt，進而活化 ASK1/p38MAPK/p53 的訊息傳遞路徑，增加 Bax 的表現，進一步誘導腦內皮細胞凋。一旦腦內皮細胞凋亡將會使得血腦障蔽破壞產生更大的腦部傷害。如此，希望能夠透過本計劃的研究，能夠更清楚了解樣澱粉β對於構成血腦障蔽的腦內皮細胞的細胞凋亡作用機轉，提供作為往後發展治療樣澱粉病變引起腦部傷害的參考。

參考文獻

Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Alvarez, A., Alarcon, R., Opazo, C., Campos, E.O., Munoz, F.J., Calderon, F.H., Dajas, F., Gentry, M.K., Doctor, B.P., DeMello, F.G. and Inestrosa, N.C., (1998) Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.*18, 3213-3223.

Arends, M.J. and Wyllie, A.H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Blasko, I., Wagner, M., Whitaker, N., Grubeck-Loebenstein, B. and Jansen-Durr, P. (2000) The amyloid beta peptide abeta (25-35) induces apoptosis independent of p53. *FEBS Letters.* 470, 221-225.

Braun, J.S., Novak, R., Murray, P.J., Eischen, C.M., Susin, S.A., Kroemer, G., Halle, A., Weber, J.R., Tuomanen, E.I. and Cleveland, J.L. (2001) Apoptosis-inducing factor mediates microglial and

neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis*. 184, 1300-1309

Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G. and Burgering, B.M. (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3534-3546.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.

Carpenter, C.L. and Cantley, L.C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 153-158.

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. and Tsichlis, P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 965-1014.

Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., Baltimore, D. (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.

Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 20, 2438-2452.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffer, P.J. (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 10, 1201-1204.

Drouet, B., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J. and Pillot, T. (2000) Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci*. 57, 705-715.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42

Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A. and Gillespie, D.A. (2002) Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell. Signal.* 14, 585-593.

Estus, S., Tucker, H.M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E.F., Wogulis, M. and Rydel, R.E. (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736-7745.

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. and Mori, N. (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* 349, 629-634.

Glenner G.G., Wong, C.W., Quaranta, V. and Eanes, E.D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* 2, 357-369.

Gobbel, G.T., Chan, T.Y., Gregory, G.A. and Chan, P.H., (1994) Response of cerebral endothelial cells to hypoxia: modification by fructose-1,6-bisphosphate but not glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 653, 23-30.

Gotoh, Y., Cooper, J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.* 273, 17477-17482.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C. and Korsmeyer, S.J. (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17, 3878-3885.

Harkany, T., Penke, B. and Luiten, P.G. (2000) beta-Amyloid excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis. Effect of cortical deafferentation on cerebral blood flow regulation and implications for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 374-386.

Hoeflich, K.P., Yeh, W.C., Yao, Z., Mak, T.W., Woodgett, J.R. (1999) Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene* 18, 5814-5820.

Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nunez, G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase- 9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18, 3586-3595.

Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D.G. and Wu, H. (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104, 781-790.

Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y., (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak,

T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. and Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Kaestner, K.H., Knochel, W. and Martinez, D.E. (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 14, 142-146.

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H., Bazenet, C.E. (2000) Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol. Cell Biol.* 20, 196-204.

Kaplan, D.R. and Miller, F.D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. in Neurobiol.* 10, 381-391.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F. and Chao, M.V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cel. Biol.* 21, 893-901.

Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., Chao, M.V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell Biol.* 21, 893-901.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. and Reed, J.C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 53, 4701-4714.

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R. and Karin, M. (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.*19, 751-763.

Liu, Y., Dargusch, R. and Schubert, D. (1997) Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. *Biochem.Biophys. Res.commun.* 237, 37-40.

Marin, N., Romero, B., Bosch-Morell, F., Llansola, M., Felipo, V., Roma, J. and Romero, F.J. (2000) Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. *Mech. Ageing.Dev.* 119, 63-67.

Marte, B.M. and Downward, J. (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 22, 355-358

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H., Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* 20, 6028-6036.

Neve, R.L., McPhie, D.L. and Chen, Y. (2000)Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res.* 886, 54-66.

Nijhawan, D., Honarpour, N. and Wang, X. (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 73-87.

Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes. Dev.* 16, 1345-1355.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. and Huang, D.C. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17, 384-395.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A. and Ruvkun, G. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans. *Nature* 389, 994-999.

O'Reilly, L.A., Cullen, L., Visvader, J., Lindeman, G.J., Print, C., Bath, M.L., Huang, D.C. and Strasser, A. (2000) The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am. J. Pathol.* 157, 449-461.

Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C. and LeBlanc, A. (1996) Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J. Neurosci.* 16, 7533-7539.

Preston, J.E., Hipkiss, A.R., Himsworth, D.T., Romero, I.A. and Abbott, J.N. (1998) Toxic effects of beta-amyloid(25-35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci. Lett.* 242, 105-108.

Putcha, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A. and Johnson, E.M. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29, 615-628.

Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3, 287-296.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar

to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat.Med.* 2, 864-868.

Selznick, L.A., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Rakic, P. and Roth, K.A. (2000) Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 271-279.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. and Martin, S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292.

Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffer, P.J., Burgering, B.M. and Medema, R.H. (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J. Immunol.* 168, 5024-5031.

Suo, Z., Fang, C., Crawford, F. and Mullan, M. (1997) Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta(1-42) induced endothelial toxicity. *Brain Res.* 762, 144-152.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999 b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446

Sutton, E.T., Hellermann, G.R. and Thomas, T. (1997) beta-amyloid-induced endothelial necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Exp. Cell Res.* 230, 368-376.

Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, T.S., Nishitoh, H., Saitoh, M., Ichijo, H., (2000) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 9805-9813.

Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T. and Mullan, M. (1996) beta- myloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature.* 380, 168-171.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports.* 2, 222-228.

Van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., Vandenabeele P. (2002) The role of mitochondrial factor in apoptosis: a russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031-1042.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L. and Ham, J. (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18, 751-762.

Weihl, C.C., Ghadge, G.D., Kennedy, S.G., Hay, N., Miller, R.J. and Roos, R.P. (1999) Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J. Neurosci.* 19, 5360-5369.

Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O. and Ham, J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, 629-643.

Wisniewski, T., Ghiso, J. and Frangione, B., (1997) Biology of A beta amyloid in Alzheimer's disease. *Neurobio. Dis.* 4, 313-328.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xu, J., Chen, S., Ku, G., Ahmed, S.H., Xu, J., Chen, H. and Hsu, C.Y. (2001) Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J. Cereb.Blood Flow Metab.* 21, 702-710.

Yanker, B.A., Duffy, L.K. and Kirschner, D.A. (1990) Neurotrophyc and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279-282.

Yin, K.J., Lee, J.M., Chen, S.D., Xu, J. and Hsu, C.Y. (2002) Amyloid-beta induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells. *J. Neurosci.* 22, 9764-70.

Younkin, S.G. (1995) Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease *Ann.s. Neuro.* 3, 287-288.

Zhang, J., Tan, Z. and Tran, N.D. (2000) Chemical hypoxia-ischemia induces apoptosis in cerebromicrovascular endothelial cells. *Brain Res.* 877, 134-140.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556.