

A β 42의 섬유화 및 독성에 대한 β -Asarone의 저해 효과

김지아 · 이철원 · 이부균 · 이장천 · 안원근*

부산대학교 한의학전문대학원 한의학과

Inhibition of A β 42 Fibrillation and Toxicity with β -Asarone

Jia Kim, Chul Won Lee, Boo Kyun Lee, Jang Cheon Lee, Won Gun An*

School of Korean Medicine, Pusan National University

Amyloid- β protein (A β) is a pathological component of Alzheimer's disease (AD) by participating in the senile plaque formation in the patient's brain. Although the exact mechanism of A β toxicity is not fully elucidated, it is considered to be closely related to its fibrillation process. For prevention of AD, recent studies have suggested various small molecules which inhibit A β fibrillation. In this report, β -asarone found in acorus plant has been investigated as an anti-amyloid molecule. β -Asarone was demonstrated to prevent in vitro fibrillation of A β by inducing the oligomer formation that obviously decreased cytotoxicity. Therefore, β -asarone could be suggested as an inhibitory agent of A β fibrillation and toxicity, which would help us not only to understand underlying principle of amyloidogenesis mechanism but also to develop a controlling strategy toward AD.

Key words : Amyloidogenesis, Amyloid- β , Neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease, β -Asarone, *Acorus gramineus soland*

서 론

Amyloid- β (A β)는 알츠하이머 병(Alzheimer's disease; AD)의 주된 병인 단백질로 환자 두뇌의 신경피질에서 노인반(senile plaque)을 형성한다¹⁾. A β 는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)이 β 및 γ -secretases에 의해 분해되어 생성된다^{2,3)}. 이러한 A β 의 비정상적 축적이 AD와 관련된 신경세포의 퇴화 원인으로 여겨지고 있다⁴⁾.

A β 에 의한 독성기작은 A β 섬유화와 깊이 연관되어 있다고 보고되는데 이 섬유화 과정에서는 다양한 상태의 응집체, 예를 들어 용해성 올리고머(soluble oligomers), 원섬유체(protofibril) 및 아밀로이드 섬유체(amyloid fibril)를 형성한다^{5,6)}. 최근 병리학적인 연구보고에 따르면 섬유화 과정에서 발견되는 A β 올리고머 종이 신경세포 퇴화의 주요 독성 원인으로 제시 되고 있다⁷⁻⁹⁾.

이에 따라 연구계는 A β 의 독성 올리고머 형성과 섬유화 과

정을 저해시켜 AD를 치료하는 연구에 노력을 지속하고 있다¹⁰⁻¹²⁾. 연구 초기에는 β -blocker라 불리는 작은 펩타이드를 이용하여 아밀로이드 섬유체의 구조 형성을 저해하는 효과들이 발표되었다¹³⁻¹⁵⁾. 최근 연구에서는 다양한 small molecule의 섬유화 저해 효과가 주목을 받고 있는데 8종의 화학 응집체와 3종의 아미로이드 분자물에 대한 연구가 보고 되었다¹⁶⁾. 특히 이러한 저분자 화학 물질은 A β 의 올리고머 형성과 섬유화 과정을 구분하여 저해시킬 수 있다는 특이성이 보고되어 전략적인 치료제 개발에 힘을 얻고 있다¹⁷⁾.

이와 관련하여 본 연구에서는 AD의 인지장애 치료에 효능이 있다는 β -asarone¹⁸⁾을 AD 치료를 위한 후보 물질로 제시하기 위해 최근 큰 관심을 받고 있는 A β 의 독성 올리고머 형성⁷⁻⁹⁾ 및 그에 따른 아밀로이드 섬유화에 미치는 효과를 살펴보았다. Asarone은 에테르 유기 화합물로서 *trans*의 α -type과 *cis*의 β -type이 존재하는데 β -asarone(Fig. 1)은 석창포(*acorus gramineus soland*)의 주요 성분으로 알려져 있다. 석창포는 천남성과에 속하는 다년생 초본의 뿌리줄기로 개규약에 포함되며 開竅豁痰, 醒神益智, 化濕開胃의 효능이 있는 식물이다¹¹⁾.

In vitro 실험에서 β -asarone은 섬유화로 진행되지 않는 A β 42 올리고머 형성이 유도됨이 관찰되었고 이 구조체들에서는 일

* To whom correspondence should be addressed at : Won Gun An,
School of Korean Medicine, Pusan National University, Busandaehak-ro,
Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea
· E-mail : wgan@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8455
· Received : 2014/03/26 · Revised : 2014/05/28 · Accepted : 2014/06/09

반 조건의 올리고머가 보이는 독성이 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 A β 42의 섬유화 및 세포독성에 대한 β -asarone의 저해효과를 확인함으로써 A β 42에 의한 신경계 병리기전에 대한 이해를 높이고 AD 치료를 위한 약물개발에 초석을 제공하고자 한다.

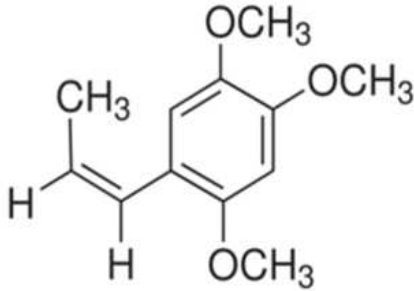


Fig. 1. Chemical structure of β -asarone (cis-2,4,5-Trimethoxy-1-propenylbenzene).

재료 및 방법

1. Amyloid- β 42(A β 42)와 β -asarone 준비

Human A β 42와 β -asarone(cis-2,4,5-Trimethoxy-1-propenylbenzene)는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 확보되었다. A β 42는 1개의 티로신(tyrosine) 잔기를 지닌 시퀀스에 기초하여 276 nm의 흡광도에서 $1450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 molar extinction coefficient를 이용한 농도 적정을 수행하였다^{19,20}. 따라서 DMSO에 용해시킨 A β 42는 이 방법을 통해 0.6 mM의 농도로 적정한 후 분액(aliquot)하여 -80°C 에 저장하였다.

2. A β 42 섬유화 kinetics 측정

A β 42는 0.1 M의 NaCl이 담긴 Tris-HCl (20 mM, pH 7.5)를 이용하여 40 mM의 농도로 희석한 후 37°C 의 정지상태(quiescent)에서 배양 하였다. 배양중의 A β 42를 20 ml 소액 채취하여 50 mM Glycine (pH 8.5)에 녹아있는 2.5 mM의 thioflavin-T와 함께 최종 부피 200 ml로 섞어 주었다. 5분 암반응 후 luminescence spectrometer(LS-55, Perkin-Elmer)를 이용하여 450 nm의 excitation 조건에 482 nm의 emission을 측정하였다²¹. 이 후 측정된 형광 수치에 대한 plotting을 통해 A β 42 섬유화 kinetics를 얻었다.

3. Transmission electron microscope(TEM)

A β 42 응집체들은 TEM(JEM1010)을 이용하여 관찰되었다. 5 ml의 A β 42 응집체들을 carbon-coated copper grid(200 mesh)에 올린 뒤 2% uranyl acetate(Electron Microscopy Sciences)로 1분간 암반응 하여 음성 염색하였다²².

4. Circular dichroism(CD) spectroscopy

A β 42 응집체들의 2차 구조는 CD spectroscopy (J-715)로 분석 되었다. CD spectra는 1.0 nm의 step resolution과 1.0 nm의

bandwidth 및 20 nm/min의 scan speed로 195와 250 nm에서 0.1-mm pathlength quartz로 측정되었다. 총 5번의 scan을 실시하여 최종 CD spectra를 확보하였다²³.

5. 세포배양

Human dopaminergic neuroblastoma cells(SH-SY5Y, ATCC number CRL-2266)는 10% fetal bovine serum가 첨가된 DMEM에서 5% CO_2 , 37°C 조건으로 배양하였다.

6. MTT assay

A β 42 응집체들에 의한 in vitro 세포독성은 MTT법을 이용하여 측정되었다. 5×10^4 cells를 96 well에 분주하여 24시간 배양 후 A β 42 응집체를 처리하고 48시간 추가 배양 후 MTT(1 mg/ml) 용액 50 μl 를 각 well에 분주하였다²⁴. 이를 다시 4시간 배양 후 배양액을 모두 버리고 DMSO 100 μl 를 넣고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계학적 분석

각 실험결과는 3회 이상 실험을 반복하여 얻은 자료를 이용하여 mean \pm S.D. 로 표시하였고, 통계학적 분석은 SPSS version 14.0의 independent t-test를 수행하여 $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. A β 42의 섬유화에 대한 β -asarone의 효과

A β 42의 아밀로이드 섬유화에 미치는 β -asarone의 영향을 파악하고자 Thioflavin-T(Thio-T) 결합 형광법을 이용하여 단백질 응집 kinetics 실험을 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. Thio-T 결합 형광 실험에서 40 μM 의 A β 42로만 37°C 로 배양했을 경우, 총 50 시간 동안 전형적인 sigmoidal 곡선 형태의 아밀로이드 섬유 형성이 관찰 되었다(Fig. 2, ○). 또한 150 μM 의 β -asarone을 첨가한 경우, 아밀로이드 섬유 형성이 150 μM 의 β -asarone을 첨가하지 않은 군에 비하여 의미 있게 저해된 결과가 나타났다(Fig. 2, ●, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 더욱이 β -asarone만을 배양할 경우에는 thio-T의 형광이 거의 나타나지 않았으며, 40 μM 의 A β 42로만 배양한 군에 비하여 의미 있는 차이를 보였다(Fig. 2, △, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

2. β -Asarone에 의한 A β 42의 올리고머 형성

β -Asarone을 첨가하여 40시간 배양한 A β 42의 상태를 살펴보고자 수행한 TEM 분석에 대한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. β -Asarone을 첨가하지 않은 경우, Fig. 2 실험의 A β 42는 40시간 후 TEM 분석 상에서 직경 약 10 nm의 아밀로이드 섬유체가 다량 관찰된데 반하여(Fig. 3B), 150 μM 의 β -asarone을 첨가한 경우, 같은 배양 조건 결과, 아밀로이드 섬유체는 전혀 관찰되지 않았고 둥근 형태(spherical form)의 올리고머 구조체들만이 존재하였다(Fig. 3A).

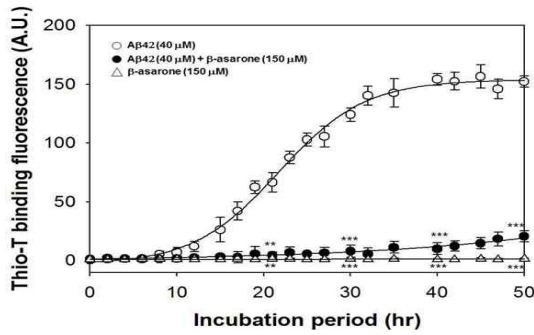


Fig. 2. Fibrillation kinetics of Aβ42 in the presence or absence of β-asarone assessed with Thioflavin-T binding fluorescence. Data represent the mean ± S.D. from three separate experiments. **p < 0.01, ***p < 0.001, significant compared with Aβ42(40 μM).

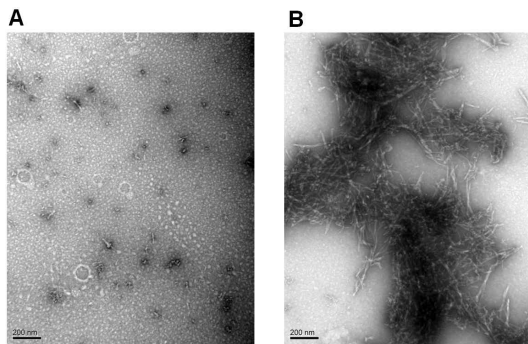


Fig. 3. TEM images of (A) β-asarone-induced Aβ42 oligomers and (B) amyloid fibrils.

3. β-Asarone에 의해 유도된 Aβ42 올리고머의 2차 구조 특성

β-Asarone이 첨가된 조건에서 40시간 배양 후 형성된 Aβ42 올리고머의 구조적 특성을 조사하기 위해 CD 측정을 시행한 결과는 Fig. 4와 같다. β-Asarone에 의해 유도된 Aβ42 올리고머는 여전히 197 nm에서 minimum ellipticity를 보임으로써 무작위(random)의 2차 구조를 가짐이 확인되었다(Fig. 4. straight line). 그러나 disordered structure를 갖는 Aβ42 모노머(Fig. 4. dashed line)에 비해 구조적 무작위 수준은 다소 낮은 편이었다. β-Asarone이 없이 40시간 배양된 Aβ42의 경우, 197 nm에서의 minimum ellipticity는 완전히 사라지고 220 nm에서의 ellipticity가 증가하여 전형적인 β-sheet 구조를 나타내었다.

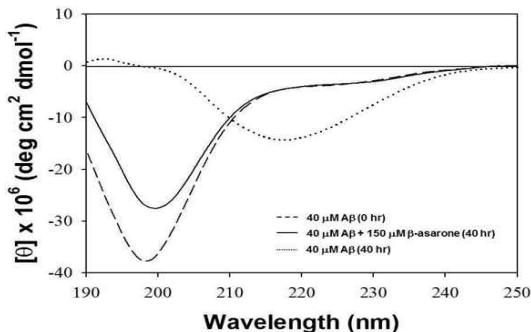


Fig. 4. CD spectra of Aβ monomers (dashed line), β-asarone-induced Aβ42 oligomers (solid line), and fibrils (dotted line). The spectra shown are representative of five spectra yielding similar results.

4. β-Asarone에 의한 Aβ42의 독성 저해 효과

Aβ42에 대한 β-asarone의 독성 저해 효과를 조사하기 위해 신경아 세포종인 SH-SY5Y의 cell viability를 MTT assay²⁴⁾로 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. β-Asarone 없이 8시간 배양한 Aβ42의 경우, SH-SY5Y의 생존율이 대조군의 약 50%였고(Fig. 5, p < 0.01), β-asarone 없이 40시간 배양한 Aβ42의 경우, 생존율이 대조군의 약 68%였다(Fig. 5, p < 0.05). 하지만 β-asarone과 함께 40시간 배양한 Aβ42는 SH-SY5Y의 생존율이 대조군의 약 85%까지 회복되었고, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편, β-asarone과 함께 40시간 배양한 Aβ42는 β-asarone 없이 40시간 배양한 Aβ42에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5, p < 0.05).

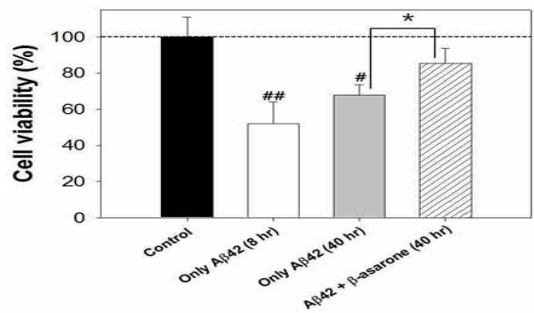


Fig. 5. Effects of β-asarone on Aβ-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. Data represent the mean ± S.D. from three separate experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01, significant compared with control; *p < 0.05, significant compared with only Aβ42(40 hr).

고찰

Aβ는 알츠하이머의 주된 병인 단백질로 환자 두뇌의 신경피질에서 노인반을 형성한다¹⁾. 이러한 Aβ의 비정상적 축적이 알츠하이머와 관련된 신경세포의 퇴화 원인으로 여겨지고 있다⁴⁾. 또한 Aβ에 의한 독성기작은 Aβ의 섬유화와 깊이 관련되어 있다^{5,6)}. 본 연구에서는 Aβ42의 섬유화 및 세포독성에 대한 β-asarone의 저해효과를 Aβ42 섬유화 kinetics 측정, Transmission electron microscope, Circular dichroism spectroscopy 및 MTT assay를 통해 조사하였다.

Thio-T는 단백질의 베타-병풍(β-sheet) 구조에 결합하는 형광염색 물질로서, Aβ42가 형성하는 아밀로이드 구조체는 전형적인 베타-병풍으로 이루어져 있기 때문에 Thio-T 결합 형광 측정을 통해 아밀로이드를 정량하게 된다²¹⁾. 본 연구결과에서 40 μM의 Aβ42로만 배양했을 경우, 총 50 시간 동안 전형적인 sigmoidal 곡선 형태의 아밀로이드 섬유 형성시 관찰되었고, 이와 대조적으로 40 μM의 Aβ42에 150 μM의 β-asarone을 첨가한 경우, 아밀로이드 섬유 형성이 의미 있게 저해되었다. 이는 아밀로이드 섬유체의 β-sheet 구조에 특이적으로 결합하는 Thio-T의 형광 세기가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 β-asarone은 Aβ42의 β-sheet 구조 형성을 막고 결과적으로 아밀로이드 섬유체 형성 또한 저해시키는 효과가 있는 것으로 판단된다. 더욱이, 본 연

구에서 얻은 kinetics 데이터는 최근 연구에서 보고되었던 결과와¹³⁻¹⁷⁾ 같이 β -asarone이 아밀로이드 형성 억제를 통해 A β 42의 독성을 저해할 수 있음을 제안한다.

TEM 분석에 대한 연구결과에 의하면, β -asarone을 첨가하지 않은 경우, A β 42는 40시간 배양 후 아밀로이드 섬유체가 다량 관찰되었으나, β -asarone을 첨가한 경우, 아밀로이드 섬유체는 전혀 생기나지 않았고 올리고머 구조체들만이 존재하였다. 이와 같이 A β 42의 단백질 응집체를 TEM으로 관찰한 결과를 통해 이전 연구에서 보고되었던 A β 42의 올리고머와 섬유체의 형성을 재확인할 수 있었고, β -asarone은 A β 42의 올리고머 형성을 유도하여 섬유화를 저해시킴이²²⁾ 판명되었다. 이는 Fig. 2의 Thio-T 형광법의 결과와 일치하는 자료로 β -asarone에 의한 A β 42의 독성 저해 효과¹⁵⁻¹⁷⁾가 기대 된다.

A β 42 올리고머의 구조적 특성을 조사하기 위해 CD 측정을 시행한 결과, β -asarone에 의해 유도된 A β 42 올리고머는 minimum ellipticity를 보임으로써 random한 2차 구조를 가짐이 확인되었으나, disordered structure를 갖는 A β 42 모노머에 비해 구조적 무작위 수준은 다소 낮은 편이었다. 또한 β -asarone이 없이 40시간 배양된 A β 42의 경우, 220 nm에서 ellipticity가 증가하여 전형적인 β -sheet 구조를 보였다. 이 결과는 Thio-T 형광법 및 TEM에서의 분석결과와 일치하였으며, 이는 β -asarone에 의해 A β 42의 섬유화가 저해됨²²⁾을 의미한다.

A β 42에 대한 β -asarone의 독성 저해 효과를 조사하기 위해 신경아 세포종인 SH-SY5Y의 cell viability를 측정된 결과, β -asarone이 없이 8시간 배양한 A β 42의 경우, SH-SY5Y의 생존율이 대조군에 비해 통계적으로 의미 있게 감소하였고($p < 0.01$), β -asarone 없이 40시간 배양한 A β 42의 경우도 생존율이 대조군에 비해 의미 있게 감소하였다($p < 0.05$). 하지만, β -asarone과 함께 40시간 배양한 A β 42는 SH-SY5Y의 생존율이 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편, β -asarone과 함께 40시간 배양한 A β 42는 β -asarone 없이 40시간 배양한 A β 42에 비해 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.05$). 즉 β -asarone과 함께 40시간 배양한 A β 42는 β -asarone 없이 40시간 배양한 A β 42에 비해 독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이는 β -asarone이 형성된 A β 올리고머 및 섬유체의 독성을 억제¹⁵⁻¹⁷⁾ 시킨 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서 β -asarone은 A β 42와의 상호작용을 통해 A β 42의 섬유화 과정을 저해시키고 독성이 없는 올리고머 형성을 유도함이 확인되었다. 또한 β -asarone이 존재할 경우 형성되는 A β 42 올리고머는 아밀로이드 섬유체와는 대조적으로 β -sheet 구조가 없는 구형의 구조물이고, β -asarone이 없이 형성된 A β 42 올리고머와는 전혀 다른 생화학적 특성을 보여 SH-SY5Y에 대한 독성을 거의 나타내지 않았다. 결과를 종합해보면, β -asarone은 A β 42가 나타내는 전형적인 섬유화 과정과는 다른 경로로 A β 42의 응집 과정을 유도시켜 A β 42의 올리고머를 형성시키고 이러한 올리고머는 독성이 감소된 응집체로 확인 되었다. 따라서 이

러한 β -asarone의 효과는 추후 A β 42의 섬유화 기작 및 올리고머 형성에 대한 이해도를 높이고 섬유화 진행을 저해시키는 약물 개발에 후보물질로 활용될 수 있음을 제시하는 바이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Morrison, J.H., Hof, P.R. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412-419, 1997.
- Fraser, P.E., Lévesque, L., McLachlan, D.R. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin. Biochem.* 26: 339-349, 1993.
- Checler, F. Processing of the b-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65: 1431-1444, 1995.
- Davies, P., Maloney, A.J.F. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 308: 1403, 1976.
- Stefani, M., Dobson, C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81: 678-699, 2003.
- Chiti, F., Dobson, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 333-366, 2006.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Ab1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6448-6453, 1998.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E. Targeting small Ab oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 24: 219-224, 2001.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539, 2002.
- 國家中醫藥管理局. 中華本草(第8卷). 上海: 上海科學技術出版社, pp 472-478, 1999.
- 전국한의과대학 공동교재편찬위원회, 본초학, 영림사, pp 563-564, 2011
- Findeis, M.A. Approaches to discovery and characterization

- of inhibitors of amyloid b-peptide polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* 1502: 76-84, 2000.
13. Talaga, P. beta-Amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality? *Mini Rev. Med. Chem.* 1: 175-186, 2001.
 14. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 140: 627-638, 2004.
 15. Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johanson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.* 271: 8545-8548, 1996.
 16. Permanne, B., Adessi, C., Fraga, S., Frossard, M.J., Saborio, G.P., Soto, C. Are beta-sheet breaker peptides dissolving the therapeutic problem of Alzheimer's disease? *J. Neural Transm. Suppl.* 62: 293-301, 2002.
 17. Adessi, C., Frossard, M.-J., Boissard, C., Fraga, S., Bieler, S., Ruckle, T., Vilbois, F., Robinson, S. M., Mutter, M., Banks, W. A., Soto, C. Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 13905-13911, 2003.
 18. Feng, B.Y., Toyama, B.H., Wille, H., Colby, D.W., Collins, S. R., May, B.C.H., Prusiner, S.B., Weissman, J., Shoichet, B.K. Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization. *Nat. Chem. Biol.* 4: 197-199, 2008.
 19. Necula, M., Kaye, R., Milton, S., Glabe, C.G. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid b oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* 282: 10311-10324, 2007.
 20. Geng, Y., Li, C., Liu, J., Xing, G., Zhou, L., Dong, M., Li, X., Niu, Y. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 33: 836-843, 2010.
 21. Matthew, B.I., Shohei, K. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804: 1405-1412, 2010
 22. Mahiuddin, A., Judianne, D., Darryl, A., Takeshi, S., Shivani, A., Saburo, A., James, I.E., William, E.V. & Steven, O.S. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1 - 42 oligomers to fibrils. *Nature Structural. and Molecular bio.* 17: 561-567, 2010.
 23. Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., Zagorski, M.G. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* 225: 1075-1093, 1992.
 24. Datki, Z., Juhász, A., Gálfi, M., Soós, K., Papp, R., Zádori, D., Penke, B. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Res Bull.* 62: 223-229, 2003.