

Aus dem Bereich der
Experimentellen Neurologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar

**Die Bedeutung von Phospholipiden und oxidierten Lipiden
für die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins
(APP) und die Alzheimer Krankheit**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von

Viola J. Haupenthal

geboren am 24. August 1982 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

Seite

(A)	Auflistung des eigenen Anteils und des Anteils von Mitautoren an den Publikationen	1
(B)	Abkürzungen	5
(1)	Zusammenfassung.....	7
(1.1)	Die Bedeutung von Phospholipiden und oxidierten Lipiden für die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) und die Alzheimer Krankheit	7
(1.2)	The importance of phospholipids and oxidized lipids in Amyloid Precursor Protein processing (APP) and Alzheimer´s disease	9
(2)	Einleitung	11
(2.1)	Die Alzheimer Krankheit – Grundlagen und Epidemiologie	11
(2.2)	Neurobiologische Grundlagen der Alzheimer Krankheit.....	13
(2.3)	Fragestellung der Arbeit	17
(3)	Methoden	18
(3.1)	Methoden der Zellkultur.....	18
(3.1.1)	Kultivierung eukaryotischer Zellen	18
(3.1.2)	Präparation von primären kortikalen Mausneuronen	18
(3.1.3)	Inkubation mit Phospholipiden	19
(3.1.4)	Inkubation mit PL.....	19
(3.1.5)	Inkubation mit oxidierten Lipiden, Lipidperoxidationsprodukten oder DHA.....	19
(3.1.6)	Bestimmung der Zytotoxizität	20
(3.2)	Proteinanalytik.....	21
(3.2.1)	Bestimmung der Proteinkonzentration	21
(3.2.2)	Herstellung von Zell-/ Gewebe- Homogenaten.....	21
(3.2.3)	Herstellung von Zelllysaten.....	22
(3.2.4)	Aufarbeitung humaner <i>post-mortem</i> Gehirnproben.....	23
(3.2.5)	<i>Post</i> -nukleäre Fraktionierung und Isolation von Membranen	23
(3.2.6)	<i>In vitro</i> Inkubationen.....	24
(3.2.7)	Bestimmung der β - und γ -Sekretase Aktivität nach <i>in vitro</i> Inkubation	24
(3.2.8)	Bestimmung der Sekretase Aktivität auf lebenden Zellen	25

(3.2.9) Bestimmung der α -Sekretase- und ADAM-10 Aktivität nach <i>in vitro</i> Inkubation	25
(3.2.10) Bestimmung des A β , sAPP β und sAPP α Gehalts	26
(3.2.11) Bestimmung des ADAM-17, BACE-1 und PS-1 Gehalts	27
(3.3.) Lipidanalytik	28
(3.3.1) Extraktion von Lipiden aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen	28
(3.3.2) Messung der DHA-Stabilität.....	28
(3.3.3) Bestimmung des Lipidgehalts durch Massenspektrometrie	28
(3.3.4) Bestimmung des Phospholipidgehalts mittels Dünnschichtchromatographie	29
(3.3.5) Bestimmung des HNE-Gehalts	30
(3.3.6) Bestimmung der Lipidperoxidation	30
(3.4) RNS-Analytik.....	31
(3.4.1) Isolation von RNS	31
(3.4.1) cDNS-Synthese und Echtzeitpolymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	31
(3.5) Statistische Auswertung	32
(4) Publikationen	33
(4.1) Zusammenfassung von Publikation 1 und Beschreibung des Eigenanteils.....	33
(4.2) Zusammenfassung von Publikation 2 und Beschreibung des Eigenanteils.....	69
(4.3) Zusammenfassung von Publikation 3 und Beschreibung des Eigenanteils.....	87
(5) Erweiterte Zusammenfassung	102
(5.1) Lipide in der AD.....	102
(5.2) Im Kontext: Phospholipide, DHA und oxidierte Lipide in der APP Prozessierung und ihre Rolle für die AD	104
(6) Zusammenfassung und Ausblick.....	117
(7) Beteiligung an weiteren Publikationen.....	119
(8) Literaturverzeichnis	121
(C) Danksagung.....	133

(A) Auflistung des eigenen Anteils und des Anteils von Mitautoren an den Publikationen

Diese Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung vieler Personen nicht in der vorliegenden Form möglich gewesen. Es handelt sich um eine kumulative Dissertation, daher sind nachfolgend alle Abbildungen und Tabellen zu den Publikationen 1 – 3 zusammen mit einer Beschreibung des Eigenanteils bzw. des Anteils der Mitautoren an der entsprechenden Publikation aufgeführt. Die Abbildungen der Publikationen wurden erstellt von Marcus O.W. Grimm.

Publikation 1 (geteilte Erstautorenschaft mit Marcus O.W. Grimm)

Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease, International Journal of Molecular Sciences, veröffentlicht am 13. März 2013, Volume 14, Pages 5879-5898

Tabelle 1 - Kooperationen I

Abbildung/ Tabelle	Tätigkeit	Durchführende Person
figure 1	(a) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (b) Präparation von isolierten Membranen aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen, Inkubation mit Lipiden, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (c) Inkubation der Lipide	Viola J. Hauptenthal
	(c) Präparation des Lipidextrakts aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen	Benjamin Hundsdörfer
	(c) Bestimmung der ADAM-10 Aktivität	Tatjana Rothhaar
figure 2	(a) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (b) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (c) Präparation von isolierten Membranen aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen, Inkubation mit Lipiden, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität	Viola J. Hauptenthal

weiter nächste Seite

Abbildung/ Tabelle	Tätigkeit	Durchführende Person
figure 3	(a) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (b) Präparation von isolierten Membranen aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen, Inkubation mit Lipiden, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (c) Inkubation der Lipide	Viola J. Haupenthal
	(c) Präparation des Lipidextrakts aus humanen <i>post-mortem</i> Gehirnen	Benjamin Hundsdörfer
	(c) Bestimmung der ADAM-10 Aktivität	Tatjana Rothhaar
figure 4	(a) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität (b) Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität	Viola J. Haupenthal
figure S1	Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipid, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität	Viola J. Haupenthal
figure S2	Aufarbeitung der Proben	Viola J. Haupenthal
	Dünnschichtchromatographische Analyse	Benjamin Hundsdörfer
figure S3	(a-j) Plotten der Enzymkinetiken	Viola J. Haupenthal
figure S4	(a, b) Kultivierung der Zellen, Bestimmung der Spezifität der α -Sekretase Messung, sAPP α -Gehaltsbestimmung	Viola J. Haupenthal
figure S5	Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden	Viola J. Haupenthal
	Massenspektrometrische Analyse	Sven Grösgen
table S1 – S4	Statistische Auswertung der Daten mittels ANOVA	Valerie Zimmer, Johannes Lehmann
table S5	Präparation von isolierten Membranen	Viola J. Haupenthal
	Massenspektrometrische Analyse	Sven Grösgen
/	Erstellung des Manuskripts	Tobias Hartmann, Marcus O.W. Grimm, Heike S. Grimm

Publikation 2 (Mitautorenschaft)

Plasmalogens Inhibit APP Processing by Directly Affecting γ -secretase Activity in Alzheimer's Disease, The Scientific World Journal, veröffentlicht am 01. April 2012, Volume 2012, Article ID 141240, 15 Pages

Tabelle 2 - Kooperationen II

Abbildung/ Tabelle	Tätigkeit	Durchführende Person
table 2	Aufarbeitung der humanen <i>post-mortem</i> Gehirnproben	Tatjana L. Rothhaar
	Massenspektrometrische Analyse	Sven Grösgen
table 3	Kultivierung der Zellen, Inkubation der Lipide	Tatjana L. Rothhaar
	Real Time PCR Analyse	Sven Grösgen
figure 2	Kultivierung der Zellen, Inkubation mit Lipiden, Aufarbeitung der Proben	Tatjana L. Rothhaar
	Bestimmung des ADAM-17, BACE-1, PS1-Gehalts	Verena K. Burg
figure 3, 4, 6	Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Messung der β - bzw. γ -Sekretase Aktivität	Tatjana L. Rothhaar
figure 5	Herstellung PNFs	Tatjana L. Rothhaar
	Inkubation mit Lipiden, Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der α -Sekretase Aktivität	Viola J. Haupenthal
figure S1	Kultivierung der Zellen, Aufarbeitung der Proben, Bestimmung der Zytotoxizität	Tatjana L. Rothhaar
figure S2	Herstellung PNFs	Tatjana L. Rothhaar
	Präparation von isolierten Membranen, Inkubation mit Inhibitoren, Bestimmung der α -Sekretaseaktivität	Viola J. Haupenthal
figure S3 & S4	Präparation von isolierten Membranen, Inkubation mit Inhibitoren, Bestimmung der β - & γ -Sekretaseaktivität	Tatjana L. Rothhaar
/	Erstellung des Manuskripts	Tobias Hartmann, Marcus O.W. Grimm, Heike S. Grimm, Mattias Riemenschneider, Benjamin Hundsdörfer, Janine Mett

Publikation 3 (geteilte Erstautorenschaft mit Marcus O.W. Grimm)

Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing, Neurodegenerative Diseases, 2016, Volume 16, Number 1-2, Pages 44-54, 2016, veröffentlicht online am 08. Dezember 2015

Tabelle 3 - Kooperationen III

Abbildung/ Tabelle	Tätigkeit	Durchführende Person
figure 1	(a) Homogenisierung, Aufbereitung und Proteingehaltsanalyse des humanen <i>post-mortem</i> Gehirnmaterials	Nadine T. Mylonas
	(a) Bestimmung der Lipid-Peroxidationsprodukte, Bestimmung des HNE-Gehalts (c-f) Inkubation mit oxidierten DHA-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten (HHE, HNE), Bestimmung des A β -, sAPP α - & sAPP β -Gehalts	Viola J. Haupenthal
figure 2	(a, b) Inkubation mit oxidierten DHA-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten (HHE, HNE), Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität (c) Inkubation mit oxidierten DHA-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten (HHE, HNE), Präparation von isolierten Membranen, Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität (d) Inkubation mit oxidierten DHA-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten (HHE, HNE)	Viola J. Haupenthal
	(d) Real Time PCR Analyse	Janine Mett
table 2	Präparation der murinen kortikalen Primärneurone	Inge Tomic
	Inkubation der Lipide, Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität	Viola J. Haupenthal
Zytotoxizität Ergebnisse im Text	Inkubation der oxidierten Lipide	Viola J. Haupenthal
	Aufarbeitung der Proben, Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit 17-OH-, 17-Keto-, 17-Hydroxyperoxy-DHA, HHE, HNE	Viola J. Haupenthal
	Bestimmung der Zytotoxizität nach Inkubation mit 19,20-Epoxy-DPA und 7,17-OH-DPA	Janine Mett
Bestimmung der DHA Stabilität Ergebnisse im Text	Inkubation von DHA	Viola J. Haupenthal
	Massenspektrometrische Analyse	Christoph P. Stahlmann
Aβ-Gehalt nach DHA Inkubation Ergebnisse im Text	Inkubation von DHA, Bestimmung des A β -Gehalts	Viola J. Haupenthal
	Auswertung A β -Gehalt aus Inkubation mit DHA im Vergleich zu oxidierten DHA-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten	Nadine T. Mylonas
Bestimmung der β- und γ-Sekretaseaktivität nach Inkubation mit DHA Ergebnisse im Text	Inkubation von DHA	Viola J. Haupenthal
	Aufarbeitung der Proben, Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität	Tamara Blümel
/	Erstellung des Manuskripts	Tobias Hartmann, Marcus O.W. Grimm, Heike S. Grimm, Kristina Endres

(B) Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μM	micro Molar
AA	Arachidonsäure
Aβ	Amyloid β
AD	Alzheimer Krankheit
ADAM	α-Sekretase A-Disintegrin-and-metalloprotease
AICD	intrazelluläre APP-Domäne
Aph	<i>engl.</i> Anterior pharynx-defective
APO E	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläufer Protein
BACE	β-Sekretase
BSA	Bovine serum albumin
COX	Cyclooxygenase
CTF	C-terminale Domäne von APP
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dublecco's modified eagle medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECE	Endothelin konvertierendes Enzym
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EOAD	Frühe Form der Alzheimer Krankheit
EPA	Eicosapentaensäure
FAD	Familiäre Form der Alzheimer Krankheit
FCS	Fetales Kälberserum
<i>g/g</i>	Gramm / <i>Erdbeschleunigung</i>
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunden
HBSS	Salzhaltige Pufferlösung für Primärneurone
HDL	Lipoprotein mit hoher Dichte
HHE	4-Hydroxyhexenal
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

HNE	4-Hydroxynonenal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IDE	Insulin degradierendes Enzym
IP	Immunopräzipitation
LDH	Lactatdehydrogenase-Messung
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte
LOAD	Späte Form der Alzheimer Krankheit
LOX	Lipoxygenase
LRP1	Lipoproteinrezeptor 1
Min	Minute
Me	Methanol
mM	millimolar
NP-40	Nonidet-P-40 Lösung
NPD-1	Neuroprotektin-D1
NTF	Neurofibrilläre Bündel
OD	Optische Dichte
P	p-Wert, Signifikanzniveau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PL	Plasmalogen
PS	Phosphatidylserin
PSEN	<i>engl.</i> Presenilin enhancer
RIP	Regulierte Intramembran Proteolyse
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SAD	Sporadische Form der Alzheimer Krankheit
sAPP	lösliches APP
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
SPT	Serinpalmitoyl-Coenzym A-Synthase
TBA	Thiobarbitursäure
wt	Wildtyp

(1) Zusammenfassung

(1.1) Die Bedeutung von Phospholipiden und oxidierten Lipiden für die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) und die Alzheimer Krankheit

Die molekularen Grundlagen der Alzheimer Krankheit (AD) werden intensiv erforscht. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der proteolytischen Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) zu. Die amyloidogene Prozessierung des APP durch die β - und γ -Sekretase resultiert in der Bildung des Amyloid- β (A β)-Peptids. A β stellt ein Hauptbestandteil der A β -Plaques dar, welche neben den Neurofibrillenbündeln, ein Kennzeichen der Alzheimer Krankheit sind. Die nicht amyloidogene APP Prozessierung durch die α - und γ -Sekretase verhindert die A β -Bildung. Da die Lipidzusammensetzung der Membran die Sekretasen und APP beeinflussen kann, wurden in dieser Arbeit Phospholipide und oxidierte Lipide hinsichtlich ihrer Wirkung auf die APP Prozessierung analysiert.

In Publikation 1 wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die Aktivität der α -Sekretase im nicht amyloidogenen Weg der APP Prozessierung betrachtet. Es wurden Phospholipide verwendet, welche sich durch unterschiedliche Fettsäuren, hinsichtlich Kettenlänge, Sättigungsgrad und Position der Doppelbindung unterschieden. Zusätzlich wurden Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen betrachtet. In Experimenten mit entweder lebenden SH-SY5Y Zellen oder isolierten Membranen dieser Zellen aktivierten kurzkettige, gesättigte Phospholipide die α -Sekretase, während langkettige, gesättigte Phospholipide keinen Effekt auf die Aktivität hatten. Langkettige, ungesättigte Phospholipide hingegen steigerten die Aktivität der α -Sekretase. Die aktivierende Wirkung von gesättigten, kurzkettigen und ungesättigten, langkettigen Phospholipiden auf die α -Sekretase konnte in einem *ex vivo* Ansatz zusätzlich in Membranen aus humanen *post-mortem* Gehirnen nachgewiesen werden. Der Effekt der verwendeten Phospholipide wurde auf die α -Sekretase ADAM-10 zurückgeführt. Die Variation der Kopfgruppe und die Position der Doppelbindung innerhalb der Fettsäuren der Phospholipide hatten schwache oder keine Effekte auf die Aktivität der α -Sekretase.

In Publikation 2 dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Plasmalogene (PL), eine Untergruppe der Phospholipide, auf die proteolytische Prozessierung des APP haben. In Versuchen mit isolierten Membranen von SH-SY5Y Zellen oder Mausgehirnen und lebenden

SH-SY5Y Zellen verursachten PL eine Reduktion der γ -Sekretase Aktivität. Die Aktivität der α - und β - Sekretase war weitestgehend unbeeinflusst durch die verwendeten PL. Die Reduktion der γ -Sekretase Aktivität wurde durch einen direkten Effekt der PL auf die Enzymaktivität hervorgerufen. Auch in isolierten Membranen von Gehirnen von AD-Patienten zeigte sich eine signifikante Reduktion der γ -Sekretase durch die verwendeten PL.

Zuletzt wurde in Publikation 3 die Auswirkung von oxidierten Docosahexaensäure (DHA)-Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten der ω -3 und ω -6 Fettsäuren auf die APP Prozessierung analysiert. Es wurde nachgewiesen, dass die Lipidperoxidation in humanen *post-mortem* Gehirnen von AD-Patienten erhöht war. Die oxidierten DHA Derivate und Lipid-Peroxidationsprodukte steigerten die Produktion von $A\beta$ und sAPP β , während der Gehalt an sAPP α weitestgehend unverändert blieb. Eine Mischung aus allen oxidierten Lipiden und DHA resultierte in einer Steigerung der $A\beta$ -Produktion und invertierte damit den positiven Effekt von nicht oxidiertem DHA. Der Effekt der oxidierten DHA-Derivate und Lipid-Peroxidationsprodukte auf die $A\beta$ Produktion konnte auf einen direkten Einfluss auf die β -Sekretase Aktivität und die Expression des β -site-cleaving-enzyme (BACE-1) zurückgeführt werden. Die γ -Sekretase Aktivität wurde weitestgehend durch Expressionseffekte der oxidierten Lipide auf die einzelnen Bestandteile des Enzyms hervorgerufen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verwendeten Phospholipide und oxidierten Lipide die Prozessierung des APP beeinflussen. Dabei wirkten diese Lipide auf die Aktivität der Sekretasen und beeinflussten zum Teil auch die Expression der Sekretasen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Lipiden für die molekularen Grundlagen der Alzheimer Krankheit und geben Hinweise auf mögliche Präventionsansätze zur Reduktion der $A\beta$ -Bildung.

(1.2) The importance of phospholipids and oxidized lipids in Amyloid Precursor Protein (APP) processing and Alzheimer's disease

The molecular principles of Alzheimer's disease are intensively investigated. With regard to that, the proteolytic processing of the Amyloid Precursor Protein (APP) is of importance. The amyloidogenic processing of APP via the β - and γ -secretase results in the production of Amyloid- β (A β). A β is a major constituent of A β -plaques, which represent together with neurofibrillary tangles a hallmark of Alzheimer's disease. The non amyloidogenic processing of APP via the α - and γ -secretase precludes A β -formation. The processing of APP depends on the lipid environment of the membranes, therefore in this thesis phospholipids and oxidized lipids are analyzed with regard to that.

In publication 1 the influence of phospholipids on the α -secretase activity in the non amyloidogenic pathway of APP processing is analyzed. Phospholipids differing in fatty acid chain length and saturation, as well as position of double bonds and the head groups were used. In experiments based on living SH-SY5Y cells or isolated membranes of these cells short chain, saturated fatty acids activated the α -secretase, while phospholipids with long chain saturated fatty acids did not influence the activity of the α -secretase. Long chain, unsaturated fatty acid phospholipids again increased the α -secretase activity. Using an *ex vivo* approach the activation of phospholipids with short chain saturated fatty acids and long chain unsaturated fatty acids was demonstrated in isolated membranes of human *post-mortem* brain samples, too. The activating effect of the above mentioned lipids could be traced back to the α -secretase ADAM-10. The variation of the position of double bonds within the phospholipids or the head group mainly showed no effect on α -secretase activity.

In publication 2 of this thesis, the influence of plasmalogens (PL), a subgroup of phospholipids, on APP processing was analyzed. PL decreased γ -secretase activity in membranes of SH-SY5Y cells or mouse brains and living SH-SY5Y cells. The activity of α - and β -secretase was mainly unchanged by the analyzed PL. The decreased γ -secretase activity was caused by a direct effect of PL on the activity of the enzyme. In line with these results, PL decreased γ -secretase activity in isolated membranes of human *post-mortem* brain samples of Alzheimer's disease patients.

Finally, in publication 3 the effect of oxidized docosahexaenoic acid (DHA) derivatives and the lipid peroxidation products of ω -3 and ω -6 fatty acids, were analyzed. It was demonstrated, that lipid peroxidation is increased in *post-mortem* brains of Alzheimer's disease patients. In SH-SY5Y cells the oxidized DHA-derivatives and lipid peroxidation products increased the production of A β and sAPP β , whereas the sAPP α level during non amyloidogenic cleavage of APP, was mainly unaffected. Furthermore, a mixture of all oxidized lipids together with DHA increased the A β level, too. The effects of oxidized DHA derivatives and lipid peroxidation products on A β production were traced back to a direct effect of the oxidized lipids on β -secretase activity and the expression of β -site-cleaving enzyme (BACE1). The oxidized lipids increased also the γ -secretase activity, resulting from an elevated gene expression of the γ -secretase components.

To summarize, in this thesis the influence of the analyzed phospholipids and oxidized lipids are able to influence APP processing. The lipids affected the activity of the secretases and partly their expression. The results underline the importance of lipids for the molecular mechanisms of Alzheimer's disease and reveal possible prevention actions for the reduction of A β .

(2) Einleitung

(2.1) Die Alzheimer Krankheit – Grundlagen und Epidemiologie

Laut Welt-Alzheimer-Bericht leiden weltweit zirka 46 Millionen Menschen an Demenz. Zudem wird sich die Zahl bis zum Jahre 2050 voraussichtlich verdreifachen. Die Alzheimer Krankheit, im Folgenden als AD (Alzheimer Demenz) bezeichnet, ist mit 50-75% aller Erkrankungen die häufigste Form von Demenz (Prince et al. 2015).

Weltweit betrachtet ist sowohl die Prävalenz, als auch die Inzidenz der AD in westlichen Ländern, wie Westeuropa, Nordamerika und Lateinamerika am höchsten. Gefolgt werden diese Länder von China, wo weltweit die meisten über 60-jährigen AD-Patienten leben: 151 Millionen im Jahre 2001. Im Vergleich dazu lebten in Westeuropa zu diesem Zeitpunkt 90 Millionen AD-Fälle diesen Alters (Ferri et al. 2005).

Vor über 100 Jahren wurde die AD erstmals beschrieben und von dem Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer anhand des Falles von Auguste Deter charakterisiert. Die Patientin litt an Vergesslichkeit, Desorientierung und Verwirrtheit. Seine Beobachtungen beschrieb Alzheimer im Jahre 1906 während eines Kongresses in Tübingen (Ramirez-Bermudez 2012).

Im Anfangsstadium äußert sich die AD bei den Betroffenen unter anderem durch eine eingeschränkte Erinnerungsfähigkeit des Kurzzeitgedächtnisses und leichte Einschränkungen bei alltäglichen Aufgaben. Der progressive und irreversible Verlauf der AD führt zur kontinuierlichen Verschlechterung der Symptome und die Beeinträchtigungen im Alltag der Betroffenen nehmen zu. Nach und nach treten zusätzlich Verwirrheitszustände, Probleme mit Zeit- und Ortsangaben, Rückzug aus dem sozialen Umfeld, Wortfindungsstörungen, Schreibschwäche und letztlich gravierende Persönlichkeitsveränderungen, sowie Depression und Bettlägerigkeit auf. Der Tod tritt meist durch Sekundärerkrankungen ein (Alzheimer's Association 2014).

Die AD kann in der sporadischen und der familiären Form auftreten. Die sporadische Form (SAD, sporadische Alzheimer Demenz) ist die häufigste Ausprägung der Krankheit. Die SAD tritt ungefähr in der siebten Dekade des Lebens, also im letzten Lebensabschnitt auf und wird dann auch als LOAD (engl. Late Onset AD, späte AD) bezeichnet. Die Risikofaktoren, sowie die Ursachen für die SAD sind mannigfaltig. Das Alter stellt dafür den größten Risikofaktor

dar (Finckh 2006). Als genetischer Risikofaktor gilt unter Anderem der Apolipoprotein E (Apo E) Status. Es wird zwischen Apo E ϵ 1-4 unterschieden. Ist eine Person Träger von nur einem Allel des Apo E ϵ 4 Gens, so steigert dies ihr Risiko an AD zu erkranken deutlich (Hauser & Ryan 2013; Corder et al. 1993).

Die weitaus seltenere Form der AD wird familiäre Alzheimer Krankheit (FAD, Familiäre Alzheimer Demenz) genannt. In diesem Fall tritt eine familiäre Anhäufung der Krankheit auf und die Personen erkranken meist vor dem 60. Lebensjahr. Deshalb wird diese Form der AD auch als EOAD (engl. Early Onset Alzheimer's Disease, frühe Form der Alzheimer Demenz) bezeichnet. Die FAD wird in den meisten Fällen autosomal-dominant vererbt, dies hängt von den entsprechenden Genen, die die Mutation tragen, ab. Als Risikofaktoren gelten Mutationen im Amyloid-Vorläufer Protein (APP, engl. Amyloid Precursor Protein), Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2); die Verteilung dieser Mutationen in Familien, welche an FAD erkrankten, ist 15-20% (APP-Mutation), 75-80% (PS1-Mutation) und weniger als 5% (PS2-Mutation) (Wu et al. 2012; Blennow et al. 2006).

Zusätzlich zu den genannten Ursachen der AD werden weitere Risikofaktoren, die zu der Entstehung von AD beitragen, diskutiert. Darunter fallen persönliche und kulturelle Lebensumstände, wie z.B. Ernährung, Bildung und andere Krankheiten. Im Zusammenhang mit anderen Krankheiten gilt es zu erwähnen, dass Faktoren, die das Herz-Kreislaufsystem betreffen, das Risiko an AD zu erkranken beeinflussen (Qiu et al. 2009). Vaskuläre Risikofaktoren, z.B. Bluthochdruck, hoher Gesamtcholesterinspiegel im Blut sowie Diabetes steigern Risiko für eine AD. Für die meisten dieser Risikofaktoren ist das Auftreten im mittleren Lebensabschnitt entscheidend, zusammengefasst in (Launer et al. 2015; Kivipelto et al. 2001; de la Monte 2008; Sims et al. 2015). Zusätzlich kommt der Ernährung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von AD zu. Übergewicht und Fettleibigkeit steigern das Risiko für Herz-/Kreislaufkrankungen. Auch hier ist der mittlere Lebensabschnitt entscheidend (Kivipelto et al. 2005; Koivisto et al. 2016). Zahlreiche Nahrungsbestandteile, wie z.B. Antioxidantien, Vitamine und Lipide beeinflussen das AD-Risiko. Die Reduktion von oxidativem Stress durch Antioxidantien wird als protektiv gegenüber AD angesehen (Vina et al. 2011). Oxidativer Stress, der zusammen mit inflammatorischen Prozessen im Gehirn von AD-Patienten auftreten kann, steigert hingegen das AD Risiko (Obeid & Herrmann 2006). So wurden z.B. Cytokine, die bei der Neuroinflammation und der Aktivierung von Mikroglia im Gehirn auftreten (Swardfager et al. 2015), bei AD-typischen Veränderungen im Gehirn nachgewiesen. Allerdings haben Studien mit anti-inflammatorischer Medikation bislang keinen eindeutigen Erfolg bei der Prävention von AD erzielen können (Galasko et al. 2012;

Aisen et al. 2003; ADAPT Research Group, Lyketsos et al. 2007). Als weiterer Aspekt eines gesteigerten AD Risikos wird ein erhöhter Homocysteinspiegel im Blutplasma diskutiert (Seshadri et al. 2002; Zylberstein et al. 2015). Dieser kann neurotoxische Effekte, wie mitochondriale Dysfunktion, DNA Schäden und oxidativen Stress hervorrufen (Lin et al. 2014; Kim & Pae 1996; Obeid & Herrmann 2006).

Nicht zuletzt wird diskutiert, ob Rauchen und Alkoholkonsum das Risiko an AD zu erkranken steigert (Ruitenbergh et al. 2002; Huang et al. 2002; Anttila et al. 2004; Anstey et al. 2007).

Die Wirkung von Lipiden bei der Entstehung von AD wird in der *Erweiterten Zusammenfassung* in Kapitel 5 ausführlich diskutiert.

(2.2) Neurobiologische Grundlagen der Alzheimer Krankheit

Charakteristisch für die AD sind intrazelluläre Ansammlungen des hyperphosphorylierten Tau-Proteins und extrazelluläre Aggregate des Amyloid- β Peptids ($A\beta$), auch als Plaques bezeichnet. Die Tau-Ansammlungen bilden Neurofibrillenbündel (engl. *Neurofibrillary tangles*, NFT) innerhalb der Zellen aus. Diese schädigen die Zellen und führen unter anderem zur Blockade des axonalen Transports in Neuronen (Alonso et al. 1996; LaPointe et al. 2009).

$A\beta$ resultiert aus der Proteolyse des APP, welches im Körper ubiquitär exprimiert wird. Die physiologische Funktion von APP ist bis heute nicht abschließend aufgeklärt. APP hat wichtige Funktionen in dem Lipidhaushalt (Grimm, Rothhaar & Hartmann 2012), dies ist in Kapitel 4 beschrieben. Eine Rolle von APP unter anderem bei der Zell-Zelladhäsion, der neuronalen Plastizität und der Synapsenbildung wird diskutiert (Wolfe & Guénette 2007). APP ist ein Typ-1-Transmembranprotein und kommt in Neuronen gehäuft entlang der Axone vor, wo es in Zusammenhang mit dem schnellen anterograden Transport steht (Satpute-Krishnan et al. 2006). APP wird sequenziell von mehreren Enzymen gespalten. Diese Prozessierung kann amyloidogen oder nicht amyloidogen ablaufen. Während der amyloidogenen Prozessierung wird APP durch die β - und γ -Sekretase gespalten, während es in der nicht amyloidogenen Prozessierung durch die α - und γ - Sekretase prozessiert wird. Die amyloidogene Prozessierung resultiert in der Bildung des $A\beta$ -Peptids (Grimm & Hartmann 2013). Der Einfluss von Lipiden auf die APP Proteolyse wird u.a. durch die subzelluläre Lokalisation der Prozessierungswege deutlich. Die nicht amyloidogene Prozessierung des APP durch die α - und γ - Sekretase findet an der an der Zelloberfläche statt (Sisodia 1992;

Kojro et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist die amyloidogene Prozessierung des APP durch die β - und γ - Sekretase mit dem endosomalen Kompartiment assoziiert. Zusätzlich wird das Modell der *Lipid Rafts* bei der amyloidogenen Prozessierung diskutiert (Eehalt et al. 2003; Merched et al. 2000; Choy et al. 2012). Die nicht amyloidogene Prozessierung ist unabhängig von *Lipid Rafts*. Das Modell der *Lipid rafts* beschreibt dicht gepackte Membranabschnitte, welche reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind (Sonnino et al. 2013; Karnovsky et al. 1982; Simons & Van Meer 1988).

Während der amyloidogenen Prozessierung wird APP N-terminal durch die β -Sekretase BACE-1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1*) gespalten. BACE-1 ist eine Aspartatprotease und ein Typ-1 Membranprotein, welches vorwiegend innerhalb des endolysosomalen Komplexes vorliegt und dort, bedingt durch den sauren pH-Wert, die größte proteolytische Aktivität aufweist (Vassar 1999). Der β -Sekretase Schnitt resultiert im extrazellulär oder endolysosomal vorliegenden löslichen sAPP β (soluble APP β) und dem in der Membran verbleibenden C-terminalen Fragment β CTF (β -cleaved C-terminal Fragment), welches im Folgenden durch die γ -Sekretase gespalten werden kann (Esch et al. 1990; Haass, Koo, et al. 1992; De Strooper et al. 1998; Wolfe et al. 1999). Diese Art der Proteolyse wird regulierte Intramembranproteolyse (RIP) genannt. Diese Spaltung findet innerhalb der Lipiddoppelschicht statt und erfordert spezielle Bedingungen, was den Einfluss der Lipide bei der Prozessierung des APP weiter verdeutlicht (Brown et al. 2000). Die γ -Sekretase ist eine Aspartatprotease und wird als funktioneller Multienzymkomplex von mindestens den folgenden vier Untereinheiten gebildet: PS 1 oder 2, Anterior-Pharynx-defective 1a oder b (Aph1a oder Aph1b), Nicastrin und Presenilin Enhancer 2 (PSEN2) (Selkoe & Wolfe 2016). Nach dem Schnitt durch die γ -Sekretase liegt zytosolisch die intrazelluläre Domäne des APP, AICD (engl. *APP intracellular domain*) vor, extrazellulär resultiert dieser Schnitt in der Bildung des A β Peptids (Haass, Schlossmacher, et al. 1992; Haass et al. 1993). A β kommt auch intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum und dem endosomalen Kompartiment vor (Grimm, Rothhaar & Hartmann 2012; Choy et al. 2012; Koo & Squazzo 1994; Hartmann et al. 1997). Die Spezies A β ₄₀ und besonders A β ₄₂ besitzen ein hohes Aggregationspotential, wodurch sich A β -Dimere, -Trimere, - Oligomere und schließlich Fibrillen ausbilden. Dieser Prozess resultiert letztlich in der Bildung der A β Plaques im Gehirn von AD-Patienten. Aggregate von A β sind besonders in Form von Oligomeren neurotoxisch, was bei AD-Patienten nachgewiesen wurde (Bharadwaj et al. 2009; Mclean CA et al. 1999; Lue et al. 1999; Renner et al. 2010). Die biologische Funktion von sAPP β ist noch nicht geklärt,

Einflüsse auf die Differenzierung von Neuronen und das Neuritenwachstum werden diskutiert (Freude et al. 2011). Das intrazelluläre Produkt des γ -Sekretase Schnitts, AICD, ist transkriptionell aktiv. Dies gilt besonders für AICD, welches aus der amyloidogenen Prozessierung des APP resultiert. Begründet wird dieses Modell durch die subzelluläre Lokalisation der amyloidogenen Prozessierung im endolysosomalen Kompartiment. Durch Bindung von Fe65, TIP60 und anderer Cofaktoren wird AICD stabilisiert und vor dem Abbau geschützt. Dann kann es durch Translokation in den Zellkern gelangen (Belyaev et al. 2010; Müller et al. 2013). AICD reguliert unter anderem die Transkription des A β -degradierenden Enzyms Nepilysin, LRP-1 (Low-density lipoprotein receptor 1), Gsk3 β , SPT (Serin-Palmitoyl-Coenzym A Transferase) und auch des APP selbst (Müller & Wild 2013; Słomnicki & Leśniak 2008; Grimm, Mett, et al. 2015; Grimm, Mett, et al. 2013; Grimm, Grösgen, Rothhaar, Burg, et al. 2011).

Im Gegensatz zur amyloidogenen Prozessierung durch die β - und γ -Sekretase, wird in der nicht amyloidogenen Prozessierung des APP die Bildung von A β durch den Schnitt der α -Sekretase verhindert (Esch et al. 1990). Dieser Schritt stellt ein entscheidendes Ereignis zur Verhinderung der neurotoxischen Wirkung des A β dar und wird in der Prävention von AD daher umfassend diskutiert (Lichtenthaler 2011; Postina et al. 2004; Nitsch et al. 2000; Caccamo et al. 2016; Endres & Fahrenholz 2010). Die α -Sekretase spaltet APP an der Plasmamembran, was extrazellulär in der Bildung des löslichen sAPP α (engl. *soluble APP α*) und des membranständigen α CTF resultiert (Lammich et al. 1999). sAPP α besitzt neuroprotektive Eigenschaften, fördert das Neuritenwachstum und ein protektiver Einfluss gegenüber oxidativem Stress durch A β wird diskutiert (Chasseigneaux & Allinquant 2012). Als α -Sekretasen gelten die Disintegrin- und Metalloproteasen ADAM-10 (engl. *A disintegrin and metalloprotease -10*) und ADAM-17, beides sind Typ-I Transmembranproteine (Lichtenthaler 2011; Black & White 1998; Mezyk et al. 2003). In murinen kortikalen Primärneuronen ist hauptsächlich ADAM-10 für die konstitutive Aktivität der α -Sekretase (Kuhn et al. 2010) verantwortlich, während die regulierte Aktivität der α -Sekretase von z.B. ADAM-10, -17 und -9 übernommen werden kann (Kojro et al. 2006; Buxbaum et al. 1998; Shen et al. 2016). Diese wird durch eine Vielzahl von Molekülen, z.B. Phorbolmyristateacetate (PMA), Pituitary-Adenylatcyclase aktivierendes Polypeptid (PACAP) und nicht zuletzt durch verschiedene Lipide beeinflusst (Kojro et al. 2006; Buxbaum et al. 1998).

Nach dem Schnitt der α -Sekretase wird das membranständige α CTF durch die γ -Sekretase gespalten, wodurch zytosolisch AICD und extrazellulär das kleine Fragment p3 freigesetzt wird. AICD aus dem nicht amyloidogenen Weg wird im Gegensatz zum amyloidogenen Weg, innerhalb der Zelle unter anderem durch das Insulin degradierende Enzym (engl. *Insulin degrading enzyme, IDE*) degradiert weshalb die transkriptionelle Relevanz dieses AICD umstritten ist (Belyaev et al. 2010). Die Funktion von p3 ist noch unklar. Eine Übersicht der APP Prozessierung ist in Abbildung 1 dargestellt.

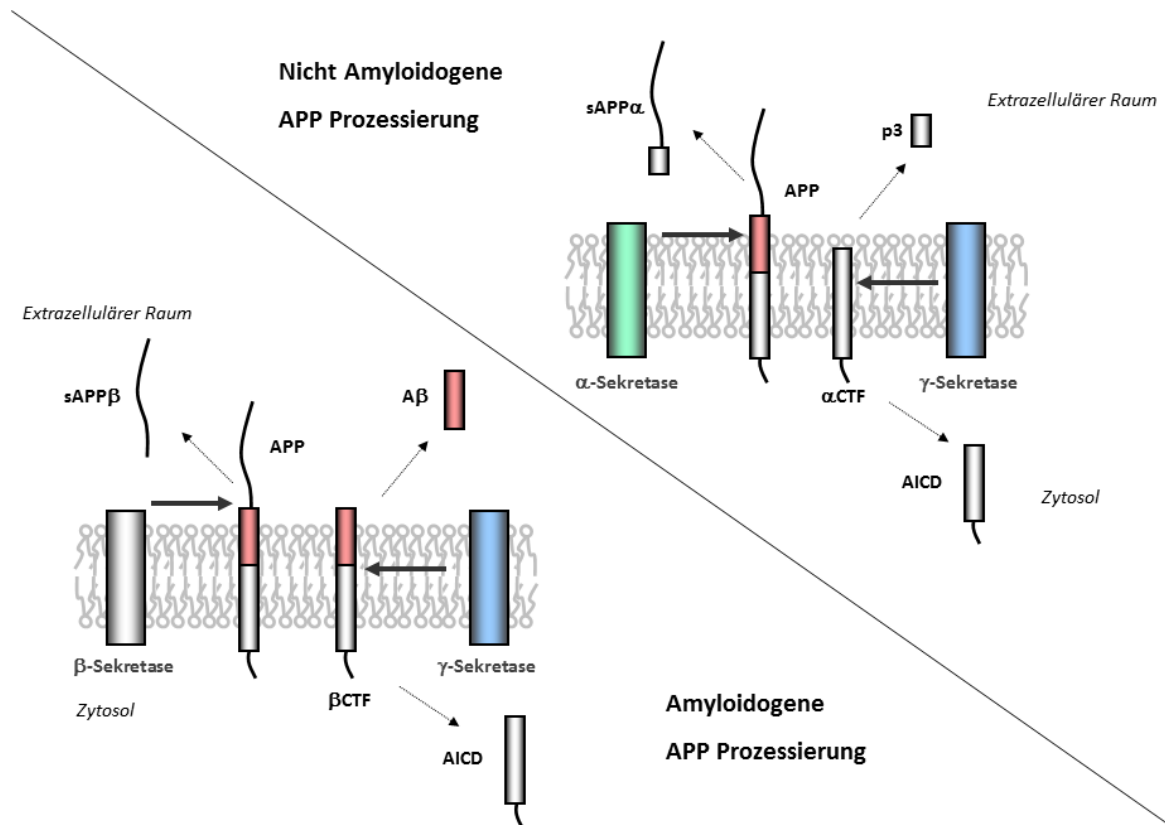


Abbildung 1 Schematische Darstellung der APP Prozessierung, modifiziert nach (Grimm, Rothhaar & Hartmann 2012). Die nicht amyloidogene Prozessierung, oben rechts dargestellt, wird durch die α - (grün) und γ -Sekretase (blau) übernommen. Dabei entsteht zunächst das lösliche sAPP α sowie das membranständige α CTF. Danach werden p3 und AICD gebildet. A β ist innerhalb von APP rot gekennzeichnet. Die amyloidogene Prozessierung ist unten linksgezeigt. Die β -Sekretase schneidet APP wodurch sAPP β und β CTF entsteht. Danach wird durch die γ -Sekretase A β und AICD freigesetzt.

(2.3) Fragestellung der Arbeit

Trotz intensiver Forschung ist für Patienten mit AD bis zum heutigen Tag keine kausale Therapie verfügbar. Die Behandlung beschränkt sich auf eine symptomatische Therapie, in der Acetylcholinesterase-Hemmer (z.B. Donepezil) oder Glutamat-Antagonisten (z.B. Memantin) eingesetzt werden (Anand et al. 2014). A β , welches aus der proteolytischen Prozessierung des APP durch die Sekretasen resultiert, ist Hauptbestandteil der Plaques im Gehirn von AD-Patienten. Es ist bekannt, dass einige Lipide die A β -Produktion reduzieren können (Grimm, Kuchenbecker, Grösgen, et al. 2011; Burg et al. 2013). Die an der APP Prozessierung beteiligten Sekretasen sind Transmembranproteine, die durch ihre Lipidumgebung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Da die Prozessierung des APP direkt von der α -, β - und γ -Sekretase abhängt, war es Ziel dieser Arbeit insbesondere den Einfluss von Lipiden auf die Aktivität der an der APP Proteolyse beteiligten Sekretasen und die Bildung des A β -Peptids zu untersuchen. Dazu wurden zum einen Phospholipide und Plasmalogene (PL), die zu den häufigsten Lipidklassen des menschlichen Gehirns zählen, und zum anderen oxidierte Derivate der Docosahexaensäure (DHA, C22:6) und Lipid-Peroxidationsprodukte verwendet.

Der Gehalt an Phospholipiden und PL ist im Gehirn von AD-Patienten im Vergleich zum gesunden Gehirn verändert. Zudem ist eine Wirkung von Phospholipiden auf die γ -Sekretase und A β , welches aus der amyloidogenen Prozessierung des APP resultiert (Haass, Schlossmacher, et al. 1992), gezeigt worden. Als Ergänzung wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Phospholipiden auf die nicht amyloidogenen Prozessierung untersucht, da dies ein wichtiger Schritt zur Verhinderung der A β -Bildung darstellt. In einem weiteren Schritt wurde der molekulare Wirkmechanismus von PL auf die APP Prozessierung analysiert.

Die Wirkung der ω -3 Fettsäure DHA in der Prävention oder Therapie der AD ist nicht abschließend geklärt (Quinn et al. 2010; Freund-Levi et al. 2006; Chiu et al. 2008). Eine mögliche Ursache für die heterogene Studienlage könnte die Instabilität der ω -3 Fettsäure DHA darstellen, was zu einem erhöhten Gehalt an oxidierten Derivaten führen könnte. Daher wurde in dieser Arbeit schließlich die Wirkung von verschiedenen oxidierten DHA-Derivaten und den Lipid-Peroxidationsprodukten der ω -3 und ω -6 Fettsäuren auf die amyloidogene APP Prozessierung untersucht.

(3) Methoden

(3.1) Methoden der Zellkultur

(3.1.1) Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

- Humane Neuroblastom Zelllinie (SH-SY5Y Wildtyp (wt)) (Biedler et al. 1973)
- Humane Neuroblastom Zelllinie stabil transfiziert mit der APP-Isoform mit 695 Aminosäuren (SH-SY5Y APP) von Heike Grimm (Grimm et al. 2003)

Die SH-SY5Y Zellen wurden direkt nach dem Auftauen in warmem DMEM-Medium (Dublecco's modified eagle's medium, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit 10% fetalem Kälberserum FCS (Fetal Calf Serum, Pan Biotech, Aidenbach) und Aminosäurelösung (MEM 100x, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium für die SH-SY5Y-APP Zellen 300µg/ml Hygromyzin B (Pan Biotech, Aidenbach) zugesetzt.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz bei 5% CO₂ in einem Inkubator (Heracell, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) kultiviert. Danach wurden die Zellen alle 3-4 Tage 1:5 (Wildtyp) und 1:3 (APP-überexprimierend) gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen, nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 1,5ml Trypsin 2min inkubiert. Durch wiederholtes auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und dann auf neue Zellkulturplatten ausgesät. Vor Inkubationen wurden die Zellen entweder 1:3 auf 10cm-Platten/6-Loch Platten oder 1:1 auf 96-Loch-Platten ausgesät. Die Platten wurden mindestens 24h vor Inkubationsbeginn unter Standardbedingungen inkubiert.

(3.1.2) Präparation von primären kortikalen Mausneuronen

Durchgeführt von Inge Tomic.

Embryos von C57Bl6/N wt-Mäusen (E14-18, Charles River, Sulzfeld) wurden entnommen und 15min bei 37°C mit Trypsin behandelt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und in warmem HBSS 5x gewaschen. Danach wurden die Gehirne in 1ml HBSS durch Auf- und Abpipettieren in einer Glaspipette homogenisiert. Die Neurone wurden auf einer 96-Loch

Platte (Thermo Scientific, Karlsruhe), die mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) beschichtet wurde ausgesät und 7 Tage kultiviert.

(3.1.3) Inkubation mit Phospholipiden

Die Phospholipide wurden mit, im Ultraschallbad für 15min, entgastem Ethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gelöst, in dunkle Glasflaschen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Konzentration dieser Lösungen war für Phosphatidylcholin (PC) 25mM, für Phosphatidyserin (PS) 0,5 μ M und für Phosphatidylethanolamin (PE) 2,5mM.

Bei Konfluenz wurden die SH-SY5Y Zellen in DMEM mit 0,1% FCS für 4h inkubiert. Dann wurden die Zellen für 8h und anschließend für 16h mit 10 μ M des jeweiligen Phospholipids (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) in DMEM mit 0,1% FCS oder dem Lösemittel als Kontrolle inkubiert.

(3.1.4) Inkubation mit PL

Durchgeführt von Tatjana Rothhaar.

Die verwendeten PL (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) und korrespondierenden Ester-Phospholipide wurden in entgastem Ethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Konzentration von 50mM angesetzt, in dunkle Glasflaschen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die konfluenten Zellen wurden unter reduziertem FCS-Gehalt (0,1%) im Kulturmedium für 12h inkubiert. Dann wurden die Zellen für 2x 12h mit 100 μ M des jeweiligen PL oder dem korrespondierenden Ester-Phospholipid als Kontrolle inkubiert.

(3.1.5) Inkubation mit oxidierten Lipiden, Lipid-Peroxidationsprodukten oder DHA

Die verwendeten oxidierten Lipide (Caymen Chemicals, Biomol, Hamburg) und Lipid-Peroxidationsprodukte (Merck, Darmstadt) wurden in entgastem Ethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Konzentration von 250 μ M gelöst. DHA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in einer Konzentration von 50mM gelöst. Die Lipide wurden in dunklen Glasflaschen (Wheaton, Millville, New Jearsey, USA) aliquotiert und mit Stickstoff überschichtet. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden bei Konfluenz in DMEM mit

0,1% FCS für 16h inkubiert. Dann wurden die Zellen für 24h unter Verwendung von 0,1% w/v BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit 2 μ M oxidierten Lipiden, Lipidperoxidationsprodukten, 20 μ M DHA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder dem Lösemittel als Kontrolle inkubiert. Nach 8h erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Inkubation auf 6-Lochplatten wurden 2ml Medium pro Ansatz auf die Zellen gegeben, für die Inkubation auf 96-Lochplatten 50 μ l Medium.

(3.1.6) Bestimmung der Zytotoxizität

Für Publikation 2 wurde die Messung von Tatjana Rothhaar, für Publikation 3 in Kooperation mit Janine Mett durchgeführt.

Die Zytotoxizität wurde mittels Lactatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay, Roche, Grenzach-Wyhlen) bestimmt. Dazu wurde unmittelbar nach Inkubationsende das Medium von den Zellen abgenommen und 5min bei 1.000rpm zentrifugiert. Dann wurden jeweils 100 μ l pro Probe auf eine 96-Loch Platte gegeben. Im Anschluss wurden die *Catalyst* und *Dyesolution* im Verhältnis 1:45 vermischt und mit einer Multipipette (*Multipette Plus*, Eppendorf, Hamburg) auf die Proben gegeben. Die Proben wurden dann 30min bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schütteln inkubiert und im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l *Stopsolution* beendet. Die OD wurde durch Messung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 490nm bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen einer Platte mit 0,1% Triton-X-100 lysiert um eine Positivkontrolle mit maximaler LDH-Konzentration zu erhalten. Diese wurde linear verdünnt und als Standardreihe im Assay verwendet. Die Zytotoxizität der Inkubation wurde dann über die Geradengleichung ermittelt.

(3.2) Proteinanalytik

(3.2.1) Bestimmung der Proteinkonzentration

Für Publikation 2 durchgeführt von Tatjana Rothhaar.

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mittels Bicinchoninsäure -Assay nach Smith *et al.* (Smith *et al.* 1985) durchgeführt. Dabei wurde ein Protein-Standard (Bovines-Serum-Albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) von 0-1,1mg/ml verwendet. Jede der Proben wurde dreifach auf eine transparente 96-Loch Platte pipettiert und mit 200µl einer Arbeitslösung aus Bicinchoninsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 4% w/v Kupfersulfat im Verhältnis 39:1 versetzt. Nach Inkubation der Platte bei 37°C für 15min wurde diese für weitere 15min bei Raumtemperatur (RT) bei 300rpm auf einem Plattenschüttler inkubiert. Die optische Dichte der Proben wurden dann bei 560nm in einem Photometer (Multiskan EX Thermo Scientific) gemessen und die Standardreihe als Referenz zur Berechnung des Proteingehalts mittels der Geradengleichung verwendet.

(3.2.2) Herstellung von Zell-/ Gewebe- Homogenaten

Für Publikation 2 durchgeführt von Tatjana Rothhaar.

Die SH-SY5Y Zellen wurden 3x mit kaltem PBS gewaschen und in Saccharosepuffer (200mM Saccharose, 10mM Tris/HCL, pH 7,5) abgeschabt. Danach wurden die Zellen mittels Minilyse durch Keramikkügelchen (Peqlab, Erlangen) bei höchster Intensität 30s lang aufgeschlossen (Publikation 3) oder mit einem Potter (Publikation 1+2) bei maximaler Drehzahl mit 25 Stößen homogenisiert. Die erhaltenen Homogenate wurden nach der Proteinbestimmung mittels BCA-Tests auf 1mg/ml Gesamtproteingehalt eingestellt bevor sie zur *post*-nukleären Fraktionierung verwendet wurden. Für Publikation 3 wurden die humanen *post-mortem* Gehirne analog aufgeschlossen. Für Publikation 1 und 2 wurden die Mausgehirne/Proben von humanen Gehirnen in 4°C kaltem Saccharosepuffer aufgenommen und durch Verwendung eines Potters bei maximaler Drehzahl mit 25 Stößen (Publikation 1) bei 1.500rpm Geschwindigkeit mit 50 Stößen (Publikation 2) aufgeschlossen. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte wie oben für die SH-SY5Y Zellen beschrieben. Es wurden für Publikation 1 nur *post-mortem* Gehirne von Personen ohne Alzheimer Pathologie, wie in nachfolgender Tabelle 4 aufgeführt, verwendet. Die Gehirne wurden von *Brain Bank* (München) bezogen.

Tabelle 4 Humane *post-mortem* Gehirne

NP	-	
Diagnosis	Alter bei Tod	PM Zeit
Kontrolle	71	48
Kontrolle	79	20
Kontrolle	51	45
Kontrolle	62	48
Kontrolle	64	15
Kontrolle	69	14
Kontrolle	54	35
Kontrolle	54	39
Kontrolle	69	30

Für Publikation 2 wurden die in *Table 1* der Publikation genannten *post-mortem* Gehirne verwendet. Dabei handelt es sich um 58 Gehirne von BrainNet (München). Darunter befanden sich 21 Gehirnen von Personen, die nicht an AD erkrankt waren und 37 Gehirne von Personen mit AD. Für Publikation 3 wurden die humanen *post-mortem* Gehirne wie in der *Supplemental Table 1* der Publikation gezeigt verwendet. Die Gehirne wurden von der *Netherlands Brain Bank* (Amsterdam) bezogen.

(3.2.3) Herstellung von Zellysaten

Für Publikation 2 durchgeführt von Tatjana Rothhaar.

Die Zellen wurden 3x mit kaltem PBS gewaschen und mit 400µl Lysepuffer (150mM NaCl, 50mM Tris/HCl, pH7,4, 2mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,1% Triton X-100, Complete (Roche, Grenzach-Wyhlen) versetzt. Nach einer 15min Inkubation des Lysepuffers auf der Schale wurde das Lysat mit einem Gummischaber von der Schale gelöst und in ein Reagiergefäß überführt. Nach weiteren 30min auf Eis wurden die Proben mit 15.682g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelösten Proteine und wurde in ein neues Gefäß überführt. Der Proteingehalt wurde mittels BCA, wie unter 3.2.1 beschrieben, bestimmt und die Proben wurden auf den gleichen Proteingehalt mit Lysepuffer normiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

(3.2.4) Aufarbeitung humaner *post-mortem* Gehirnproben

Durchgeführt in Kooperation mit Nadine Mylonas.

Die Gehirnproben, die für Publikation 3 verwendet wurden, wurden von der *Netherlands brain bank* in Amsterdam bezogen. Die humanen Gehirnproben wurden entsprechend ihres Gewichts in vollentsalztem Wasser durch Minilyse für 30s bei maximaler Intensität mit Keramik-Precellys homogenisiert. Der Proteingehalt wurde durch BCA-Test bestimmt und die Homogenate auf einen Gesamtproteingehalt von 10mg/ml eingestellt. Die verwendeten humanen Gehirne sind in *Supplemental table 1* der Publikation 3 aufgelistet.

(3.2.5) Post-nukleäre Fraktionierung und Isolation von Membranen

Für Publikation 2 durchgeführt von Tatjana Rothhaar.

Zur *post*-nukleären Fraktionierung wurden die Homogenate zunächst auf einen Gesamtproteingehalt von 2mg/ml (β -, γ -Sekretasemessung) oder 1mg/ml (α -Sekretasemessung) eingestellt. Dann wurden die Homogenate bei 900g und 4°C für 10min zentrifugiert. Die resultierenden *post*-nukleären Fraktionen wurden weiterhin bei 135.520g und 4°C für 75min in einer Ultrazentrifuge (Optima, Beckman-Coulter, Krefeld) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde für die Messung der β - und γ -Sekretaseaktivität in Saccharosepuffer (200mM Saccharose, 10mM Tris/HCL, pH 7,5, 1mM EDTA) aufgenommen. Zur Messung der α -Sekretaseaktivität wurde das Pellet mit Saccharosepuffer (200mM Saccharose, 10mM Tris/HCL, pH 7,5; Publikation 1) oder HEPES-Puffer (Publikation 2) unter Zugabe der folgenden Inhibitoren (Complete (Roche), 1 μ M β -Sekretase-Inhibitor (Merck, Darmstadt), 1,46 μ M Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen); 5 μ M CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂) aufgenommen. Die isolierten Membranen wurden unter Verwendung von Kanülen mit kleiner werdendem Durchmesser (23,27G; BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA; U-100 Insulinspritze, Teruno, Somerset, New Jersey, USA) solubilisiert (Publikation 1+2) oder durch Minilyse (Minilys Peqlab, Erlangen) mit mittlerer Intensität für 10s unter Verwendung von Glaskügelchen (Peqlab, Erlangen; Publikation 3).

(3.2.6) *In vitro* Inkubationen

Für Publikation 2 wurden die Inkubationen in Kooperation mit Tatjana Rothhaar durchgeführt.

Die *post*-nukleären Fraktionen von SH-SY5Y Zellen und Mausgehirnen wurden zunächst 10min bei 37°C im Wasserbad erwärmt mit 100µM Plasmalogen, 25µM Phospholipid oder 2µM oxidiertem Lipid inkubiert. Die isolierten Membranen aus humanen *post-mortem* Gehirnen wurden nach dem Erwärmen mit 50µM Phospholipid bzw. 100µM Plasmalogen inkubiert.

Die Inkubation wurde für 15 min bei 37°C unter leichtem Schütteln in 1ml Glasflaschen (Wheaton, Millville, New Jearsey, USA) ausgeführt. Die PNFs wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und dann für die Bestimmung der α -, β - und γ -Sekretase Aktivität verwendet.

Zur Bestimmung der ADAM-10 Aktivität wurde 25µM Phospholipid oder Ethanol als Kontrolle mit 100ng ADAM-10 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) und Lipidextrakt aus humanen Gehirnen (5µg pro 100µl) Saccharosepuffer für 1h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 15min im Eiswasserbad sonifiziert.

(3.2.7) Bestimmung der β - und γ -Sekretase Aktivität nach *in vitro* Inkubation

Für Publikation 2 wurden die Messungen von Tatjana Rothhaar durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden 100µl der isolierten Plasmamembranen als Dreifachbestimmung auf eine schwarze 96-Loch Platte gegeben. Dies entsprach für die Messung aus SH-SY5Y Zellen 125µg (β -Sekretase Messung) und 250µg (γ -Sekretase Messung) Gesamtprotein. Für die Messung aus humanen und murinen Gehirnen wurden 250µg (β -Sekretase Messung) bzw. 500µg (γ -Sekretase Messung) an Gesamtprotein verwendet. Die Aktivität wurde nach Zugabe von 20µM β -Sekretase Substrat oder 10µM γ -Sekretase Substrat gemessen. Die Spezifität der Messung wurde durch Zugabe von spezifischen Inhibitoren für die β - und γ -Sekretase bestimmt. Nach der Messung wurde das unspezifische Fluoreszenzsignal von den Werten subtrahiert.

Die Fluoreszenz wurde 8000s lang bei einer Exzitation von 345 ± 5 nm, sowie einer Emission von $500 \pm 2,5$ nm für die β -Sekretaseaktivität und 6000s lang bei einer Exzitation von 355 ± 10 nm, sowie einer Emission von 440 ± 10 nm für die γ -Sekretaseaktivität für 8000s bei 37 °C bestimmt.

(3.2.8) Bestimmung der Sekretase Aktivität auf lebenden Zellen

Für Publikation 2 wurden die Messungen von Tatjana Rothhaar durchgeführt.

Nach der Inkubation mit Phospholipiden wurden die Zellen 1x mit Cell-Imaging-Solution (140mM NaCl, 5mM KCl, 8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, pH 7.4) gewaschen. Anschließend wurde 50µl Cell-Imaging-Solution mit 10µM Phospholipid und 10µM α-Sekretase Substrat auf die Zellen gegeben. Die α-Sekretase Aktivität wurde kontinuierlich für 10.000s in einem Fluorometer (Safire2 Fluorometer Tecan, Crailsheim, Germany) gemessen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Exzitation von 340 ± 10 nm, sowie einer Emission von 490 ± 10 nm mit einer Verstärkung von 150 bei 37 °C bestimmt.

Zur Bestimmung der β- und γ-Sekretaseaktivität wurde Cell-Imaging-Solution mit 30µM β- und 24µM γ-Sekretase Substrat versetzt und pro Loch 50µl auf die 96-Loch Platte pipettiert. Die Spezifität der Messung wurde durch Verwendung spezifischer Inhibitoren (Calbiochem, Darmstadt) ermittelt und nach der Messung subtrahiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Exzitation von 345 ± 5nm, sowie einer Emission von 500 ± 2,5nm für die β-Sekretaseaktivität und einer Exzitation von 355 ± 10nm, sowie einer Emission von 440 ± 10nm für die γ-Sekretaseaktivität bei 37 °C bestimmt.

(3.2.9) Bestimmung der α-Sekretase- und ADAM-10 Aktivität nach *in vitro* Inkubation

Die Messungen der ADAM-10 Aktivität wurde von Tatjana Rothhaar durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden 100µl der isolierten Plasmamembranen der SH-SY5Y Zellen und humanen *post-mortem* Gehirnen entsprechend 100µg an Gesamtprotein oder für Mausgehirne entsprechend 50µg an Gesamtprotein als Dreifachbestimmung auf eine schwarze 96-Loch Platte (Corning, New York, USA) gegeben. Die Aktivität wurde nach Zugabe von 4µM α-Sekretase Substrat (Merck, Darmstadt) gemessen. Die Fluoreszenz wurde wie oben beschrieben in einem Fluorometer (Safire2 Fluorometer Tecan, Crailsheim) für 10.000s nach Inkubation mit Phospholipiden auf lebenden Zellen und SH-SY5Y Zellhomogenaten, 15.000s für Inkubation mit PLn auf Mausgehirnen gemessen. Zur Bestimmung der Spezifität wurde ein EDTA-EGTA Gemisch, jeweils 5mM, eingesetzt.

Die Messung der ADAM-10 Aktivität wurde nach Zugabe von 4µM α-Sekretase Substrat (Merck, Darmstadt) in einem Fluorometer (Infinite M1000 Pro Fluorometer, Tecan,

Crailsheim) bestimmt, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich über 15.000s bei einer Verstärkung von 115 gemessen wurde.

(3.2.10) Bestimmung des A β , sAPP β und sAPP α Gehalts

Die Bestimmung des A β -Gehalts wurde nach Ida *et al.* (Ida et al. 1996), die Bestimmung des sAPP α Gehalts nach Grimm *et al.* (Grimm, Rothhaar, Grösgen, et al. 2012) durchgeführt. Das konditionierte Medium wurde für 5min mit 13.000rpm bei 4°C zentrifugiert um tote Zellen und Zellpartikel zu entfernen. Für die Bestimmung des A β -Gehalts wurden dem Medium 10 μ g W02-Antikörper und 20 μ l Protein-G-Sepharose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt und die Ansätze bei 4°C für 16-18h auf einem Über-Kopf-Taumler (Reax2, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Die Proben wurden dann bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge (5415D, Eppendorf, Hamburg) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde dann nacheinander 3x mit IP-Waschpuffer A, B und C (siehe Tabelle 6) gewaschen. Während der Waschschrte wurden die Proben 10x invertiert und dann wie oben beschrieben zentrifugiert.

Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet mit 15 μ l 3x Protein-Proben-Puffer (187,5mM Tris/HCl, 6% v/v SDS , 30% v/v Glycerol , 15% β -Mercaptoethanol , 0,03% w/v Bromphenolblau) versetzt und 5min bei 98°C erhitzt.

Tabelle 5 IP-Waschpuffer

	Puffer A	Puffer B	Puffer C
Tris/HCl	10mM	10mM	10mM
NaCl	250mM	500mM	-
EDTA	2mM	2mM	-
Triton X-100	0,1% (v/v)	0,1%	-
NP-40	0,1% (v/v)	0,1%	-

Anschließend wurde der Überstand auf ein 10-20% Gradientengel (Tris-Tricin Gel, Anamed, Bad Ems) geladen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben wurden danach auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman/GE Healthcare, Freiburg) für 1h (A β) und 3h (sAPP α / β) bei 380mA in einer Kammer (Biorad, München) transferiert (Transferpuffer: 250 mM Trizma Base; 1,57 M Glycin, 20% Methanol, 0,025% SDS).

Die Membran wurde für die sAPP α - und A β -Messung 5min in der Mikrowelle (Micromat, AEG, Frankfurt am Main) in 1xPBS gekocht. Die unspezifischen Antikörperbindestellen wurden durch Inkubation mit 1xPBS mit 10% w/v Magermilchpulver für 1h geblockt. Die Inkubation mit W02 Antikörper erfolgte für 1,5h in 1x PBS mit 2% w/v Magermilchpulver, gefolgt von einer Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus (Dako, Hamburg) für 1h im gleichen Puffer. Die Inkubation mit sAPP β -Antikörper (my biosource, San Diego, Kalifornien, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:400 in 1xPBS mit 5% Milch durchgeführt, gefolgt von einer 1h Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen (Promega, Madison, Wisconsin).

Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils 3x mit 1xPBS für 10min gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit der *Enhanced chemilumineszenz* Methode (ECL, Western Lightning PLUS ECL, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Dabei wurde die ECL-Lösung 1 im Verhältnis 1:1 mit ECL-Lösung 2 verdünnt und auf der Membran 1min inkubiert. Dann wurde die Membran zwischen 2 Klarsichtfolien gelegt und die entstehende Chemolumineszenz im Dunkeln durch einen Photofilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Freiburg) detektiert.

(3.2.11) Bestimmung des ADAM-17, BACE-1 und PS-1 Gehalts

Für Publikation 2 wurden die Messungen von Verena Burg durchgeführt.

Nach Inkubation mit PL wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurde die Membran 1h mit 10% w/v Magermilchpulver bei RT inkubiert und 1,5h mit spezifischen ADAM-17 (ab39162, abcam, Cambridge, UK), BACE-1 (B0806, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder PS1- (sc-7860, Santa Cruz, Heidelberg) Antikörper in den Verdünnungen 1:5000, 1:1000 und 1:500 inkubiert. Nach der Inkubation mit Sekundärantikörper anti-Kaninchen (W401B, Promega, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 wurde die Membran mittels der ECL Methode wie unter 3.2.10 beschrieben entwickelt.

(3.3.) Lipidanalytik

(3.3.1) Extraktion von Lipiden aus humanen *post-mortem* Gehirnen

Durchgeführt von Sven Grösgen und Benjamin Hundsdörfer.

Die Lipidextraktion wurde mit leichten Modifikationen nach Bligh und Dyer durchgeführt (Bligh & Dyer 1959). Die Gehirnproben wurden mit 3,75 mL CHCl_3 :MeOH:HCl (37%; Sigma-Aldrich Taufkirchen) (1:2:0.06; v/v/v) versetzt und 1 h bei RT durch einem Vortexer (Bender-Hohbein, Bruchsal) geschüttelt. Dann wurden 1,25 mL CHCl_3 hinzugegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Schließlich wurden 1,25 mL CHCl_3 und 1,25 mL H_2O hinzugefügt und die Proben weitere 10min geschüttelt bevor sie mit 5.000rpm 10 min zentrifugiert wurden. Die Phasentrennung ergibt eine obere, eine dünne mittlere und eine untere Phase. Die untere Phase enthält Lipide und wurde unter kontinuierlichem Stickstofffluss evaporiert. Die Lipide wurden in 1ml H_2O resuspendiert und wieder bei 30°C evaporiert. Abschließend wurden die Lipide in Ethanol gelöst. Zur Herstellung eines Gesamtlipidextraktes aus humanen *post-mortem* Gehirnen wurden alle Proben vereinigt und auf eine Konzentration von 5 mM eingestellt.

(3.3.2) Messung der DHA-Stabilität

DMEM wurde mit 20 μM PC-DHA/DHA versetzt und 16h unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Die Proben wurden zum Startzeitpunkt und nach 16h entnommen und in einem Gemisch aus Methanol und 5mM Ammoniumacetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben wie unter 3.3.3 beschrieben mittels Massenspektrometrie vermessen.

(3.3.3) Bestimmung des Lipidgehalts durch Massenspektrometrie

Für Publikation 1 und 2 wurde die Analytik von Sven Grösgen, für Publikation 3 von Christoph Stahlmann durchgeführt.

Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 2mg/ml (Publikation 1) bzw. 6mg/ml (Publikation 2) eingestellt.

Zur Bestimmung der Phospholipide wurde das Massenspektrometer 4000 QTRAP (ABSciex) mit Turbo Spray Ion Source (AB SCIEX) verwendet. Der Phospholipidgehalt wurde mit dem AbsoluteIDQ™ p150 (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria) bestimmt. Dazu wurden 20 μl (Publikation 1) bzw. 10 μl (Publikation 2) der Proben auf eine Membran

(Whatman-GE Healthcare, Freiburg) in einer 96-Loch Sterilfilterplatte (0,45µM; Milipore, Schwalbach) gegeben. Die Proben wurden unter Stickstofffluss (1-2 bar; 30 min; RT) evaporiert. Dann wurden 20µl 5%iges Phenylisothiocyanat (v/v) (Verdünnung in Ethanol/Wasser/Pyridin (1/1/1; v/v/v) jedem Loch zugegeben und die Platte für 20min bei RT inkubiert und anschließend unter Stickstofffluss evaporiert (1-2 bar; 30 min; RT). Die Proben wurden unter Zugabe von 300 µl 5 mM Ammoniumacetat in Methanol extrahiert und 30min bei RT und 450 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 500g für 2 min durch die Sterilfilterplatte in eine 96-Loch Sammelplatte zentrifugiert. Die Proben wurden dann mit 600µl Laufpuffer A (161,5mM Ammoniumacetat in Wasser/Methanol, 3/297, v/v) verdünnt und die Platte 2min bei RT und 450 rpm geschüttelt. Die Sammelplatte wurde mit einer durchstechbaren Silikonmatte verschlossen und in den vorgekühlten Autosampler (10°C) gestellt und die Messung gestartet. Die Proben wurden mit einem Gradienten aus Laufpuffer A in das 4000 QTRAP Massenspektrometer injiziert (Phase1: 0min – 1,6min, 30µl/min Laufpuffer A; Phase 2: 1,6min – 2,4min, 30µl/min Laufpuffer A; Phase 3: 2,4min – 2,8min, 200µl/min Laufpuffer A; Phase 4: 2,8min – 3min, 200µl/min Laufpuffer A). Die Detektion in Triplicaten (20µl Injektionsvolumen) wurde mittels Analyst 1.4.2 software (AB SCIEX, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Folgende Parameter wurden für die massenspektroskopische Untersuchung angewendet: Curtain gas (CUR) 20.0, collision gas (CAD) medium, ion spray voltage (IS) 5500.0, Temperatur (TEM) 200.0, ion source gas 1 (GS1) 40, ion source gas 2 (GS2) 50, interface heater (ihe) on, Entrance potential (EP) 10, Cell exit Potential (CXP) 15

(3.3.4) Bestimmung des Phospholipidgehalts mittels Dünnschichtchromatographie

Durchgeführt von Benjamin Hundsdörfer.

Eine Dünnschichtchromatographie-Kieselgelplatte (Merck, Darmstadt) wurde mit 1mM EDTA in Wasser imprägniert und bei 100°C getrocknet. Die Platte wurde dann mit dem Laufmittel A (Chloroform / Methanol / HPLC-Wasser im Verhältnis 60:40:10) gewaschen und bei 100°C über Nacht getrocknet. Dann wurden 100µl der Lipidextrakte von SH-SY5Y Zellen und humanen *post-mortem* Gehirnen langsam auf die Kieselgelplatte gegeben und nacheinander mit Laufmitteln wie folgt aufgetrennt: Die Auftrennung mit Laufmittel B (Chloroform / Methanol / HPLC-Wasser (65:40:5)) erfolgte bis 5cm; die Auftrennung mit Laufmittel C (Ethyl-acetat / 2-Propanol / Ethanol / Chloroform / Methanol / 0,25 % KCl in

HPLC-Wasser (35:5:20:22:15:9)) bis 10cm; mit Laufmittel D (Toluol / Diethylether / Ethanol (60:40:3)) bis 12,5 cm und mit Laufmittel E (n-Heptan / Diethylether (94 : 8) bis 15cm. Zuletzt wurden die Proben mit Laufmittel F (n-Heptan) bis 0,5cm unter den oberen Rand aufgetrennt. Zwischen den einzelnen Läufen wurde die Platte jeweils unter Heißluft getrocknet. Die Lipide wurden dann durch Inkubation der Platte mit einer Kupfersulfatlösung (10 % CuSO₄ / 8% P₂SO₄) bei 200°C für 1-10min gefärbt.

(3.3.5) Bestimmung des HNE-Gehalts

Der Gehalt an HNE wurde mittels enzymgekoppeltem Immunbindungsstest (*Human 4-Hydroxynonenal ELISA Kit Artikelnummer CSB-E16214h, Cusabio, Hubei Province, China*) entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Die humanen Gehirnproben von Patienten mit AD bzw. von den Kontrollpatienten wurden vereinigt und auf 790µg Gesamtprotein eingestellt. Die Proben wurden bei 5.000g für 5 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reagiergefäß überführt. Ein Volumen von 100µl der Proben wurde für die Messung verwendet, die gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt wurde. Die Messung erfolgte bei 450nm, wobei eine Wellenlängenkorrektur durch zusätzliche Messung bei 560nm vorgenommen wurde.

(3.3.6) Bestimmung der Lipidperoxidation

Die humanen Gehirnproben von Patienten mit AD bzw. von Kontrollpatienten wurden vereinigt und auf einen Gehalt von 2mg Gesamtprotein eingestellt. Die Bestimmung der Lipidperoxidation wurde gemäß der Herstellerangaben (*Lipid Peroxidation MDA Assay kit Colorimetric, Fluorometric, Artikelnummer ab118970, Protokoll Version 7, abcam, Cambridge, UK*) kolorimetrisch durchgeführt. Demnach wurden die Homogenate im Lysepuffer (Lysis Solution) für 20s bei maximaler Intensität lysiert. Nach anschließender Zentrifugation der Proben wurde der Überstand mit TBA-Reagenz (*engl. Thiobarbituric Acid, Thiobarbitursäure*) versetzt und für 60min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden für 10min auf Eis gestellt und anschließend die optische Dichte der Proben in einer 96-Loch Platte bei 532nm gemessen.

(3.4) RNS-Analytik

Für Publikation 2 wurde die Analytik von Sven Grösgen, für Publikation 3 von Janine Mett durchgeführt.

(3.4.1) Isolation von RNS

Die Echtzeitpolymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde zur Bestimmung der mRNA Spiegel in den Proben herangezogen. Die RNS aus Zellen wurde mittels 1ml Trizol pro 10cm Schale (Thermo Fisher, Walham Massachusetts, USA) isoliert. Nach einer Inkubation von 5min bei RT wurden die Proben mit 200µl Chlorophorm versetzt und 15s lang gevortext. Anschließend wurden die Proben 3min lang inkubiert (RT) und danach bei 12.000rpm für 15min zentrifugiert. Die obere Phase, welche die RNS enthielt, wurde abgenommen, mit 500µl Isopropanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C.

Das resultierende RNS Pellet wurde mit 75% v/v Ethanol gewaschen und im Anschluss bei 7.500 rpm zunächst für 5min zentrifugiert dann bei RT getrocknet.

Die RNS wurde in 100µl RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10min bei 55°C im Wasserbad bei 55°C in Lösung gebracht.

Die RNS wurde auf eine Konzentration von 40µg/ml nach Messung der Proben bei 260nm eingestellt.

(3.4.1) cDNS-Synthese und Echtzeitpolymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Synthese der cDNS aus den Proben wurde mittels High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Zur Messung der mRNA Spiegel mittels RT-PCR wurde SYBR-Green (Thermo Fisher, Walham Massachusetts, USA) in einem 7500 Fast Real Time PCR System Gerät (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) für Publikation 2 oder einem PikoReal-Gerät (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, PikoReal Software Version 2.1.158.545) für Publikation 3 verwendet. 5µl der cDNS Proben wurden mit jeweils 0,5µl Primer forward und 0,5µl Primer reverse, sowie 4µl Nuklease-freiem Wasser und 10µl SYBR Green Master Mix in einer 96-Lochplatte (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) pipettiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak & Schmittgen 2001) unter Normierung auf die Expression des β -Actin. Die Sequenzen der Primer, welche in

Publikation 2 verwendetet wurden, sind in Kapitel 4.2 in der entsprechenden Publikation unter Abschnitt 2.10 aufgeführt.

Für Publikation 3 wurden die folgenden Primer verwendet:

APH1a: 5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3' and 5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3';

APH1b: 5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3' and 5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3';

BACE-1: 5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3' and 5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3';

NCSTN: 5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3' and 5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3';

PS1: 5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3' and 5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3';

PS2: 5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3' and 5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3';

PEN2: 5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3' and 5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3';

β - Actin: 5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3' and 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'.

Die Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

(3.5) Statistische Auswertung

Die Auswertung mittels ANOVA wurde für Publikation 1 in Kooperation mit Valerie Zimmer und Johannes Lehmann, für Publikation 3 in Kooperation mit Nadine Mylonas durchgeführt.

Alle quantifizierten Daten basieren auf dem Mittelwert von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert. Die statistische Signifikanz wurde durch Varianzanalyse mit *post-hoc*-Test oder zweiseitigen, ungepaartem *student-t-test* bestimmt. Das Signifikanzniveau beträgt bei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Alle beteiligten Personen waren zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung Angestellte oder Studenten der Universität des Saarlandes.

(4) Publikationen

Die Daten der Publikationen 1-3 sind in Zusammenarbeit mit den Mitautoren entstanden. Der Eigenanteil an den Publikationen ist unter den Abschnitten 4.1, 4.2 und 4.3 zusammengefasst und kann auch den Kooperationstabellen 1-3 (siehe Seite 1-4) entnommen werden, in denen für alle Abbildungen und Tabellen die durchführenden Personen genannt werden. Die Publikationen 1 und 3 sind in geteilter Erstautorenschaft mit Marcus O.W. Grimm entstanden.

(4.1) Zusammenfassung von Publikation 1 und Beschreibung des Eigenanteils

Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease

Hauptenthal VJ, Grimm MO*, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grösgen S, Hundsdörfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T*

** equally contributed*

In Publikation 1 wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die Aktivität der α -Sekretase im nicht amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung analysiert. Phospholipide können sich einerseits in der Struktur der gebundenen Fettsäuren, andererseits in der Kopfgruppe unterscheiden. Um den direkten Einfluss der Phospholipide auf die α -Sekretase Aktivität zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Phosphatidylcholin (PC) - Spezies verwendet, die sich in der Länge und dem Sättigungsgrad der gebundenen Fettsäuren, sowie der Position der Doppelbindung in der Fettsäurekette unterschieden. Zusätzlich wurden Phospholipide mit identischen Fettsäuren aber unterschiedlichen Kopfgruppen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aktivität der α -Sekretase analysiert. Da PC eine der Hauptspezies der Phospholipide im humanen Gehirn darstellt (Söderberg et al. 1991), wurde in dieser Arbeit zunächst die Wirkung von unterschiedlich langen Fettsäuren gebunden an PC auf die α -Sekretase Aktivität analysiert. Dazu wurden Phospholipide verwendet, die sowohl an der *sn1*- als auch der *sn2*-Position des Glycerin die gleiche Fettsäure gebunden hatten. PC-Spezies mit der Kettenlänge von 10 C-Atomen (PC 10:0) bis hin zu 24 C-Atomen (PC 24:0) wurden mit isolierten Membranen von SH-SY5Y Zellen und auf lebenden SH-SY5Y Zellen inkubiert. In Analogie zu diesem Ansatz wurde PC gebunden an die ungesättigten Fettsäuren 18:1, 18:2, 18:3, 20:4, 20:5 und 22:6 betrachtet. Um die Wirkung der Position der Doppelbindung auf die α -Sekretase Aktivität zu messen, wurde PC 18:1 mit einer Doppelbindung an Position 6 (D6) im Vergleich zu PC18:1 mit der Doppelbindung an Position 9 (D9) der Fettsäuren verwendet.

Der Einfluss der Kopfgruppen auf die Aktivität der α -Sekretase wurde durch Verwendung von Phosphatidylethanolamin (PE) und -serin (PS) gebunden an 12:0 und 14:0 im Vergleich zu PC untersucht. Die Aufnahme der Lipide in die Zellen wurde exemplarisch für PC12:0 und PC18:0 mittels Massenspektrometrie kontrolliert. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Phospholipide untereinander zu erzielen, wurde PC18:0, außer bei der Kopfgruppenanalyse, für alle Versuche als Kontrolle verwendet, da es im Vergleich zur Lösemittelkontrolle keine Veränderung der α -Sekretase Aktivität verursachte. Die Spezifität der α -Sekretase Messung wurde durch Verwendung verschiedener Inhibitoren kontrolliert.

Die Versuche ergaben eine Steigerung der α -Sekretase Aktivität durch die kurzkettigen, gesättigten Phospholipide PC10:0 & PC12:0. PC14:0 steigerte die Aktivität der α -Sekretase tendenziell, jedoch nicht signifikant. Hingegen bewirkten die langkettigen, gesättigten Phospholipide PC16:0 – 24:0 keine Veränderung der α -Sekretase Aktivität.

Langkettige, ungesättigte Phospholipide verursachten ebenfalls einen Anstieg der α -Sekretase Aktivität. Bemerkenswert ist, dass der signifikante Effekt erst durch Phospholipide, die mindestens 4 Doppelbindungen (PC 20:4, PC 20:5, PC 22:6) enthielten, auftrat. Phospholipide mit weniger Doppelbindungen steigerten die Aktivität der α -Sekretase nur tendenziell.

In weiteren Analysen wurden keine Veränderungen der Aktivität der α -Sekretase durch die Position der Doppelbindung innerhalb der Phospholipide oder durch Variation der Kopfgruppe festgestellt. Lediglich PS12:0 und PS14:0 zeigten eine Veränderung der Aktivität der α -Sekretase in lebenden SH-SY5Y Zellen bzw. deren isolierten Membranen.

Die steigernde Wirkung von kurzkettigen, gesättigten (PC12:0) und langkettigen, ungesättigten Phospholipiden (PC22:6) auf die α -Sekretase Aktivität konnte exemplarisch auch in isolierten Membranen von humanen *post-mortem* Gehirnen nachgewiesen und auf die α -Sekretase ADAM-10 zurückgeführt werden.

Publikation 1 ist in geteilter Erstautorenschaft entstanden. Ich habe für diese Publikation die Versuche koordiniert und in Zusammenarbeit mit Marcus O.W. Grimm geplant. Die Inkubationen mit Lipiden, die Probenaufarbeitung und die nachfolgende Bestimmung der α -Sekretase Aktivität wurde in allen Zellkultur und *in vitro*- Versuchen von mir durchgeführt (*figure 1 a+b, figure 2a-c, figure 3 a+b, figure 4a+b, figure S1, figure S3, figure S4a*). Auch die Ergebnisse der Bestimmung der Spezifität der α -Sekretase Messung und des sAPP α -Gehalts wurden von mir generiert (*figure S4 a+b*). Für die Messung der ADAM-10 Aktivität, die von T. Rothhaar durchgeführt wurde (*figure 1c+3c*), sowie die Messung der Aufnahme

der Lipiden in die Zellen und isolierten Membranen, die von S. Grösgen durchgeführt wurde (*figure S5*), habe ich die Inkubationen der Lipide durchgeführt.

Für die Bestimmung des PC-, PE- und PS-Gehalts mittels Dünnschichtchromatographie, die von B. Hundsdörfer durchgeführt wurde (*figure S2*), und die Bestimmung des Lipidprofils, durchgeführt von S. Grösgen (*table S5*), habe ich die Membranen aus SH-SY5Y Zellen und humanen *post-mortem* Gehirnen isoliert.

Die statistische Auswertung der Daten mittels ANOVA habe ich in Zusammenarbeit mit V. Zimmer und J. Lehmann durchgeführt (*figure 1- 4, table S1-4*).

Nachfolgend ist Publikation 1 zu finden. **Das Original der Publikation ist auf der Internetseite des Verlages MDPI AG (Basel, Schweiz), www.mdpi.com/journal/ijms, unter der Nummer doi:10.3390/ijms14035879 zu finden.**

Int. J. Mol. Sci. **2013**, *14*, 5879–5898; doi:10.3390/ijms14035879

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences

ISSN 1422-0067

www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease

Marcus O. W. Grimm ^{1,2,3,†,*}, Viola J. Hauptenthal ^{1,†}, Tatjana L. Rothhaar ¹,
Valerie C. Zimmer ¹, Sven Grösgen ¹, Benjamin Hundsdörfer ¹, Johannes Lehmann ¹,
Heike S. Grimm ¹ and Tobias Hartmann ^{1,2,3}

¹ Experimental Neurology, Saarland University, Kirrberger Str. 1, 66421 Homburg/Saar, Germany; E-Mails: viola.hauptenthal@uniklinikum-saarland.de (V.J.H.); tatjana.rothhaar@uks.eu (T.L.R.); valerie-zimmer@web.de (V.C.Z.); sven.groesgen@uks.eu (S.G.); benjamin.hundsdoerfer@uks.eu (B.H.); lehmannjohannes87@web.de (J.L.); heike.grimm@gmx.de (H.S.G.); tobias.hartmann@uniklinikum-saarland.de (T.H.)

² Neurodegeneration and Neurobiology, Saarland University, Kirrberger Str. 1, 66421 Homburg/Saar, Germany

³ Deutsches Institut für DemenzPrävention (DIDP), Saarland University, Kirrberger Str. 1, 66421 Homburg/Saar, Germany

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: marcus.grimm@uks.eu; Tel.: +49-6841-1647919; Fax: +49-6841-1647925.

Received: 13 December 2012; in revised form: 19 January 2013 / Accepted: 1 March 2013 / Published: 13 March 2013

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is characterized by extracellular accumulation of amyloid- β peptide (A β), generated by proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase. A β generation is inhibited when the initial ectodomain shedding is caused by α -secretase, cleaving APP within the A β domain. Therefore, an increase in α -secretase activity is an attractive therapeutic target for AD treatment. APP and the APP-cleaving secretases are all transmembrane proteins, thus local membrane lipid composition is proposed to influence APP processing. Although several studies have focused on γ -secretase, the effect of the membrane lipid microenvironment on α -secretase is poorly understood. In the present study, we systematically investigated the effect of fatty acid (FA) acyl chain length (10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0), membrane polar lipid headgroup (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine),

saturation grade and the FA double-bond position on α -secretase activity. We found that α -secretase activity is significantly elevated in the presence of FAs with short chain length and in the presence of polyunsaturated FAs, whereas variations in the phospholipid headgroups, as well as the double-bond position, have little or no effect on α -secretase activity. Overall, our study shows that local lipid membrane composition can influence α -secretase activity and might have beneficial effects for AD.

Keywords: Alzheimer's disease; α -secretase; ADAM10; lipids; phospholipids; chain length; saturation; headgroup

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia among neurodegenerative diseases in the industrialized nations and is characterized by a progressive memory loss and cognitive failure. One of the main pathological hallmarks of AD is the aggregation of a small peptide, called amyloid- β ($A\beta$), as senile plaques in the brains of affected individuals [1,2]. $A\beta$ is generated by sequential proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP), a large type-I transmembrane protein [3]. In the amyloidogenic pathway, APP is first cleaved by the transmembrane aspartic protease β -secretase BACE1 [4,5], generating the *N*-terminus of $A\beta$ followed by a second cleavage at the γ -cleavage site within the transmembrane domain of APP, releasing toxic $A\beta$ peptides [6,7]. The γ -secretase has been identified as a protein complex, consisting of at least four transmembrane proteins, presenilin1 (PS1) or presenilin2 (PS2), nicastrin, anterior pharynx defective 1 (APH1a or APH1b) and presenilin enhancer 2 (PEN2) [8–11]. In an alternative non-amyloidogenic pathway, APP can be processed by α -secretases, cleaving APP within the $A\beta$ domain, resulting in a non-toxic peptide [12]. As the α - and β -secretases are assumed to compete for APP as a substrate, an increase in α -secretase cleavage is discussed to be a therapeutic approach for AD [13]. The α -secretases have been identified as members of the ADAM family (a disintegrin and metalloproteinase) [14–17], type-I transmembrane proteins of the metzincin family, requiring a zinc ion for their proteolytic activity. As APP itself and the secretases involved in APP cleavage are all integral membrane proteins, lipid composition of cellular membranes is discussed as influencing the proteolytic processing of APP [18–21], either by directly affecting secretase activities, or by modulating the dynamics and accessibility of APP to the cleaving proteases [22–24]. Moreover, it has been shown that the flexible transmembrane domain of APP is able to bind cholesterol [25]. Several lipids, including cholesterol, sphingomyeline and gangliosides, have been shown to alter amyloidogenic APP processing [22,26–31]. Furthermore, accumulating evidences suggest that neuronal phospholipid composition is altered in AD [32–34] and a recent study addressed the influence of membrane phospholipids on amyloidogenic processing of APP [35]. However, the effect of different phospholipids on non-amyloidogenic APP processing is poorly investigated. Phospholipids belong to glycerol-based lipids, which are characterized by a glycerol-backbone. The sn-1 and sn-2 position of the glycerol-backbone are esterified to a fatty acid (FA), while the sn-3 position is esterified to a phosphate group, which in turn is esterified to a polar headgroup. Phospholipids can

therefore vary in different attributes, e.g., FA acyl chain length, saturation grade, double-bond position and in the polar lipid headgroup, greatly influencing the physicochemical properties of a specific phospholipid. As phospholipids determine the local microenvironment of transmembrane proteins and influence e.g., membrane fluidity, which is important for lateral movement of transmembrane proteins within the phospholipid bilayer, we systematically investigated the effect of specific phospholipids on α -secretase activity in different *in vitro* systems and in living cells.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of FA Carbon Chain Length on α -Secretase Activity

In order to evaluate whether FA carbon chain length affects non-amyloidogenic processing of APP, we analyzed saturated FA chains of increasing carbon chain length with phosphatidylcholine (PC) as constant headgroup (PC10:0, PC12:0, PC14:0, PC16:0, PC18:0, PC20:0, PC22:0, PC24:0). In a first step, we prepared purified membranes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y containing the membrane protein secretases involved in APP processing, incubated them with the PC phospholipids mentioned above, and measured α -secretase activity directly by *in vitro* processing of a fluorogenic α -secretase substrate. Uptake of the phospholipids was controlled by mass spectrometry (Figure S5).

As PC18:0 revealed no effect on α -secretase activity compared to purified SH-SY5Y membranes incubated with the solvent ethanol (Figure S1), and PC18:0 is one of the major PC species in the membrane (Table S5), PC18:0 represents the control FA throughout our study addressing FA carbon chain length. PC10:0, PC12:0 and PC14:0 increased α -secretase activity in purified membranes of SH-SY5Y wildtype (wt) cells (Figure 1A). However, statistical significance was only obtained for PC12:0 (PC10:0: 127.7% \pm 2.2%, $p = 0.123$; PC12:0: 144.0% \pm 9.3%, $p = 0.002$; PC14:0: 128.0% \pm 11.9%, $p = 0.116$), whereas PC16:0, PC20:0, PC22:0 and PC24:0 showed no effect (Figure 1A, Table S1), thereby indicating that PC10:0, PC12:0 and PC14:0 increase α -secretase activity. Additionally, we evaluated the effect of increasing FA chain length on α -secretase activity in context of living cells. SH-SY5Y wt cells were cultured for 8 + 16 h in the presence of the phospholipids mentioned earlier (final concentration 10 μ M) and α -secretase activity was measured by adding 10 μ M phospholipid and 10 μ M fluorogenic α -secretase substrate to the 96-well cell culture plate. In line with the efficient uptake of the phospholipids in purified membranes, the phospholipids were significantly increased after incubation in living SH-SY5Y cells. Uptake controls were shown for PC12:0 and PC18:0 (Figure S5). As already observed for purified SH-SY5Y wt membranes, PC10:0 and PC12:0 increased α -secretase activity (PC10:0: 124.8% \pm 1.3%; $p < 0.001$; PC12:0: 126.9 \pm 1.3%, $p < 0.001$) and PC16:0, PC20:0, PC22:0 and PC24:0 had no significant effect (Figure 1A, Table S1). However, as a slight difference compared to the results obtained from purified membranes, PC14:0 did not increase α -secretase activity in living cells (Figure 1A, Table S1). The discrepancy of the effect on α -secretase activity obtained for PC14:0 in purified membranes and living cells might be caused by additional factors present in a living system, e.g., altered gene expression or protein stability of α -secretase in the presence of PC14:0. Combining the α -secretase measurements of neuroblastoma SH-SY5Y wt cells, including purified membranes and living cells, revealed significance for PC10:0, PC12:0 and PC14:0 (combined data: PC10:0: 126.0% \pm 1.3%, $p < 0.001$; PC12:0: 129.9% \pm 2.4%,

$p < 0.001$; PC14:0: 114.0 ± 6.7 , $p = 0.001$) (Table S1), indicating that FA acyl chains with short chain length increase non-amyloidogenic processing of APP. Interestingly, for γ -secretase, it has been recently reported that increasing the FA carbon chain length (14, 16, 18 and 20) elevates γ -secretase activity [35], peaking at lengths of 18 and 20 carbons. The diverse effects of FAs with increasing carbon chain length on α - and γ -secretase activity might be caused by the presence of membrane microdomains with defined lipid and protein compositions. Detergent-resistant membrane microdomains, also called lipid rafts [36], containing higher levels of cholesterol and sphingolipids, are implicated in amyloidogenic APP processing [37]. The β -secretase BACE1 and amyloidogenic γ -secretase cleavage have been shown to be associated with lipid rafts [38–40]. Remarkably, lipid rafts also contain higher levels of FAs with 20 and 22 carbons [41]. In contrast to the involvement of lipid rafts in β - and γ -secretase processing of APP, the α -secretase mediated non-amyloidogenic processing is discussed to occur in non-raft regions of the membrane [42–44], which could be a possible explanation why phospholipids with longer FA carbon chains affect γ - but not α -secretase activity.

Figure 1. Effect of FA carbon chain length on α -secretase activity. (A) Purified membranes of SH-SY5Y wildtype (wt) cells and living SH-SY5Y wt cells were exposed to phospholipids containing FAs of increasing carbon chain length. For purified membranes, 25 μ M phospholipid was used; living cells were exposed 8 + 16 h to 10 μ M phospholipid. The α -secretase activity was measured by adding a fluorogenic α -secretase substrate and fluorescence was measured using a Safire² Fluorometer; (B) Purified membranes of human *post mortem* brains were incubated with 50 μ M PC12:0 or PC18:0. The α -secretase activity was determined as described for A; (C) Purified α -secretase ADAM10 was incubated with 25 μ M PC12:0 or PC18:0 in the presence of human brain lipid extract. The α -secretase activity was determined as described for A. (A,B,C) All quantified data represent an average of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean. Asterisks show the statistical significance (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$).

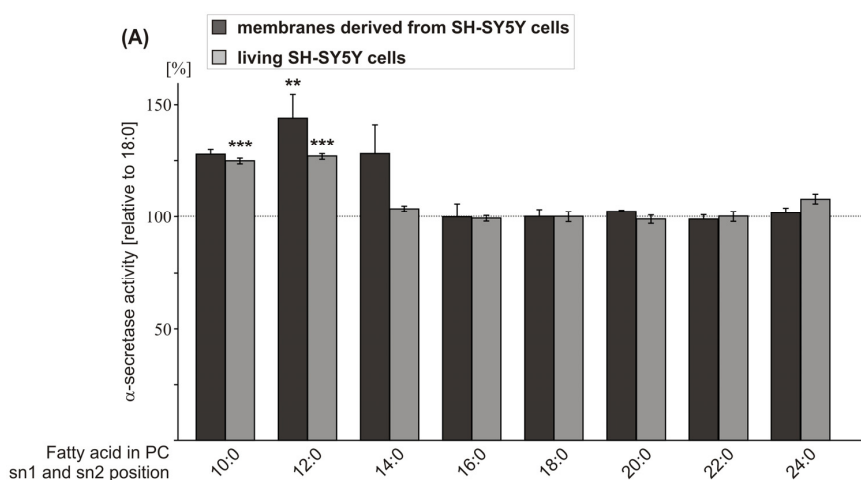
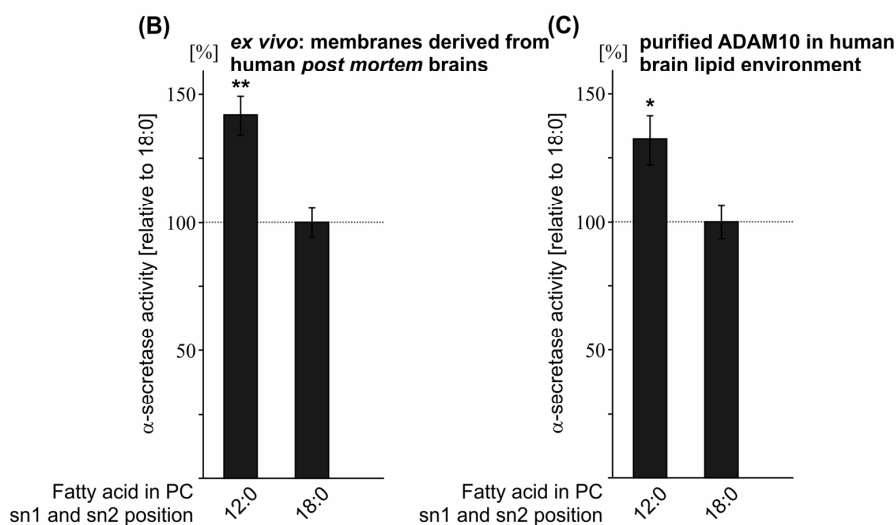


Figure 1. Cont.



As phospholipid PC12:0 showed the strongest effect on α -secretase activity in purified membranes of SH-SY5Y wt cells and in living cells, we analyzed whether PC12:0 also increases non-amyloidogenic APP processing in the lipid environment of human brain. Therefore, purified membranes of nine healthy human *post mortem* brains were prepared and pooled, and α -secretase activity was measured in the presence of PC12:0. Indeed, PC12:0 also significantly elevated α -secretase activity in purified membranes of human *post mortem* brains compared to the control PC18:0 (PC12:0: 141.9% \pm 7.6%, $p = 0.004$) (Figure 1B; Table S1). The increase was nearly identical as observed for purified SH-SY5Y wt membranes (PC12:0: 144.0% \pm 9.3%, $p = 0.002$) (Figure 1A). Because these results suggest, that PC12:0 directly increases α -secretase activity, we further analyzed the effect of PC12:0 on purified enzyme. As the α -secretase ADAM10 has been recently shown to be the physiologically relevant α -secretase in neurons [45], we selected ADAM10 to determine the effect of phospholipids on purified α -secretase throughout this study. Purified ADAM10 was incubated with PC12:0 in the presence of human *post mortem* brain lipid extract to reconstitute brain lipid environment. Also in this experimental approach, ADAM10 activity was significantly increased in the presence of PC12:0 compared to PC18:0 (PC12:0: 132.0% \pm 9.6%; $p = 0.011$) (Figure 1C, Table S1), validating that PC12:0 directly influences α -secretase activity. However, although ADAM10 is discussed to be the major α -secretase in neurons [45], further α -secretase candidates, e.g., ADAM17 and ADAM9 [14,16], might be affected by PC12:0. This is a rather likely scenario, as we obtained for purified membranes of SH-SY5Y wt cells and purified membranes of human *post mortem* brains, where total α -secretase and not exclusively ADAM10 activity is determined, an even stronger increase in α -secretase activity. However, our data suggest that ADAM10 is the α -secretase candidate mostly affected by shorter FA acyl chain length.

2.2. Variations in the Phospholipid Headgroup on α -Secretase Activity

Beside FA carbon chain length the polar lipid headgroups of membrane phospholipids might affect non-amyloidogenic APP processing. As we observed increased α -secretase activity in the presence of

PC10:0, PC12:0 and PC14:0, we examined whether changing the polar lipid headgroup to phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylserine (PS) might additionally modulate the observed effect of short FA acyl chain length on α -secretase activity. In accordance with the analysis of the FA carbon chain length, we first measured α -secretase activity in purified membranes of SH-SY5Y wt cells exposed to different phospholipids, having a constant FA chain length (12:0 or 14:0) but variable headgroups (PC, PE, PS). No significant alterations in α -secretase activity were observed for PE12:0 and PE14:0 compared to PC12:0 or PC14:0 as control (Figure 2A, Table S2), indicating that a change in the phospholipid headgroup from PC to PE does not affect non-amyloidogenic α -secretase cleavage of APP. In contrast, changing PC to PS revealed some influence on α -secretase activity. However, there was no consistent effect on α -secretase activity in all experimental approaches as that observed for the FA acyl chain length. In detail, for PS14:0, we found a slight but nonetheless significant, increase in α -secretase activity in purified SH-SY5Y wt membranes, as compared to PC14:0 (PS14:0: $116.2\% \pm 3.1\%$, $p = 0.001$) (Figure 2A, Table S2). On the other hand, for PS12:0 no effect was observed, thereby indicating that the altered α -secretase activity found for PS14:0 is not only mediated by the variation in the phospholipid headgroup from PC to PS, but is also dependent on the FA chain length esterified to the PS phospholipid. Therefore we decided to calculate the effects on α -secretase activity in purified SH-SY5Y wt membranes observed for variable polar lipid headgroups independent of FA chain length. Indeed statistical analysis revealed no significant alterations on α -secretase activity for PE and PS compared to PC (PE: $99.7\% \pm 1.0\%$, $p = 1.000$; PS: $102.0\% \pm 4.5\%$, $p = 0.936$) (Table S2), suggesting that a change in the polar headgroup alone does not affect α -secretase activity.

Figure 2. Effect of the phospholipid headgroup on α -secretase activity. Phospholipids having a constant FA chain length (12:0 and 14:0) but variable headgroups (PC, PE, PS) were incubated on (A) purified membranes of SH-SY5Y wt cells (B) living SH-SY5Y wt cells (C) purified membranes of human *post mortem* brains. (A,B,C) Phospholipid concentration, determination of α -secretase activity, illustration and statistical significance as described for Figure 1.

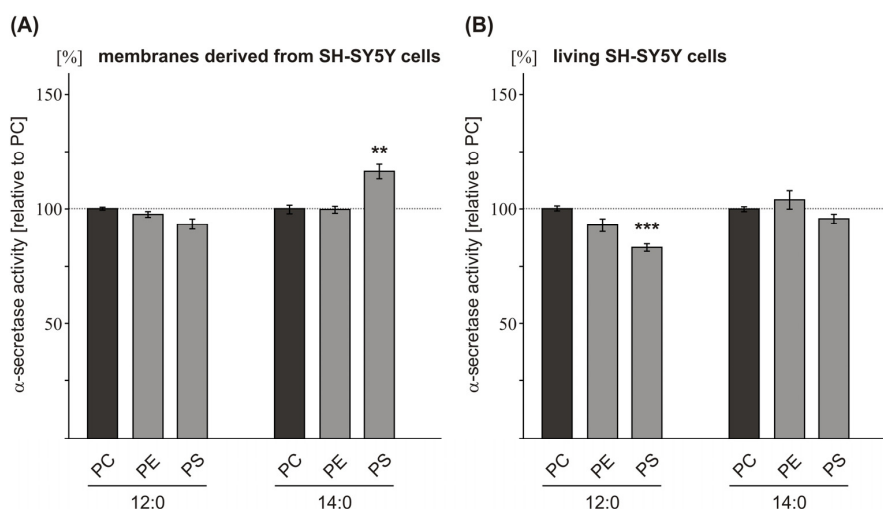
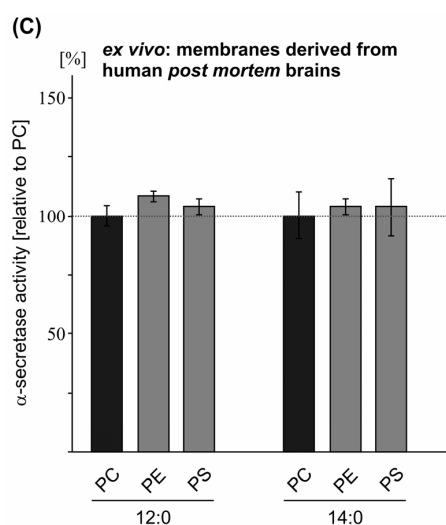


Figure 2. Cont.



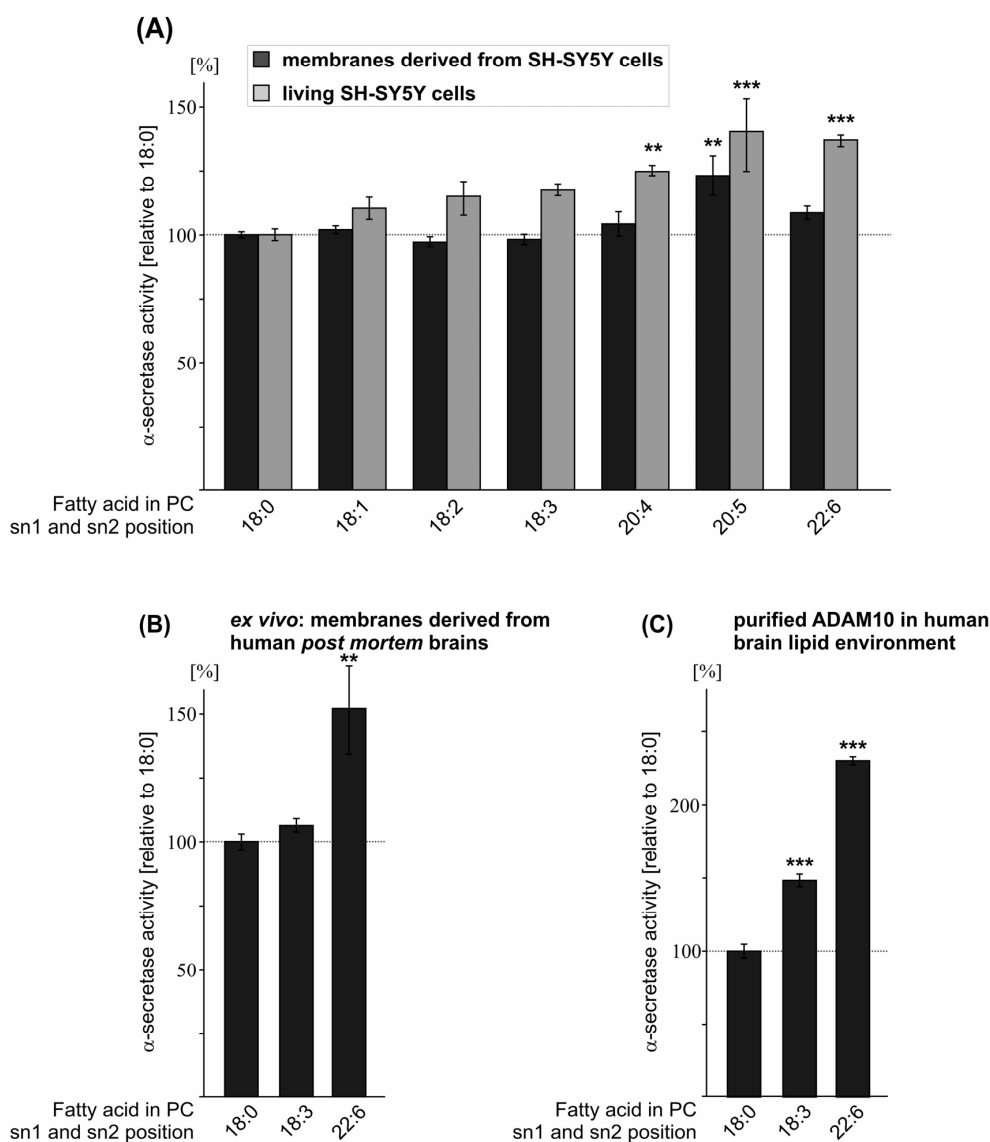
To further elucidate this, we analyzed the influence of variable phospholipid headgroups on α -secretase activity in living SH-SY5Y wt cells. In accordance to the results obtained with purified SH-SY5Y wt membranes, changing the phospholipid headgroup from PC to PE had no significant effect on α -secretase activity (Figure 2B, Table S2). In contrast to the results obtained with purified membranes of SH-SY5Y wt cells, PS12:0 significantly decreased α -secretase activity in living cells (PS12:0: $83.8\% \pm 1.6\%$, $p = 0.003$), whereas PS14:0 showed no significant effect compared to the corresponding PC phospholipids (Figure 2B, Table S2). Although a change in the polar lipid headgroup from PC to PS also seems to affect α -secretase cleavage of APP in living cells, at least for PS12:0, one has to take into consideration that, compared to the results obtained with purified membranes of SH-SY5Y wt cells, a significant effect was observed for chain length 12:0 and not for chain length 14:0 and α -secretase activity was reduced and not elevated. For that reason, from our results we cannot conclude whether a change from PC to PS *per se* in fact influences α -secretase activity and further experiments have to be done to address this topic. However, statistical analysis of the α -secretase measurements obtained for PE and PS independent of FA chain length in living cells again revealed no significant alterations on α -secretase activity (Table S2), suggesting that variations in the polar lipid headgroup independent of FA chain length might not affect α -secretase activity. Our hypothesis that a change in the phospholipid headgroup has no or only minor effects on α -secretase activity was also supported when purified membranes of human *post mortem* brains were exposed to the aforementioned phospholipids. Neither a change from PC to PE nor a change to PS in the phospholipid headgroup significantly affected α -secretase activity (Figure 2C, Table S2). The lack of an α -secretase effect when human brain membranes instead of SH-SY5Y wt membranes were incubated with PS14:0 might be explained by analyzing the PS to PC ratio in both membranes. TLC analysis of purified membranes (SH-SY5Y wt cells and human *post mortem* brains) revealed that the PS:PC ratio is lower in SH-SY5Y wt membranes compared to human brain membranes (Figure S2). Therefore, changing the phospholipid headgroup from PC to PS should have a more pronounced effect in SH-SY5Y wt cells compared to human brain membranes, as we were able to observe. This result indicates that the influence of a single phospholipid on the activity of membrane-imbedded enzymes

strongly depends on the local lipid microenvironment. As A β deposition is a crucial event in AD and α -secretase cleavage prevents the formation of A β by forming a non-toxic peptide [12], we conclude from our results that changes in the phospholipid headgroup of phospholipid species with short FA acyl chain length have no significant effects on α -secretase activity in the lipid environment of human brain. Nevertheless, our results do not rule out that variations in the phospholipid headgroup might play a role in AD by affecting other molecular pathways besides α -secretase activity. Several studies addressed levels of the major membrane phospholipids in AD *post mortem* brains. PE and phosphatidylinositol (PI) levels have been reported to be significantly decreased in AD brains [33,34,46,47], whereas PS phospholipids are increased [33]. For PC Nitsch *et al.* reported a significant decrease in AD brains [47], whereas PC was unaffected in the study by Wells *et al.* [33]. In addition, mixtures of different phospholipid headgroup types, including PC, PE, PS, PI and phosphatidic acid (PA) have been shown to alter γ -secretase cleavage *in vitro* [19,35]. Furthermore, recently Nesic *et al.* reported, that α -secretase non-amyloidogenic APP processing is increased when PE synthesis was inhibited in mammalian HEK293 cells whereas γ -secretase cleavage of APP is reduced, resulting in decreased A β levels [48].

2.3. Effect of FA Saturation on α -Secretase Activity

Another important feature of membrane phospholipids is the saturation grade of the FA acyl chains. In addition to FA chain length, the FA saturation grade strongly affects membrane fluidity, which is important for membrane-dependent cellular functions, e.g., cell signaling, transmembrane protein function, lateral diffusion of membrane proteins within the membrane, protein–lipid interactions and vesicle formation [49]. To investigate whether FA acyl chain saturation of phospholipids influences the proteolytic activity of α -secretase, we analyzed monounsaturated and polyunsaturated FA chains esterified to a PC glycerol-backbone compared to saturated stearic acid (PC18:0, PC18:1, PC18:2, PC18:3, PC20:4, PC20:5, PC22:6). Moreover, these FAs represent the most dominant species found in brain (Table S5). Treatment of purified SH-SY5Y wt membranes with oleic acid (PC18:1 $\Delta 9$ -cis), linoleic acid (PC18:2), linolenic acid (PC18:3), arachidonic acid (AA, PC20:4) and docosahexaenoic acid (DHA, PC22:6) showed no significant changes in α -secretase activity compared to the control phospholipid PC18:0 (Figure 3A, Table S3). FA side chain eicosapentaenoic acid (EPA, PC20:5) significantly elevated α -secretase activity (EPA/PC20:5: 123.1% \pm 7.6%, $p = 0.005$) (Figure 3A, Table S3). Exposing living SH-SY5Y wt cells to the aforementioned phospholipids (final concentration 10 μ M) revealed significantly increased α -secretase activity in the presence of arachidonic acid, EPA and DHA, compared to control PC18:0 (AA/PC20:4: 124.7% \pm 2.0%, $p = 0.001$; EPA/PC20:5: 140.1% \pm 14.2%, $p < 0.001$; DHA/PC22:6: 136.8% \pm 2.2%, $p < 0.001$) (Figure 3A, Table S3). Interestingly, in living cells, α -secretase activity was elevated with an increasing number of double bonds within the acyl chains with the strongest increase for EPA and DHA (Figure 3A), indicating that EPA and DHA are potent stimulators of non-amyloidogenic APP processing in a living system. Calculating all α -secretase measurements for SH-SY5Y wt cells, including purified membranes and living cells, showed similar results. Significance was obtained for arachidonic acid, EPA and DHA (AA/PC20:4: 117.9% \pm 3.5%, $p = 0.002$; EPA/PC20:5: 132.5% \pm 5.9%, $p < 0.001$; DHA/PC22:6: 123.5% \pm 3.9%, $p < 0.001$) (Table S3).

Figure 3. Effect of FA saturation on α -secretase activity. Phospholipids containing mono- or polyunsaturated FAs were exposed to (A) purified membranes of SH-SY5Y wt cells and living SH-SY5Y wt cells (B) purified membranes of human *post mortem* brains (C) purified α -secretase ADAM10 in the presence of human brain lipid extract. (A,B,C) Phospholipid concentration, determination of α -secretase activity, illustration and statistical significance as described for Figure 1.



To analyze whether polyunsaturated FAs also increase α -secretase activity in the lipid environment of human brain, we incubated stearic acid (18:0), linolenic acid (18:3) and DHA (22:6), which is highly enriched in neuronal membranes [50–52], on purified membranes of human *post mortem* brains. As already observed for purified SH-SY5Y wt membranes and for living cells, linolenic acid showed non-significant alterations on α -secretase activity and DHA again significantly elevated α -secretase activity (DHA: $152.0\% \pm 17.4$, $p = 0.007$) (Figure 3C, Table S3). Using purified ADAM10 enzyme for

the incubation with linolenic acid (PC18:3) and DHA (PC22:6) in the presence of human *post mortem* brain lipid extract, revealed that ADAM10 activity was significantly increased for both polyunsaturated FAs (PC18:3: $148.2\% \pm 4.2\%$, $p < 0.001$; DHA/PC22:6: $229.7\% \pm 2.7\%$, $p < 0.001$) (Figure 3C, Table S3). The extraordinary strong increase obtained with purified ADAM10 enzyme might be explained by the lack of other membrane proteins potentially involved in α -secretase regulation using brain lipid extract in contrast to purified membranes of human brains, which are not devoid of integral membrane proteins. One might speculate that such a protein could be e.g., β -secretase BACE1, which competes with α -secretase for the initial cleavage of the substrate APP. In purified membranes of human *post mortem* brains BACE1 is still present and can cleave the APP substrate resulting in lower α -secretase cleavage compared to the α -secretase measurements using purified α -secretase ADAM10 and brain lipid extract where BACE1 is lacking and ADAM10 has not to compete with BACE1 for APP cleavage. In summary, all our results indicate that FA acyl chain saturation of phospholipids affects α -secretase activity with a more pronounced effect with an increasing number of double bonds within the hydrocarbon chains of the FAs. Arachidonic acid (four double bonds), EPA (five double bonds) and DHA (six double bonds) significantly increased α -secretase activity in living SH-SY5Y wt cells, whereas FAs with less than four double bonds revealed minor or no significant effects. This finding is in line with the recent study by Yang *et al.*, showing increased levels of α -secreted APP (sAPP α) in the culture medium of differentiated SH-SY5Y cells exposed to arachidonic acid (20:4), EPA (20:5) and DHA (22:6) [53]. In the presence of DHA sAPP α secretion has also been shown to be increased in HEK cells expressing the substrate APP [54]. Additionally, stearic acid (18:0), oleic acid (18:1) and linoleic acid (18:2) showed no changes in sAPP α secretion in the study by Yang *et al.* [53], validating our results obtained by measuring α -secretase activity by the use of fluorogenic peptide. Furthermore, we validated our assay by using α -secretase inhibitors. Utilizing these inhibitors, α -secretase activity was decreased and for the non-cytotoxic α -secretase inhibitor GM6001, a reduction of sAPP α was also observed (Figure S4). However, it cannot be ruled out that the natural substrate, the intact APP protein, has different physical properties, e.g., affinity to the α -secretases, compared to the fluorogenic peptide and that these differences might influence the effect strength of phospholipids on α -secretase activity.

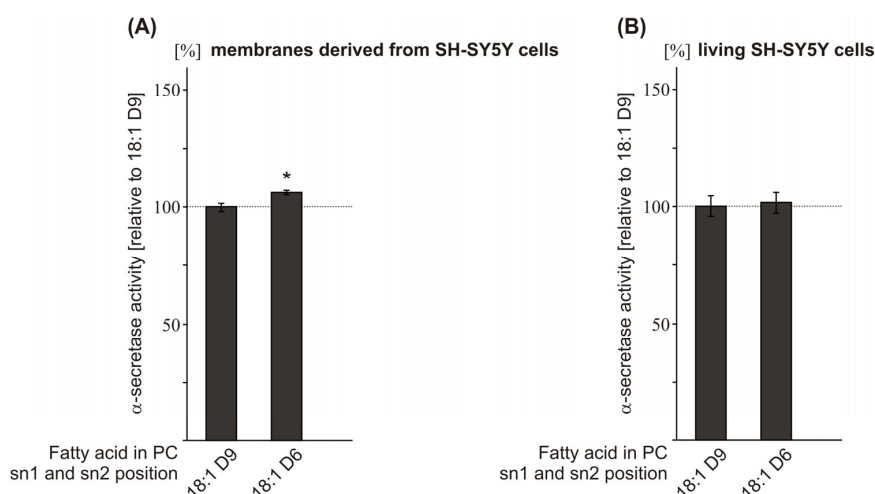
Among the FAs analyzed, the main focus has to concentrate on DHA. DHA is highly enriched in neuronal cell membranes [50–52] and DHA levels have been found to be decreased in the brain and serum of AD patients and in AD *post mortem* brains [55–57]. Furthermore, several epidemiological studies indicate an inverse correlation between DHA intake and AD incidence or cognitive decline [58–61]. Importantly, DHA has also been shown to reduce A β generation *in vitro* and in animal models of AD [35,62–68]. These findings, together with our finding that DHA strongly increases non-amyloidogenic α -secretase activity in the lipid environment of human brain, indicate that DHA might have protective effects on AD by decreasing amyloidogenic and increasing non-amyloidogenic APP processing.

2.4. Effect of the Double-Bond Position on α -Secretase Activity

As we observed that FA chain length and the saturation grade of FAs influence α -secretase activity, we asked whether shifting the position of the double-bond within the monounsaturated FA oleic acid

PC18:1 might also affect α -secretase activity. Therefore, as a proof of principle, we analyzed PC18:1 Δ 6-cis and PC18:1 Δ 9-cis. Exposure of purified SH-SY5Y wt membranes to the Δ 6-cis isomer revealed slightly—though significantly—increased α -secretase activity compared to PC18:1 Δ 9-cis (PC18:1 Δ 6-cis: $106.1\% \pm 1.0\%$, $p = 0.041$) (Figure 4A, Table S4), whereas no effect on α -secretase activity was obtained in living SH-SY5Y wt cells (Figure 4B, Table S4), thereby indicating that changing the position of the double-bond within a monounsaturated FA chain has no or only minor effects on non-amyloidogenic processing of APP. However, shifting the double-bond position further from the center of the membrane bilayer has been recently shown to affect γ -secretase cleavage [35]. In this study, γ -secretase activity was reduced in PC18:1 Δ 6-cis compared to PC18:1 Δ 9-cis. The observation that γ -secretase activity is affected more strongly by the position of the double-bond-induced kink within the phospholipid bilayer as α -secretase activity might be explained by the fact that γ -secretase cleaves the substrate APP within the middle of the phospholipid bilayer [69], whereas α -secretase cleaves APP within the extracellular/luminal domain.

Figure 4. Effect of the double-bond position within the FA carbon chain on α -secretase activity. Phospholipids containing either FA 18:1 Δ 9-cis or FA 18:1 Δ 6-cis were incubated on (A) purified membranes of SH-SY5Y wt cells and (B) living SH-SY5Y wt cells; (A,B) Phospholipid concentration, determination of α -secretase activity, illustration and statistical significance as described for Figure 1.



3. Experimental Section

3.1. Chemicals and Reagents

All chemicals used here were purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany), if not stated otherwise. Complete protease inhibitor cocktail was purchased from Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany), Aspartate protease inhibitor, β -secretase inhibitor, and fluorogenic substrate were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The following phospholipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), except for PC20:5 (Sigma, Taufkirchen, Germany): **PC10:0**—1,2-didecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC12:0**—1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-

phosphocholine; **PC14:0**—1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC16:0**—1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC18:0**—1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC20:0**—1,2-diarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC22:0**—1,2-dibehenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC24:0**—1,2-dilignoceroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC18:1D9**—1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC18:1D6**—1,2-dipetroselenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC18:2**—1,2-dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC18:3**—1,2-dilinenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC20:4**—1,2-diarachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC20:5**—1,2-dieicosapentaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PC22:6**—1,2-didocosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **PE12:0**—1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; **PE14:0**—1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; **PS12:0**—1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine; **PS14:0**—1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine.

3.2. Cell Culture and Incubation with Phospholipids

SH-SY5Ywt cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FCS (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) and non-essential amino acid solution. For incubation with phospholipids, SH-SY5Ywt cells were plated on a 96-well plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and grown until confluency. Before incubation, cells were cultivated in medium containing 0.1% FCS for 4 h. Incubation was carried out for 8 h + 16 h with 10 μ M phospholipid. Final concentration of ethanol was less than 2‰, except PE- and PS-species (10‰).

3.3. Detection of α -Secretase Activity in Vivo

After incubation, SH-SY5Ywt cells were washed once with HEPES buffer, then 100 μ L of cell imaging solution (140 mM NaCl₂, 5 mM KCl, 8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, pH 7.4) containing 10 μ M phospholipid and 10 μ M fluorogenic α -secretase substrate (sequence: Ac-RE-EDANS-VHHQK LVF-K-DABCYL-R-OH, Cat. No. 565767, Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added. Fluorescence was measured continuously for 10,000 s with an excitation wavelength of 340 ± 10 nm and an emission wavelength of 490 ± 10 nm at 37 °C under light exclusion using a Safire² Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany) [23]. Enzyme activity kinetics are shown in the supplemental data section.

3.4. Human Post Mortem Brains

In total, nine human *post mortem* control brain samples were used. Brains were obtained from BrainNet (Munich, Germany). No CERAD status was assigned to 4 out of 5 brain samples. The fifth brain sample was assigned with CERAD status 0 (CERAD = the consortium to establish a registry for AD, standardizing procedures for the evaluation and diagnosis of patients with AD. A, B, C, 0 as described in <http://cerad.mc.duke.edu/> [70]).

3.5. Preparation of Purified Membranes

SH-SY5Ywt cells and human *post mortem* brains were homogenized using a PotterS (Braun, Melsungen, Germany) at maximum speed (25 strokes) on ice. Protein concentration was measured

according to Smith *et al.* [71], as described in detail earlier [72]. Samples were adjusted to 1 mg/mL, centrifuged at 900 rcf for 10 min at 4 °C and the obtained post-nuclear fractions were centrifuged at 55,000 rpm for 75 min at 4 °C. The pellet with purified membranes was resuspended using cannulae (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with decreasing diameter in sucrose buffer (200 mM sucrose, 5 μ M CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂) according to Grimm *et al.* [68].

3.6. Preparation of Human Brain Lipid Extract

Lipids were extracted according to Bligh and Dyer [73] with minor modifications [72,74]. In brief, 3.75 mL CHCl₃:MeOH:HCl (37%) (1:2:0.06; v/v/v) was added to the sample and the mixture was vortexed for 1 h at room temperature (RT). Then, 1.25 mL CHCl₃ was added and vortexed again for 1 h at RT. Finally, 1.25 mL CHCl₃ and 1.25 mL H₂O were added and samples were vortexed for another 10 min before centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The lower phase containing lipids was transferred to another glass tube and evaporated under nitrogen flow at 30 °C. Lipids were resuspended in 1 mL H₂O and the extraction cycle described earlier was repeated before lipids were finally dissolved in ethanol.

3.7. Determination of α -Secretase Activity and in Vitro Incubation

Post-nuclear fractions of SH-SY5Ywt cells/human brain-purified membranes were incubated with 25 μ M/50 μ M phospholipids for 15 min at 37 °C while shaking (Multireax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany). For determination of α -secretase activity, samples were adjusted to 100 μ g of protein and 4 μ M of fluorogenic α -secretase substrate was added. Fluorescence was measured as described above. Enzyme activity kinetics are shown in the supplemental data section.

3.8. Determination of ADAM10 Purified Enzyme Activity

Phospholipids (25 μ M) were mixed with human brain lipid extract (5 μ g lipid per 100 μ L sucrose buffer) and incubated with 100 ng of ADAM10 purified enzyme (Cat. no. A9975, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) in sucrose buffer for 1 h at 4 °C while shaking, followed by sonification for 15 min on ice. ADAM10 purified enzyme activity was determined as described above using the Infinite M1000 Pro Fluorometer. Enzyme activity kinetics are shown in the supplemental data section.

3.9. Detection of Phospholipid Species in SH-SY5Ywt Cells and Human Post Mortem Brains

Lipid extraction was performed as described above. One hundred microliter of each sample were spotted on thin layer chromatography plate and lipids were analyzed as described before [75].

3.10. Mass Spectrometry Analysis

To determine phospholipid distribution in post-nuclear fractions and membranes derived from human brains, phosphatidylcholine amounts were measured as described and validated in detail earlier [76]. For analysis, we used 20 μ L of post-nuclear fractions and human brain lipid extract (for preparations see sections before). According to this method, additionally, the phospholipid uptake into living cells and membranes of SH-SY5Y cells was determined.

3.11. Statistical Analysis

All quantified data presented here is based on an average of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean. Statistical significance was determined by ANOVA or two-tailed Student's *t*-test; significance was set at * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

4. Conclusions

Our results suggest that changes in the phospholipid composition of plasma membranes can influence α -secretase activity (Table 1) and might be involved in the development of AD. We found that α -secretase activity was significantly increased in the presence of FAs with short chain length and in the presence of polyunsaturated FAs with more than three double-bonds, thus suggesting that an increase in these phospholipids might have beneficial effects for AD.

Table 1. Summary of the effects of different phospholipids on α -secretase activity.

	SH-SY5Y membranes	living SH-SY5Y cells	purified ADAM10	human <i>post mortem</i> brain
	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)
Effect of chain length				
PC 10:0	127.7 (2.2 n.s.)	124.8 (1.3 ***)		
PC 12:0	144.0 (9.3 **)	126.9 (1.3 ***)	132.0 (9.6 *)	141.9 (7.6 **)
PC 14:0	128.0 (11.9 n.s.)	103.5 (1.2 n.s.)		
PC 16:0	99.8 (5.9 n.s.)	99.2 (1.3 n.s.)		
PC 18:0	100.0 (3.2)	100.0 (2.3 n.s.)	100.0 (6.4)	100.0 (5.7)
PC 20:0	102.3 (0.5 n.s.)	98.8 (1.9 n.s.)		
PC 22:0	98.8 (1.9 n.s.)	100.1 (2.3 n.s.)		
PC 24:0	101.7 (1.5 n.s.)	107.8 (2.2 n.s.)		
	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)
Effect of headgroup				
PC 12:0	100.0 (0.7)	100.0 (1.1)		100.0 (4.5)
PE 12:0	98.5 (1.3 n.s.)	93.6 (2.8 n.s.)		109.2 (3.1 n.s.)
PS 12:0	93.4 (2.5 n.s.)	83.8 (1.6 **)		104.9 (3.7 n.s.)
PC 14:0	100.0 (1.9)	100.0 (1.1)		100.0 (10.9)
PE 14:0	101.0 (1.5 n.s.)	105.0 (4.0 n.s.)		105.7 (3.6 n.s.)
PS 14:0	116.2 (3.1 ***)	96.6 (2.0 n.s.)		104.7 (12.2 n.s.)
	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)
Effect of saturation				
PC 18:0	100.0 (1.2)	100.0 (2.3)	100.0 (4.8)	100.0 (3.1)
PC 18:1	102.0 (1.5 n.s.)	110.3 (4.3 n.s.)		
PC 18:2	97.1 (2.1 n.s.)	115.0 (6.6 n.s.)		
PC 18:3	98.2 (2.0 n.s.)	117.4 (2.3 n.s.)	148.2 (4.2 ***)	106.3 (2.7 n.s.)
PC 20:4	104.2 (4.8 n.s.)	124.7 (2.0 **)		
PC 20:5	123.1 (7.6 **)	140.1 (14.2 ***)		
PC 22:6	108.6 (2.6 n.s.)	136.8 (2.2 ***)	229.7 (2.7 ***)	152.0 (17.4 **)
	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)	Mean % (SEM % +/- Sign.)
Effect of double-bond position				
PC 18:1D9	100.0 (1.8)	100.0 (4.4)		
PC 18:1D6	106.1 (1.0 *)	101.7 (4.5 n.s.)		

Asterisks show the statistical significance (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, n.s. not significant).

Acknowledgments

We thank Inge Tomic for technical assistance. The research leading to these results has received fundings from the EU FP7 project LipiDiDiet, Grant Agreement No 211696 (TH), the DFG (TH), the Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie via NGFNplus and KNDD (TH), the HOMFOR 2009 (MG, TH) and the HOMFORexcellent 2011 (MG) (Saarland University research grants). We thank Tecan Ltd. for their technical support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Masters, C.L.; Simms, G.; Weinman, N.A.; Multhaup, G.; McDonald, B.L.; Beyreuther, K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4245–4249.
2. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.
3. Dyrks, T.; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J.M.; Lemaire, H.G.; Kang, J.; Muller-Hill, B.; Masters, C.L.; Beyreuther, K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* **1988**, *7*, 949–957.
4. Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, *286*, 735–741.
5. Sinha, S.; Anderson, J.P.; Barbour, R.; Basi, G.S.; Caccavello, R.; Davis, D.; Doan, M.; Dovey, H.F.; Frigon, N.; Hong, J.; *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **1999**, *402*, 537–540.
6. Haass, C.; Schlossmacher, M.G.; Hung, A.Y.; Vigo-Pelfrey, C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B.L.; Lieberburg, I.; Koo, E.H.; Schenk, D.; Teplow, D.B.; *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **1992**, *359*, 322–325.
7. Shoji, M.; Golde, T.E.; Ghiso, J.; Cheung, T.T.; Estus, S.; Shaffer, L.M.; Cai, X.D.; McKay, D.M.; Tintner, R.; Frangione, B.; *et al.* Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **1992**, *258*, 126–129.
8. Herreman, A.; Serneels, L.; Annaert, W.; Collen, D.; Schoonjans, L.; de Strooper, B. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell. Biol.* **2000**, *2*, 461–462.
9. Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G.; Iwatsubo, T. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **2003**, *422*, 438–441.
10. Kimberly, W.T.; LaVoie, M.J.; Ostaszewski, B.L.; Ye, W.; Wolfe, M.S.; Selkoe, D.J. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6382–6387.

11. Duering, M.; Grimm, M.O.; Grimm, H.S.; Schroder, J.; Hartmann, T. Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiol. Aging* **2005**, *26*, 785–788.
12. Haass, C.; Hung, A.Y.; Schlossmacher, M.G.; Teplow, D.B.; Selkoe, D.J. Beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3021–3024.
13. Lichtenthaler, S.F. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 10–21.
14. Buxbaum, J.D.; Liu, K.N.; Luo, Y.; Slack, J.L.; Stocking, K.L.; Peschon, J.J.; Johnson, R.S.; Castner, B.J.; Cerretti, D.P.; Black, R.A. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27765–27767.
15. Lammich, S.; Kojro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M.; Haass, C.; Fahrenholz, F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3922–3927.
16. Koike, H.; Tomioka, S.; Sorimachi, H.; Saido, T.C.; Maruyama, K.; Okuyama, A.; Fujisawa-Sehara, A.; Ohno, S.; Suzuki, K.; Ishiura, S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **1999**, *343*, 371–375.
17. Allinson, T.M.; Parkin, E.T.; Turner, A.J.; Hooper, N.M. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 342–352.
18. Hartmann, T.; Kuchenbecker, J.; Grimm, M.O. Alzheimer's disease: The lipid connection. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 159–170.
19. Osenkowski, P.; Ye, W.; Wang, R.; Wolfe, M.S.; Selkoe, D.J. Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 22529–22540.
20. Grimm, M.O.; Rothhaar, T.L.; Hartmann, T. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Exp. Brain Res.* **2012**, *217*, 365–375.
21. Lemkul, J.A.; Bevan, D.R. Lipid composition influences the release of Alzheimer's amyloid beta-peptide from membranes. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1530–1545.
22. Grimm, M.O.; Rothhaar, T.L.; Grösgen, S.; Burg, V.K.; Hundsdorfer, B.; Hauptenthal, V.J.; Friess, P.; Kins, S.; Grimm, H.S.; Hartmann, T. Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 1214–1223.
23. Rothhaar, T.L.; Groschen, S.; Hauptenthal, V.J.; Burg, V.K.; Hundsdorfer, B.; Mett, J.; Riemenschneider, M.; Grimm, H.S.; Hartmann, T.; Grimm, M.O. Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 141240.
24. Marenchino, M.; Williamson, P.T.; Murri, S.; Zandomenighi, G.; Wunderli-Allenspach, H.; Meier, B.H.; Kramer, S.D. Dynamics and Cleavability at the alpha-cleavage site of APP(684–726) in different lipid environments. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 1460–1473.
25. Barrett, P.J.; Song, Y.; van Horn, W.D.; Hustedt, E.J.; Schafer, J.M.; Hadziselimovic, A.; Beel, A.J.; Sanders, C.R. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* **2012**, *336*, 1168–1171.

26. Simons, M.; Keller, P.; de Strooper, B.; Beyreuther, K.; Dotti, C.G.; Simons, K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6460–6464.
27. Grösgen, S.; Grimm, M.O.; Friess, P.; Hartmann, T. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 966–974.
28. Grimm, M.O.; Grimm, H.S.; Tomic, I.; Beyreuther, K.; Hartmann, T.; Bergmann, C. Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11302–11311.
29. Grimm, M.O.; Grimm, H.S.; Patzold, A.J.; Zinser, E.G.; Halonen, R.; Duering, M.; Tschape, J.A.; De Strooper, B.; Muller, U.; Shen, J.; *et al.* Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell. Biol.* **2005**, *7*, 1118–1123.
30. Zha, Q.; Ruan, Y.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Zhang, D. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol. Psychiatry* **2004**, *9*, 946–952.
31. Grimm, M.O.; Zinser, E.G.; Grösgen, S.; Hundsdorfer, B.; Rothhaar, T.L.; Burg, V.K.; Kaestner, L.; Bayer, T.A.; Lipp, P.; Muller, U.; *et al.* Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* **2012**, *7*, e34095.
32. Svennerholm, L.; Gottfries, C.G. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 1039–1047.
33. Wells, K.; Farooqui, A.A.; Liss, L.; Horrocks, L.A. Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem. Res.* **1995**, *20*, 1329–1333.
34. Prasad, M.R.; Lovell, M.A.; Yatin, M.; Dhillon, H.; Markesbery, W.R. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **1998**, *23*, 81–88.
35. Holmes, O.; Paturi, S.; Ye, W.; Wolfe, M.S.; Selkoe, D.J. Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry* **2012**, *51*, 3565–3575.
36. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
37. Vetrivel, K.S.; Thinakaran, G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 860–867.
38. Riddell, D.R.; Christie, G.; Hussain, I.; Dingwall, C. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1288–1293.
39. Vetrivel, K.S.; Cheng, H.; Lin, W.; Sakurai, T.; Li, T.; Nukina, N.; Wong, P.C.; Xu, H.; Thinakaran, G. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44945–44954.
40. Vetrivel, K.S.; Cheng, H.; Kim, S.H.; Chen, Y.; Barnes, N.Y.; Parent, A.T.; Sisodia, S.S.; Thinakaran, G. Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25892–25900.
41. Koumanov, K.S.; Tessier, C.; Momchilova, A.B.; Rainteau, D.; Wolf, C.; Quinn, P.J. Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *434*, 150–158.

42. Kojro, E.; Gimpl, G.; Lammich, S.; Marz, W.; Fahrenholz, F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5815–5820.
43. Ehehalt, R.; Keller, P.; Haass, C.; Thiele, C.; Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 113–123.
44. Parr-Sturgess, C.A.; Rushton, D.J.; Parkin, E.T. Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 283–294.
45. Kuhn, P.H.; Wang, H.; Dislich, B.; Colombo, A.; Zeitschel, U.; Ellwart, J.W.; Kremmer, E.; Rossner, S.; Lichtenthaler, S.F. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **2010**, *29*, 3020–3032.
46. Stokes, C.E.; Hawthorne, J.N. Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J. Neurochem.* **1987**, *48*, 1018–1021.
47. Nitsch, R.M.; Blusztajn, J.K.; Pittas, A.G.; Slack, B.E.; Growdon, J.H.; Wurtman, R.J. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1671–1675.
48. Nestic, I.; Guix, F.X.; Vennekens, K.; Michaki, V.; van Veldhoven, P.P.; Feiguin, F.; de Strooper, B.; Dotti, C.G.; Wahle, T. Alterations in phosphatidylethanolamine levels affect the generation of A β . *Aging Cell* **2012**, *11*, 63–72.
49. Escriba, P.V.; Gonzalez-Ros, J.M.; Goni, F.M.; Kinnunen, P.K.; Vigh, L.; Sanchez-Magraner, L.; Fernandez, A.M.; Busquets, X.; Horvath, I.; Barcelo-Coblijn, G. Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 829–875.
50. Bazan, N.G.; Scott, B.L. Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses. *Ups. J. Med. Sci. Suppl.* **1990**, *48*, 97–107.
51. Ansari, K.A.; Shoeman, D.W. Arachidonic and docosahexanoic acid content of bovine brain myelin: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* **1990**, *15*, 7–11.
52. Horrocks, L.A.; Farooqui, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: Its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2004**, *70*, 361–372.
53. Yang, X.; Sheng, W.; Sun, G.Y.; Lee, J.C. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem. Int.* **2011**, *58*, 321–329.
54. Eckert, G.P.; Chang, S.; Eckmann, J.; Copanaki, E.; Hagl, S.; Hener, U.; Muller, W.E.; Kogel, D. Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 236–243.
55. Soderberg, M.; Edlund, C.; Kristensson, K.; Dallner, G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* **1991**, *26*, 421–425.
56. Tully, A.M.; Roche, H.M.; Doyle, R.; Fallon, C.; Bruce, I.; Lawlor, B.; Coakley, D.; Gibney, M.J. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: A case-control study. *Br. J. Nutr.* **2003**, *89*, 483–489.

57. Cunnane, S.C.; Schneider, J.A.; Tangney, C.; Tremblay-Mercier, J.; Fortier, M.; Bennett, D.A.; Morris, M.C. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *29*, 691–697.
58. Barberger-Gateau, P.; Letenneur, L.; Deschamps, V.; Peres, K.; Dartigues, J.F.; Renaud, S. Fish, meat, and risk of dementia: Cohort study. *Br. Med. J.* **2002**, *325*, 932–933.
59. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Bienias, J.L.; Tangney, C.C.; Bennett, D.A.; Wilson, R.S.; Aggarwal, N.; Schneider, J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 940–946.
60. Schaefer, E.J.; Bongard, V.; Beiser, A.S.; Lamon-Fava, S.; Robins, S.J.; Au, R.; Tucker, K.L.; Kyle, D.J.; Wilson, P.W.; Wolf, P.A. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: The Framingham Heart Study. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 1545–1550.
61. Van Gelder, B.M.; Tijhuis, M.; Kalmijn, S.; Kromhout, D. Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: The Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1142–1147.
62. Lukiw, W.J.; Cui, J.G.; Marcheselli, V.L.; Bodker, M.; Botkjaer, A.; Gotlinger, K.; Serhan, C.N.; Bazan, N.G. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2774–2783.
63. Perez, S.E.; Berg, B.M.; Moore, K.A.; He, B.; Counts, S.E.; Fritz, J.J.; Hu, Y.S.; Lazarov, O.; Lah, J.J.; Mufson, E.J. DHA diet reduces AD pathology in young APPswe/PS1 Delta E9 transgenic mice: Possible gender effects. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 1026–1040.
64. Oksman, M.; Iivonen, H.; Hogyes, E.; Amtul, Z.; Penke, B.; Leenders, I.; Broersen, L.; Lutjohann, D.; Hartmann, T.; Tanila, H. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *23*, 563–572.
65. Calon, F.; Lim, G.P.; Yang, F.; Morihara, T.; Teter, B.; Ubeda, O.; Rostaing, P.; Triller, A.; Salem, N., Jr.; Ashe, K.H.; *et al.* Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* **2004**, *43*, 633–645.
66. Hooijmans, C.R.; Rutters, F.; Dederen, P.J.; Gambarota, G.; Veltien, A.; van Groen, T.; Broersen, L.M.; Lutjohann, D.; Heerschap, A.; Tanila, H.; *et al.* Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched Typical Western Diet (TWD). *Neurobiol. Dis.* **2007**, *28*, 16–29.
67. Cole, G.M.; Ma, Q.L.; Frautschy, S.A. Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2009**, *81*, 213–221.
68. Grimm, M.O.; Kuchenbecker, J.; Grösgen, S.; Burg, V.K.; Hundsdorfer, B.; Rothhaar, T.L.; Friess, P.; de Wilde, M.C.; Broersen, L.M.; Penke, B.; *et al.* Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14028–14039.
69. Grziwa, B.; Grimm, M.O.; Masters, C.L.; Beyreuther, K.; Hartmann, T.; Lichtenthaler, S.F. The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6803–6808.

70. Duyckaerts, C.; Hauw, J.J. Diagnosis and staging of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **1997**, *18*, S33–S42.
71. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
72. Grimm, M.O.; Grösgen, S.; Rothhaar, T.L.; Burg, V.K.; Hundsdorfer, B.; Hauptenthal, V.J.; Friess, P.; Muller, U.; Fassbender, K.; Riemenschneider, M.; *et al.* Intracellular APP domain regulates serine-palmitoyl-coa transferase expression and is affected in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, *2011*, 695413.
73. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
74. Grimm, M.O.; Kuchenbecker, J.; Rothhaar, T.L.; Grösgen, S.; Hundsdorfer, B.; Burg, V.K.; Friess, P.; Muller, U.; Grimm, H.S.; Riemenschneider, M.; *et al.* Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 916–925.
75. Ruiz, J.I.; Ochoa, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 1482–1489.
76. Grimm, M.O.; Grösgen, S.; Riemenschneider, M.; Tanila, H.; Grimm, H.S.; Hartmann, T. From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7713–7722.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Supplementary Information

Figure S1. Effect of PC18:0 on α -secretase activity compared to the solvent control. Purified membranes of SH-SY5Y wt cells were incubated with 25 μ M PC18:0 or the solvent EtOH. PC18:0 showed no alterations in α -secretase activity.

Figure S1: effect of PC 18:0 vs ethanol solvent control

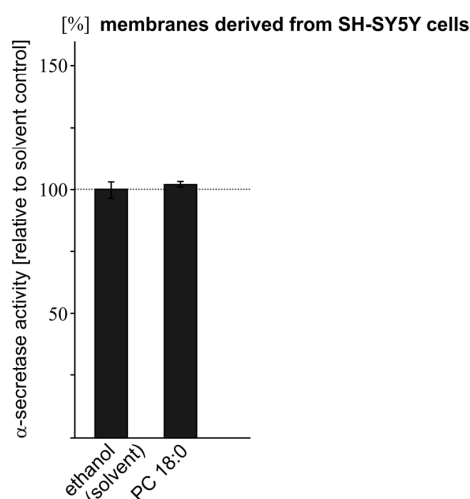


Figure S2. Ratio of phospholipid species in SH-SY5Y and human *post mortem* brain membranes. The ratio of the phospholipid species PC, PE and PS was determined by thin layer chromatography. The distribution of the three phospholipid species is represented below. PC is set to 100%. Both in SH-SY5Y cells and human brains PC is the major species followed by PE and PS. However, the distribution between PC:PE:PS is slightly different between the neuroblastoma cell lines and the membrane derived from human brains.

Figure S2: distribution of headgroups in membranes derived from SH-SY5Y and human brains

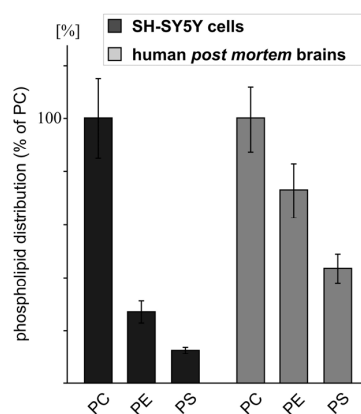


Figure S3. Representative kinetics for α -secretase measurements. **(A)** PC18:0 *versus* solvent control ethanol. Determination of α -secretase activity in the presence of PC18:0 (25 μ M) in purified membranes of SH-SY5Y cells. The α -secretase activity was determined by a fluorometric assay; **(B)** PC10:0–PC18:0 *in vitro*. Determination of α -secretase activity in the presence of PC10:0–PC18:0: Influence of the fatty acid chain length on α -secretase activity in purified membranes of human SH-SY5Y cells. Purified membranes of SH-SY5Y cells were incubated with the phospholipids (25 μ M), PC18:0 served as control. The α -secretase activity was determined by a fluorometric assay. α -secretase activity was increased by PC10:0, PC12:0 and PC14:0 and not by PC16:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(C)** PC18:0, PC20:4, PC20:5, PC22:6 *in vitro*. Determination of α -secretase activity in the presence of PC18:0–PC22:6: Influence of the saturation grade on α -secretase activity in purified membranes of human SH-SY5Y cells. Purified membranes of SH-SY5Y cells were incubated with the phospholipids (25 μ M), PC18:0 served as control. α -secretase activity was determined by a fluorometric assay. The α -secretase activity was increased by PC20:4 and PC22:6. The strongest effect can be seen for PC20:5. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(D)** PC12:0–PC18:0 *in vivo*. Determination of α -secretase activity in the presence of PC10:0–PC18:0: Influence of the fatty acid chain length on α -secretase activity in human SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were incubated with the phospholipids (10 μ M) for 8 + 16 h. α -secretase activity was determined by a fluorometric live cell assay. The α -secretase activity was increased by PC10:0, PC12:0 and PC14:0 and not by PC16:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(E)** PC18:0, PC 20:4, PC20:5, PC22:6 *in vivo*. Determination of α -secretase activity in the presence of PC18:0–PC22:6: Influence of the saturation grade on α -secretase activity in human SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were incubated with the phospholipids (10 μ M) for 8 + 16 h. The α -secretase activity was determined by a fluorometric live cell assay. The α -secretase activity was increased by all unsaturated PC species, PC18:2 and PC18:3 showed minor effects, the strongest effect can be seen for PC20:5 and PC22:6. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(F)** Linear regression of the kinetics shown in E; **(G)** PC12:0, PC 18:0, purified ADAM10. Determination of ADAM10 activity in the presence of PC12:0 and PC18:0 (control): ADAM10 purified enzyme was treated with the phospholipids (25 μ M) in the presence of a human brain lipid environment. ADAM10 activity was determined by a fluorometric assay. PC12:0 showed a significant increase of activity compared to PC18:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(H)** PC18:0, PC22:6, purified ADAM10. Determination of ADAM10 activity in the presence of unsaturated phospholipids PC18:3 and PC22:6, PC18:0 served as a control: ADAM10 purified enzyme was treated with the phospholipids (25 μ M) in the presence of a human brain lipid environment. ADAM10 activity was determined by a fluorometric assay. PC18:3 and PC22:6 showed significantly increased activity of ADAM10 compared to PC18:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); **(I)** PC12:0, PC18:0, human *post mortem* brain. Influence on α -secretase activity *ex vivo* in purified membranes of human *post mortem* brains. Purified brain membranes were incubated with PC12:0 and

the corresponding control PC18:0 (50 μ M). Afterwards, α -secretase activity was measured by a fluorometric assay. PC12:0 increased α -secretase activity significantly compared to PC18:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean); (J) PC18:0, PC22:6, human *post mortem* brains. Influence on α -secretase activity *ex vivo* in purified membranes of human *post mortem* brains. Purified brain membranes were incubated with unsaturated phospholipids PC18:3 and PC22:6 and the corresponding control PC18:0 (50 μ M). Afterwards, α -secretase activity was measured by a fluorometric assay. PC18:3 showed a moderate increase in the activity of α -secretase, whereas PC22:6 significantly enhanced α -secretase activity compared to PC18:0. Error bars represent SEM (Standard error of the mean).

Figure S3: representative kinetics for α -secretase measurements

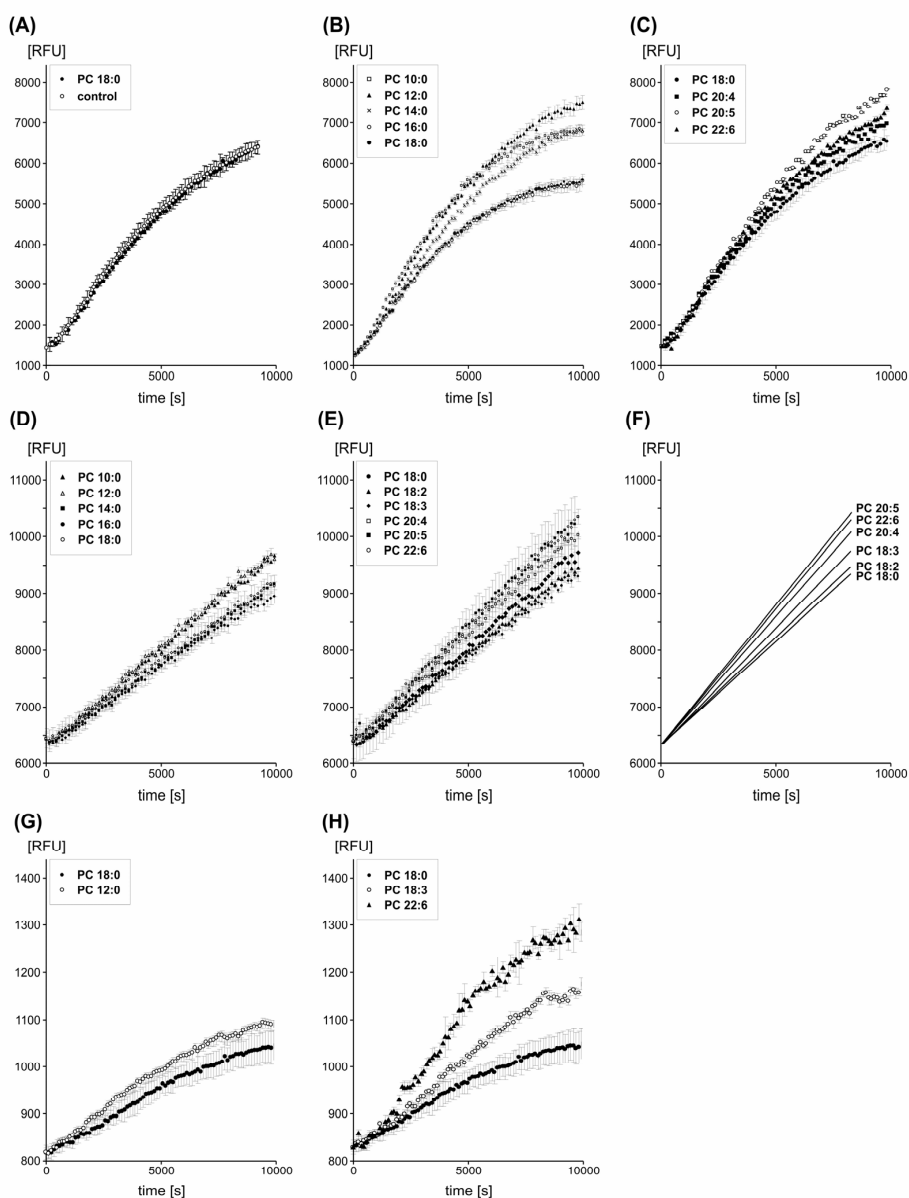


Figure S3. Cont.

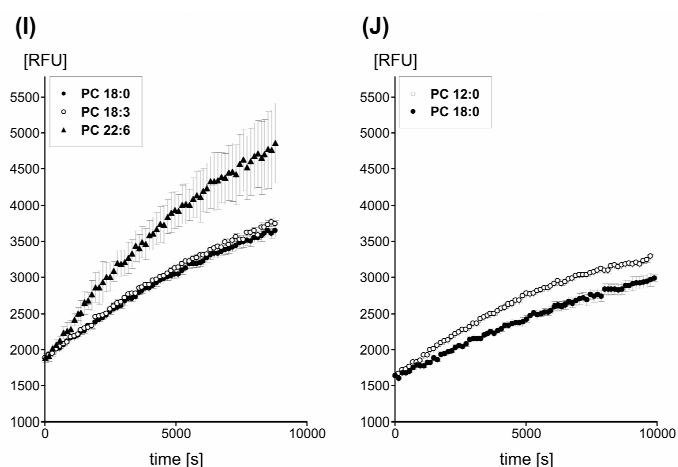


Figure S4. Specificity of α -secretase activity assay. **(A)** Specificity of α -secretase activity measurement was analyzed by adding the α -secretase inhibitors GM6001 (100 μ M), Phenanthroline (1 mM) and EDTA/EGTA (1 mM) to purified membranes of SH-SY5Y cells; **(B)** For validation of the α -secretase measurement on living SH-SY5Y cells, the sAPP α level was determined by the use of the antibody W02 as described in Ida *et al.*, 1996.

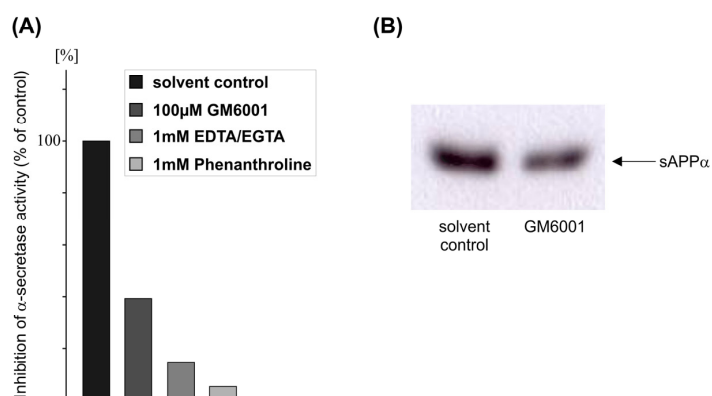
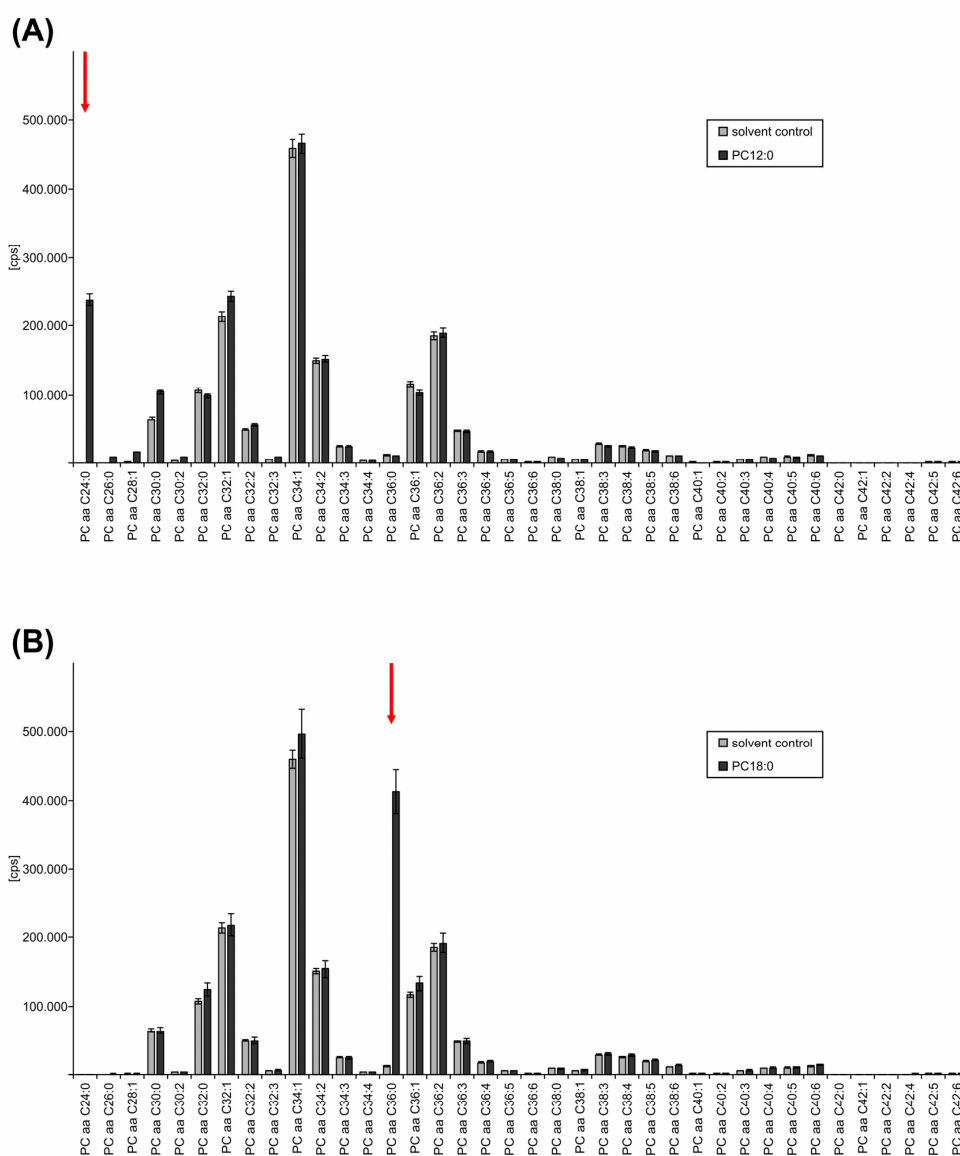
Figure S4: Specificity of α -secretase activity assay

Figure S5. Phospholipid uptake into SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were incubated with phospholipids (A) PC12:0 and (B) PC 18:0. Phospholipid uptake into SH-SY5Y cells was measured via mass spectrometry. Arrows represent specific signal for the incubated phospholipid. Additionally, the phospholipid incorporation into SH-SY5Y membranes was measured. cps (counts per second) for PC12:0 is 116,682.4 +/- 10,977.5, corresponding control is 133.8 +/- 9.9. PC18:0 is 116,111.3 +/- 8892.1 cps, the corresponding control is 2371.9 +/- 1668 cps.

Figure S5: Phospholipid uptake into SH-SY5Y cells



Statistical Analysis of Phospholipid Species on α -Secretase Activity.

Statistical analysis was performed by ANOVA test for SH-SY5Y and human brain lipid environment. F values from analysis of variance and the corresponding p-values are shown. Two-tailed Student's *t*-test was performed for analysis of FA chain length in human brain lipid environment. *p*-values determined by *post hoc* test are listed below. Additionally, mean values and SEM for each phospholipid are displayed. Effect of phospholipid species were analyzed for each method alone (first two lanes) and, additionally, in a combined data set for SH-SY5Y membranes and living cells (last lanes) and a combined data set for human brain membranes and ADAM10 in human brain lipid environment. **(S1) Effect of FA chain length** Effect of chain length was analyzed for PC 10:0 to PC 24:0 in SH-SY5Y cells, and for PC18:0 and PC12:0 in human brain lipid environment. Statistical analysis of human brain lipid environment was performed here by Student's *t*-test. **(S2) Effect of phospholipid headgroup** The effect of the headgroup on α -secretase activity was analyzed for PC / PE / PS 12:0 and 14:0 on SH-SY5Y cells and human brain lipid environment. **(S3) Effect of FA saturation** The effect of phospholipid saturation on α -secretase activity was determined for PC18:0 to PC18:3, PC20:4, PC20:5 and PC22:6 in SH-SY5Y cells and PC18:0, PC18:3, PC22:6 in human brain lipid environment. **(S4) Effect of double-bond position** The effect of phospholipid double-bond position on α -secretase activity was determined for PC18:1 Δ 9-cis and PC18:1 Δ 6 in SH-SY5Y cells.

Table S1. Effect of chain length.

SH-SY5Y	membranes (a)	ANOVA: F(7,16) = 8.77 , p < 0.001
	living cells (b)	ANOVA: F(7,76) = 32.00 , p < 0.001
	combined data (a+b)	ANOVA: F(7,92) = 33.13 , p < 0.001
human brain lipid environment	membranes (c)	ttest 2 tailed 12:0 vs 18:0 p = 0.004
	purified ADAM 10 (d)	ttest 2 tailed 12:0 vs 18:0 p = 0.011
	combined data (c+d)	ttest 2 tailed 12:0 vs 18:0 p < 0.001

Mean & SEM%:

	SH-SY5Y membranes (a)		living SH-SY5Y cells (b)		combined data (a+b)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
PC 10:0	127.71	2.23	124.75	1.30	126.02	1.25
PC 12:0	143.98	9.31	126.91	1.28	129.92	2.38
PC 14:0	127.99	11.92	103.52	1.24	114.01	6.72
PC 16:0	99.81	5.91	99.20	1.29	99.30	1.33
PC 18:0	100.00	3.20	100.00	2.29	100.00	1.98
PC 20:0	102.32	0.53	98.81	1.89	99.68	1.48
PC 22:0	98.77	1.90	100.08	2.26	99.77	1.76
PC 24:0	101.67	1.52	107.82	2.18	106.40	1.84

Table S1. Cont.

	human brain lipid environment					
	membranes (c)		purified ADAM10 (d)		combined data (c+d)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
18:0	100.00	5.69	100.00	6.40	100.00	4.99
12:0	141.86	7.55	132.01	9.60	134.97	7.05

Post-Hoc Test (p-values)

		SH-SY5Y membranes (a)	living SH-SY5Y cells (b)	combined data (a+b)
PC 10:0	PC 12.0	0.8761	1.0000	0.9996
	PC 14.0	1.0000	0.0005	0.0816
	PC 16.0	0.1178	0.0000	0.0000
	PC 18.0	0.1233	0.0000	0.0000
	PC 20.0	0.2090	0.0000	0.0000
	PC 22.0	0.0920	0.0000	0.0000
	PC 24.0	0.1808	0.0012	0.0000
PC 12:0	PC 10.0	0.8761	1.0000	0.9996
	PC 14.0	0.8918	0.0000	0.0002
	PC 16.0	0.0023	0.0000	0.0000
	PC 18.0	0.0024	0.0000	0.0000
	PC 20.0	0.0042	0.0000	0.0000
	PC 22.0	0.0018	0.0000	0.0000
	PC 24.0	0.0036	0.0000	0.0000
PC 14:0	PC 10.0	1.0000	0.0005	0.0816
	PC 12.0	0.8918	0.0000	0.0002
	PC 16.0	0.1104	0.9996	0.0005
	PC 18.0	0.1155	1.0000	0.0011
	PC 20.0	0.1966	0.9995	0.0027
	PC 22.0	0.0861	1.0000	0.0024
	PC 24.0	0.1698	0.9999	0.5795
PC 16:0	PC 10.0	0.1178	0.0000	0.0000
	PC 12.0	0.0023	0.0000	0.0000
	PC 14.0	0.1104	0.9996	0.0005
	PC 18.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 20.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 22.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 24.0	1.0000	0.0479	0.2204
PC 18:0	PC 10.0	0.1233	0.0000	0.0000
	PC 12.0	0.0024	0.0000	0.0000
	PC 14.0	0.1155	1.0000	0.0011
	PC 16.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 20.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 22.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 24.0	1.0000	0.1032	0.3777
PC 20:0	PC 10.0	0.2090	0.0000	0.0000
	PC 12.0	0.0042	0.0000	0.0000
	PC 14.0	0.1966	0.9995	0.0027
	PC 16.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 18.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 22.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 24.0	1.0000	0.1038	0.5126

Table S1. Cont.

		SH-SY5Y membranes (a)	living SH-SY5Y cells (b)	combined data (a+b)
PC 22:0	PC 10.0	0.0920	0.0000	0.0000
	PC 12.0	0.0018	0.0000	0.0000
	PC 14.0	0.0861	1.0000	0.0024
	PC 16.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 18.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 20.0	1.0000	1.0000	1.0000
	PC 24.0	1.0000	0.2539	0.4985
PC 24:0	PC 10.0	0.1808	0.0012	0.0000
	PC 12.0	0.0036	0.0000	0.0000
	PC 14.0	0.1698	0.9999	0.5795
	PC 16.0	1.0000	0.0479	0.2204
	PC 18.0	1.0000	0.1032	0.3777
	PC 20.0	1.0000	0.1038	0.5126
	PC 22.0	1.0000	0.2539	0.4985

Table S2. Effect of head group.

SH-SY5Y	membranes	FA 12:0 (a1)	ANOVA: F(2,11) = 3,29 , p = 0.076
		FA 14:0 (a2)	ANOVA: F(2,11) = 15,93 , p < 0.001
		FA combined (a1&a2)	ANOVA: F(2,25) < 1,0 , p = 0.787
	living cells	FA 12:0 (b1)	ANOVA: F(2,6) = 17.52 , p = 0.003
		FA 14:0 (b2)	ANOVA: F(2,6) = 2.49 , p = 0.163
		FA combined (b1&b2)	ANOVA: F(2,15) = 4,25 , p = 0.035
combined data membranes and living cells (a&b)		ANOVA: F(2,43) < 1,0 , p = 0.502	
human brain membranes	membranes	FA 12:0 (c1)	ANOVA: F(2,14) = 1,37 , p = 0.286
		FA 14:0 (c2)	ANOVA: F(2,6) < 1,0 , p = 0.908
		FA combined (c1&c2)	ANOVA: F(2,23) = 1,08 , p = 0.358

Mean & SEM%

	SH-SY5Y					
	membranes					
	FA 12:0 (a1)		FA 14:0 (a2)		FA combined (a1&a2)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
PC	100.00	0.66	100.00	1.89	100.00	1.15
PE	98.48	1.28	100.95	1.54	99.71	1.02
PS	93.42	2.47	116.18	3.12	101.96	4.53

	SH-SY5Y						combined living cells and membranes (a+b)	
	living cells							
	FA 12:0 (b1)		FA 14:0 (b2)		FA combined (b1&b2)			
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
PC	100.00	1.10	100.00	1.08	100.00	0.69	100.00	0.70
PE	93.63	2.75	104.99	4.04	99.31	3.35	99.58	1.25
PS	83.81	1.62	96.57	2.04	90.19	3.08	96.91	3.24

Table S2. Cont.

	human brain membranes					
	FA 12:0 (c1)		FA 14:0 (c2)		FA combined (c1&c2)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
PC	100.00	4.50	100.00	10.90	100.00	4.28
PE	109.24	3.05	105.68	3.55	107.91	2.26
PS	104.85	3.68	104.67	12.20	104.79	4.25

Post-Hoc Test (p-values)

		SH-SY5Y						
		membranes			living cells			combined data membranes and living cells (a&b)
		FA 12:0 (a1)	FA 14:0 (a2)	FA combined (a1&a2)	FA 12:0 (b1)	FA 14:0 (b2)	FA combined (b1&b2)	
PC	PE	0.935	0.978	1.000	0.170	0.555	0.997	0.998
	PS	0.128	0.001	0.936	0.003	0.785	0.058	0.639
PE	PC	0.935	0.978	1.000	0.170	0.555	0.997	0.998
	PS	0.169	0.001	0.883	0.035	0.191	0.082	0.698
PS	PC	0.128	0.001	0.936	0.003	0.785	0.058	0.639
	PE	0.169	0.001	0.883	0.035	0.191	0.082	0.698

		human brain membranes		
		FA 12:0 (c1)	FA 14:0 (c2)	FA combined (c1&c2)
PC	PE	0.322	0.971	0.410
	PS	0.761	0.983	0.756
PE	PC	0.322	0.971	0.410
	PS	0.831	1.000	0.923
PS	PC	0.761	0.983	0.756
	PE	0.831	1.000	0.923

Table S3. Effect of saturation.

SH-SY5Y	membranes (a)	ANOVA: F(6,23) = 4,95, p = 0.002
	living cells (b)	ANOVA: F(6,56) = 11,39, p < 0.001
	combined data (a+b)	ANOVA: F(6,79) = 9,77, p < 0.001
human brain lipid environment	membranes (c)	ANOVA: F(2,12) = 7,80, p = 0.007
	purified ADAM 10 (d)	ANOVA: F(2,9) = 182,87, p < 0.001
	combined data (c+d)	ANOVA: F(2,24) = 18,41, p < 0.001

Mean & SEM%

	SH-SY5Y					
	membranes (a)		living cells (b)		combined data (a+b)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
18:0	100.00	1.17	100.00	2.29	100.00	1.77
18:1	101.96	1.54	110.32	4.33	108.04	3.33
18:2	97.11	2.10	115.00	6.60	110.12	5.36
18:3	98.18	1.99	117.40	2.31	112.15	3.20
20:4	104.21	4.78	124.70	1.97	117.87	3.49
20:5	123.08	7.63	140.05	14.18	132.51	8.23
22:6	108.56	2.63	136.82	2.22	123.52	3.89

	human brain lipid environment					
	membranes (c)		purified ADAM10 (d)		combined data (c+d)	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%	Mean	SEM%
18:0	100.00	3.08	100.00	4.76	100.00	2.63
18:3	106.28	2.65	148.17	4.21	127.23	9.63
22:6	151.98	17.40	229.70	2.72	181.13	17.64

Post-Hoc Test (p-values)

		SH-SY5Y		
		membranes (a)	living cells (b)	combined data (a+b)
		18:0	18:1	1.000
	18:2	1.000	0.201	0.404
	18:3	1.000	0.068	0.142
	20:4	1.000	0.001	0.002
	20:5	0.005	0.000	0.000
	22:6	0.791	0.000	0.000
18:1	18:0	1.000	0.802	0.791
	18:2	1.000	1.000	1.000
	18:3	1.000	0.999	1.000
	20:4	1.000	0.516	0.674
	20:5	0.042	0.005	0.000
	22:6	0.996	0.003	0.026
18:2	18:0	1.000	0.201	0.404
	18:1	1.000	1.000	1.000
	18:3	1.000	1.000	1.000
	20:4	0.998	0.965	0.938
	20:5	0.006	0.033	0.002
	22:6	0.615	0.026	0.096

Table S3. Cont.

		SH-SY5Y		
		membranes (a)	living cells (b)	combined data (a+b)
18:3	18:0	1.000	0.068	0.142
	18:1	1.000	0.999	1.000
	18:2	1.000	1.000	1.000
	20:4	1.000	0.999	0.998
	20:5	0.009	0.080	0.006
	22:6	0.763	0.077	0.288
20:4	18:0	1.000	0.001	0.002
	18:1	1.000	0.516	0.674
	18:2	0.998	0.965	0.938
	18:3	1.000	0.999	0.998
	20:5	0.056	0.633	0.133
	22:6	1.000	0.754	0.993
20:5	18:0	0.005	0.000	0.000
	18:1	0.042	0.005	0.000
	18:2	0.006	0.033	0.002
	18:3	0.009	0.080	0.006
	20:4	0.056	0.633	0.133
	22:6	0.131	1.000	0.790
22:6	18:0	0.791	0.000	0.000
	18:1	0.996	0.003	0.026
	18:2	0.615	0.026	0.096
	18:3	0.763	0.077	0.288
	20:4	1.000	0.754	0.993
	20:5	0.131	1.000	0.790

		human brain lipid environment		
		membranes (c)	purified ADAM 10 (d)	combined data (c+d)
18:0	18:3	0.974	0.000	0.212
	22:6	0.007	0.000	0.000
18:3	18:0	0.974	0.000	0.212
	22:6	0.058	0.000	0.008
22:6	18:0	0.007	0.000	0.000
	18:3	0.058	0.000	0.008

Table S4. Effect of double bond position.

SH-SY5Y	membranes	ttest 2 tailed 18:1D9 (cis) vs 18:1D6, p = 0.041
	living cells	ttest 2 tailed 18:1D9 (cis) vs 18:1D6, p = 0.78

Mean & SEM%:

	SH-SY5Y			
	membranes		living cells	
	Mean	SEM%	Mean	SEM%
18:1D9 (cis)	100.00	1.76	100.00	4.40
18:1D6	106.08	0.96	101.65	4.45

Table S5. Lipid composition of membranes derived from human *post mortem* brain and SH-SY5Y cell membranes. The metabolites of the fatty acids are measured from lipid extracts of human brain and SH-SY5Y membranes. The metabolites are listed in the first lane, the Q1 and Q2 masses of the metabolites were detected by mass spectrometry. PC aa and PC ae represent both phospholipids, PC ae are plasmalogens. PC C 34:1 is set to 100%. The other phospholipid species are given in % to PC C 34:1.

PC Lipid composition of membranes derived from SH-SY5Y and human *post mortem* brains
Samples were normalized to PC aa 34:1 and PCae 34:1

Metabolite	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	SH-SY5Y Mean%	human brain Mean%	SH-SY5Y SEM%	human brain SEM%
PC aa C24:0	622.4	184	0.330	0.062	0.028	0.006
PC aa C26:0	650.5	184	1.167	0.609	0.095	0.065
PC aa C28:1	676.5	184	0.689	0.161	0.027	0.013
PC aa C30:0	706.5	184	12.592	3.486	0.063	0.025
PC aa C30:2	702.5	184	0.724	0.083	0.009	0.004
PC aa C32:0	734.6	184	24.145	32.487	0.066	0.103
PC aa C32:1	732.6	184	37.181	19.681	0.100	0.122
PC aa C32:2	730.5	184	8.300	1.437	0.025	0.010
PC aa C32:3	728.5	184	0.886	0.042	0.004	0.000
PC aa C34:1	760.6	184	100.000	100.000		
PC aa C34:2	758.6	184	26.674	5.550	0.078	0.023
PC aa C34:3	756.6	184	3.762	0.324	0.012	0.004
PC aa C34:4	754.5	184	0.411	0.098	0.008	0.002
PC aa C36:0	790.6	184	2.635	2.896	0.010	0.007
PC aa C36:1	788.6	184	27.707	29.832	0.057	0.107
PC aa C36:2	786.6	184	36.188	13.058	0.138	0.045
PC aa C36:3	784.6	184	8.385	3.885	0.041	0.018
PC aa C36:4	782.6	184	2.340	8.794	0.010	0.022
PC aa C36:5	780.6	184	0.803	0.329	0.066	0.004
PC aa C36:6	778.5	184	0.264	0.103	0.017	0.003
PC aa C38:0	818.7	184	1.311	0.349	0.005	0.003
PC aa C38:1	816.7	184	1.308	3.031	0.005	0.027
PC aa C38:3	812.6	184	5.881	2.817	0.016	0.021
PC aa C38:4	810.6	184	4.328	9.055	0.023	0.037
PC aa C38:5	808.6	184	2.940	3.979	0.149	0.050
PC aa C38:6	806.6	184	1.575	5.285	0.042	0.026
PC aa C40:1	844.7	184	0.285	0.387	0.005	0.003
PC aa C40:2	842.7	184	0.475	1.446	0.001	0.012

Table S5. Cont.

Metabolite	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	SH-SY5Y Mean%	human brain Mean%	SH-SY5Y SEM%	human brain SEM%
PC aa C40:3	840.7	184	1.333	0.365	0.006	0.003
PC aa C40:4	838.6	184	1.845	1.120	0.010	0.006
PC aa C40:5	836.6	184	1.562	1.235	0.038	0.017
PC aa C40:6	834.6	184	1.772	3.195	0.054	0.013
PC aa C42:0	874.7	184	0.172	0.088	0.009	0.001
PC aa C42:1	872.7	184	0.143	0.339	0.003	0.003
PC aa C42:2	870.7	184	0.104	0.388	0.002	0.005
PC aa C42:4	866.7	184	0.192	0.125	0.002	0.001
PC aa C42:5	864.7	184	0.214	0.094	0.004	0.002
PC aa C42:6	862.6	184	0.334	0.182	0.007	0.010
PC ae C30:0	692.6	184	5.950	2.271	0.055	0.038
PC ae C30:1	690.5	184	1.780	1.351	0.043	0.085
PC ae C30:2	688.5	184	0.298	0.404	0.023	0.036
PC ae C32:1	718.6	184	25.050	10.680	0.100	0.089
PC ae C32:2	716.6	184	4.337	0.979	0.013	0.034
PC ae C34:0	748.6	184	22.981	32.355	0.169	0.209
PC ae C34:1	746.6	184	100.000	100.000		
PC ae C34:2	744.6	184	21.120	5.621	0.121	0.084
PC ae C34:3	742.6	184	3.339	0.835	0.021	0.038
PC ae C36:0	776.7	184	3.969	8.509	0.085	0.066
PC ae C36:1	774.6	184	22.747	50.795	0.090	0.210
PC ae C36:2	772.6	184	30.646	21.567	0.145	0.111
PC ae C36:3	770.6	184	16.933	3.142	0.127	0.046
PC ae C36:4	768.6	184	6.152	5.826	0.015	0.047
PC ae C36:5	766.6	184	1.213	1.045	0.047	0.020
PC ae C38:0	804.7	184	1.953	5.212	0.032	0.046
PC ae C38:1	802.7	184	4.478	18.418	0.039	0.221
PC ae C38:2	800.7	184	8.199	13.103	0.043	0.067
PC ae C38:3	798.6	184	14.828	3.914	0.050	0.051
PC ae C38:4	796.6	184	12.293	8.464	0.066	0.097
PC ae C38:5	794.6	184	10.873	5.829	0.116	0.034
PC ae C38:6	792.6	184	6.059	3.867	0.038	0.044
PC ae C40:0	832.7	184	5.060	24.187	0.065	0.126
PC ae C40:1	830.7	184	3.664	19.827	0.269	0.397
PC ae C40:2	828.7	184	1.781	35.134	0.016	0.364
PC ae C40:3	826.7	184	4.683	3.419	0.026	0.040
PC ae C40:4	824.7	184	7.047	3.920	0.033	0.046
PC ae C40:5	822.6	184	5.952	3.069	0.033	0.037
PC ae C40:6	820.6	184	6.329	3.586	0.050	0.062
PC ae C42:0	860.8	184	1.019	3.461	0.035	0.052
PC ae C42:1	858.7	184	0.732	3.417	0.021	0.065
PC ae C42:2	856.7	184	0.616	3.967	0.020	0.097
PC ae C42:3	854.7	184	0.749	3.121	0.027	0.045
PC ae C42:4	852.7	184	0.812	0.701	0.007	0.014
PC ae C42:5	850.7	184	0.848	0.829	0.007	0.032
PC ae C44:3	882.7	184	0.416	1.058	0.039	0.021
PC ae C44:4	880.7	184	0.259	0.876	0.009	0.037
PC ae C44:5	878.7	184	0.244	1.692	0.008	0.033
PC ae C44:6	876.7	184	0.337	0.806	0.006	0.036

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

(4.2) Zusammenfassung von Publikation 2 und Beschreibung des Eigenanteils

Plasmalogens Inhibit APP Processing by Directly Affecting γ -Secretase Activity in Alzheimer's Disease

Rothhaar TL, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO

In dieser Publikation wurde der Einfluss von Plasmalogenen (PL) auf die Aktivität der γ -Sekretase untersucht. PL gehören zu den Glycerophospholipiden und sind durch eine Vinyletherbindung an der *sn1*-Position des Glycerin zwischen der polaren Kopfgruppe und den Fettsäureresten gekennzeichnet. An der *sn2*-Position des Glycerin liegt eine Esterbindung der Fettsäure vor (Braverman & Moser 2012; Fahy et al. 2005). Die Struktur von PL ist in *figure 1* der Publikation 2 im Vergleich zum korrespondierenden Phospholipid dargestellt, dieses trägt an *sn1*- und *sn2*-Position eine Esterbindung trägt und wird daher hier als Esterphospholipid bezeichnet. Im humanen Gehirn stellen PE-PL, einen Anteil von bis zu 60% des Gehaltes an Glycerophospholipiden dar, zusammengefasst in (Farooqui & Horrocks 2001).

Um zu untersuchen welche PL im humanen Gehirn verändert sind, wurde in einem ersten Schritt der Gehalt an PC-PL und PE-PL in humanen *post-mortem* Gehirnen von AD-Patienten mittels Massenspektrometrie bestimmt. Als Kontrollgruppe wurden Gehirnproben von Personen, die nicht an AD erkrankt waren, analysiert. Es konnte eine signifikante Reduktion von fast allen PC-PL Spezies im AD-Gehirn gemessen werden. Am stärksten fiel der Effekt bei PC-PL18:1 aus, daher wurde dieses PL für die folgenden Versuche ausgewählt. Zusätzlich wurden PL mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren verwendet, da diese in Neuronen des Gehirns stark vertreten sind (Sun & Sun 1972). An der *sn1*-Position der verwendeten PL war immer 18:0 gebunden. Als Kontrolle diente durchweg das korrespondierende Ester-Phospholipid. Die verwendeten Lipide verursachten keine Zytotoxizität im Zellkulturmodell. Die Spezifität der Sekretasemessungen wurde durch Einsatz von Inhibitoren kontrolliert.

Die analysierten PL bewirkten in SH-SY5Y Zellen keine Veränderung des Proteinspiegels oder der Expression der α -, β - oder γ -Sekretase. Auch die Aktivität der β -Sekretase wurde

weitestgehend nicht durch PL verändert; einzig PC-PL 20:4 verursachte in lebenden SH-SY5Y Zellen eine signifikante Reduktion der β -Sekretase Aktivität.

Im Gegensatz dazu reduzierten alle verwendeten PL signifikant die Aktivität der γ -Sekretase und damit den letzten Schritt der A β -Synthese (Haass, Schlossmacher, et al. 1992). Die Aktivität der α -Sekretase im nicht amyloidogenen Weg der APP Proteolyse wurde tendenziell erhöht, für einige PL war dieser Effekt signifikant. Die Ergebnisse wurden in 6 humanen *post-mortem* Gehirnproben von AD-Patienten verifiziert. In diesem *ex vivo* Experiment wurde demonstriert, dass die Behandlung der Gehirnproben mit PL einer Reduktion der γ -Sekretase Aktivität in 5 der 6 verwendeten Gehirnproben bewirkte.

Publikation 2 verdeutlicht, dass Veränderungen des PL-Spiegel nicht nur als Folge der AD-Pathologie auftreten können, sondern auch direkt die amyloidogene APP-Prozessierung beeinflussen.

Als Mitautor von Publikation 2 habe ich die Messung der α -Sekretase Aktivität in isolierten Membranen von SH-SY5Y Zellen und Mausgehirnen durchgeführt. Dazu habe ich die Inkubation von PNF's aus SH-SY5Y Zellen bzw. Mausgehirnen mit PL, die Isolation von Membranen, sowie die statistische Analyse der gewonnenen Daten durchgeführt (*figure 5*). Weiterhin habe ich für diese Publikation die Spezifität der α -Sekretase Messung durch Inkubation mit einem spezifischen α -Sekretase Inhibitor durchgeführt (*figure S2*).

Nachfolgend ist Publikation 2 zu finden. **Das Original der Publikation ist auf der Internetseite des Verlages Hindawi Publishing Cooperation (Kairo, Ägypten), www.hindawi.com/journals/tswj/, unter der Nummer doi:10.1100/2012/141240 oder unter der Internetseite <http://dx.doi.org/10.1100/2012/141240> zu finden.**

Research Article

Plasmalogens Inhibit APP Processing by Directly Affecting γ -Secretase Activity in Alzheimer's Disease

Tatjana L. Rothhaar,¹ Sven Grösgen,¹ Viola J. Hauptenthal,¹ Verena K. Burg,¹ Benjamin Hundsdörfer,¹ Janine Mett,¹ Matthias Riemenschneider,² Heike S. Grimm,¹ Tobias Hartmann,^{1,3,4} and Marcus O. W. Grimm^{1,3,4}

¹Experimental Neurology, Saarland University, Kirrbergerstraße, 66421 Homburg/Saar, Germany

²Psychiatry, Saarland University, Kirrbergerstraße, 66421 Homburg/Saar, Germany

³Deutsches Institut für Demenzprävention (DIDP), Universität des Saarlandes, Kirrbergerstraße, 66421 Homburg/Saar, Germany

⁴Neurodegeneration and Neurobiology, Saarland University, Kirrbergerstraße, 66421 Homburg/Saar, Germany

Correspondence should be addressed to Marcus O. W. Grimm, marcus.grimm@uks.eu

Received 10 October 2011; Accepted 30 November 2011

Academic Editor: Dietmar R. Thal

Copyright © 2012 Tatjana L. Rothhaar et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lipids play an important role as risk or protective factors in Alzheimer's disease (AD). Previously it has been shown that plasmalogens, the major brain phospholipids, are altered in AD. However, it remained unclear whether plasmalogens themselves are able to modulate amyloid precursor protein (APP) processing or if the reduced plasmalogen level is a consequence of AD. Here we identify the plasmalogens which are altered in human AD *postmortem* brains and investigate their impact on APP processing resulting in $A\beta$ production. All tested plasmalogen species showed a reduction in γ -secretase activity whereas β - and α -secretase activity mainly remained unchanged. Plasmalogens directly affected γ -secretase activity, protein and RNA level of the secretases were unaffected, pointing towards a direct influence of plasmalogens on γ -secretase activity. Plasmalogens were also able to decrease γ -secretase activity in human *postmortem* AD brains emphasizing the impact of plasmalogens in AD. In summary our findings show that decreased plasmalogen levels are not only a consequence of AD but that plasmalogens also decrease APP processing by directly affecting γ -secretase activity, resulting in a vicious cycle: $A\beta$ reduces plasmalogen levels and reduced plasmalogen levels directly increase γ -secretase activity leading to an even stronger production of $A\beta$ peptides.

1. Introduction

Plasmalogens are glycerophospholipids and major constituents of neuronal membranes. Beside human brain, where plasmalogens represent almost 20% of total glycerophospholipids, they can be found in all mammalian tissues, especially in the heart muscle [1–3]. Characteristic of plasmalogens is an enol ether double bond at the sn-1 position of the glycerol backbone (Figure 1), which makes plasmalogens more susceptible to oxidative stress than the corresponding ester-bonded glycerophospholipid, thus protecting cells from oxidative stress [4]. Beside their function as antioxidants, plasmalogens are involved in membrane fusion [5, 6], ion transport [7–9], and cholesterol efflux [10, 11]. Furthermore, plasmalogens can be hydrolyzed by plasmalogen-selective

phospholipase A2 [3, 12], generating fatty acids like arachidonic acid, which is important for modulating ion channels, regulating different enzyme activities like protein kinase A, protein kinase C, NADPH oxidase, Na^+K^+ -ATPase, and others [13]. Arachidonic acid released from plasmalogens can be metabolized to eicosanoids, acting as second messengers [14]. Due to the fact that plasmalogens represent major constituents of neuronal membranes and are involved in different cellular processes, it is not unexpected that neuronal function also depends on a delicate balance in lipid composition of cellular membranes. Alterations of plasmalogen levels occur in several neurological disorders including Alzheimer's disease (AD) [15–17], spinal cord trauma [18], ischemia [19, 20], Niemann-Pick disease [21], and multiple sclerosis [22]. For AD, plasmalogen levels have been described to be

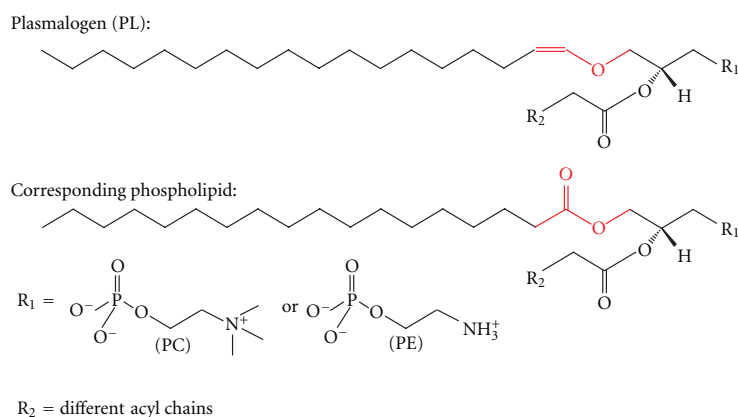


FIGURE 1: Structure of plasmalogen (PL) and the corresponding phospholipid used in this study. In the plasmalogens, the fatty acid is linked via an enol ether bond instead of an ester bond marked in red. Residue 1 (R₁) can either be a phosphatidylcholine or a phosphatidylethanolamine leading to PC-plasmalogen or PE-plasmalogen. The sn-2 position can vary in different fatty acids symbolized by residue 2 (R₂).

reduced in autopsy brain samples from AD patients compared to age-matched control brains [15–17, 23, 24]. However, Pettegrew et al. reported no differences or even a slight increase in AD patients [25]. One of the characteristic pathological hallmarks of AD is the massive accumulation of a small peptide, called amyloid beta peptide ($A\beta$) that aggregates in amyloid plaques [26, 27]. $A\beta$ is generated by sequential processing of the amyloid precursor protein (APP), a type I integral membrane protein [28]. For the generation of $A\beta$, APP is first cleaved by β -secretase BACE1, a membrane-bound aspartyl-protease [29], generating β -secreted APP (sAPP β), and a C-terminal membrane-bound fragment, called C99 or β -CTF. C99 is further processed by γ -secretase, releasing the $A\beta$ peptide. The γ -secretase has been identified as a multimeric complex of at least four transmembrane proteins, presenilin 1 (PS1) or presenilin 2 (PS2), nicastrin, anterior pharynx-defective 1 (Aph-1), and presenilin enhancer 2 (Pen-2) [30]. The polytopic transmembrane proteins PS1 or PS2 constitute the active site of the protease [31]. Beside the amyloidogenic processing of APP involving β - and γ -secretase activity, APP can be cleaved in a nonamyloidogenic pathway by α -secretases [32, 33]. The α -secretases have been identified as members of the ADAM family (a disintegrin and metalloproteinase), cleaving APP within the $A\beta$ domain and therefore prevent the formation of $A\beta$ [33–35]. As APP and its processing secretases are all integral membrane proteins, we analyzed in this study whether plasmalogens, major components of neuronal membranes, influence amyloidogenic and nonamyloidogenic processing of APP.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents. All phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine species used in this study were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

Bovine serum albumin was purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). All other reagents if not otherwise stated were purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany).

2.2. Cell Culture. SH-SY5Y cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Taufkirchen, Germany) with 10% FCS (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). For incubation phospholipids solved in ethanol p.a. (Sigma, Taufkirchen, Germany) were added in a final concentration of 100 μM to culture media with 0.1% FCS. Incubation was carried out for 24 h with changing incubation medium with phospholipids after 12 h. Lactate Dehydrogenase-assay analysis revealed no signs for elevated cytotoxicity or reduced membrane integrity in presence of phospholipids (which is available at doi:10.1100/2012/141240).

2.3. Brain Samples. In total, 58 human *postmortem* brain samples from 21 control and 37 Alzheimer's disease patients were used. For more details, see Table 1. Furthermore, for *ex vivo* analysis of γ -secretase activity postnuclear fractions from further 6 human *postmortem* brains obtained from confirmed AD patients were utilized. All human *postmortem* brains were obtained from BrainNet (Munich, Germany). In addition, postnuclear fractions from C57Bl6/N wild-type mice were used. Preparation of postnuclear fractions is described in detail below.

2.4. Protein Amount Determination. All samples, including human *postmortem* brains and cells, were homogenized on ice using a PotterS (Braun, Melsungen, Germany) at 1500 revolutions per minute and 50 strokes. Protein determination was carried out according to Smith et al. [37]. Briefly, 20 μL of bovine serum albumin in a concentration range of 0.1–1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were used for determination of the standard curve. For determination of samples' protein amount, 1–2 μL of each sample was loaded in triplicate onto a 96 well

TABLE 1: List of all human brains ($n = 58$) used for analysis. Human brain samples were kindly provided from BrainNet (Munich). In total, we used 58 human brain samples from 21 control and 37 AD patients. Brains were obtained from patients with an age at death between 61 and 88 years, and no significant differences in age and gender were observed between control (mean 75 years) and AD patients (mean 78 years) group. Abbreviations used are AD = Alzheimer's disease; F = female; M = male; CERAD = the consortium to establish a registry for AD, standardizing procedures for the evaluation and diagnosis of patients with AD. A, B, C, 0 as described in <http://cerad.mc.duke.edu/>; Braak and Braak = Braak and Braak stage of AD; H. Braak and E. Braak stages [36]; FR = frontal cortex; n.d. = not determined.

#	Age at death	Sex	Diagnosis	Postmortem delay [h]	Braak and Braak	CERAD	Brain region
Con #01	69	n.d.	Control	14	n.d.	n.d.	n.d.
Con #02	77	F	Control	n.d.	II	A	FR
Con #03	61	M	Control	24	0	0	FR
Con #04	85	F	Control	20	I	0	FR
Con #05	80	F	Control	n.d.	III-IV	0	FR
Con #06	75	M	Control	27	II	0	FR
Con #07	71	M	Control	23	0-I	0	FR
Con #08	79	n.d.	Control	20	n.d.	n.d.	n.d.
Con #09	62	n.d.	Control	48	n.d.	n.d.	n.d.
Con #10	88	F	Control	48	I-II	B	FR
Con #11	64	n.d.	Control	15	n.d.	n.d.	n.d.
Con #12	69	n.d.	Control	30	n.d.	n.d.	n.d.
Con #13	83	F	Control	22	II	0	FR
Con #14	74	n.d.	Control	23	n.d.	n.d.	n.d.
Con #15	85	M	Control	25	III-IV	B	FR
Con #16	76	F	Control	26	III-IV	C	FR
Con #17	87	M	Control	48	I-II	0	FR
Con #18	71	n.d.	Control	48	n.d.	n.d.	n.d.
Con #19	75	F	Control	24	III-IV	B	FR
Con #20	77	F	Control	20	II	C	FR
Con #21	63	M	Control	18	I	0	FR
AD #01	83	M	AD	22	VI	C	FR
AD #02	78	F	AD	21	VI	C	FR
AD #03	76	M	AD	14	V	B	FR
AD #04	88	F	AD	39	VI	C	FR
AD #05	67	F	AD	49	V-VI	C	FR
AD #06	82	F	AD	33	V	C	FR
AD #07	80	M	AD	12	V	C	FR
AD #08	75	M	AD	24	VI	C	FR
AD #09	74	M	AD	50	V-VI	C	FR
AD #10	83	M	AD	37,5	VI	C	FR
AD #11	80	M	AD	13	V	C	FR
AD #12	88	F	AD	36	V	C	FR
AD #13	73	M	AD	24	V-VI	C	FR
AD #14	62	M	AD	n.d.	VI	C	FR
AD #15	70	M	AD	39	VI	C	FR
AD #16	81	n.d.	AD	n.d.	n.d.	n.d.	FR
AD #17	75	F	AD	12	VI	C	FR
AD #18	73	n.d.	AD	n.d.	n.d.	n.d.	FR
AD #19	78	F	AD	n.d.	V-VI	C	FR
AD #20	79	n.d.	AD	18	>V	C	FR
AD #21	86	n.d.	AD	42	>V	C	n.d.
AD #22	85	F	AD	n.d.	IV	C	FR
AD #23	75	n.d.	AD	18	VI	C	n.d.
AD #24	80	F	AD	48	V	C	FR
AD #25	73	F	AD	n.d.	V-VI	C	FR
AD #26	85	F	AD	n.d.	III	C	FR

TABLE 1: Continued.

#	Age at death	Sex	Diagnosis	Postmortem delay [h]	Braak and Braak	CERAD	Brain region
AD #27	80	n.d.	AD	5	>V	C	n.d.
AD #28	78	F	AD	n.d.	VI	C	FR
AD #29	87	M	AD	4	V	C	FR
AD #30	65	F	AD	48	V-VI	C	FR
AD #31	82	F	AD	14	V-VI	C	FR
AD #32	76	F	AD	24	V-VI	C	FR
AD #33	79	F	AD	20	V	C	n.d.
AD #34	87	M	AD	26	V	C	FR
AD #35	68	F	AD	n.d.	VI	C	FR
AD #36	85	n.d.	AD	n.d.	n.d.	n.d.	FR
AD #37	83	M	AD	48	V	C	FR

plate (Nunc, Langensfeld, Germany). 200 μ L of reagent buffer (CuSO₄:bichinchonic acid; 1:39; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was added to each well using a multi-channel pipette (Eppendorf, Hamburg, Germany). Incubation took place for 15 minutes at 37°C and afterwards for further 15 minutes at room temperature while shaking (IKA, Staufen, Germany) at 300 revolutions per minute. Absorbance was measured at a wavelength of 560 nm using a MultiscanEX (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany).

2.5. Western Blot Analysis. For detection of ADAM17, PS1 and BACE1 protein amount, proteins of cell lysate were separated on 10%–20% Tricine gels (Anamed, Groß-Bieberau, Germany). Western Blot (WB) analysis was performed using antibody ab39162 (1:5000; abcam, Cambridge, UK), sc-7860 (1:500; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), and B0806 (1:1000; Sigma, Taufkirchen, Germany) respectively. W401B (1:10000; Promega, Mannheim, Germany) was used as secondary antibody, and detection was carried out using Western Lightning Plus-ECL solution (Perkin Elmer, Rodgau, Germany). Densitometric quantification was performed using Image Gauge software.

2.6. Postnuclear Fractions. For preparing postnuclear fractions (PNFs) SH-SY5Y wild-type cells, mouse brains or human AD brains were washed with PBS and homogenized in sucrose-buffer (pH 7.4) using a PotterS (Braun, Melsungen, Germany) at maximum speed. Protein amount was adjusted to 2 mg/mL for β - and γ -secretase assay and to 1 mg/mL for measuring α -secretase activity. After centrifugation at 900 rcf for 10 min at 4°C supernatants were collected and stored at –80°C.

2.7. In Vitro Incubation. PNFs were warmed up at 37°C, and phospholipids solved in ethanol p.a. were added in a final concentration of 100 μ M. Samples were incubated while shaking (Multireax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) for 15 min at 37°C before being centrifuged at 55.000 rpm for 75 min at 4°C for pelleting membranes.

2.8. Secretase Activities

α -Secretase Activity. Pelleted SH-SY5Y membranes were resuspended in 1 mL, and purified mouse brain membranes were resuspended in 2 mL Hepes-buffer pH 7.5. For solubilisation, samples were passed through needles (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with decreasing diameters. Samples were dispensed in triplicate onto a black 96-well plate using 100 μ L per well corresponding to 100 μ g for SH-SY5Y and 50 μ g for mouse brain membranes. After adding 3 μ M α -secretase-substrate (Calbiochem, Darmstadt, Germany), fluorescence was detected with excitation wavelength at 340 \pm 10 nm and emission wavelength at 490 \pm 10 nm using Safire² Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany). Kinetic was plotted for 120 cycles with kinetic intervals of 120 s. For specificity control, 10 mM EDTA/EGTA was used (supplement Figure S2).

β - and γ -Secretase Activities. Pelleted membranes were resuspended in 800 μ L sucrose-buffer for SH-SY5Y membranes and 400 μ L for mouse brain and human AD brain membranes. Membranes were solubilized as described above. For analysing γ -secretase activity, samples were dispensed in triplicate on black 96-well plates (Corning, Lowell, MA, USA) using 100 μ L per well corresponding to 250 μ g for SH-SY5Y membranes and 500 μ g for mouse and human brain membranes. After adding 10 μ M γ -secretase substrate (Calbiochem, Darmstadt, Germany), fluorescence was measured with excitation wavelength 355 \pm 10 nm and fluorescence detection at 440 \pm 10 nm in a Safire² Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany) at 37°C under light exclusion. Kinetics were plotted for 50 cycles with kinetic intervals of 180 s. For determination of assay specificity, we used γ -secretase Inhibitor X (50 μ M) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) (supplement Figure S3). For measuring β -secretase activity, samples were dispensed in triplicate on black 96 well plates (50 μ L per well corresponding to 125 μ g for SH-SY5Y membranes and 250 μ g for mouse brain membranes). β -secretase substrate (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added with a final concentration of 20 μ M

and fluorescence was detected with an excitation wavelength at 345 ± 5 nm and emission wavelength at 500 ± 2.5 nm under light exclusion at 37°C . Kinetics were plotted for 180 cycles with kinetic intervals of 60 s. Assay specificity was validated using β -secretase Inhibitor II ($1 \mu\text{M}$) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) (supplement Figure S4). For all secretase assays, the unspecificity was between 10% to 30%. The secretase activities presented, were calculated by subtracting the unspecific turnover determined by adding secretase inhibitors.

2.9. Mass Spectrometry Analysis. For determination of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine levels in human control and AD brains, we used a 4000 quadrupole linear-ion trap (QTrap) equipped with a Turbo-V ion source (AB SCIEX, Darmstadt, Germany) connected to a 1200 Agilent HPLC (Agilent, Böblingen, Germany). Briefly, samples were adjusted to 6 mg/mL protein amount and $10 \mu\text{L}$ of the adjusted samples was pipetted onto a membrane (Whatman, GE Healthcare, Freiburg, Germany) fixed in the wells of a MultiScreen, solvintert 96-well plate with a $0.45 \mu\text{m}$ sterile filter at the bottom (Millipore, Schwalbach, Germany). This 96 well plate was placed onto a 1 mL 96-well deep well plate (Nunc, Langenselbold, Germany). Samples were dried under a gentle flow of nitrogen for at least 30 min at room temperature. Meanwhile, phenylisothiocyanate was diluted in ethanol:water:pyridine (1:1:1; v/v/v) to obtain a final 5% phenylisothiocyanate solution. $20 \mu\text{L}$ of this solution was pipetted onto each membrane, and the plate was incubated for 20 min at room temperature and afterwards dried under a gentle flow of nitrogen for at least 30 min. Samples were extracted using $300 \mu\text{L}$ 5 mM ammonium acetate buffer in methanol using a multichannel pipette (Eppendorf, Germany) and the plate was shaken at 300 revolutions per minute using a plate shaker (IKA, Staufen, Germany) at room temperature for 30 min. Samples were centrifuged (Thermo Scientific, Langenselbold, Germany) at $500 \times g$ for 2 min through $0.45 \mu\text{m}$ sterile filters into the 96 deep well plate and further diluted with $600 \mu\text{L}$ of 5 mM ammonium acetate dissolved in methanol:water (97:3, v/v) which also was used as the only running solvent. Finally plate was covered with a silicone mat and shook for further 2 min at 300 rpm at room temperature. Plate was placed into the cooled autosampler and detection was carried out using Analyst 1.5 software (AB SCIEX, Darmstadt, Germany). Phosphatidylcholine species were detected using MRM transitions (PCae C34:1: 746,6 m/z – 184 m/z; PCae C36:4: 768,6 m/z – 184 m/z; PCae C36:2: 772,6 m/z – 184 m/z; PCae C36:1: 774,6 m/z – 184 m/z; PCae C38:6: 792,6 m/z – 184 m/z; PCae C38:5: 794,6 m/z – 184 m/z; PCae C38:4: 796,6 m/z – 184 m/z; PCae C40:6: 820,6 m/z – 184 m/z), and phosphatidylethanolamine species were detected using a neutral loss scan for 141 m/z (PEae 36:4: 728,8 m/z; PEae 36:2: 732,8 m/z; PEae 38:6: 752,8 m/z; PEae 38:5: 754,8 m/z; PEae 38:4: 756,8 m/z; PEae 40:6: 780,8 m/z). For both species detection, $20 \mu\text{L}$ sample was injected into sample loop with the following running solvent gradient (0.0–2.4 min, $30 \mu\text{L}$; 2.4–3.0 min, $200 \mu\text{L}$; 3.0 min, $30 \mu\text{L}$).

2.10. Quantitative Real-Time Experiments. RNA was extracted in total from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), according to manufacturer's protocols. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) was used to reverse-transcribe $2 \mu\text{g}$ total RNA. Quantitative real-time PCR analysis was carried out using Fast SYBR Green Master Mix on 7500 Fast Real-Time PCR System (7500 Fast System SDS Software 1.3.1.; Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). All results were normalized to β -actin gene expression and changes detected in gene expression were calculated using $2^{-(\Delta\Delta\text{Act})}$ method [38]. The following primer sequences were used: *ADAM17*: 5'-CTG TGT GCC CTA TGT CGA TG-3' and 5'-CAG CTG GTC AAT GAA ATC CC-3'; *BACE1*: 5'-GCA GGG CTA CTA CGT GGA GA-3' and 5'-TAG TAG CGA TGC AGG AAG GG-3'; *PSEN1*: 5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3' and 5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3'; *PSEN2*: 5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3' and 5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3'; *APH1a*: 5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3' and 5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3'; *APH1b*: 5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3' and 5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3'; *NCSTN*: 5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3' and 5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3'; *PSENIEN*: 5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3' and 5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3'; β -Actin: 5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3' and 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'. To verify the results obtained by quantitative real time experiments, samples were separated on 3% agarose gels in TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH8.0).

2.11. Cytotoxicity Measurement. Cytotoxicity was measured utilizing Lactate Dehydrogenase Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) according to manufacturer's protocol.

2.12. Statistical Analysis. All quantified data presented here is based on an average of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean. Statistical significance was determined by two-tailed Student's *t*-test; significance was set at $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$ and $***P \leq 0.001$.

3. Results

3.1. Determination of PC-PL and PE-PL Levels in Human AD Postmortem Brain. In our previous studies, we reported a decrease in total phosphatidylethanolamine-plasmalogen (PE-PL) [39] and some phosphatidylcholine-plasmalogen (PC-PL) species [40] in *postmortem* AD brains. To elucidate the question which plasmalogen species are mostly changed in AD, we determined in this study the major PE-PL and PC-PL species. In total, we analyzed 58 human brain samples, 21 control brains with an average age of 75 years, and 37 brain samples obtained from AD patients with an average age of 78 years (Table 1). There were no significant differences in the age and sex of AD patients and controls. Mass spectrometry analysis revealed that PC-PL levels were significantly reduced

TABLE 2: Analyzed PC-PL and PE-PL species in human AD *postmortem* brains compared to healthy individuals. Levels of all analyzed PC-PL and PE-PL species were reduced in human AD *postmortem* brains. Statistical significance was determined by two-tailed Students *t*-test. SEM = standard deviation of the mean.

Metabolite	% (compared to control)	SEM	<i>t</i> -test
PC-PL 16:0/18:1 (PC-PL 34:1)	64,55	1,654	0,0011
PC-PL 18:0/18:1 (PC-PL 36:1)	68,93	1,814	0,0005
PC-PL 18:1/18:1 (PC-PL 36:2)	49,17	1,452	0,0007
PC-PL 16:0/20:4 (PC-PL 36:4)	81,56	2,681	0,0483
PC-PL 18:0/20:4 (PC-PL 38:4)	85,02	1,930	0,0051
PC-PL 18:1/20:4 (PC-PL 38:5)	84,58	3,744	0,1105
PC-PL 16:0/22:6 (PC-PL 38:6)	88,21	2,925	0,0735
PC-PL 18:0/22:6 (PC-PL 40:6)	88,99	2,388	0,0184
PE-PL 18:1/18:1 (PE-PL 36:2)	83,18	7,252	0,2152
PE-PL 16:0/20:4 (PE-PL 36:4)	78,67	7,181	0,1631
PE-PL 18:0/20:4 (PE-PL 38:4)	80,55	6,795	0,1540
PE-PL 18:1/20:4 (PE-PL 38:5)	93,96	6,194	0,5656
PE-PL 16:0/22:6 (PE-PL 38:6)	94,07	6,250	0,5752
PE-PL 18:0/22:6 (PE-PL 40:6)	86,24	5,190	0,2049

TABLE 3: RT-PCR analysis of α -secretase ADAM17, the γ -secretase components and β -secretase BACE1 in presence of PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 compared to the corresponding phospholipids PC 18:1 and PC 20:4 as control. The abbreviations set are ADAM17 = α -secretase, PSEN1 = presenilin1, PSEN2 = presenilin2, APH1a = anterior pharynx-defective 1a, APH1b = anterior pharynx-defective 1b, NCSTN = nicastrin, PSENEN2 = presenilin enhancer 2, and SEM = standard deviation of the mean. Statistical significance was determined by two-tailed Student's *t*-test.

	Gene	% (compared to control)	SEM	<i>t</i> -test	
PC-PL 18:0/18:1	α -secretase	ADAM17	110,65	17,775	0,5658
		PSEN1	96,32	11,721	0,7574
		PSEN2	103,59	13,585	0,7981
	γ -secretase	APH1a	87,01	23,043	0,5884
		APH1b	106,43	18,578	0,7380
		NCSTN	87,42	20,414	0,5548
		PSENEN2	108,75	14,912	0,5734
	β -secretase	BACE1	104,24	22,534	0,8554
	PC-PL 18:0/20:4	α -secretase	ADAM17	90,44	4,919
PSEN1			94,97	9,865	0,6162
PSEN2			110,28	10,516	0,3568
γ -secretase		APH1a	86,45	8,927	0,1676
		APH1b	92,58	12,544	0,5707
		NCSTN	85,93	8,304	0,1287
		PSENEN2	98,99	7,433	0,8949
β -secretase		BACE1	92,90	9,413	0,4607

in AD *postmortem* brains compared to healthy individuals, whereas PC-PL 18:1/18:1 showed the strongest reduction to 49,17% (Table 2). PE-PL levels were also reduced; however, changes in individual species were not significant (Table 2). However, the question whether a reduced plasmalogen level is caused by AD or plasmalogens themselves affect AD by directly affecting APP processing remained unclear and is addressed by the following experiments. As PC-PL 18:1 showed the strongest reduction in AD *postmortem* brains, we mainly focused on this lipid species and verified our results with PC-PL 20:4, PC-PL 22:6 or PE-PL 22:6.

3.2. Plasmalogens Do Not Affect Gene Expression of α -, β -, and γ -Secretase. In order to analyze whether plasmalogens affect APP cleavage by modulating gene expression of the secretases involved in the nonamyloidogenic and amyloidogenic processing of APP, we performed RT-PCR analysis of ADAM17, BACE1, and the components of the γ -secretase complex, PS1, PS2, Aph1a, Aph1b, nicastrin, and Pen-2 (Table 3). Therefore, cultured cells were incubated with the plasmalogens PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4, respectively. Control cells were incubated with the corresponding phospholipid. As cellular system, we used the human neuroblastoma cell

line SH-SY5Y. Significant changes in gene expression of ADAM17, BACE1, and the γ -secretase components were not observed, neither for PC-PL 18:1 nor for PC-PL 20:4 (Table 3). In accordance, total protein level of ADAM17, PS1 and BACE1 were not affected in presence of PC-PL 18:1 or PC-PL 20:4 (Figures 2(a) and 2(b)).

3.3. Influence of Plasmalogens on β -Secretase Activity. Cleavage of APP by β -secretase BACE1 is the initial step in the amyloidogenic processing of APP and the generation of A β peptides. To examine whether plasmalogens influence β -secretase activity directly, we first prepared purified membranes of SH-SY5Y cells, incubated these membranes with different plasmalogens and measured β -secretase activity with a fluorescent β -secretase assay [41, 42]. PC-PL 18:1 and PC-PL 22:6 slightly directly reduced β -secretase activity, whereas PC-PL 20:4 and PE-PL 22:6 revealed no effect on β -secretase activity (Figure 3(a)). To analyze a potential direct effect of plasmalogens on β -secretase activity *ex vivo*, we prepared purified membranes of mouse brains for directly measuring β -secretase activity. PC-PL 18:1 as well as PC-PL 20:4 showed slightly, however, not significant decreased β -secretase activity in purified membranes of mouse brains (Figure 3(b)). To validate these results, we incubated living SH-SY5Y cells in culture with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4, purified the membranes of the incubated cells and determined β -secretase activity. The β -secretase activity was not significantly affected in presence of plasmalogen PC-PL 18:1, whereas PC-PL 20:4 slightly reduced β -secretase activity (Figure 3(c)).

3.4. Plasmalogens Reduce Amyloidogenic Processing by Affecting γ -Secretase Activity. As described above, we observed not or only slightly reduced β -secretase activity in the presence of plasmalogens, indicating that the initial step in the generation of A β is not or only slightly affected by plasmalogens. To evaluate a potential effect of plasmalogens on the final step in the generation of A β peptides, we analyzed the effect of plasmalogens on γ -secretase activity. Similar to the experiment for the determination of β -secretase activity, we first incubated purified membranes of SH-SY5Y cells with different plasmalogens, PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6, and PE-PL 22:6, and directly measured γ -secretase activity. All analyzed plasmalogens PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6, and PE-PL 22:6 significantly reduced γ -secretase activity (Figure 4(a)). The strongest effect was observed for PC-PL 22:6, which reduced γ -secretase activity to 60%. In agreement with these findings, PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 also significantly reduced γ -secretase activity of *ex vivo* purified membranes from mouse brains to 80% (Figure 4(b)). Similar results were obtained when SH-SY5Y cells were cultured in presence of PC-PL 18:1 or PC-PL 20:4 (Figure 4(c)).

3.5. Influence of Plasmalogens on α -Secretase Activity. In contrast to β -secretase cleavage of APP which generates the N-terminus of A β , APP shedding by α -secretase prevents the formation of toxic A β peptides, because α -secretase cleaves

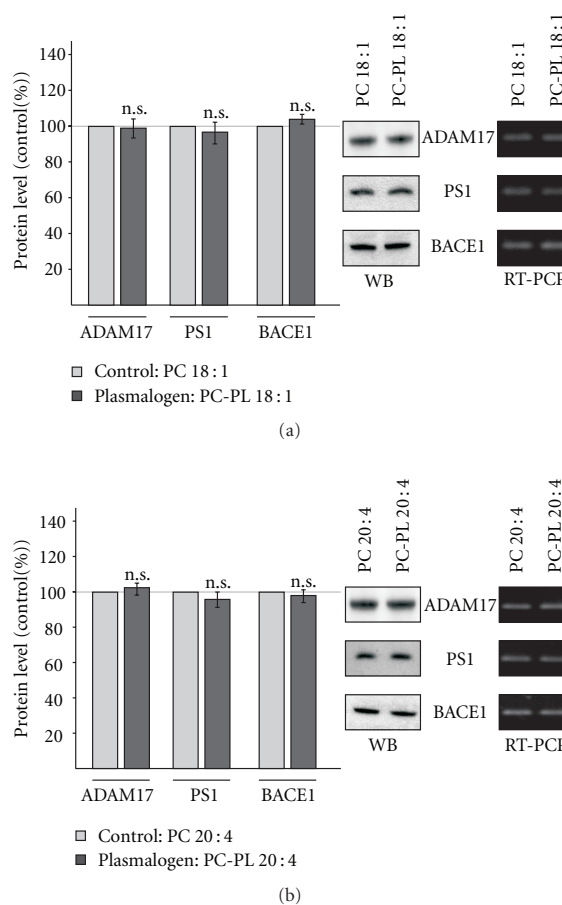


FIGURE 2: Protein level of the secretases involved in APP processing. (a) SH-SY5Y cells were incubated with PC-PL 18:1 and the corresponding phospholipid PC 18:1. Cell lysates were prepared, subjected to gel electrophoresis and Western blot (WB) analysis. Protein level of ADAM17, PS1, and BACE1 were detected with antibodies ab39162, sc-7860 and B0806, respectively. (b) Effect of PC-PL 20:4 on protein level of ADAM17, PS1, and BACE1 compared to the corresponding phospholipid PC 20:4. Detection was performed as described for (a). All quantified data represent an average of at least three independent experiments. Error bars represent standard deviation of the mean. Asterisks show the statistical significance (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$, n.s. = not significant). (a, b) Representative WBs of protein determination and representative agarose gels of RT-PCR analysis are shown.

APP within the A β domain [32, 33, 43]. In order to evaluate whether plasmalogens also affect nonamyloidogenic processing of APP, we directly measured α -secretase activity in purified membranes of SH-SY5Y cells and mouse brains. Plasmalogens PC-PL 18:1 and PC-PL 22:6 showed no effect on α -secretase activity, whereas PC-PL 20:4 and PE-PL 22:6 significantly increased α -secretase activity by 10% to 20% (Figure 5(a)) in purified membranes of SH-SY5Y cells. However, α -secretase activity was not significantly elevated for any

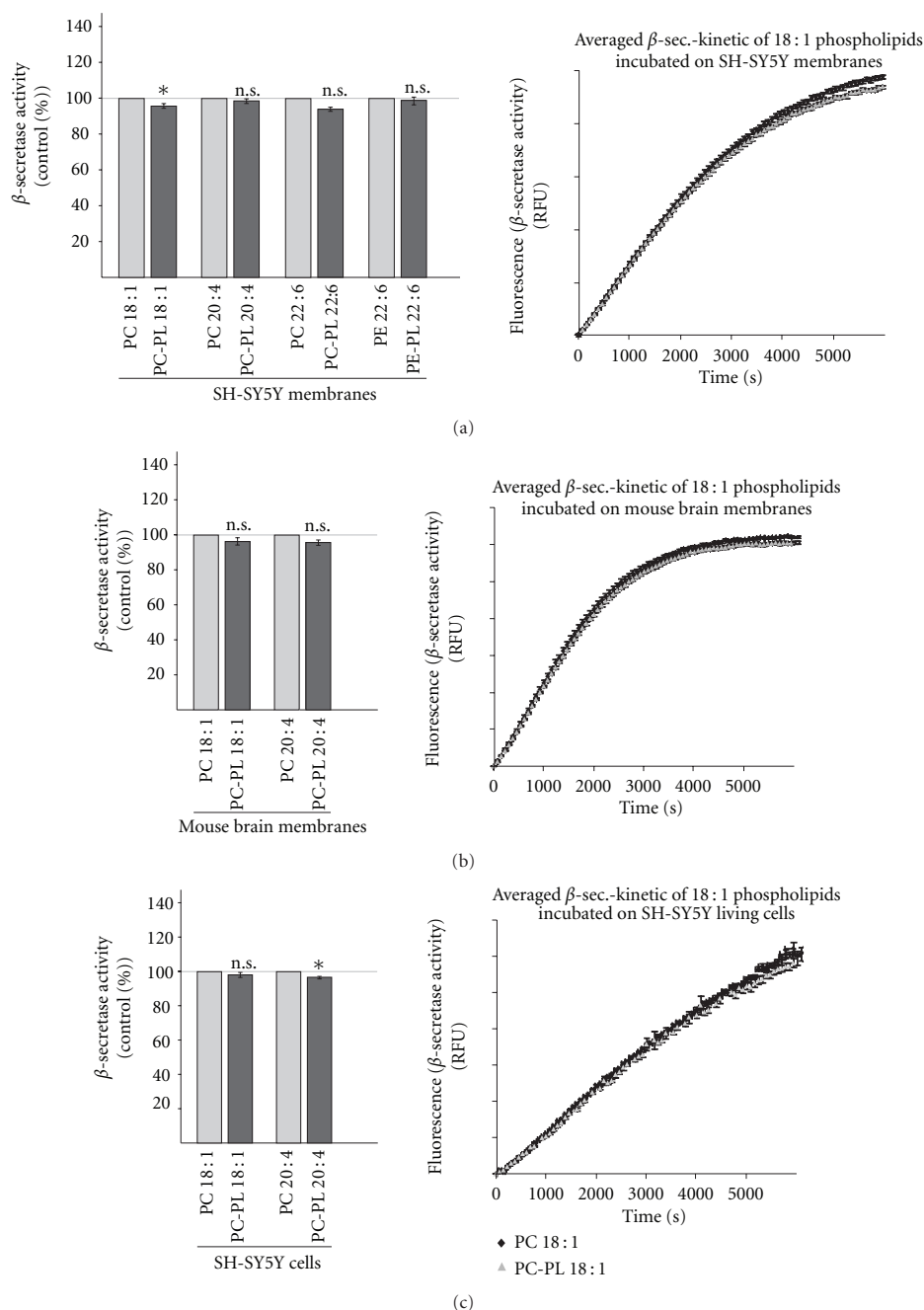


FIGURE 3: Effect of PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6 and PE-PL 22:6 on β -secretase activity. (a) Influence on β -secretase activity in purified membranes of human SH-SY5Y cells. Purified membranes of SH-SY5Y cells were prepared, incubated with PC-PL 18:1, 20:4, 22:6, or PE-PL 22:6 and the corresponding phospholipids ($100\ \mu\text{M}$), and β -secretase activity was determined by a fluorometric assay. A representative kinetic is shown for PC-PL 18:1 and PC 18:1. (b) Influence on β -secretase activity *ex vivo* in purified membranes of mouse brains. Purified membranes of mouse brains were incubated with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and the corresponding phospholipids PC 18:1 and PC 20:4 ($100\ \mu\text{M}$). A representative kinetic is shown for PC-PL 18:1 and PC 18:1. (c) Living SH-SY5Y cells were incubated in cell culture with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and the corresponding phospholipids in a final concentration of $100\ \mu\text{M}$ for 24 hours. After the incubation, purified membranes were prepared and analyzed in the β -secretase assay. A representative kinetic is shown for PC-PL 18:1 and PC 18:1. (a, b, c) All quantified data represent an average of at least three independent experiments. Illustration and statistical significance are as described for Figure 2.

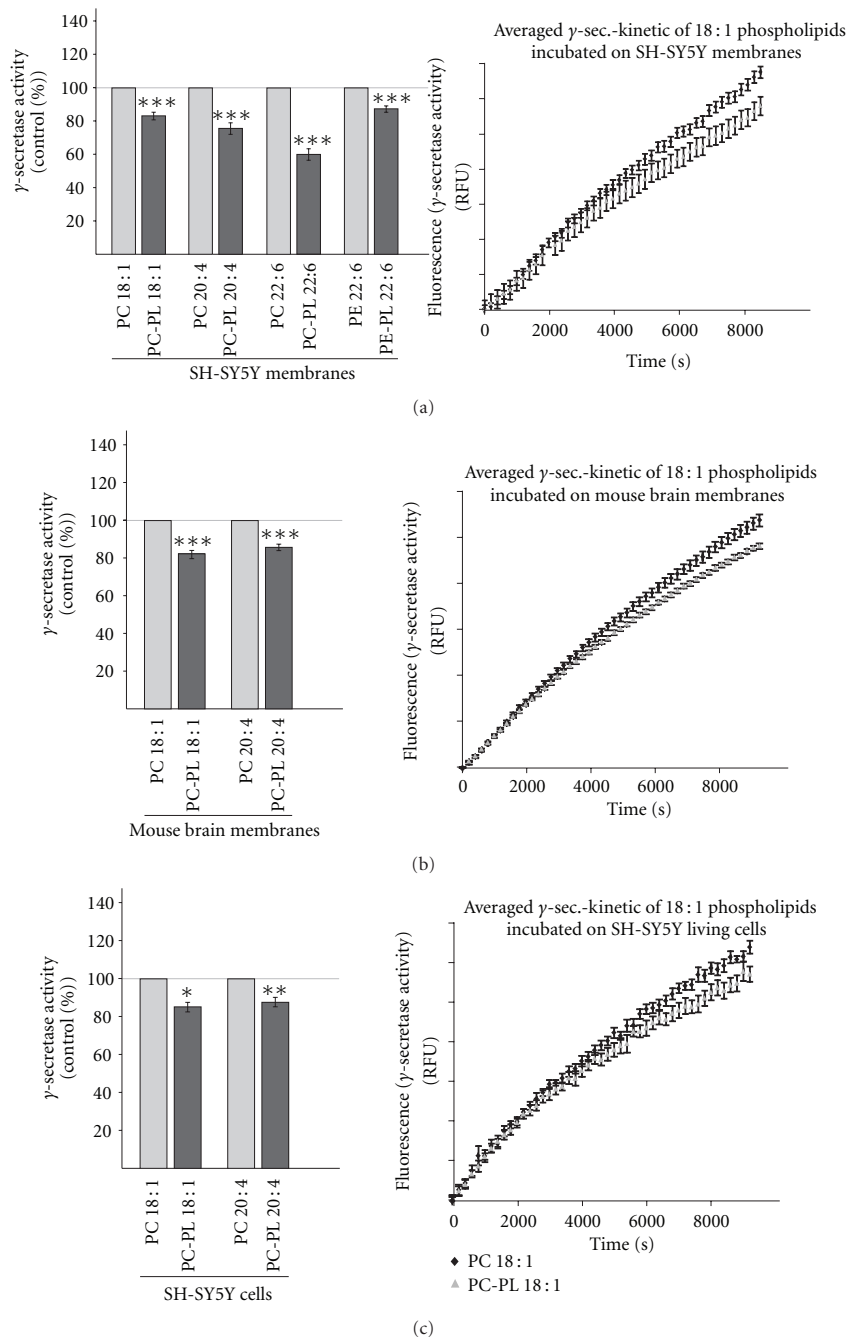


FIGURE 4: Determination of γ -secretase activity in the presence of PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6, and PE-PL 22:6. (a) Influence on γ -secretase activity in purified membranes of human SH-SY5Y cells. Purified membranes of SH-SY5Y cell were incubated with PC-PL 18:1, 20:4, 22:6, or PE-PL 22:6 and the corresponding phospholipids (100 μ M), and γ -secretase activity was determined by a fluorometric assay. (b) Influence on γ -secretase activity *ex vivo* in purified membranes of mouse brains. Purified mouse brain membranes were incubated with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and the corresponding phospholipids (100 μ M), and γ -secretase activity was determined. (c) Cultured SH-SY5Y cells were incubated with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and the corresponding phospholipids PC 18:1 and PC 20:4 for 24 hours in a final concentration of 100 μ M. Membranes of incubated SH-SY5Y cells were prepared and γ -secretase activity was determined with a fluorometric assay. (a, b, c) Representative kinetics are shown for PC-PL 18:1 and PC 18:1. All quantified data represent an average of at least three independent experiments. Illustration and statistical significance are as described for Figure 2.

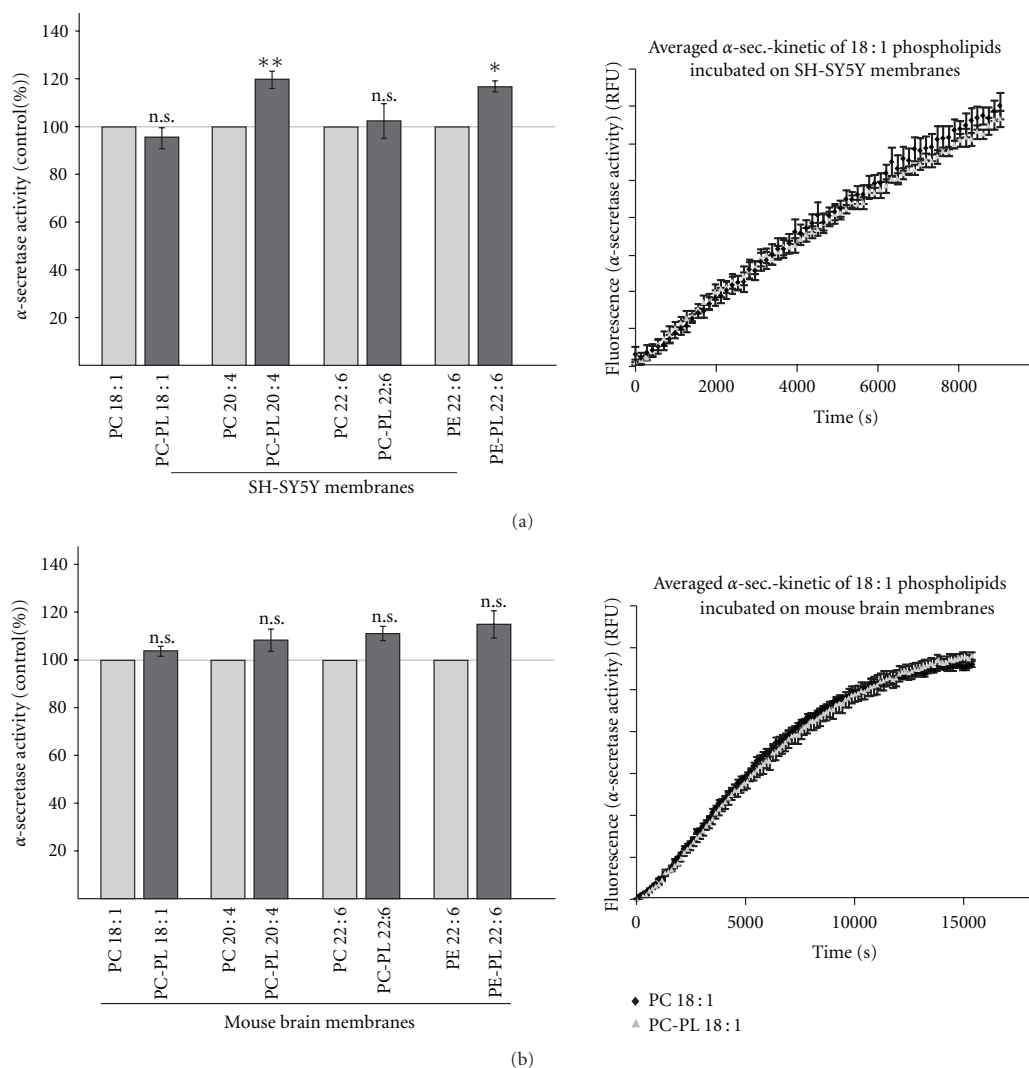


FIGURE 5: Effect of PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6 and PE-PL 22:6 on α -secretase activity. PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6 and PE-PL 22:6 and the corresponding phospholipids ($100\ \mu\text{M}$) were incubated on purified membranes of (a) human SH-SY5Y cells and (b) mouse brains, and α -secretase activity was determined as described in materials and methods. (a, b) Representative kinetics were shown for PC-PL 18:1 and PC 18:1. All quantified data represent an average of at least three independent experiments. Illustration and statistical significance as described for Figure 2.

of the analyzed plasmalogens, PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6, and PE-PL 22:6 when we used purified membranes of mouse brains instead of SH-SY5Y membranes.

3.6. Influence of PC-PL on γ -Secretase Activity in Human AD Brains. Above findings indicate that PC-PL reduce amyloidogenic processing of APP by affecting γ -secretase activity. The significantly reduced levels of PC-PL in the analyzed AD *postmortem* brains might therefore in return increase γ -secretase activity, leading to the massive generation of A β peptides, one of the characteristic hallmarks for AD. To reveal whether an increase in plasmalogens is in principle able to

decrease γ -secretase in human AD brains we prepared purified membranes of six AD *postmortem* brains and incubated these membranes with PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and the corresponding PC phospholipids. As described above, we found that PC-PL 18:1 is one of the species which is mostly changed in AD brains and was therefore selected for the incubation experiments. Indeed supplementation with PC-PL 18:1 reduced γ -secretase activity in five out of six AD brains (Figures 6(a) and 6(b)). A similar result was obtained by incubation with PC-PL 20:4. Interestingly, the same AD brain, which showed instead of decreased, increased γ -secretase activity for PC-PL 18:1 also showed increased

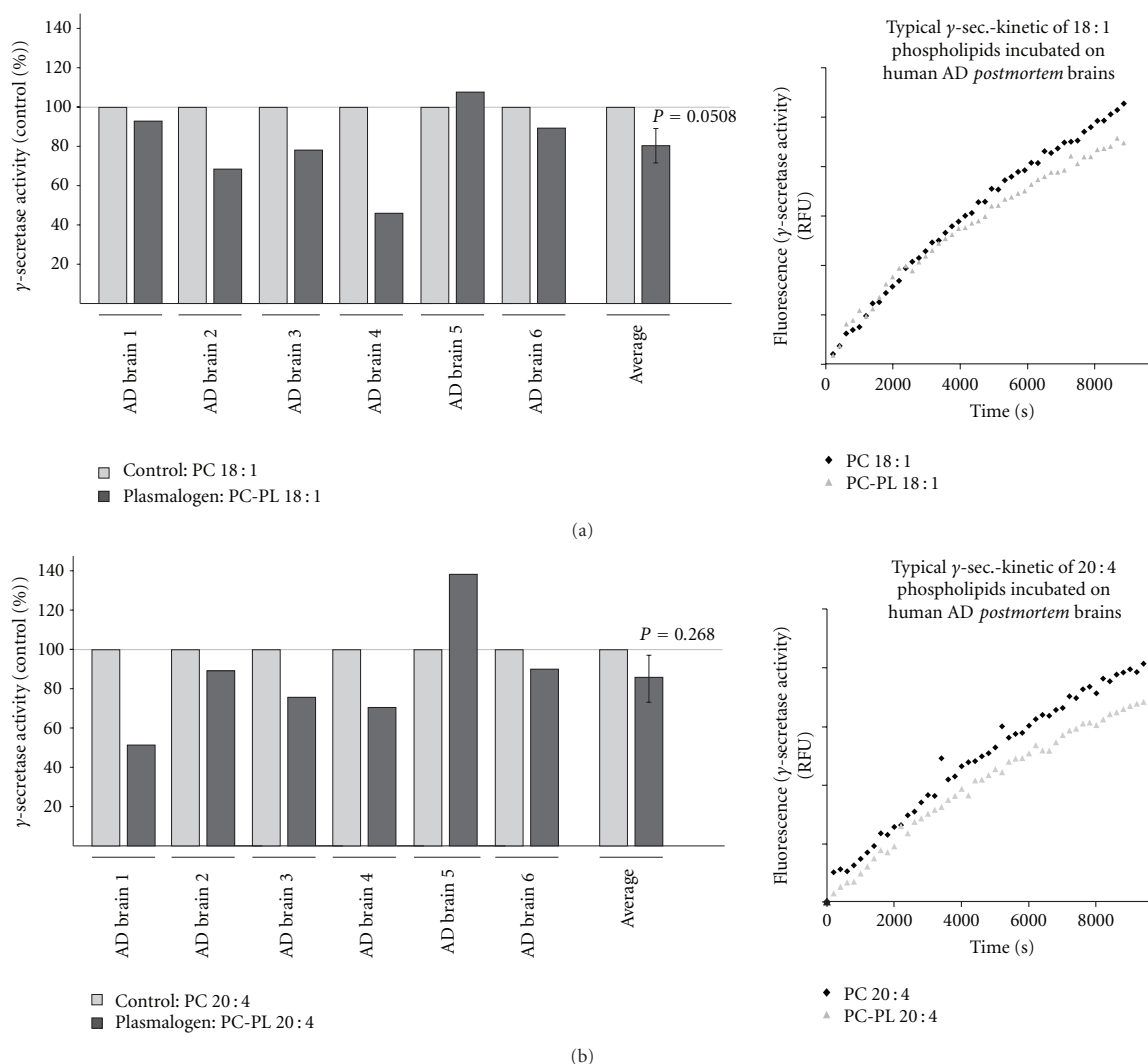


FIGURE 6: Effect of PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 on γ -secretase activity in purified membranes of human AD *postmortem* brains. Membranes of six human AD *postmortem* brain samples were purified and incubated with (a) PC-PL 18:1 and the corresponding phospholipid PC 18:1 or (b) PC-PL 20:4 and PC 20:4 as control. PC-PLs and corresponding phospholipids were incubated in a final concentration of 100 μ M and γ -secretase activity was determined with a fluorometric assay. (a, b) Representative kinetics were shown. Illustration and statistical significance are as described for Figure 2.

γ -secretase activity for PC-PL 20:4 as well (AD brain 5, Figure 6). However, in total, PC-PL 18:1 reduced γ -secretase activity to 80%, statistical analysis revealed a P value of 0.0508 (Figure 6(a)). For PC-PL 20:4, the mean reduction in γ -secretase activity was in a similar range with a P value of 0.268, when the results of all six AD brains were combined (Figure 6(b)).

4. Discussion

Plasmalogens are a subclass of glycerophospholipids characterized by the presence of an enol ether substituent at

the sn-1 position of the glycerol backbone [1]. Beside phosphoethanolamine-plasmalogens (PE-PL), reported to be the major plasmalogens in the brain, a further plasmalogen species, phosphatidylcholine-plasmalogens (PC-PL) occur in brain [3, 44]. Plasmalogens are common constituents of cellular membranes, most abundant in brain and heart, with important functions like signal transduction, ion transport, membrane fusion, cell-cell communication, and cholesterol dynamics (reviewed in: [3]). Alterations in the lipid composition of cellular membranes affect membrane fluidity and a number of cellular functions [45] and occur in several diseases, including AD [15, 17, 46–48], Parkinson's Disease

[49], Creutzfeldt-Jakob disease [50, 51], Gaucher disease [52], and Fabry disease [53, 54]. Recent studies have shown that several lipids influence the proteolytic processing of APP. Cholesterol and GM1 are reported to increase the generation of $A\beta$ [55–57], whereas docosahexaenoic acid and sphingomyelin decrease amyloidogenic processing of APP [42, 58]. Beside their influence on the generation of $A\beta$, altered lipid composition might also affect the recently identified physiological function of APP. Beside the neuroprotective and memory enhancing effect of α -secreted APP [59–61], we and others could show that $A\beta$ and the intracellular domain of APP (AICD), which is beside $A\beta$ released by γ -secretase cleavage of β -CTF, regulate lipid homeostasis and gene transcription [39, 58, 62, 63]. AICD has been reported to affect gene transcription of several proteins, including APP, BACE, GSK3 β [62], serine-palmitoyl-CoA transferase [63], and alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase (AGPS) [39], a rate limiting enzyme in plasmalogen synthesis. Although plasmalogen levels are altered in AD brain samples and are major constituents of neuronal membranes, so far, it is not known whether plasmalogens affect the proteolytic processing of APP. Our studies on the proteolytic processing of APP revealed that plasmalogens decrease the amyloidogenic processing of APP. The detailed analysis of the secretases involved in $A\beta$ generation, β - and γ -secretase, revealed that plasmalogens decrease amyloidogenic processing by reducing γ -secretase activity, whereas no or only a very slight reduction in the enzymatic activity of β -secretase was determined. All PC-PL and PE-PL species analyzed showed a highly significant decrease in γ -secretase activity to 60%–85% compared to the corresponding phospholipid lacking the enol ether. All plasmalogens independent of the fatty acid showed a decrease in γ -secretase activity further emphasizing that the observed effect is due to the enol ether and not to the fatty acid. Analyzed protein levels of PS1 and BACE1 in presence of PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 and RT-PCR analysis of PC-PL 18:1 or PC-PL 20:4 incubated cells showed that plasmalogens do not affect gene expression of the secretases involved in amyloidogenic processing of APP. This result is in line with our finding that PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 incubated cultured SH-SY5Y cells showed a similar reduction in γ -secretase activity like purified membranes of SH-SY5Y cells incubated with PC-PL 18:1 or PC-PL 20:4, further strengthening our finding that plasmalogens directly reduce the enzymatic activity of γ -secretase and that it is unlikely that indirect effects of plasmalogens might influence γ -secretase activity. The α -secretase activity, which prevents the formation of $A\beta$ peptides, was in contrast to γ -secretase diversely affected by plasmalogens. Whereas PC-PL 18:1 and PC-PL 22:6 showed no significant differences in α -secretase activity compared to PC 18:1 and PC 22:6, respectively, PC-PL 20:4 and PE-PL 22:6 significantly increased directly α -secretase activity compared to the corresponding phospholipids suggesting that the fatty acids or the phospholipid headgroups are at least able to modulate the effect of the enol ether on α -secretase activity. However, this increase in α -secretase activity was only obtained when purified membranes of SH-SY5Y cells were used for the α -secretase assay, whereas on purified membranes of mouse

brains all plasmalogens showed no significant changes in α -secretase activity. Many matrix metalloproteases (MMPs) are known to contribute to the α -secretase activity initiating the nonamyloidogenic pathway [32–34, 64]. These MMPs are differentially expressed in different cell lines or tissues [65–67]. The different effect for PC-PL 20:4 and PE-PL 22:6 might therefore be a result of different α -secretase composition in SH-SY5Y cells and mouse brains. Similar to the effect on the protein level and RNA level of BACE1 and the γ -secretase components, PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 revealed no changes in gene transcription of ADAM17. Because of the cell-type-specific effect of some plasmalogen species, we cannot exclude that plasmalogens influence some other MMPs, which contribute to α -secretase activity. However these effects cannot be observed for all tested plasmalogens pointing out that in respect to α -secretase the enol ether has only a minor or modulating effect.

To test if our findings are relevant in AD, we analyzed whether AD *postmortem* brains show altered levels of PC-PL and PE-PL. For PE-PL several studies have revealed that PE-PL level are reduced in AD brain [15, 17, 23, 68]. However, one study reported no differences or even a slight increase in PE-PL level in AD [25]. By analyzing 37 AD *postmortem* brain samples compared to 21 control brains not affected by AD, we found PE-PL level to be reduced in AD brains; however, statistical analysis of the single PE-PL species revealed no significance. These findings are in line with the reduced PE-PL level reported by Ginsberg et al. [15] and Han et al. [24, 68] and our recent study that revealed also reduced PC-PL level in AD *postmortem* brain [40]. Interestingly, PC-PL level were significantly decreased in AD *postmortem* brain, indicating that PC-PL might play an important role in the development of AD, although PC-PL are less abundant in neuronal membranes compared to PE-PL [44]. The importance of PC-PL is further substantiated by the results obtained for γ -secretase activities. As PC-PL level showed the most prominent reduction in AD brains and AD brains show increased $A\beta$ generation and accumulation, we tested whether incubation of PC-PL 18:1 and PC-PL 20:4 on purified membranes of human AD *postmortem* brains might also reduce γ -secretase activity. Indeed, supplementation with PC-PL 18:1 or PC-PL 20:4 on AD brain samples reduced γ -secretase activity in five out of six analyzed AD brains, further strengthening the importance of PC-PL in APP processing and probably the development of AD. Incubating plasmalogens *ex vivo* on human *postmortem* material has its clear limitations; further studies are required to clarify whether an increase in plasmalogen levels are a suitable target, which might have a positive impact in AD.

However, the importance of plasmalogens on the pathogenesis of AD is further substantiated by our recent finding that AGPS, a rate-limiting enzyme in plasmalogen synthesis, is regulated by APP processing [39]. Increased $A\beta$ levels as observed in AD lead to peroxisomal dysfunction and reduced AGPS protein stability, resulting in reduced AGPS protein level and reduced plasmalogen *de novo* synthesis [39]. Furthermore, $A\beta$ peptides have been shown to increase the formation of reactive oxidative species [69–74], also reducing plasmalogen levels, because plasmalogens are susceptible

to oxidative stress and function as antioxidants. Reduced plasmalogen levels in AD might also be a result of increased phospholipase A2 activity. Sanchez-Mejia et al. recently reported that A β stimulates phospholipase A2 [75, 76], responsible for the degradation of plasmalogens. Increased levels of A β peptides therefore, decrease plasmalogen levels by reducing AGPS protein stability, increasing oxidative stress and activation of phospholipase A2. Therefore, in AD, a vicious cycle between APP processing and plasmalogen level occurs. A β peptides reduce the plasmalogen level and reduced plasmalogen level directly increase γ -secretase activity leading to an even stronger production of A β peptides. In summary, our findings indicate that plasmalogens might play a crucial role in the development of AD and that a delicate balance in lipid composition of cellular membranes is important for neuronal function.

Acknowledgments

The authors gratefully thank BrainNet for the brain samples. The research leading to these results has received fundings from the EU FP7 project LipiDiDiet, Grant Agreement no. 211696 (TH), the DFG (TH), the Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie via NGFN-plus and KNDD (TH), the HOMFOR 2008 (MG), and HOMFOR 2009 (MG, TH) (Saarland University research grants).

References

- [1] L. A. Horrocks and M. Sharma, "Plasmalogen and O-alkyl glycerophospholipids," in *Phospholipids*, J. N. Hawthorne and G. B. Ansell, Eds., pp. 51–93, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1982.
- [2] R. W. Gross, "Identification of plasmalogen as the major phospholipid constituent of cardiac sarcoplasmic reticulum," *Biochemistry*, vol. 24, no. 7, pp. 1662–1668, 1985.
- [3] A. A. Farooqui and L. A. Horrocks, "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia," *Neuroscientist*, vol. 7, no. 3, pp. 232–245, 2001.
- [4] R. A. Zoeller, O. H. Morand, and C. R. Raetz, "A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 23, pp. 11590–11596, 1988.
- [5] W. C. Breckenridge, I. G. Morgan, J. P. Zanetta, and G. Vincendon, "Adult rat brain synaptic vesicles. II. Lipid composition," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 320, no. 3, pp. 681–686, 1973.
- [6] P. E. Glaser and R. W. Gross, "Plasmenylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion," *Biochemistry*, vol. 33, no. 19, pp. 5805–5812, 1994.
- [7] D. A. Ford and C. C. Hale, "Plasmalogen and anionic phospholipid dependence of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger," *FEBS Letters*, vol. 394, no. 1, pp. 99–102, 1996.
- [8] J. Duhm, B. Engelmann, U. M. Schonhauer, and S. Streich, "Accelerated maximal velocity of the red blood cell Na⁺/K⁺ pump in hyperlipidemia is related to increase in 1-palmitoyl, 2-arachidonoyl-plasmalogen phosphatidylethanolamine," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1149, no. 1, pp. 185–188, 1993.
- [9] C. Young, P. W. Gean, L. C. Chiou, and Y. Z. Shen, "Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus," *Synapse*, vol. 37, no. 2, pp. 90–94, 2000.
- [10] N. Nagan, A. K. Hajra, L. K. Larkins et al., "Isolation of a Chinese hamster fibroblast variant defective in dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activity and plasmalogen biosynthesis: use of a novel two-step selection protocol," *Biochemical Journal*, vol. 332, part 1, pp. 273–279, 1998.
- [11] H. Mandel, R. Sharf, M. Berant, R. J. Wanders, P. Vreken, and M. Aviram, "Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 250, no. 2, pp. 369–373, 1998.
- [12] A. A. Farooqui and L. A. Horrocks, "Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 16, no. 2-3, pp. 263–272, 2001.
- [13] A. A. Farooqui, T. A. Rosenberger, and L. A. Horrocks, "Arachidonic acid, neurotrauma, and neurodegenerative diseases," in *Handbook of Essential Fatty Acid Biology*, S. Yehuda and D. I. Mostofsky, Eds., pp. 277–296, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1997.
- [14] H. C. Yang, A. A. Farooqui, and L. A. Horrocks, "Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction," *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, vol. 14, no. 1–3, pp. 9–13, 1996.
- [15] L. Ginsberg, S. Rafique, J. H. Xuereb, S. I. Rapoport, and N. L. Gershfeld, "Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain," *Brain Research*, vol. 698, no. 1-2, pp. 223–226, 1995.
- [16] K. Wells, A. A. Farooqui, L. Liss, and L. A. Horrocks, "Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease," *Neurochemical Research*, vol. 20, no. 11, pp. 1329–1333, 1995.
- [17] Z. Guan, Y. Wang, N. J. Cairns, P. L. Lantos, G. Dallner, and P. J. Sindelar, "Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 58, no. 7, pp. 740–747, 1999.
- [18] P. Demediuk, R. D. Saunders, and D. K. Anderson, "Membrane lipid changes in laminectomized and traumatized rat spinal cord," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 20, pp. 7071–7075, 1985.
- [19] P. Viani, I. Zini, G. Cervato, G. Biagini, L. F. Agnati, and B. Cestaro, "Effect of endothelin-1 induced ischemia on peroxidative damage and membrane properties in rat striatum synaptosomes," *Neurochemical Research*, vol. 20, no. 6, pp. 689–695, 1995.
- [20] J. P. Zhang and G. Y. Sun, "Free fatty acids, neutral glycerides, and phosphoglycerides in transient focal cerebral ischemia," *Journal of Neurochemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 1688–1695, 1995.
- [21] S. Schedin, P. J. Sindelar, P. Pentchev, U. Brunk, and G. Dallner, "Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 10, pp. 6245–6251, 1997.
- [22] T. Yanagihara and J. N. Cumings, "Alterations of phospholipids, particularly plasmalogens, in the demyelination of multiple sclerosis as compared with that of cerebral oedema," *Brain*, vol. 92, no. 1, pp. 59–70, 1969.

- [23] A. A. Farooqui, S. I. Rapoport, and L. A. Horrocks, "Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens," *Neurochemical Research*, vol. 22, no. 4, pp. 523–527, 1997.
- [24] X. Han, D. M. Holtzman, and D. W. McKeel Jr., "Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry," *Journal of Neurochemistry*, vol. 77, no. 4, pp. 1168–1180, 2001.
- [25] J. W. Pettegrew, K. Panchalingam, R. L. Hamilton, and R. J. McClure, "Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease," *Neurochemical Research*, vol. 26, no. 7, pp. 771–782, 2001.
- [26] C. L. Masters, G. Simms, and N. A. Weinman, "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 12, pp. 4245–4249, 1985.
- [27] D. J. Selkoe, "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases," *Nature Cell Biology*, vol. 6, no. 11, pp. 1054–1061, 2004.
- [28] C. Haass, "Take five—BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation," *EMBO Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 483–488, 2004.
- [29] S. Sinha, J. P. Anderson, R. Barbour et al., "Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain," *Nature*, vol. 402, no. 6761, pp. 537–540, 1999.
- [30] H. Steiner, R. Fluhrer, and C. Haass, "Intramembrane proteolysis by γ -secretase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 44, pp. 29627–29631, 2008.
- [31] T. Wakabayashi and B. De Strooper, "Presenilins: members of the γ -secretase quartets, but part-time soloists too," *Physiology*, vol. 23, no. 4, pp. 194–204, 2008.
- [32] J. D. Buxbaum, K. N. Liu, Y. Luo et al., "Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 43, pp. 27765–27767, 1998.
- [33] S. Lammich, E. Kojro, R. Postina et al., "Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 7, pp. 3922–3927, 1999.
- [34] H. Koike, S. Tomioka, H. Sorimachi et al., "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein," *Biochemical Journal*, vol. 343, part 2, pp. 371–375, 1999.
- [35] T. M. Allinson, E. T. Parkin, A. J. Turner, and N. M. Hooper, "ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 74, no. 3, pp. 342–352, 2003.
- [36] H. Braak and E. Braak, "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes," *Acta Neuropathologica*, vol. 82, no. 4, pp. 239–259, 1991.
- [37] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson et al., "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Analytical Biochemistry*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, 1985.
- [38] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [39] M. O. Grimm, J. Kuchenbecker, T. L. Rothhaar et al., "Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 116, no. 5, pp. 916–925, 2011.
- [40] M. O. Grimm, S. Grösgen, M. Riemenschneider, H. Tanila, H. S. Grimm, and T. Hartmann, "From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 42, pp. 7713–7722, 2011.
- [41] M. O. Grimm, H. S. Grimm, I. Tomic, K. Beyreuther, T. Hartmann, and C. Bergmann, "Independent inhibition of Alzheimer disease β - and γ -secretase cleavage by lowered cholesterol levels," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 17, pp. 11302–11311, 2008.
- [42] M. O. Grimm, J. Kuchenbecker, S. Grösgen et al., "Docosahexaenoic acid reduces amyloid β production via multiple pleiotropic mechanisms," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 16, pp. 14028–14039, 2011.
- [43] T. M. Allinson, E. T. Parkin, T. P. Condon et al., "The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein," *European Journal of Biochemistry*, vol. 271, no. 12, pp. 2539–2547, 2004.
- [44] T. Miyazawa, S. Kanno, T. Eitsuka, and K. Nakagawa, "Plasmalogen: a short review and newly-discovered functions," in *Dietary Fats and Risk of Chronic Disease*, Y. Yanagita, H. R. Knapp, and Y. S. Huang, Eds., pp. 196–202, AOCS Publishing, 2006.
- [45] A. A. Spector and M. A. Yorek, "Membrane lipid composition and cellular function," *Journal of Lipid Research*, vol. 26, no. 9, pp. 1015–1035, 1985.
- [46] M. R. Prasad, M. A. Lovell, M. Yatin, H. Dhillon, and W. R. Markesbery, "Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease," *Neurochemical Research*, vol. 23, no. 1, pp. 81–88, 1998.
- [47] D. B. Goodenowe, L. L. Cook, J. Liu et al., "Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia," *Journal of Lipid Research*, vol. 48, no. 11, pp. 2485–2498, 2007.
- [48] P. L. Wood, R. Mankidy, S. Ritchie et al., "Circulating plasmalogen levels and Alzheimer disease assessment scale-cognitive scores in Alzheimer patients," *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, vol. 35, no. 1, pp. 59–62, 2010.
- [49] N. Fabelo, V. Martin, G. Santpere et al., "Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease," *Molecular Medicine*, vol. 17, no. 9-10, pp. 1107–1118, 2011.
- [50] Y. Tamai, H. Kojima, F. Ikuta, and T. Kumanishi, "Alterations in the composition of brain lipids in patients with Creutzfeldt-Jakob disease," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 35, no. 1, pp. 59–76, 1978.
- [51] A. Federico, P. Annunziata, and G. Malentacchi, "Neurochemical changes in Creutzfeldt-Jakob disease," *Journal of Neurology*, vol. 223, no. 2, pp. 135–146, 1980.
- [52] L. K. Hein, S. Duplock, J. J. Hopwood, and M. Fuller, "Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease," *Journal of Lipid Research*, vol. 49, no. 8, pp. 1725–1734, 2008.
- [53] I. Hozumi, M. Nishizawa, T. Ariga, and T. Miyatake, "Biochemical and clinical analysis of accumulated glycolipids in symptomatic heterozygotes of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry's disease) in comparison with hemizygotes," *Journal of Lipid Research*, vol. 31, no. 2, pp. 335–340, 1990.

- [54] K. Maalouf, J. Jia, S. Rizk et al., "A modified lipid composition in Fabry disease leads to an intracellular block of the detergent-resistant membrane-associated dipeptidyl peptidase IV," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 33, no. 4, pp. 445–449, 2010.
- [55] K. Fassbender, M. Simons, C. Bergmann et al., "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 10, pp. 5856–5861, 2001.
- [56] Q. Zha, Y. Ruan, T. Hartmann, K. Beyreuther, and D. Zhang, "GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein," *Molecular Psychiatry*, vol. 9, no. 10, pp. 946–952, 2004.
- [57] B. Wolozin, "Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease," *Neuron*, vol. 41, no. 1, pp. 7–10, 2004.
- [58] M. O. Grimm, H. S. Grimm, A. J. Patzold et al., "Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin," *Nature Cell Biology*, vol. 7, no. 11, pp. 1118–1123, 2005.
- [59] K. Furukawa, B. L. Sopher, R. E. Rydel et al., "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 67, no. 5, pp. 1882–1896, 1996.
- [60] H. Meziane, J. C. Dodart, C. Mathis et al., "Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 21, pp. 12683–12688, 1998.
- [61] M. P. Mattson, Z. H. Guo, and J. D. Geiger, "Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism," *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, no. 2, pp. 532–537, 1999.
- [62] R. C. von Rotz, B. M. Kohli, J. Bosset et al., "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 19, pp. 4435–4448, 2004.
- [63] M. O. Grimm, S. Grösgen, T. L. Rothhaar et al., "Intracellular APP domain regulates serine-palmitoyl-CoA transferase expression and is affected in Alzheimer's disease," *International Journal of Alzheimer's Disease*, Article ID 695413, 2011.
- [64] M. Blacker, M. C. Noe, T. J. Carty, C. G. Goodyer, and A. C. LeBlanc, "Effect of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons," *Journal of Neurochemistry*, vol. 83, no. 6, pp. 1349–1357, 2002.
- [65] I. Karkkainen, E. Rybnikova, M. Pelto-Huikko, and A. P. Huovila, "Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS," *Molecular and Cellular Neurosciences*, vol. 15, no. 6, pp. 547–560, 2000.
- [66] E. Llano, G. Adam, A. M. Pendas et al., "Structural and enzymatic characterization of Drosophila Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 26, pp. 23321–23329, 2002.
- [67] J. Lin, X. Yan, A. Markus, C. Redies, A. Rolfs, and J. Luo, "Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord," *Developmental Dynamics*, vol. 239, no. 4, pp. 1246–1254, 2010.
- [68] X. Han, "Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and the altered lipids at the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 774–783, 2010.
- [69] K. V. Subbarao, J. S. Richardson, and L. S. Ang, "Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro," *Journal of Neurochemistry*, vol. 55, no. 1, pp. 342–345, 1990.
- [70] R. J. Mark, Z. Pang, J. W. Geddes, K. Uchida, and M. P. Mattson, "Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation," *Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 3, pp. 1046–1054, 1997.
- [71] W. R. Markesbery, "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 134–147, 1997.
- [72] S. M. Yatin, S. Varadarajan, C.D. Link, and D. A. Butterfield, "In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1–42)," *Neurobiol Aging*, vol. 20, no. 3, pp. 325–330, 1999.
- [73] D. A. Butterfield and C. M. Lauderback, "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 32, no. 11, pp. 1050–1060, 2002.
- [74] H. Mohammad Abdul, G. L. Wenk, M. Gramling, B. Hauss-Wegrzyniak, and D. A. Butterfield, "APP and PS-1 mutations induce brain oxidative stress independent of dietary cholesterol: implications for Alzheimer's disease," *Neuroscience Letters*, vol. 368, no. 2, pp. 148–150, 2004.
- [75] R. O. Sanchez-Mejia, J. W. Newman, S. Toh et al., "Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease," *Nature Neuroscience*, vol. 11, no. 11, pp. 1311–1318, 2008.
- [76] R. O. Sanchez-Mejia and L. Mucke, "Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 784–790, 2010.

Fig. S1
Cytotoxicity after lipid incubation

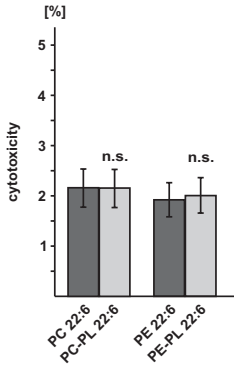


Fig. S2
Control of specificity in α -secretase assay

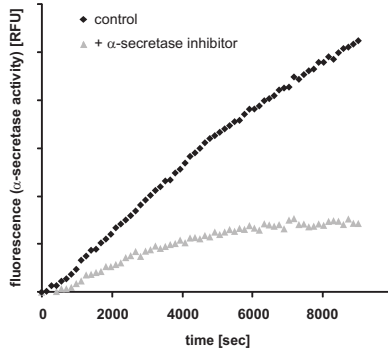


Fig. S3
Control of specificity in β -secretase assay

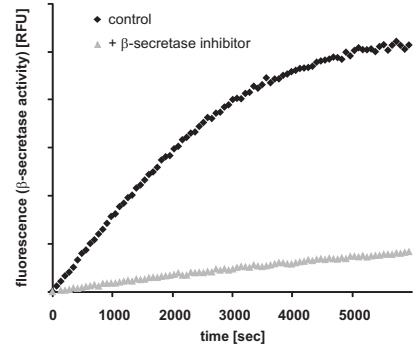
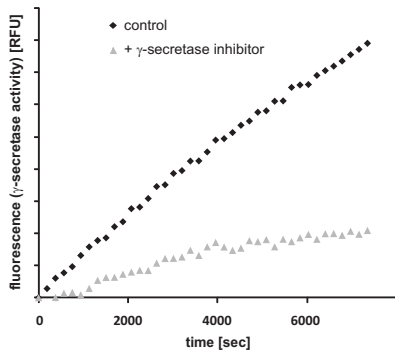


Fig. S4
Control of specificity in γ -secretase assay



(4.3) Zusammenfassung von Publikation 3 und Beschreibung des Eigenanteils

Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing

Hauptenthal VJ, Grimm MO*, Mett J, Stahlmann CP, Blümel T, Mylonas NT, Endres K, Grimm HS, Hartmann T*

** equally contributed*

In Publikation 3 wurde der Effekt von oxidierten Docosahexaensäure (DHA) -Derivaten und Lipid-Peroxidationsprodukten der ω -3 und ω -6 Fettsäuren, 4-Hydroxyhexenal (HHE) und 4-Hydroxynonenal (HNE), auf die APP-Prozessierung untersucht. Die Lipide sind in *figure 1b* der Publikation 3 dargestellt.

Der Einsatz von DHA in der Prävention und Therapie der AD führte in epidemiologischen und klinischen Studien zu kontroversen Ergebnissen; einerseits wurde DHA ein protektiver Effekt zur Vorbeugung oder Behandlung der AD bescheinigt, andererseits gibt es Studien, die keinen positiven Effekt von DHA nachweisen konnten (Chiu et al. 2008; Quinn et al. 2010; Lee et al. 2013) (zusammengefasst in *table 1* der Publikation 3).

Da DHA durch seine sechs Doppelbindungen für Oxidation anfällig ist und dadurch oxidierte Derivate entstehen können, wurde in dieser Publikation der Einfluss von 7 oxidierten Lipiden auf die APP-Proteolyse analysiert (VanRollins & Murphy 1984; Roberts et al. 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Lipid-Peroxidation in humanen *post-mortem* Gehirnen von Personen mit AD im Vergleich zu Personen ohne AD signifikant erhöht war. Zusätzlich war der Gehalt an HNE in diesen Gehirnen sogar signifikant verdoppelt. Um den Einfluss von oxidierten Lipiden auf die APP Proteolyse zu bestimmen, wurden SH-SY5Y Zellen und murine, kortikale Primärneurone mit 5 oxidierten DHA-Derivaten, sowie den beiden Lipid-Peroxidationsprodukten HNE und HHE inkubiert. Die Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit oxidierten Lipiden verursachte keine vermehrte Zytotoxizität.

4 von 5 oxidierte DHA-Derivate, HHE und HNE steigerten signifikant die Bildung von A β in SH-SY5Y Zellen. Die sAPP β Produktion wurde ebenfalls durch diese Lipide erhöht, jedoch unterschied sich der Gehalt an sAPP β nur bei 5 der 7 oxidierten Lipide signifikant von der

Kontrolle. Der Gehalt an sAPP α wurde durch die oxidierten Lipide tendenziell reduziert, der Effekt war im Vergleich zur Kontrolle bei 2 der 7 oxidierten Lipide signifikant reduziert.

Im Gegenzug wurde der A β Gehalt durch nicht oxidiertes DHA signifikant im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Stabilität von DHA über den Inkubationszeitraum wurde durch massenspektrometrische Analyse kontrolliert. Die Supplementierung von DHA mit einer Mischung aller verwendeten, oxidierten Lipide invertierte den protektiven Effekt von DHA, indem bereits 1% der oxidierten Lipidmischung den A β -Gehalt signifikant steigerte.

Der Anstieg des A β -Gehalts durch die oxidierten Lipide, wurde durch die Steigerung der amyloidogenen APP-Prozessierung hervorgerufen. Es wurde in dieser Publikation nachgewiesen, dass die Enzymaktivität der β -Sekretase direkt durch die verwendeten Lipide erhöht wird. Zusätzlich wirkten die oxidierten Lipide auf die Expression von BACE-1, indem sie diese steigerten. Im Gegensatz dazu, wurde die Steigerung der γ -Sekretase Aktivität in lebenden Zellen ausschließlich durch eine vermehrte Expression der γ -Sekretase Bestandteile, unter anderem PS1, dem aktiven Zentrum der γ -Sekretase, hervorgerufen. Es wurde kein direkter Effekt der oxidierten DHA-Derivate oder der Lipid-Peroxidationsprodukte auf die γ -Sekretase Aktivität festgestellt. Die steigernden Wirkung der oxidierten Lipide auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase wurde auch in kortikalen Primärneuronen der Maus nachgewiesen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer Betrachtung der oxidierten DHA-Derivate hinsichtlich der Prävention und möglicher Therapieansätze in der AD.

Publikation 3 ist in geteilter Erstautorenschaft mit Marcus O.W. Grimm entstanden. Ich habe für diese Publikation die Versuche koordiniert und in Zusammenarbeit mit Marcus Grimm geplant. Für diese Publikation wurden von mir die Lipid-Peroxidation und der Gehalt an HNE in humanen *post-mortem* Gehirnen (*figure 1a*) bestimmt. Die Aufarbeitung der dafür benötigten humanen *post-mortem* Gehirnproben wurde von Nadine T. Mylonas durchgeführt. Die Analyse des A β -, sAPP β -, sowie des sAPP α -Spiegels nach Inkubation mit oxidierten Lipiden und DHA wurde von mir durchgeführt (*figure 1c-f*). Für diese Versuche habe ich die Inkubation mit Lipiden, die Probenaufarbeitung und die statistische Analyse der gewonnenen Daten durchgeführt. Die Analyse der Zytotoxizität der oxidierten Lipide wurde nach Inkubation mit 2 der 7 Lipide von J. Mett durchgeführt, nach Inkubation der restlichen Lipide wurde diese Messung von mir durchgeführt (*Ergebnisse im Text*).

Weiterhin habe ich die Aktivität der β - und γ -Sekretase, sowohl in lebenden SH-SY5Y Zellen (*figure 2a+b*), als auch in lebenden kortikalen Primärneuronen der Maus gemessen (*table 2*). Auch hier wurde von mir die Inkubation und statistische Datenanalyse durchgeführt.

Neben der Analyse in lebenden Zellen, habe ich die Inkubation von Membranen aus SH-SY5Y Zellen und die nachfolgende Messung der β -Sekretase Aktivität durchgeführt und die Daten statistisch ausgewertet (*figure 2c*). Die Bestimmung der Expression der Sekretasen wurde von J. Mett im Anschluss an die von mir durchgeführte Inkubation der Zellen mit oxidierten Lipiden (*figure 2d*) durchgeführt. T. Blümel bestimmte die Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit DHA (*Ergebnisse im Text*) und C. Stahlmann die DHA-Stabilität (*Ergebnisse im Text*); zu beiden Analysen habe ich die Inkubation mit Lipiden durchgeführt. Die statistische Auswertung der A β -Spiegel nach Inkubation mit DHA und oxidierten Lipiden wurde von N. Mylonas durchgeführt (*Ergebnisse im Text*).

Nachfolgend ist Publikation 3 zu finden. **Das Original der Publikation ist auf der Internetseite des Verlages S. Karger AG (Basel, Schweiz), www.karger.com/ndd, unter der Nummer doi:10.1159/000440839 zu finden.**

Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing

Marcus O.W. Grimm^{a-c} Viola J. Haupenthal^a Janine Mett^a
 Christoph P. Stahlmann^a Tamara Blümel^a Nadine T. Mylonas^a
 Kristina Endres^d Heike S. Grimm^a Tobias Hartmann^{a-c}

^aExperimental Neurology, ^bNeurodegeneration and Neurobiology and ^cDeutsches Institut für Demenzprävention (DIDP), Saarland University, Homburg/Saar, and ^dDepartment of Psychiatry and Psychotherapy, Clinical Research Group, University Medical Centre Johannes Gutenberg, University of Mainz, Mainz, Germany

Key Words

Oxidized docosahexaenoic acid · Lipid peroxidation · Amyloid precursor protein processing · β -Amyloid

Abstract

One of the main characteristics of Alzheimer's disease (AD) is the β -amyloid peptide (A β) generated by β - and γ -secretase processing of the amyloid precursor protein (APP). Previously it has been demonstrated that polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially docosahexaenoic acid (DHA), are associated with a reduced risk of AD caused by decreased A β production. However, in epidemiological studies and nutritional approaches, the outcomes of DHA-dependent treatment were partially controversial. PUFAs are very susceptible to reactive oxygen species and lipid peroxidation, which are increased during disease pathology. In line with published results, lipid peroxidation was elevated in human postmortem AD brains; especially 4-hydroxy-nonenal (HNE) was increased. To investigate whether lipid peroxidation is only a consequence or might also influence the processes leading to AD, we analyzed 7 different oxidized lipid species including 5 oxidized DHA derivatives and the lipid peroxidation products of ω -3 and ω -6 PUFAs, HNE and 4-hydroxy-hexenal, in human neuroblastoma cells and mouse mixed cortical

neurons. In the presence of oxidized lipids A β and soluble β -secreted APP levels were elevated, whereas soluble α -secreted APP was decreased, suggesting a shift from the nonamyloidogenic to the amyloidogenic pathway of APP processing. Furthermore, β - and γ -secretase activity was increased by oxidized lipids via increased gene expression and additionally by a direct effect on β -secretase activity. Importantly, only 1% oxidized DHA was sufficient to revert the protective effect of DHA and to significantly increase A β production. Therefore, our results emphasize the need to prevent DHA from oxidation in nutritional approaches and might help explain the divergent results of clinical DHA studies.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder in the aged population. Main pathological features of AD include β -amyloid (A β) accumulation and hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau, leading to the neuropathological

Marcus O.W. Grimm and Viola J. Haupenthal contributed equally to this work.

hallmarks of AD, senile plaques and neurofibrillary tangles [1, 2]. Amyloidogenic A β peptides are generated by sequential proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP), a type-I transmembrane protein. Initial cleavage by the β -secretase BACE1 results in release of soluble β -secreted APP (sAPP β) and the generation of a membrane-tethered C-terminal stub called β -CTF [3]. Further cleavage of this C-terminal fragment by γ -secretase, a heterotetrameric protein complex comprising presenilin-1 or -2 (PS1, PS2), nicastrin, anterior pharynx defective 1 (Aph1) and presenilin enhancer 2 generates A β peptides [4]. Beside amyloidogenic processing of APP involving β - and γ -secretase activity, APP can be cleaved by α -secretases in a nonamyloidogenic pathway, preventing A β generation. The α -secretases cleave APP within the A β domain, releasing α -secreted APP (sAPP α) [3]. The remaining C-terminal fragment is also cleaved by the γ -secretase complex, liberating nonamyloidogenic p3 peptides [3]. Mounting evidence arises that the lipid microenvironment of the membrane modulates APP processing. Beside the fact that APP itself and its processing secretases are all transmembrane proteins, amyloidogenic APP processing is discussed to be dependent on particular membrane microdomains, called lipid rafts, enriched in cholesterol and sphingolipids [5]. Furthermore, several lipids have been shown to alter A β generation, including gangliosides, sphingomyelin, *trans*-fatty acids, phytosterols, cholesterol and docosahexaenoic acid (DHA) [6–12]. DHA, an ω -3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) predominantly found in marine fish and algae, was shown to reduce A β production in vitro and in animal models of AD [12–15]. Therefore, DHA has become of major interest for nutritional intervention in AD. Moreover, DHA is decreased in postmortem AD brains, and AD patients have reduced serum DHA levels [16, 17]. DHA, as an important component of neuronal membranes, is involved in neurogenesis, neuronal differentiation, neurotransmission, synaptogenesis, synaptic plasticity and neurite outgrowth. DHA is therefore suggested to be crucial in learning, memory and cognitive processes [18]. However, epidemiological studies and clinical trials addressing the relationship between ω -3/DHA uptake and AD incidence or cognitive decline revealed diverging results; examples are given in table 1. Although ω -3 fatty acids have several biological properties that might be beneficial in AD, DHA is very susceptible to lipid peroxidation and might auto-oxidize and induce lipid peroxidation in vivo, resulting in oxidative stress, known to be involved in AD pathogenesis [19]. Interestingly, it is known that DHA derivatives like neuroprotectins also af-

fect the mechanisms leading to AD [20]. However, up to now very little has been known about the effect of the oxidation products of DHA on APP processing.

In gray matter, 25–30% of all fatty acids in phospholipids are DHA. The oxidation products of PUFAs are increased in CSF of AD patients [21]. In human postmortem AD brains, Subbarao et al. [22] report a concentration of 2 nmol oxidized DHA per milligram protein. Similar results were found by Musiek et al. [23] reporting 4.9 ng oxidized DHA in C57BL/6 mouse brain and 8.7 ng oxidized DHA in human brain per gram tissue (wet weight). In our study, we used a comparable concentration range of oxidized PUFAs (0.3–3.3 nmol/mg protein).

In the present study, we addressed whether different oxidized DHA and lipid species affect APP processing and A β generation. Considering that DHA, which is highly susceptible to oxidation, and its oxidized products might have different effects on APP processing, our results are not only important for nutritional approaches, but might also help understand the diverging outcomes of different DHA-based clinical trials.

Materials and Methods

If not stated otherwise, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Oxidized lipids – 4-hydroxy-2E-hexenal (HHE), 4-hydroxy-nonenal (HNE), 17S-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid (17-OH-DHA), 7, 17-dihydroxy-8E,10Z,13Z,15E,19Z-docosapentaenoic acid (7,17-OH-DPA), 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA – were purchased from Biomol (Hamburg, Germany).

Cell Culture and Lipid Incubations

SH-SY5Y cells were cultivated as described earlier [9].

For lipid incubations SH-SY5Y cells were plated on 96-well or 6-well plates (Thermo Scientific, Waltham, Mass., USA/Corning, Tewksbury, Mass., USA). When confluent, cells were cultivated in medium containing 0.1% fetal calf serum and 0.1% bovine serum albumin for 16 h. Incubation with lipids was carried out for 8 + 16 h with 2 μ M oxidized DHA/20 μ M DHA. Measurement of cytotoxicity was performed using the lactate dehydrogenase assay (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Preparation of Primary Cortical Neurons

C57BL/6 mice (E13) were used for preparation as described earlier [9]. Lipid incubation was carried out as described above.

Measurement of A β , sAPP α and sAPP β Levels

Analyses of A β levels were performed as described before [9]. Briefly, A β in conditioned cell culture media was immunoprecipitated using W02 antibody (epitope: amino acid 2–8 of A β) [24] and detected by Western blot analysis. For sAPP α / β detection, conditioned media were adjusted to equal protein amounts using the

Table 1. Clinical and epidemiological studies on PUFA/DHA effects in AD

Authors	Study design	Summarized results
Freund-Levi et al. [32], 2006	Administration of 1.7 g of DHA and 0.6 g of EPA for 6 months in 204 patients with mild to moderate AD	No improvement in MMSE or the ADAS-cog except patients in a small subgroup with very mild AD
Chiu et al. [33], 2008	46 patients with MCI to moderate AD received ω -3 PUFAs 1.8 g/day for 24 weeks	Improvement in the CIBIC-plus Significant improvement in the ADAS-cog score in patients with MCI, not observed in those with AD
Quinn et al. [34], 2010	295 individuals with mild to moderate AD received 2 g/day DHA/placebo for 18 months	No beneficial effect on rate of change on the ADAS-cog score The rate of brain atrophy was not affected by treatment with DHA
Lee et al. [35], 2013	18 patients received concentrated DHA fish oil for 12 months	Significant improvement in short-term and working memory, immediate verbal memory and delayed recall capability
Kalmijn et al. [36], 1997	Rotterdam study with 5,386 nondemented participants and 2.1-year follow-up study	Inverse correlation of fish consumption with risk for AD at 2.1 years of follow-up
Barberger-Gateau et al. [37], 2002	1,674 people without dementia and 2-, 5- and 7-year follow-up study	Participants consuming fish or seafood at least once a week showed lower risk for dementia diagnosis and AD
Morris et al. [38], 2003	815 people without dementia; a follow-up study of a mean of 3.9 years	60% reduced risk for AD when consuming fish once a week Reduced risk is associated with total DHA intake
Schaefer et al. [39], 2006	Framingham Heart Study: 899 participants without dementia and follow-up after a mean of 9.1 years (mean DHA intake of 0.18 g/day)	Fish consumption reduces risk for dementia and AD
Van de Rest et al. [40], 2010	302 cognitively healthy individuals received 1,800 mg/day EPA-DHA or 400 mg/day EPA-DHA for 26 weeks	No improvement in cognitive performance (test of memory, attention, executive functions)
Stough et al. [41], 2011	74 healthy participants received 252 mg DHA, 60 mg EPA for 90 days	No improvement in cognitive performance (CDR factor scores)

Current epidemiological studies reflecting diverging effects of DHA in clinical trials. Authors, study design and main outcome are shown. MCI = Mild cognitive impairment; EPA = eicosapentaenoic acid; MMSE = Mini Mental State Examination; ADAS-cog = cognitive portion of the Alzheimer Disease Assessment Score; CIBIC-plus = Clinician's Interview-Based Impression of Change Scale; CDR = Clinical Dementia Rating.

bicinchoninic acid assay and separated by SDS-PAGE. Following Western blot, proteins were detected using W02 antibody for sAPP α and anti-sAPP β antibody (MyBioSource, San Diego, Calif., USA) for sAPP β levels. Densitometric quantification was carried out using Image Gauge V3.45.

Determination of β - and γ -Secretase Activity on SH-SY5Y Cells

Determination was performed as described before [25]. Briefly, after incubation cells were washed twice with prewarmed imaging solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂,

20 mM HEPES, pH 7.4). Then, 50 μ l imaging solution containing 30 μ M/24 μ M specific β - and γ -secretase substrate (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added. Unspecificity was subtracted after measurement.

Determination of β - and γ -Secretase Activity in Isolated SH-SY5Y Membranes

Measurement was performed as described before [26]. Briefly, SH-SY5Y cells were homogenized in sucrose buffer with Minilys (Peqlab, Erlangen, Germany) for 30 s at maximum speed using

ceramic beads. After adjusting to an equal protein amount, homogenates were centrifuged at 900 relative centrifugal force for 10 min, and the resulting postnuclear fractions were incubated with 2 μM of the lipids for 15 min at 37°C. Postnuclear fractions were ultracentrifuged at 55,000 rpm for 75 min at 4°C for pelleting membranes. Using glass beads in Minilys (10 s, medium speed) membranes were resuspended by breaking them into small pieces. After addition of 10 μM specific substrate, γ -secretase activity was measured continuously in an Infinite M1000 Pro Fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany). β -Secretase activity was measured by adding 20 μM specific substrate and plotting kinetics in a Safire 2 Fluorometer (Tecan).

Human Postmortem Brains

Human postmortem brains were obtained from the Netherlands Brain Bank (Amsterdam, The Netherlands). Brain samples were homogenized in deionized water and adjusted to an equal protein amount according to brain wet weight. As the amount of samples was limited, samples were pooled before measurement of lipid peroxidation and HNE.

Detection of Lipid Peroxidation Products

Measurement of lipid peroxidation was performed using the lipid peroxidation assay (Abcam, Cambridge, UK). Briefly, homogenates of human postmortem brains were adjusted to 2 mg of total protein and assayed according to the manufacturer's protocol.

HNE ELISA

The HNE level in human postmortem brains was determined using an HNE ELISA kit (Cusabio, Hubei Province, China). Briefly, human postmortem brain homogenates were adjusted to equal protein amounts, and 790 μg of total protein amount was assayed according to the manufacturer's protocol.

Quantitative Real-Time PCR

Quantitative real-time (RT) PCR for the assessment of γ -secretase components or BACE1 mRNA was performed as described in detail earlier [9].

Mass Spectrometry Analysis

DMEM was supplemented with 20 μM PCaa 22:6/22:6 and incubated 16 h under standard cell culture conditions. Samples were taken at 0 and 16 h, dissolved 1:100 in methanol with 5 mM ammonium acetate and infused into an electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometer (4,000 QTrap, AB Sciex, Darmstadt, Germany). PCaa 22:6/22:6 (m/z 878.7) was measured as precursor ion of the phosphatidylcholine head group (m/z 184.1) in positive mode with the following parameters: curtain gas, 10; collision-activated dissociation, medium; ion spray voltage, 5,500 V; temperature, 0°C; ion source gas 1, 17; ion source gas 2, 0; interface heater, on; declustering potential, 90 V; entrance potential, 10 V; collision energy, 48 V; collision cell exit potential, 9 V.

Statistical Analysis

All quantified data represent an average of at least 3 independent experiments. Error bars represent standard deviations of the mean. Statistical significance was determined by ANOVA or two-tailed Student's *t* test; significance was set at $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$.

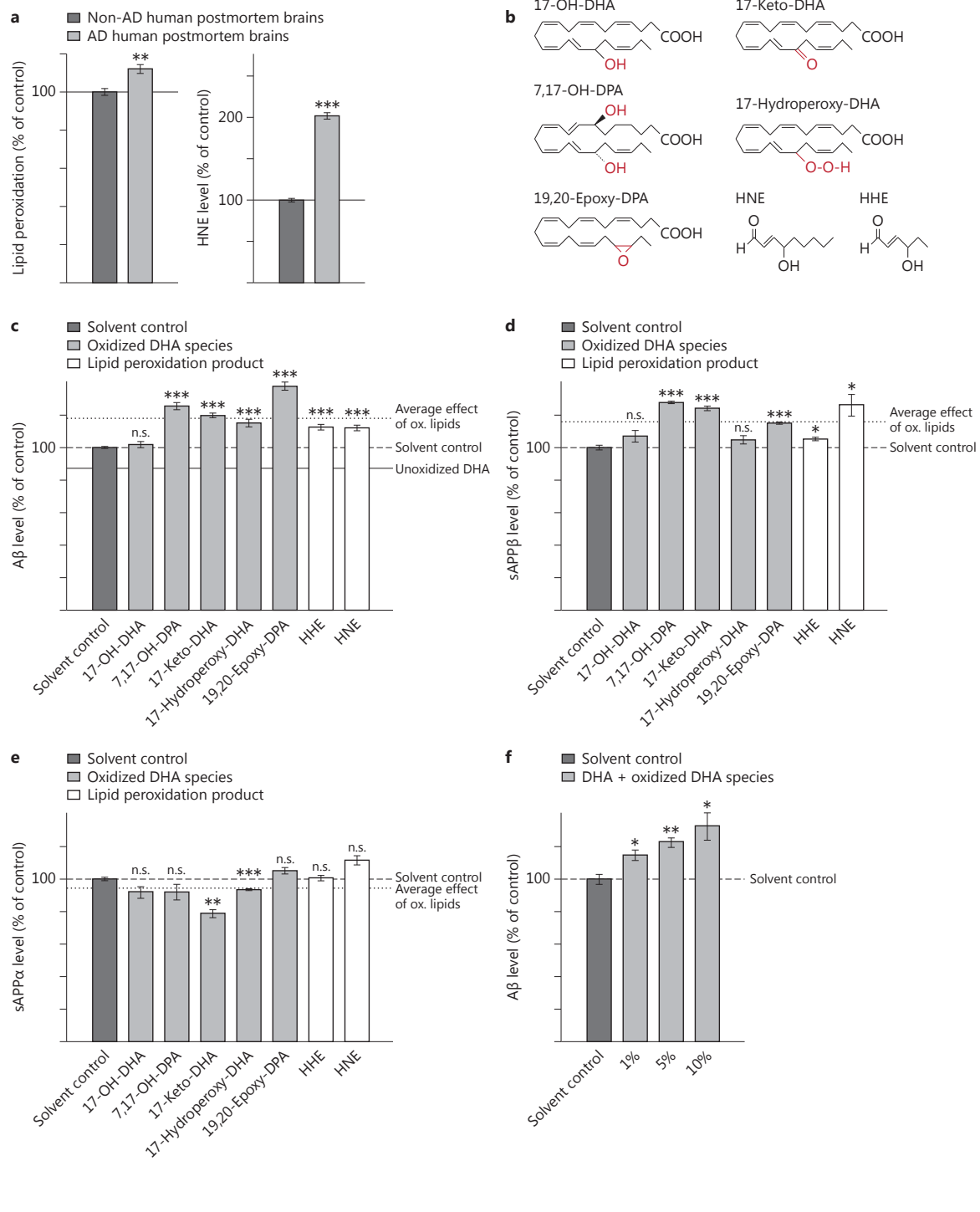
Results

Lipid Peroxidation in Human Postmortem AD Brains

Reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathological processes of AD. It has been reported that ROS contribute to increased neuronal damage and elevated APP processing, but A β itself is also able to increase the amount of ROS [19]. Here we analyzed 108 human postmortem AD brains compared to 52 control subjects (online suppl. table 1; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000440839). The control and AD brain samples did not differ significantly in age. In line with the reported increased ROS levels in AD, lipid peroxidation was significantly elevated in human postmortem AD brains (lipid peroxidation products: 112.3%; fig. 1a). Analyzing the HNE content derived from lipid peroxidation of ω -6 PUFAs, the effect was even more pronounced (HNE: 201.7%). Similar results were found analyzing brains of transgenic 5xFAD mice as a commonly used AD mouse model – cerebrum of wild-type mice (5 male, 3 female) and Tg5xFAD mice (4 female, 4 male) each 2 months old [27] – but the results obtained did not reach a significant level. Our findings underline that oxidation of lipids, especially of PUFAs, takes place in AD and raise the question whether these oxidation products represent only a consequence of AD or if these species are also highly bioactive compounds able to influence processes leading to AD.

Effect of Oxidized DHA Derivatives and Lipids on A β Production

We analyzed 5 different oxidized DHA derivatives and additionally the lipid peroxidation products HNE derived from ω -6 PUFAs and HHE derived from the oxidation of ω -3 PUFAs. The DHA oxidation products comprise single and double hydroxylated DHA (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA) or DHA containing a carbonyl group (17-keto-DHA). Furthermore, 2 DHA derivatives with either a hydroperoxy group (17-hydroperoxy-DHA) or an epoxide (19,20-epoxy-DPA) were utilized (fig. 1b). Neuroblastoma cells were incubated for 24 h with the different oxidized species at a concentration of 2 μM . Under these conditions, cells did not show changes in their morphology, and cell viability was unaltered compared to solvent control. Cytotoxicity was below 2% in total (solvent control: $1.2 \pm 0.1\%$; 17-OH-DHA: $1.2 \pm 0.1\%$; $p = 0.587$; 7,17-OH-DPA: $0.1 \pm 0.02\%$; $p < 0.001$; 17-keto-DHA: $1.7 \pm 0.2\%$; $p = 0.065$; 17-hydroperoxy-DHA: $1.3 \pm 0.3\%$; $p = 0.692$; 19,20-epoxy-DPA: $0.2 \pm 0.02\%$; $p < 0.001$; HHE: $1.2 \pm 0.1\%$; $p = 0.828$;



1

(For legend see next page.)

HNE: $1.3 \pm 0.1\%$; $p = 0.557$). As an additional control, 20 μM DHA was incubated on cells. To investigate if DHA is oxidized under the incubation conditions used in this study, the DHA stability was determined by mass spectrometry. After 16 h the DHA amount was not altered (0 h: $100.0 \pm 17.9\%$; 16 h: $100.9 \pm 17.0\%$, $p = 0.9697$). As previously shown, DHA significantly decreased A β production (DHA: $85.9 \pm 2.5\%$; $p < 0.001$). In contrast, 6 out of 7 oxidized species significantly elevated the A β levels compared to solvent control (17-OH-DHA: 102.0%; 7,17-OH-DPA: 125.7%; 17-keto-DHA: 120.0%; 17-hydroperoxy-DHA: 115.2%; 19,20-epoxy-DPA: 137.8%; HHE: 112.6%; HNE: 112.3%; average: 118%; fig. 1c). Significant elevation of A β levels compared to nonoxidized DHA was found for all oxidized lipids (17-OH-DHA: $p = 0.001$; 7,17-OH-DPA: $p < 0.001$; 17-keto-DHA: $p < 0.001$; 17-hydroperoxy-DHA: $p < 0.001$; 19,20-epoxy-DPA: $p < 0.001$; HHE: $p < 0.001$; HNE: $p < 0.001$).

To substantiate the observed effect, we measured sAPP β . sAPP β levels were increased in all cells incubated with oxidized lipids (17-OH-DHA: 107.2%; 7,17-OH-DPA: 127.8%; 17-keto-DHA: 124.3%; 17-hydroperoxy-DHA: 105.0%; 19,20-epoxy-DPA: 115.3%; HHE: 105.3%; HNE: 126.3%; fig. 1d). On average the sAPP β levels were increased to 115.9% and showed a correlation with the A β level ($r = 0.5427$). In contrast, the nonamyloidogenic α -secretase-derived sAPP α fragment was decreased to 96.5% on average, when cells were incubated with oxidized lipids as shown in figure 1e (17-OH-DHA: 92.3%; 7,17-OH-DPA: 92.1%; 17-keto-DHA: 79.0%; 17-hydro-

peroxy-DHA: 93.7%; 19,20-epoxy-DPA: 105.3%; HHE: 100.9%; HNE: 111.8%). In our previous study we could show that 100 μM DHA caused an increase in sAPP α levels ($131.2 \pm 3.5\%$, $p < 0.001$ [12]). In line with these results, the sAPP α /sAPP β ratio was changed, which was also published by Sahlin et al. [28] showing a 40% alteration.

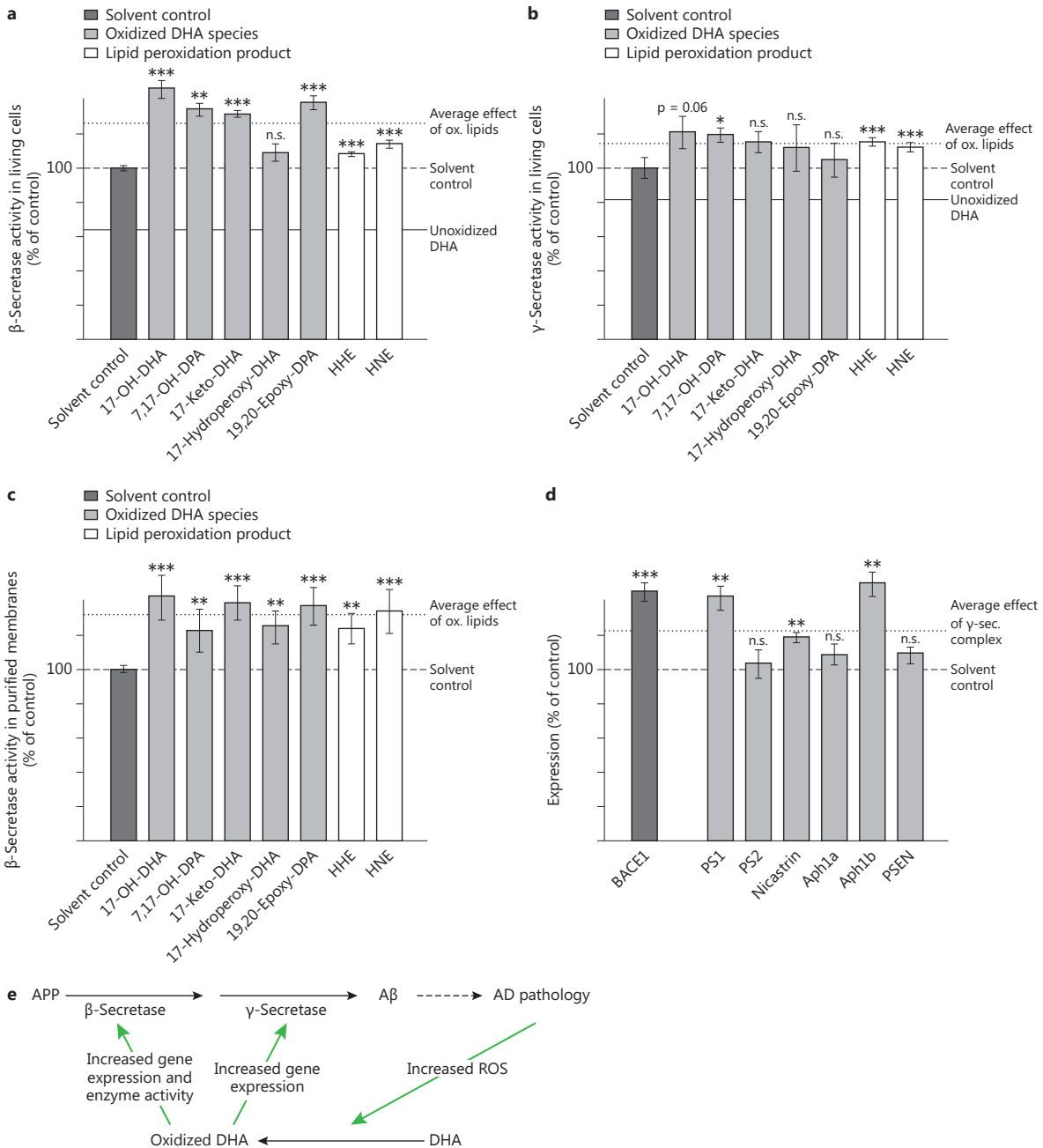
Taking into consideration that a certain proportion of DHA is oxidized under physiological conditions, we incubated unoxidized DHA with a certain percentage of oxidized DHA. In total 20 μM of lipid was used with a total of 1% (0.2 μM), 5% (1 μM) and 10% (2 μM) oxidized DHA species. 1% of oxidized DHA was able not only to attenuate the protective effect of DHA, but significantly increased the A β levels. The A β levels were dose-dependently increased with increasing fractions of oxidized DHA (1% oxidized DHA: 114.9%; 5% oxidized DHA: 123.3%; 10% oxidized DHA: 133.0%; fig. 1f). To sum up, our results clearly show that oxidized DHA not only increases the amyloidogenic and decreases the nonamyloidogenic processing, but it also reverts the beneficial effect of DHA under the tested conditions in very low amounts.

Effect of Oxidized DHA Derivatives and Lipids on Secretases

To elucidate the underlying mechanism of oxidized lipid species on APP processing, we measured β - and γ -secretase activity after treatment with oxidized lipids. Six oxidized species showed a significant increase in β -secretase activity in neuroblastoma cells (17-OH-

Fig. 1. Lipid peroxidation in human postmortem brains and effects of oxidized lipids on APP processing in SH-SY5Y cells. **a** Oxidized lipids (AD brain: $112.3 \pm 2.2\%$; $p = 0.004$; left) and HNE levels (AD: $201.7 \pm 3.5\%$, $p < 0.001$; right) were increased in human AD postmortem brains compared to nondemented control brains. **b** Structure of oxidized DHA species and lipid peroxidation products. **c-f** Effects of oxidized DHA (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA, 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA) and lipid peroxidation products (HHE, HNE) on APP processing: SH-SY5Y-APP695 cells were treated for 24 h with oxidized DHA derivatives or lipid peroxidation products with a final concentration of 2 μM or solvent, respectively. **c** A β levels after incubation with oxidized lipids (17-OH-DHA: $102.0 \pm 1.7\%$; $p = 0.389$; 7,17-OH-DPA: $125.7 \pm 2.1\%$; $p < 0.001$; 17-keto-DHA: $120.0 \pm 1.2\%$; $p < 0.001$; 17-hydroperoxy-DHA: $115.2 \pm 2.4\%$; $p < 0.001$; 19,20-epoxy-DPA: $137.8 \pm 2.5\%$; $p < 0.001$; HHE: $112.6 \pm 1.7\%$; $p < 0.001$; HNE: $112.3 \pm 1.6\%$; $p < 0.001$). **d** sAPP β levels (17-OH-DHA: $107.2 \pm 3.5\%$; $p = 0.222$; 7,17-OH-DPA: $127.8 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$; 17-keto-DHA: $124.3 \pm 1.1\%$; $p < 0.001$; 17-hydroperoxy-DHA:

$105.0 \pm 2.4\%$; $p = 0.224$; 19,20-epoxy-DPA: $115.3 \pm 0.5\%$; $p < 0.001$; HHE: $105.3 \pm 1.0\%$; $p = 0.019$; HNE: $126.3 \pm 6.5\%$; $p = 0.044$). **e** sAPP α levels were measured compared to solvent control (17-OH-DHA: $92.3 \pm 3.5\%$; $p = 0.197$; 7,17-OH-DPA: $92.1 \pm 4.9\%$; $p = 0.317$; 17-keto-DHA: $79.0 \pm 2.4\%$; $p = 0.004$; 17-hydroperoxy-DHA: $93.7 \pm 0.5\%$; $p < 0.001$; 19,20-epoxy-DPA: $105.3 \pm 1.9\%$; $p = 0.114$; HHE: $100.9 \pm 1.7\%$; $p = 0.760$; HNE: $111.8 \pm 2.8\%$; $p = 0.476$). **f** SH-SY5Y-APP695 cells were treated with in total 20 μM DHA containing a proportionately 1, 5 and 10% mix of all oxidized DHA species, and A β levels were measured compared to solvent control (1% oxidized DHA: $114.9 \pm 3.2\%$; $p = 0.029$; 5% oxidized DHA: $123.3 \pm 2.8\%$; $p = 0.005$; 10% oxidized DHA: $133.0 \pm 8.4\%$; $p = 0.021$). Solvent control is indicated by a dashed line, the average effect of all oxidized DHA derivatives is indicated by a dotted line. All quantified data represent an average of at least 3 independent experiments. Error bars represent standard deviations of the mean. Asterisks show the statistical significance compared to solvent control (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$).



2

(For legend see next page.)

DHA: 146.7%; 7,17-OH-DPA: 134.6%; 17-keto-DHA: 131.7%; 17-hydroperoxy-DHA: 109.1%; 19,20-epoxy-DPA: 138.4%; HHE: 108.2%; HNE: 114.2%; average: 126.1%; fig. 2a). The β -secretase activity correlated with the A β level ($r = 0.4172$). Similar results were obtained for γ -secretase activity. In the presence of 7 oxidized lipids, an elevated (114.4% on average) γ -secretase activity was found (17-OH-DHA: 121.2%; 7,17-OH-DPA: 119.6%; 17-keto-DHA: 115.5%; 17-hydroperoxy-DHA: 112.1%; 19,20-epoxy-DPA: 104.7%; HHE: 115.2%; HNE: 112.2%; fig. 2b). In contrast to β -secretase, γ -secretase showed no correlation to A β ($r = 0.0282$). To clarify whether the observed effects were cell-type specific, we measured both secretase activities in mixed cortical primary neurons. On average both secretase activities were increased to 110% by oxidized lipids (table 2). As a control, we detected a decreased activity of β -secretase ($63.9 \pm 4.7\%$, $p = 0.0047$) and γ -secretase ($81.6 \pm 3.8\%$, $p = 0.0018$) after incubation with 20 μM DHA confirming previous results [12].

Interestingly, incubation of oxidized lipids on purified membranes revealed also an increased β -secretase activity (17-OH-DHA: 142.8%; 7,17-OH-DPA: 122.6%; 17-keto-DHA: 138.9%; 17-hydroperoxy-DHA: 125.7%; 19,20-epoxy-DPA: 137.4%; HHE: 124.0%; HNE: 134.1%; on average 132.2%; fig. 2c), whereas γ -secretase (on average 100.4%) remained mainly unchanged (17-OH-DHA: $99.0 \pm 3.0\%$; $p = 0.760$; 7,17-OH-DPA: $103.8 \pm 4.1\%$; $p =$

0.454 ; 17-keto-DHA: $96.4 \pm 7.1\%$; $p = 0.635$; 17-hydroperoxy-DHA: $90.3 \pm 2.5\%$; $p = 0.071$; 19,20-epoxy-DPA: $95.6 \pm 2.9\%$; $p = 0.372$; HHE: $99.7 \pm 14.6\%$; $p = 0.984$; HNE: $118.2 \pm 6.4\%$; $p = 0.094$).

The results indicate that these oxidized lipids directly affect β -secretase activity whereas γ -secretase activity is affected by mechanisms dependent on processes only found in intact cells, e.g. gene expression. Indeed, analyzing gene expression by quantitative RT-PCR revealed that all components of the γ -secretase complex were elevated (oxidized DHA mix: PS1, 143.1%; PS2, 104.2%; nicastrin, 119.3%; Aph1a, 108.5%; Aph1b, 150.5%; PSEN, 109.1%; on average 122.5%); additionally also BACE1 expression was elevated (oxidized DHA mix: BACE1, 146.3%) suggesting a combination of a direct effect and an effect of gene expression in case of BACE1 (fig. 2d).

Discussion

In our present study we examined the effect of different oxidized lipids, oxidized DHA and the lipid peroxidation products of ω -6 and ω -3 PUFAs, HNE and HHE, with respect to their amyloidogenic potential. 17-OH-DHA and 17-hydroperoxy-DHA have been reported to be present in human blood, leukocytes and in mouse brain and have biological activity like inhibition of the

Fig. 2. Effect of oxidized DHA derivatives and lipid peroxidation species on secretase activities and summary of the results. **a, b** SH-SY5Y cells were incubated for 24 h with oxidized lipids with a final concentration of 2 μM or solvent. Secretase activity was measured continuously in a fluorometer by adding specific substrates for β - and γ -secretase. Effects of oxidized DHA derivatives (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA, 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA) and lipid peroxidation products (HHE, HNE) on β -secretase activity (**a**; 17-OH-DHA: $146.7 \pm 5.2\%$; $p < 0.001$; 7,17-OH-DPA: $134.6 \pm 3.7\%$; $p = 0.010$; 17-keto-DHA: $131.7 \pm 1.8\%$; $p < 0.001$; 17-hydroperoxy-DHA: $109.1 \pm 5.1\%$; $p = 0.1480$; 19,20-epoxy-DPA: $138.4 \pm 3.9\%$; $p < 0.001$; HHE: $108.2 \pm 1.3\%$; $p < 0.001$; HNE: $114.2 \pm 2.4\%$; $p < 0.001$) and γ -secretase activity (**b**) in SH-SY5Y cells (17-OH-DHA: $121.2 \pm 9.4\%$; $p = 0.065$; 7,17-OH-DPA: $119.6 \pm 4.3\%$; $p = 0.013$; 17-keto-DHA: $115.5 \pm 6.1\%$; $p = 0.148$; 17-hydroperoxy-DHA: $112.1 \pm 13.5\%$; $p = 0.446$; 19,20-epoxy-DPA: $104.7 \pm 9.8\%$; $p = 0.683$; HHE: $115.2 \pm 2.4\%$; $p < 0.001$; HNE: $112.2 \pm 2.6\%$; $p < 0.001$). The average effect of all oxidized lipids is indicated by a dotted line, solvent control is marked by a dashed line. **c** SH-SY5Y postnuclear fractions were incubated for 15 min with oxidized DHA derivatives (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA, 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA) or lipid peroxidation products (HHE, HNE). After preparation of isolated mem-

branes, β -secretase activity was measured continuously in a fluorometer by adding a specific substrate. Effects of oxidized DHA derivatives and lipid peroxidation products on β -secretase activity (17-OH-DHA: $142.8 \pm 13.1\%$; $p < 0.001$; 7,17-OH-DPA: $122.6 \pm 12.5\%$; $p = 0.007$; 17-keto-DHA: $138.9 \pm 10.0\%$; $p < 0.001$; 17-hydroperoxy-DHA: $125.7 \pm 9.4\%$; $p = 0.001$; 19,20-epoxy-DPA: $137.4 \pm 10.9\%$; $p < 0.001$; HHE: $124.0 \pm 8.8\%$; $p = 0.001$; HNE: $134.1 \pm 12.8\%$; $p < 0.001$). **d** Expression of BACE1 and the γ -secretase components in SH-SY5Y wild-type cells. mRNA levels were determined via RT-PCR after incubation of cells with a mix of oxidized DHA (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA, 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA) and lipid peroxidation products (HHE, HNE) in a final concentration of 2 μM . The averaged effect of all γ -secretase components is indicated by a dotted line. Solvent control is marked by a dashed line (oxidized DHA mix: PS1, $143.1 \pm 7.1\%$; $p = 0.004$; PS2, $104.2 \pm 8.3\%$; $p = 0.637$; nicastrin, $119.3 \pm 2.9\%$; $p = 0.003$; Aph1a, $108.5 \pm 6.1\%$; $p = 0.236$; Aph1b, $150.5 \pm 7.0\%$; $p = 0.002$; PSEN (presenilin enhancer), $109.1 \pm 4.9\%$; $p = 0.133$; BACE1, 146.3 ± 5.3 ; $p < 0.001$). All quantified data represent an average of at least 3 independent experiments. Error bars represent standard deviations of the mean. Asterisks show the statistical significance (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$). **e** Summary of the results: overview of the link between oxidized lipids and APP processing resulting in a futile cycle.

Table 2. Secretase activities on primary cortical neurons

	Solvent	17-OH-DHA	7,17-OH-DPA	17-Hydroperoxy-DHA	17-Keto-DHA	19,20-Epoxy-DPA	HHE	HNE	Average
<i>β-Secretase activity on living primary cortical neurons</i>									
β-Secretase activity, %	100.0	106.8	108.1	105.9	111.5	113.0	106.5	118.2	110.0
SD	1.1	2.3	1.7	1.8	2.2	2.2	4.7	10.8	
p value		0.0189	0.0007	0.0126	0.0002	0.0001	0.3458	0.2886	
<i>γ-Secretase activity on living primary cortical neurons</i>									
γ-Secretase activity, %	100.0	111.7	109.0	113.2	107.0	105.5	113.2	112.4	110.3
SD	1.7	2.8	1.9	5.2	1.8	1.1	5.7	2.9	
p value		0.0022	0.0013	0.0373	0.0068	0.0078	0.1369	0.0271	

Effect of oxidized DHA (17-OH-DHA, 7,17-OH-DPA, 17-keto-DHA, 17-hydroperoxy-DHA, 19,20-epoxy-DPA) and lipid peroxidation products (HHE, HNE) on β- and γ-secretase activity in primary cortical neurons compared to solvent control. All quantified data represent an average of at least 3 independent experiments.

tumor necrosis factor α-induced leukocyte trafficking or interleukin-1β expression [29]. 17-Keto-DHA is an endogenously produced lipoxygenase-mediated oxidation product of DHA, shown to activate Nrf2-dependent antioxidant gene expression and to be a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist [30]. 19,20-Epoxy-DPA is a DHA epoxygenase metabolite, derived from epoxidation of the ω-3 double bond of DHA and is biologically active in inflammation processes [31]. Beside these known, mainly inflammation-related properties, we could demonstrate that all examined oxidized lipids increased the amyloidogenic pathway of APP processing leading to an increased Aβ production. Importantly, even at very low concentrations (0.2 μM in total) and in the presence of a much higher concentration of unoxidized DHA (19.8 μM), Aβ production was significantly increased. Under the conditions used in our study only 1% oxidation of DHA was sufficient to revert its protective effect. These results underline the importance to avoid DHA oxidation in nutritional approaches. This might also explain the different results obtained in epidemiological studies dealing with DHA, where small contamination of oxidized DHA could lead to divergent study results.

Mechanistically, the oxidized lipids decrease the non-amyloidogenic pathway resulting in a decreased sAPPα production and increase the amyloidogenic pathway. In the amyloidogenic pathway, both β- and γ-secretase activities are affected. The oxidized lipids were able to elevate the gene expression of components of the γ-secretase complex and of BACE1 and additionally to affect BACE1

activity directly. However, taking into consideration that DHA has several pleiotropic effects [12] on the mechanisms leading to AD including e.g. effects on rafts and cholesterol homeostasis, it is reasonable to assume that other additional mechanisms might exist.

In conclusion, our study shows that lipid peroxidation is not only a result of the increased levels of ROS, but also that the oxidation products increase the amyloidogenic processing resulting in a futile cycle (fig. 2e), and small amounts of oxidized DHA are sufficient to revert the beneficial effects of DHA emphasizing the importance of preventing DHA from oxidation in nutritional approaches.

Acknowledgment

The research leading to these results has received funding from the EU FP7 project LipiDiDiet, grant agreement No. 211696 (to T.H.), the DFG (HA2985/6-2; to T.H.), the Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie via NGFN-plus and KNDD (to T.H.), and the HOMFOR (to M.O.W.G.) and the HOMFORzellent (to M.O.W.G.; Saarland University research grants).

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4245–4249.
- 2 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4913–4917.
- 3 Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H: APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 2011;4:3.
- 4 Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ: Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, APH-1, and presenilin enhancer 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6382–6387.
- 5 Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K: Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 2003;160:113–123.
- 6 Grimm MO, Zinser EG, Grosgen S, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, Burg VK, Kaestner L, Bayer TA, Lipp P, Muller U, Grimm HS, Hartmann T: Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 2012;7:e34095.
- 7 Zha Q, Ruan Y, Hartmann T, Beyreuther K, Zhang D: GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* 2004;9:946–952.
- 8 Grimm MO, Grimm HS, Patzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschape JA, De Strooper B, Muller U, Shen J, Hartmann T: Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 2005;7:1118–1123.
- 9 Grimm MO, Rothhaar TL, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Haupenthal VJ, Friess P, Kins S, Grimm HS, Hartmann T: Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem* 2012;23:1214–1223.
- 10 Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingartner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lutjohann D, Hartmann T, Grimm MO: Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 2013;33:16072–16087.
- 11 Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C: Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 2008;283:11302–11311.
- 12 Grimm MO, Kuchenbecker J, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B, Peter M, Vigh L, Grimm HS, Hartmann T: Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 2011;286:14028–14039.
- 13 Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubuda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM: A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 2005;25:3032–3040.
- 14 Oksman M, Iivonen H, Hoggies E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, Broersen L, Lutjohann D, Hartmann T, Tanila H: Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2006;23:563–572.
- 15 Perez SE, Berg BM, Moore KA, He B, Counts SE, Fritz JJ, Hu YS, Lazarov O, Lah JJ, Mufson EJ: DHA diet reduces AD pathology in young APPSWE/PS1 delta E9 transgenic mice: possible gender effects. *J Neurosci Res* 2010;88:1026–1040.
- 16 Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G: Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 1991;26:421–425.
- 17 Tully AM, Roche HM, Doyle R, Fallon C, Bruce I, Lawlor B, Coakley D, Gibney MJ: Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* 2003;89:483–489.
- 18 Bazinet RP, Laye S: Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014;15:771–785.
- 19 Cai Z, Zhao B, Ratka A: Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromol Med* 2011;13:223–250.
- 20 Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG: A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2005;115:2774–2783.
- 21 Roberts LJ 2nd, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD: Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 1998;273:13605–13612.
- 22 Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC: Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1990;55:342–345.
- 23 Musiek ES, Cha JK, Yin H, Zackert WE, Terry ES, Porter NA, Montine TJ, Morrow JD: Quantification of F-ring isoprostane-like compounds (F4-neuroprostanes) derived from docosahexaenoic acid in vivo in humans by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2004;799:95–102.
- 24 Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K: Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 1996;271:22908–22914.
- 25 Grimm MO, Stahlmann CP, Mett J, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Lehmann J, Hundsdorfer B, Endres K, Grimm HS, Hartmann T: Vitamin E: curse or benefit in Alzheimer's disease? A systematic investigation of the impact of α -, γ - and δ -tocopherol on A β generation and degradation in neuroblastoma cells. *J Nutr Health Aging* 2015;19:646–656.
- 26 Rothhaar TL, Grosgen S, Haupenthal VJ, Burg VK, Hundsdorfer B, Mett J, Riemschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO: Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Sci World J* 2012;2012:141240.
- 27 Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongarts A, Ohno M, Distenhof J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R: Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 2006;26:10129–10140.
- 28 Sahlin C, Pettersson FE, Nilsson LN, Lannfelt L, Johansson AS: Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced A β levels in cellular models of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2007;26:882–889.
- 29 Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG: Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and proinflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:43807–43817.
- 30 Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, Rudolph V, Freeman BA, Schopfer FJ: Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol* 2010;6:433–441.
- 31 Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL: Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002;196:1025–1037.
- 32 Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxen-Irving G, Garlind A, Vedin I, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J: Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: Omegad study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* 2006;63:1402–1408.

- 33 Chiu CC, Su KP, Cheng TC, Liu HC, Chang CJ, Dewey ME, Stewart R, Huang SY: The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1538–1544.
- 34 Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Van Dyck C, Galvin JE, Emond J, Jack CR Jr, Weiner M, Shinto L, Aisen PS: Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 2010;304:1903–1911.
- 35 Lee LK, Shahar S, Chin AV, Yusoff NA: Docosahexaenoic acid-concentrated fish oil supplementation in subjects with mild cognitive impairment (MCI): a 12-month randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology* 2013;225:605–612.
- 36 Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM: Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 1997;42:776–782.
- 37 Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Peres K, Dartigues JF, Renaud S: Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 2002;325:932–933.
- 38 Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J: Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:940–946.
- 39 Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA: Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 2006;63:1545–1550.
- 40 Van de Rest O, van der Zwaluw N, Beekman AT, de Groot LC, Geleijnse JM: The reliability of three depression rating scales in a general population of Dutch older persons. *Int J Geriatr Psychiatry* 2010;25:998–1005.
- 41 Stough C, Downey L, Silber B, Lloyd J, Kure C, Wesnes K, Camfield D: The effects of 90-day supplementation with the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function and visual acuity in a healthy aging population. *Neurobiol Aging* 2012;33:824. e821–e823.

Non-demented control

Sex	Age [years]	Braak	Brain region
M	61	1	gyrus rectus
F	89	2	gyrus rectus
M	83	1	orbital gyrus
F	85	0	orbital gyrus
M	78	2	orbital gyrus
F	63	0	inferior frontal gyrus
M	78	1	inferior frontal gyrus
F	89	1	inferior frontal gyrus
F	60	2	inferior frontal gyrus
F	90	2	superior frontal gyrus
F	71	2	inferior frontal gyrus
M	84	1	inferior frontal gyrus
M	93	3	superior frontal gyrus
M	87	3	inferior frontal gyrus
F	82	1	superior frontal gyrus
M	85	2	superior frontal gyrus
M	87	2	superior frontal gyrus
F	90	1	superior frontal gyrus
M	82	2	medial frontal gyrus
F	92	1	medial frontal gyrus
F	82	1	inferior frontal gyrus
M	79	1	inferior frontal gyrus
M	82	1	inferior frontal gyrus
F	90	1	inferior frontal gyrus
M	88	1	inferior frontal gyrus
F	90	3	inferior frontal gyrus
M	88	1	inferior frontal gyrus
M	86	2	inferior frontal gyrus
F	77	1	inferior frontal gyrus
F	73	2	inferior frontal gyrus
F	92	1	inferior frontal gyrus
F	91	3	inferior frontal gyrus
M	96	1	inferior frontal gyrus
M	74	0	inferior frontal gyrus
M	84	1	inferior frontal gyrus
F	85	1	inferior frontal gyrus
F	85	2	inferior frontal gyrus
F	89	2	medial frontal gyrus
M	84	1	superior frontal gyrus
F	87	3	superior frontal gyrus
M	71	2	medial frontal gyrus
F	89	3	medial frontal gyrus
M	88	2	medial frontal gyrus
M	62	1	medial frontal gyrus
F	77	1	medial frontal gyrus
M	82	3	medial frontal gyrus
M	88	3	inferior frontal gyrus
F	85	2	medial frontal gyrus
F	73	1	medial frontal gyrus
F	60	1	inferior frontal gyrus
F	94	1	medial frontal gyrus
F	60	1	medial frontal gyrus

Alzheimers disease

Sex	Age [years]	Braak	Brain region
F	91	4	medial frontal gyrus
M	86	5	medial frontal gyrus
F	98	5	medial frontal gyrus
F	86	4	medial frontal gyrus
M	76	5	medial frontal gyrus
M	83	4	medial frontal gyrus
F	74	6	medial frontal gyrus
F	80	6	inferior frontal gyrus
F	90	5	inferior frontal gyrus
F	78	6	inferior frontal gyrus
F	77	5	inferior frontal gyrus
F	87	5	inferior frontal gyrus
F	87	6	inferior frontal gyrus
F	82	6	inferior frontal gyrus
F	90	4	inferior frontal gyrus
F	87	6	medial frontal gyrus
M	72	5	inferior frontal gyrus
F	82	5	inferior frontal gyrus
F	62	6	superior frontal gyrus
F	82	5	medial frontal gyrus
F	75	6	medial frontal gyrus
M	62	5	medial frontal gyrus
F	87	6	medial frontal gyrus
F	67	5	superior frontal gyrus
F	92	4	superior frontal gyrus
F	90	4	medial frontal gyrus
M	75	5	medial frontal gyrus
F	91	4	medial frontal gyrus
F	85	5	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
F	84	4	superior frontal gyrus
F	91	5	medial frontal gyrus
F	89	5	medial frontal gyrus
F	81	6	medial frontal gyrus
F	94	6	medial frontal gyrus
F	94	4	medial frontal gyrus
F	87	5	medial frontal gyrus
F	86	6	medial frontal gyrus
F	77	6	medial frontal gyrus
F	91	6	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
F	91	4	medial frontal gyrus
F	85	5	medial frontal gyrus
F	83	5	medial frontal gyrus
F	85	5	medial frontal gyrus
F	76	5	medial frontal gyrus
F	62	6	medial frontal gyrus
F	86	5	medial frontal gyrus
F	87	5	medial frontal gyrus
F	88	5	medial frontal gyrus
F	95	4	medial frontal gyrus
M	87	5	medial frontal gyrus
F	82	5	medial frontal gyrus
F	85	5	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
F	89	5	medial frontal gyrus
F	89	5	medial frontal gyrus
F	62	5	medial frontal gyrus
F	69	6	medial frontal gyrus
F	88	5	medial frontal gyrus
F	94	4	medial frontal gyrus
F	86	4	medial frontal gyrus
F	88	5	medial frontal gyrus
F	90	5	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
M	93	5	medial frontal gyrus
F	93	4	medial frontal gyrus
F	91	6	medial frontal gyrus
F	81	5	medial frontal gyrus
F	78	5	medial frontal gyrus
F	81	6	medial frontal gyrus
F	84	5	medial frontal gyrus
F	77	5	medial frontal gyrus
F	77	5	medial frontal gyrus
M	64	6	medial frontal gyrus
M	82	5	medial frontal gyrus
F	87	6	medial frontal gyrus
F	93	4	inferior frontal gyrus
M	81	4	medial frontal gyrus
F	77	5	medial frontal gyrus
F	86	4	medial frontal gyrus
M	70	6	medial frontal gyrus
M	61	5	medial frontal gyrus
F	82	6	inferior frontal gyrus
F	84	6	inferior frontal gyrus
F	78	5	medial frontal gyrus
M	88	4	medial frontal gyrus
F	81	5	medial frontal gyrus
F	88	5	medial frontal gyrus
F	84	4	medial frontal gyrus
F	85	6	medial frontal gyrus
F	81	4	medial frontal gyrus
M	70	4	medial frontal gyrus
M	74	6	medial frontal gyrus
F	75	5	medial frontal gyrus
M	91	4	medial frontal gyrus
F	66	5	medial frontal gyrus
F	90	6	medial frontal gyrus
F	94	4	medial frontal gyrus
F	96	4	medial frontal gyrus
F	82	5	medial frontal gyrus
M	88	5	medial frontal gyrus
F	92	5	medial frontal gyrus
M	77	5	medial frontal gyrus
M	86	5	medial frontal gyrus
M	74	6	medial frontal gyrus
F	82	6	medial frontal gyrus

	Age	Sex		Braak						
	M	F	M	0	1	2	3	4	5	6
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
AD	82.95; SD= 8.28	87 (80.6)	21 (19.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (22.2)	56 (51.9)	28 (25.9)
nonAD	81.92; SD= 9.60	28 (53.8)	24 (46.2)	3 (5.8)	26 (50.0)	15 (28.8)	8 (15.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

(5) Erweiterte Zusammenfassung

(5.1) Lipide in der AD

Lipide sind ein essentieller Bestandteil aller Nervenzellen und übernehmen neben den strukturellen Funktionen wichtige zelluläre Aufgaben bei der Signaltransduktion, Energieversorgung, Aktivierung von Rezeptoren und der Bereitstellung bioaktiver Lipidmediatoren (Adibhatla & Hatcher 2007; Wenk 2005; Hullin-Matsuda et al. 2014; Purves et al. 2006). Darüber hinaus sind einige Lipide in der Lage modulierend in die Prozesse einzugreifen, die der AD Pathogenese zugrunde liegen (Grimm, Zinser, et al. 2012; Grimm, Rothhaar, Grösgen, et al. 2012; Grimm, Lehmann, et al. 2014; Markesbery & Lovell 1998; Gomez-Brouchet et al. 2007). Das schließt Lipide wie z.B. Cholesterin und Phytosterole, viele Vitamine, Sphingolipide und Ganglioside mit ein (Lim et al. 2014; Grimm, Rothhaar & Hartmann 2012; Grimm et al. 2008; Simons et al. 2002; Grimm, Hundsdörfer, et al. 2014; Burg et al. 2013; Grimm, Grimm, Patzold, et al. 2005; Grimm et al. 2006).

Die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran beeinflusst durch ihre biochemischen Eigenschaften wie die Ladungsverteilung, Fluidität und Dichte der Membran, die Funktionalität von membranständigen Proteinen (Haeffner & Privett 1975; Lenaz 1987; Lahdo et al. 2002). Aus diesem Grund nehmen die biochemischen Eigenschaften der Plasmamembran auch Einfluss auf die Prozessierung des APP. Da APP als Transmembranprotein in oder nahe an der Membran von den Sekretasen gespalten wird, und die Sekretasen selbst Transmembranproteine sind, beeinflusst die direkte Lipidumgebung die Art der Prozessierung (Yang et al. 2014; Eehalt et al. 2003; Yang et al. 2011). Einflüsse auf die APP Prozessierung können direkt oder über zusätzliche zelluläre Mechanismen APP selbst (Yoon et al. 2007; Eehalt et al. 2003) oder die beteiligten Sekretasen (Takasugi et al. 2015; Zhou et al. 2008) betreffen.

Apo E, ein Lipidtransporter, der nicht nur im peripheren Kreislauf, sondern auch im Gehirn eine essentielle Rolle bei der Versorgung mit Lipiden spielt, verdeutlicht die Rolle von Lipiden für die AD (Hauser et al. 2011; Polazzi et al. 2015; Ulrich et al. 2013). In klinischen Studien hat sich der Apo E Status als genetischer Risikofaktor für die SAD herauskristallisiert. Insbesondere das Apo E ϵ 4 Allel steigert das Risiko an AD zu erkranken,

während Apo E ε3 keinen Einfluss auf das AD Risiko nimmt. Apo ε2 vermindert sogar das Risiko an der AD zu erkranken (Corder et al. 1993; Strittmatter & Roses 1996). Ein weiterer Risikofaktor für die AD ist ein zu hoher Serumcholesterinspiegel im mittleren Lebensabschnitt. Ein reduzierter Gehalt an HDL-Cholesterin (Merched et al. 2000) ist für ein erhöhtes AD-Risiko entscheidend. Ein erhöhter LDL- sowie ein reduzierter HDL-Gehalt korrelieren zudem mit der Menge an Aβ-Plaques im humanen Gehirn (Reed et al. 2014; Bonarek et al. 2000; Reitz et al. 2010; Zuliani et al. 2010). Ein zu hoher Cholesterinspiegel resultiert oft aus einer pathologischen Aktivität der 3-Hydroxymethylglutaryl – Coenzym A – Reduktase (HMGCR) (Shinohara et al. 2014; Endo 2008), deren Aktivität unter anderem durch Aβ gesteuert wird. Die Aβ-Spezies Aβ₄₀ inhibiert die HMGCR und reduziert dadurch die Cholesterin *de novo*-Synthese. Im Gegenzug erhöht Cholesterin *in vitro* die Aβ – Produktion durch Aktivierung der amyloidogenen APP Prozessierung (Grimm, Grimm, Pätzold, et al. 2005; Wahrle et al. 2002; Simons et al. 1998). Dieser Effekt ist auch *in vivo* nachgewiesen (Fassbender et al. 2001). Neben Cholesterin steigern z.B. *trans*-Fette, wie sie in der Nahrung, z.B. in Milchprodukten und industriell gehärteten Fetten vorkommen, die Produktion von Aβ (Grimm, Rothhaar, Grösgen, et al. 2012). Ein Mangel an Vitamin D, einem Bestandteil von fetten Seefisch, kann ebenfalls den Gehalt an Aβ im Gehirn erhöhen (Grimm, Lehmann, et al. 2014). Dies ist im Kontext von AD-Patienten umso interessanter, da bei diesen oft eine Vitamin D-Hypovitaminose auftritt (Llewellyn et al. 2010).

Veränderungen des Lipidstoffwechsels in *post mortem* Gehirnen von an AD erkrankten Personen, sowie im Blut von AD-Patienten wurden bereits nachgewiesen. So ist der Gehalt an Sulfatiden, Ceramiden und Sphingolipiden in humanen *post mortem* Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen ohne AD verändert (Han 2007; Cutler et al. 2004). Zusätzlich ist der Gehalt an Phytosterinen im CSF (Vanmierlo et al. 2011) und im Blutserum von AD-Patienten (Teunissen et al. 2016) verändert. Der Gehalt an Phospholipiden, darunter im Speziellen PL, und ω-3 Fettsäuren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, unterscheidet sich zwischen dem Gehirn von AD-Patienten und dem Gehirn ohne AD Pathologie.

(5.2) Im Kontext: Phospholipide, DHA und oxidierte Lipide in der APP Prozessierung und ihre Rolle für die AD

Phospholipide und DHA (C 22:6), dessen oxidierten Derivate in dieser Arbeit untersucht wurden, stellen zusammen einen wesentlichen Teil der Lipide des humanen Gehirns dar. Phospholipide sind, neben Cholesterin, die zweithäufigste Lipidklasse im humanen Gehirn. Der Anteil von PC liegt im humanen Gehirn zwischen 14,4 und 17,5% des Gesamtlipidgehalts. Der Gehalt an Phospholipiden variiert je nach Hirnregion (Chan et al. 2012). Der Gehalt an DHA im humanen Gehirn beträgt innerhalb der Phospholipide PC und PE bis zu 24% des Gesamtfettsäuregehalts (Söderberg et al. 1990; Singh 2005). DHA stellt einen wesentlichen Teil der ω -3 Fettsäuren des humanen Gehirns dar, zusammengefasst in (Grimm, Zimmer, et al. 2013). Im Vergleich zur ω -3 Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) ist die Menge von DHA im Gehirn um ein Vielfaches größer (Tassoni & Weisinger 2008). Damit ist DHA im Gehirn die wichtigste ω -3 Fettsäure. Die Membranen von Neuronen sind angereichert mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, v.a. mit DHA und Arachidonsäure (AA, ω -6 20:4), und die Konzentration dieser Fettsäuren ist in den Synapsen der Neuronen am höchsten (Sun & Sun 1972; Kosicek & Hecimovic 2013; Kishimoto et al. 1969). Oxidierte Derivate von ω -3 Fettsäuren, sowie Lipid-Peroxidationsprodukte wurden bereits im humanen Gehirn nachgewiesen (Marcheselli et al. 2003; Serhan et al. 2002). PL kommen laut einer Studie von Ginsberg *et al.* in der weißen Substanz des humanen Gehirns in einer Konzentration von 28 μ mol pro Gramm Nassgewicht vor. Dieser Wert bezieht sich auf den Frontallappen (Ginsberg et al. 1995). Zusätzlich wird das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) im Gehirn zu 60-80% durch das korrespondierende Plasmalogen dargestellt (Guan et al. 1999).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Phospholipiden und oxidierten Derivaten der ω -3 und ω -6 Fettsäuren auf die proteolytische Prozessierung des APP analysiert. Im Vordergrund stand dabei der Einfluss der Lipide auf die Sekretasen und die A β Produktion. Um die Wirkung von Phospholipiden auf die APP Prozessierung zu analysieren, wurden in Publikation 1 und 2 unterschiedliche Phospholipide verwendet. Phospholipide sind eine heterogene Gruppe, die sich durch eine polare, spezifische Kopfgruppe, z.B. Cholin oder Ethanolamin, mit Bindung an Glycerin, Phosphat und meist eine oder zwei Fettsäuren auszeichnen (Yadav & Tiwari 2014). Die Verknüpfung zwischen den Fettsäuren und Glycerin

kann über eine Vinyletherbindung, wie sie im Falle von Plasmalogenen vorliegt, oder eine Esterbindung erfolgen (Yadav & Tiwari 2014; Fahy et al. 2005). Im Gegensatz zu frei vorliegenden Fettsäuren machen Phospholipide einen Großteil der Plasmamembran aus. Die Art der gebundenen Fettsäuren reguliert die Fluidität und beeinflusst die biochemischen Eigenschaften der Membran (Haefner & Privett 1975). Im Gehirn von AD-Patienten sind der Gehalt und die Zusammensetzung der Phospholipide im Vergleich zu gesunden Personen verändert. Unterteilt man Phospholipide nach ihrer spezifischen Kopfgruppe, so stellen PC, PE und Phosphatidylserin (PS) die Hauptspezies im humanen Gehirn dar (Söderberg et al. 1991; Chan et al. 2012). Veränderungen des PC-Gehaltes im Gehirn von AD-Patienten werden diskutiert. Einerseits existieren Studien, die eine geringfügige Reduktion des PC-Gehalts im Vergleich zu Personen, welche nicht an AD erkrankt waren, nachweisen konnten. In diesen Studien wurde ein reduzierter PC-Spiegel nur bei wenigen PC-Spezies in bestimmten Gehirnregionen nachgewiesen (Grimm, Grösgen, Riemenschneider, Tanila, et al. 2011; Nitsch et al. 1992). Im Gegensatz dazu war laut Wells *et al.* der Gehalt an PC im Gehirn von AD-Patienten signifikant reduziert (Wells et al. 1995). Zusätzlich zur PC-Reduktion wurde ein signifikant reduzierter PE-Gehalt im Gehirn von AD-Patienten nachgewiesen (Prasad et al. 1998; Wells et al. 1995). Die Veränderungen im PC- und PE-Gehalt könnten durch eine Reduktion ihrer Vorläufer, Cholin und Ethanolamin, hervorgerufen werden. Diese Vorläufer sind im frontalen und parietalen Kortex des Gehirns von AD-Patienten reduziert. Zudem ist das Abbauprodukt von PC, Glycerophosphocholin im Gehirn von AD-Patienten vermehrt vorhanden, was auf einen kombinierten Effekt aus Phospholipid-Synthese und -Abbau schließen lässt. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an Serin, dem Vorläufer von PS, im Gehirn von AD-Patienten unverändert, während der PS-Spiegel selbst erhöht ist (Nitsch et al. 1992). Der Gehalt an Phosphatidylinositol (PI), einem wichtigen Lipid für die choline Rezeptorfunktion, ist im Gehirn von AD-Patienten signifikant reduziert (Stokes & Hawthorne 1987; Pettegrew et al. 2001; Nitsch et al. 1992).

Die beschriebenen Veränderungen des Phospholipidgehalts im Gehirn variieren bei AD-Patienten je nach betrachteter Hirnregion. Die signifikante Reduktion des PE-Gehalts zeigte sich im Hippocampus und dem unteren Parietallappen von AD-Patienten im Vergleich zu Personen ohne AD. Hingegen gibt es keine Unterschiede im PE-Gehalt des mittleren temporalen Gyrus (Prasad et al. 1998). Die Reduktion des Gehalt an PC wird diskutiert und konnte z.B. im okzipitalen Kortex nachgewiesen werden (Wells et al. 1995), während im temporalen, frontalen und parietalen Kortex nur geringfügige oder keine Veränderungen

nachgewiesen wurden (Grimm, Grösgen, Riemenschneider, Tanila, et al. 2011; Nitsch et al. 1992). Der Gehalt an PC ist im Cerebellum von AD-Patienten reduziert, dies gilt wurde allerdings nur für PC 22:6 gezeigt, während der Gehalt an PC mit anderen Fettsäuren unverändert war (Prasad et al. 1998). Das Cerebellum ist bei AD erst im späten Krankheitsverlauf betroffen, während der Kortex und Hippocampus schon früh pathologische Veränderungen im Lipidprofil zeigen (Padurariu et al. 2012; Mann 1991; Wegiel et al. 1999). Demzufolge kann möglicherweise eine Reduktion von DHA im Gehirn als Anzeichen für nachfolgende, weitere Lipidveränderungen gesehen werden. Dabei ist zu beachten, dass DHA essentiell für die Funktion von Neuronen bei der Bildung von Axonen und der synaptischen Plastizität ist (Janssen et al. 2015; Liu et al. 2015; Kidd 2007). Interessanterweise zeigen speziell Membranen aus neuronalen Synaptosomen eine Veränderung im Phospholipidgehalt. Die beschriebene Reduktion von PE zeigt sich in den Synaptosomen deutlich und zwar für fast alle Hirnregionen, einschließlich des Hippocampus und des frontalen Kortex (Wells et al. 1995). Da APP, die β - und γ -Sekretase in Neuronen gehäuft an den Axonen und Synapsen vorkommen (Pliássova et al. 2015) könnten diese Veränderungen im Phospholipidgehalt auf die Prozessierung wirken.

Phospholipide und die AD

Einige Phospholipide steigern die A β Bildung und damit die amyloidogene APP Prozessierung durch direkte Aktivierung der γ -Sekretase (Holmes et al. 2012). Zusätzlich steigern langkettige, ungesättigte Lipide die sAPP α Produktion (Yang et al. 2011) im nicht amyloidogenen Weg und die Bedeutung der Lipidumgebung auf die α -Sekretase Schnittstelle im APP Protein wurde gezeigt (Marenchino et al. 2008).

Um den Einfluss von Phospholipiden auf die nicht amyloidogene APP Prozessierung zu untersuchen, wurde in Publikation 1 dieser Arbeit die Aktivität der α -Sekretase nach Inkubation mit verschiedenen Phospholipiden gemessen. Phospholipide mit der Kettenlänge 10:0 und 12:0 werden in dieser Arbeit als kurzkettige, Phospholipide mit Fettsäuren ab 20:0 als langkettige Lipide bezeichnet. 14:0, 16:0 und 18:0 können als mittellange Fettsäuren angesehen werden.

Es konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass die kurzkettigen, gesättigten Phospholipide PC 10:0 und 12:0 die Aktivität der α -Sekretase signifikant im Vergleich zu PC 18:0 steigerten. Dieser Effekt konnte für PC 12:0 sowohl in isolierten Plasmamembranen von

neuronalen SH-SY5Y Zellen als auch in lebenden SH-SY5Y Zellen nachgewiesen werden. Für PC 10:0 zeigte sich dieser Effekt nur in lebenden SH-SY5Y Zellen. Außerdem wurde in Publikation 1 die *in vivo* Relevanz durch Nachweis des Effekts der kurzkettigen, gesättigten Phospholipide auf die α -Sekretase in Membranen von humanen *post-mortem* Gehirnen verdeutlicht.

PC ist laut Literatur eines der häufigsten Phospholipide des humanen Gehirns (van Meer & de Kroon 2010), dies wurde auch in Publikation 1 dieser Arbeit durch Analyse des PC Gehalts in humanen *post-mortem* AD-Gehirnen gezeigt. Die gebundenen Fettsäuren in PC können die Eigenschaften der Plasmamembran, wie z.B die Membranfluidität, die auch durch Cholesterin reguliert wird (Buffone et al. 2009), verändern. Eine verringerte Fluidität reduziert zudem die Bildung des neuroprotektiven sAPP α (Galbete et al. 2000). Im Gegensatz zu Cholesterin steigert Kokosnussöl, welches reich an der kurzkettigen Fettsäure Laurinsäure (C12:0) ist, die Membranfluidität (Tappia et al. 1997). Der Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase wurde in Publikation 1 dieser Arbeit durch Verwendung des korrespondierenden Phospholipids PC12:0 gezeigt und lässt Rückschlüsse auf die Bedeutung der Membranfluidität für die Aktivität der α -Sekretase zu. Die Fluidität der Plasmamembran kann auch durch den Sättigungsgrad der Phospholipide moduliert werden (Suzuki et al. 1998). Es wurde bereits nachgewiesen, dass ungesättigte Fettsäuren die Membranfluidität erhöhen und dies in einer vermehrten Bildung des sAPP α resultiert (Yang et al. 2011). Diese Studien untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit, in der der aktivierende Einfluss von den langkettigen, ungesättigten Phospholipiden PC 20:4 (PC-AA), PC 20:5 (PC- EPA) und PC 22:6 (PC-DHA) auf die Aktivität der α -Sekretase demonstriert werden konnte. Es wurde in Publikation 1 demonstriert, dass die ungesättigten Phospholipide PC 22:6 und PC 20:5 eine aktivierende Wirkung auf die α -Sekretase Aktivität in SH-SY5Y Zellen, deren isolierten Membranen und in Membranen von humanen *post-mortem* Gehirnen haben. PC20:4 steigerte die Aktivität der α -Sekretase nur in lebenden SH-SY5Y Zellen. Es ist wichtig hervorzuheben, dass der positive Einfluss der Lipide auf die α -Sekretase erst durch vier oder mehr Doppelbindungen in PC hervorgerufen wurde. Eine geringere Anzahl an Doppelbindungen zeigte in Publikation 1 dieser Arbeit keinen vergleichbaren Effekt auf die α -Sekretase. Dieses Ergebnis wird durch eine Studie von untermauert, nach der die sAPP α Produktion durch Inkubation mit EPA, DHA und AA gesteigert wird (Yang et al. 2011). Schließlich wurde in Publikation 1 dieser Arbeit durch Messung der Aktivität von ADAM-10, der hauptsächlichen α -Sekretase in kultivierten, neuronalen Zellen (Kuhn et al. 2010), gezeigt, dass die gemessene Aktivierung der α -Sekretase durch kurzkettige, gesättigte und langkettige, ungesättigte Phospholipide aus einer

direkten Aktivierung von ADAM-10 resultiert. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass ungesättigte Fettsäuren nicht etwa die Expression der α -Sekretasen ADAM-10 und ADAM-17 oder von APP beeinflussen (Yang et al. 2011), sondern die direkt die Aktivität der α -Sekretase steuern, wodurch die Bedeutung der Lipidumgebung für die α -Sekretase verdeutlicht wird.

Die nicht amyloidogene Prozessierung von APP findet außerhalb der *Lipid rafts* statt. Das Modell der *Lipid rafts* beschreibt dicht gepackte, Sphingomyelin- und Cholesterin-reiche Abschnitte der Plasmamembran. Die α -Sekretase ADAM-10 ist außerhalb der *Lipid raft*-Bereiche lokalisiert (Reid et al. 2007). Im Gegensatz dazu hängt die amyloidogene Prozessierung direkt von den *Lipid rafts* ab (Ehehalt et al. 2003). Während nun die Sekretion von sAPP α durch eine gesteigerte Membranfluidität begünstigt wird, erhöhen im Gegensatz dazu A β -Oligomere durch Bindung an die Membran ihre Rigidität. Die dadurch resultierende Abnahme der Membranfluidität fördert wiederum die A β -Produktion indem es die amyloidogene APP Prozessierung steigert, dieser Mechanismus kann in einem Kreislauf aus vermehrter Produktion von A β und dessen Wirkung auf die Membranfluidität resultieren (Peters et al. 2009).

Es gibt bereits Fütterungsstudien mit ungesättigten und kurzkettigen Fettsäuren im Tiermodell. Im einem AD-Rattenmodell konnte die Membranfluidität der Neuronen im Gehirn durch Gabe der ω -6 Fettsäure AA (C20:4) verbessert werden (Fukaya et al. 2007). Kokosnussöl besteht vorwiegend aus kurzkettigen Fettsäuren (Fernando et al. 2015), die in der Lage sind die Bluthirnschranke leicht zu passieren (Ebert et al. 2003). Die Anwendung von Kokosnussöl wirkt sich positiv auf das Herz-/ Kreislaufsystem aus und kann so Krankheiten verhindern, die wiederum Risikofaktoren für AD darstellen (Fernando et al. 2015). Die Gabe von Kokosnussöl im Tiermodell wirkte sich auch positiv auf die Blutfettwerte aus. Kokosnussöl reduzierte zum Einen den Gehalt an Gesamtserum- und LDL-Cholesterin, und steigerte zum Anderem den HDL-Cholesterinspiegel (Nevin & Rajamohan 2004). Bei Patienten mit moderater bis schwerer AD führte eine Diät mit nativem Kokosnussöl zur Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten, wie in einer Studie von *Gandotra et al.* gezeigt wurde (Gandotra S 2014).

Da die molekularen Veränderungen im Gehirn lange vor dem Auftreten erster klinischer Symptome beginnen, ist es wichtig grundlegende Ernährungsansätze auch bei Personen ohne Demenz zu analysieren. Im frontalen Kortex von Patienten im frühen AD-Stadium war bereits die Membranintegrität im Vergleich zu der Kontrollgruppe verändert, was zur Akkumulation

der β -Sekretase innerhalb der *Lipid raft* der Plasmamembran führte (Fabelo et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass eine mit kurzkettigen Fettsäuren angereicherte Diät bei Probanden ohne Demenz die kognitiven Funktionen, insbesondere das Kurzzeitgedächtnis, verbesserte (Page et al. 2009).

PL und die AD

In einer Studie von Grimm *et al.*, wurde der Einfluss der APP Prozessierung auf die PL-Synthese gezeigt (Grimm, Kuchenbecker, Rothhaar, et al. 2011). Demzufolge reguliert AICD das Enzym, welches in der PL-Synthese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt übernimmt. PL sind im Gegensatz zu den Esterphospholipiden gekennzeichnet durch eine Vinyletherbindung an der *sn1*-Position des Glycerin zwischen der polaren Kopfgruppe und den Fettsäureresten (Braverman & Moser 2012; Fahy et al. 2005). PL sind im frontalen Kortex von *post-mortem* Gehirnen (Igarashi et al. 2011) und im Serum von AD-Patienten reduziert. Diese Reduktion kann zudem mit der Schwere der AD korrelieren, wie in einer Studie von Goodenowe *et al.* mittels kognitiver Tests gezeigt wurde (Goodenowe et al. 2007). PE liegt, wie bereits erwähnt, in *post-mortem* Gehirnen von AD-Patienten deutlich reduziert vor. Es wurde in einer Studie gezeigt, dass dieser Effekt durch die signifikante Reduktion des korrespondierenden PE-PL hervorgerufen werden kann, diese Tatsache spiegelte sich in einem verschobenen Verhältnis von PE zu PE-PL wider (Guan et al. 1999). PE-PL ist in Gehirnbereichen wie dem temporalen Kortex, der in besonderem Maße von der AD Pathologie betroffen ist, reduziert. In anderen Gehirnregionen, wie dem Cerebellum, die wenig oder gar nicht von AD betroffen sind, wurde keine Veränderung des PE-PL-Gehalts beobachtet (Ginsberg et al. 1995). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass der Gehalt an PE-PL sowohl in der grauen und als auch in der weißen Gehirnsubstanz reduziert war, allerdings nahm die Reduktion im Verlauf der AD nur in der grauen Substanz progressiv zu (Han et al. 2001). Auch die an PE-PL gebundenen Fettsäuren unterscheiden sich in *post-mortem* Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu Gehirnen von Personen, die nicht an AD erkrankt waren. Vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren, z.B. AA (C20:4), sowie die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) sind im Gehirn von AD-Patienten reduziert (Guan et al. 1999).

Die Reduktion des PL-Gehalts in humanen *post-mortem* Gehirnen von AD-Patienten wurde in Publikation 2 dieser Arbeit bestätigt. Innerhalb von PC-PL waren die ungesättigten

Fettsäuren, wie Ölsäure in PC-PL 16:0/18:1, 18:0/18:1 und 18:1/18:1, die mehrfach ungesättigte ω -6 Fettsäure AA in PC-PL 18:0/20:4 und die mehrfach ungesättigte ω -3 Fettsäure DHA in PC-PL 18:0/22:6 im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Hingegen waren die analysierten PE-PL-Spezies in dieser Arbeit tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert. Weiterhin wurde in Publikation 2 dieser Arbeit gezeigt, dass alle analysierten PL die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y Zellen und isolierten Membranen von Mausgehirnen im Vergleich zum korrespondierenden Ester-Phospholipid signifikant reduzierten. Darüber hinaus verringerte PC-PL 18:1 und PE-PL 20:4, die Aktivität der γ -Sekretase sogar in humanen *post-mortem* Gehirnproben von AD-Patienten.

Die Bedeutung der Ergebnisse aus Publikation 2 wird umso klarer, wenn man berücksichtigt, dass bis zu 30% aller Phospholipide und bis zu 80% des PE in neuronalen Membranen durch PL dargestellt werden (Han et al. 2001; Horrocks & Sharma 1982). Die Effekte von PE-PL auf die Aktivität der γ -Sekretase, können sich auf den A β -Spiegel auswirken, wie bereits in einer Studie von Onodera *et al.* gezeigt wurde (Onodera et al. 2015). In Publikation 2 dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die Reduktion der γ -Sekretase Aktivität durch PL unabhängig von Expressionseffekten auf die Bestandteile der γ -Sekretase, PS1 und PS2, Aph1a und Aph1b, PSEN und Nicastrin war. PL reduzieren demnach die Aktivität der γ -Sekretase durch direkte Interaktion. In einer Studie wurde eine Aktivierung der γ -Sekretase durch Esther-Phospholipide mit den gleichen Fettsäuren wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden gezeigt. In dieser Studie wurde demonstriert, dass die Aktivität der γ -Sekretase durch langkettige, ungesättigte Phospholipide, zum Beispiel PC 18:1 und PC 22:6 im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wird (Holmes et al. 2012). Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung des strukturellen Unterschieds zwischen PL und Ester-Phospholipiden für die Aktivität der γ -Sekretase hin.

Im Gegensatz zu dem gemessenen Einfluss der PL auf die γ -Sekretase Aktivität zeigte sich in dieser Arbeit kein Effekt der PL auf die Aktivität und Expression der β -Sekretase. Da die nicht amyloidogene Prozessierung des APP durch die α -Sekretase die A β -Bildung verhindern kann (Esch et al. 1990), wurde in Publikation 2 dieser Arbeit nach Inkubation mit PL die Aktivität der α -Sekretase bestimmt. Im Vergleich zum korrespondierenden Ester-Phospholipid war diese nach Behandlung mit PC-PL 20:4 und PE-PL 22:6 in SH-SY5Y Zellen gesteigert. Der Effekt konnte in Mausgehirnen nicht nachgewiesen werden. Zusammengefasst trat damit eine nur eine Aktivierung der α -Sekretase durch PL, welche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren verknüpft sind, auf. Wie bereits zuvor in Publikation 1

beschrieben, aktivieren auch Ester-Phospholipide mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren die α -Sekretase. Interessanterweise sind es genau die gleichen Fettsäuren, nämlich C20:4 und C22:6 die einen Effekt auf die α -Sekretase haben. Im Zusammenspiel mit den inhibierenden Effekten der PL auf die γ -Sekretase könnte die Aktivierung der α -Sekretase durch ungesättigte Fettsäuren innerhalb von Phospholipiden einen wichtigen Schritt zur Prävention der A β -Bildung darstellen. Ein weiterer Aspekt ist die Art der Regulation der α -Sekretase durch Phospholipide im Vergleich zur γ -Sekretase. Die α -Sekretase wurde durch den Sättigungsgrad der Fettsäuren innerhalb der Phospholipide beeinflusst während die Regulation der γ -Sekretase stärker von der Bindung der Fettsäuren an das Glycerin der Phospholipide beeinflusst wird.

Die Wirkung von PL wurde auch im Tiermodell in einer Studie von Ifuku *et al.* analysiert. Im verwendeten Mausmodell, welches die schwedische APP-Mutation trug, konnte eine Reduktion des PL-Gehalts festgestellt werden. Des Weiteren wurde nach intraperitonealer Injektion oder systemischer Verabreichung von PL die A β -Dichte in Neuronen des Gehirns der Mäuse reduziert. Interessant ist auch, dass inflammatorische Prozesse, wie z.B. aktivierte Gliazellen dadurch abgemildert wurden (Ifuku et al. 2012). Umgekehrt trat bei Mäusen, die neuroinflammatorische Prozesse im Gehirn aufwiesen, laut einer anderen Studie, eine Reduktion der PL im Hippocampus auf. Dieser Effekt konnte durch Fütterung von PL wieder aufgehoben werden (Katafuchi et al. 2012). Der Einfluss auf die A β Aggregate im Mausgehirn könnte zusätzlich zu der gesteigerten A β -Produktion auch durch eine direkte Interaktion von A β mit den Lipiden hervorgerufen werden, da A β mit anionischen Phospholipiden wie PI und PS interagieren kann und in Verbindung mit diesen eine stärkere Fibrillenbildung aufwies (Chauhan et al. 2000). Diese Resultate deuten *in vivo* auf eine Kombination aus Neuroinflammation und der neurotoxischen Wirkung von A β , bzw. A β -Aggregaten hin, die schließlich die pathologischen Veränderungen im AD-Gehirn hervorrufen können. Diese Effekte könnten zusammen mit Modifikationen im Plasmalogenhaushalt auftreten. Ob diese Veränderungen Auslöser oder eine Folge der AD sind, ist noch nicht geklärt.

Da im Gehirn von AD-Patienten im Krankheitsverlauf oxidativer Stress auftritt, ist zudem zu beachten, dass, neben ungesättigten Fettsäuren, die Vinylotherbindung der PL ein Hauptangriffspunkt für Oxidation darstellt (Guan et al. 1999). Des Weiteren kann oxidativer Stress zu Bildung von Lipid-Peroxidationsprodukten führen, die neben Phospholipiden und PL auch eine Rolle für die APP Proteolyse und die molekularen Grundlagen von AD spielen, was in Publikation 3 gezeigt wurde. In dieser Publikation wurden Lipid-

Peroxidationsprodukte der ω -3 und ω -6 Fettsäuren, sowie oxidierte DHA Derivate hinsichtlich ihres amyloidogenen Potentials untersucht.

DHA und oxidierte Lipide in der AD

DHA ist eine mehrfach ungesättigte ω -3 Fettsäure, die angereichert in fettem Kaltwasserfisch wie z.B. Lachs und Hering, sowie in marinen Algen vorkommt (Horrocks & Yeo 1999). In einigen klinischen und epidemiologischen Studien wurde ein protektiver Effekt von DHA für AD-Patienten oder die Probanden nachgewiesen. Eine DHA-reiche Diät oder eine künstliche Supplementierung von DHA reduziert demnach das Risiko an AD zu erkranken. Allerdings existieren auch Studien mit gegenteiligen Resultaten, in denen DHA keinen positiven Effekt auf die Entstehung oder den Fortschritt der AD aufweisen konnte. Die Studienlage ist in *table 1* der Publikation 3 zusammengefasst. Die Ursachen für diese gegensätzliche Studienlage können im Studiendesign (Kohortenstudien oder longitudinale Studien, Korrelationsstudien), der Probandenauswahl (Einteilung z.B. nach Alter oder Geschlecht) oder der Diagnosemethoden liegen (Kotani et al. 2006). Zwei randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien über die Wirkung einer DHA-Gabe zeigten keine oder nur sehr schwache Verbesserungen für die AD-Patienten (Quinn et al. 2010; Freund-Levi et al. 2006). Zudem muss zwischen klinischen Studien, in denen Patienten eine definierte DHA Menge verabreicht wurde, und epidemiologischen Studien, in denen die Ernährung der Probanden dokumentiert wird, differenziert werden. Möglicherweise stellt auch die chemische Struktur von DHA einen zusätzlichen Aspekt dar. DHA gilt durch seine sechs Doppelbindungen innerhalb der Fettsäure als sehr anfällig für Oxidation (VanRollins & Murphy 1984; Roberts et al. 1998). Diese Tatsache könnte zu unerwünschten Nebenprodukten bei der diätischen Aufnahme und im wissenschaftlichen Experiment führen. Die Autooxidation von ω -3 Fettsäuren kann über eine radikale Kettenreaktion verlaufen. Diese wird von freien Radikalen induziert und im Verlauf der Reaktion treten Zwischenprodukte, z.B. Hydroperoxide, auf. Die Stabilisierung von DHA mittels Antioxidanzien, wie z.B. Tocopherol wird untersucht (Kamal-Eldin & Yanishlieva 2002; Frankel et al. 2002). Die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren kann auch durch Enzyme mediiert werden. In diesem Zusammenhang sind Mitglieder der Cox- (Cyclooxygenase) und Lox- (Lipoxygenase) - Proteinfamilie zu erwähnen, die an definierten Stellen der Kohlenwasserstoffkette Hydroxylgruppen einführen (Lee et al. 2001; Reis &

Spickett 2012). Durch diese Reaktion werden z.B. aus AA bioaktive Lipidmediatoren gebildet (Hamberg et al. 1974; Hamberg & Samuelsson 1973; Bergstroem et al. 1964).

Wie bereits in Publikation 1 und 2 beschrieben, wirkt sich nicht oxidiertes DHA innerhalb von Phospholipiden positiv auf die Prozessierung des APP aus. Es aktiviert die α -Sekretase und reduziert die Aktivität der γ -Sekretase. In Publikation 3 wurde nun demonstriert, dass DHA die A β -Produktion signifikant reduziert. Die Daten werden durch andere *in vitro*- und Tiermodell- Studien unterstützt. Holmes *et al.* zeigten, dass DHA *in vitro* die Aktivität der γ -Sekretase reduziert (Holmes et al. 2012; Mulder et al. 1998) und Grimm *et al.* führten die Reduktion des A β -Gehalts durch DHA auf einen pleiotropen Wirkmechanismus zurück. Dieser Mechanismus beinhaltet eine Steigerung der nicht amyloidogenen, sowie eine Reduktion der amyloidogenen Prozessierung des APP durch nicht oxidiertes DHA (Grimm, Kuchenbecker, Grösgen, et al. 2011). Zusätzlich zur A β -Produktion, spielt die A β -Aggregation eine Rolle für die AD. In einer Studie am Tiermodell wurde gezeigt, dass die Aggregation des A β , die der Bildung von Plaques im Gehirn von AD-Patienten vorrausgeht, durch DHA reduziert und der Abbau von A β im Blut durch DHA verbessert wurde. In diesem Zusammenhang wurde auch ein Anstieg der Membranfluidität von Blutzellen durch DHA beobachtet. Dies resultierte in eine Abnahme von oxidativen Stress, welcher durch reaktive oxidative Spezies ausgelöst wird. Interessanterweise war DHA innerhalb der Blutzellmembranen an die *Lipid Rafts*, welche die amyloidogene Prozessierung des APP beeinflussen, gebunden (Hashimoto et al. 2015).

Ob DHA in Form von Phospholipiden oder als freie Fettsäure vorliegt, kann die Wirkungsweise von DHA beeinflussen. Unter physiologischen Bedingungen wird DHA im Blut als veresterte Fettsäure durch Lipoproteine transportiert. Für den Transport ins Gehirn passiert DHA die Blut-Hirn-Schranke nach rezeptormedierter Endozytose. Dabei lösen Lipasen der Endothelzellen an der Blut-Hirn-Schranke DHA vom Lipoprotein, wodurch es mittels eines Transporters (Nguyen et al. 2014) ins Gehirn gelangen kann. Passive Diffusion von DHA über die Blut-Hirn-Schranke ist zudem auch möglich. Nach Aufnahme in die Gehirnzellen kann DHA in Phospholipide integriert werden, wodurch es ein Bestandteil der Membran wird (Pan & Nicolazzo 2015). Dieser Transportmechanismus könnte auch für andere ungesättigte Fettsäuren oder oxidierte Lipide, die ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen, gelten. Jedenfalls wurden bereits oxidierte Derivate ungesättigter Fettsäuren im Blut und innerhalb des Gehirns nachgewiesen (Marcheselli et al. 2003; Serhan et al. 2002).

In Publikation 3 dieser Arbeit wurde die Steigerung der A β -Bildung durch oxidierte DHA-Derivate und Lipid-Peroxidationsprodukte gezeigt. Es wurden 5 oxidierte DHA Derivate und die beiden Lipid-Peroxidationsprodukte HHE und HNE in zellkulturbasierten Versuchen an SH-SY5Y Zellen und murinen, kortikalen Primärneuronen analysiert. HHE stammt aus dem Abbau von ω -3 Fettsäuren, während HNE von ω -6 Fettsäuren abgeleitet wird (Gladine et al. 2012; Bruce-Keller et al. 1998). Der in Publikation 3 nachgewiesene Anstieg von A β durch die oxidierten Lipide wurde von einer gesteigerten der Aktivität der β - und γ -Sekretase hervorgerufen. In Publikation 3 wurde weiterhin gezeigt, dass die Aktivität der β -Sekretase direkt durch die oxidierten Lipide beeinflusst wird, während die Aktivierung der γ -Sekretase indirekt über eine gesteigerte Expression der γ -Sekretase Bestandteile verursacht wird. Diese Effekte resultieren in einer vermehrten amyloidogenen Prozessierung des APP und sind schliesslich sogar in der Lage den positiven Effekt von nicht oxidiertem DHA auf die A β -Produktion zu revertieren. Nicht oxidiertes DHA reduzierte den A β Spiegel in Publikation 3 signifikant auf 85,9 % der Kontrolle. Bereits der Zusatz von 1% der oxidierten Lipide zu nicht oxidiertem DHA war ausreichend um die A β -Produktion im Vergleich zu DHA um 29% ansteigen zu lassen. Der Zusatz von 5% und 10% oxidierter Lipide liess diesen Effekt deutlich auf 37,4% bzw. 47,1% im Vergleich zu nicht oxidiertem DHA ansteigen. Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren für die APP Prozessierung.

Für HHE und HNE wurde bereits eine Wirkung auf die Proteolyse des APP nachgewiesen. Dabei steigerte HNE die Expression und die Aktivität der β -Sekretase BACE-1 in neuronalen Zellen. Dieser Effekt wurde durch oxidativen Stress hervorgerufen (Tamagno 2002). Außerdem wurde in einer Studie gezeigt, dass die γ -Sekretase Aktivität über HNE-Bindung an Nicastrin erhöht wird und die Bildung von A β ₄₂ in neuronalen Zellen dadurch ansteigt (Gwon et al. 2012). Diese Studie untermauert die Ergebnisse von Publikation 3 dieser Arbeit. In einer weiteren Studie wurde neben dem Einfluss der Lipid-Peroxidationsprodukte auf die Produktion von A β , auch ein Effekt auf den A β -Abbau gezeigt. HNE reduzierte die Expression und Aktivität des Endothelin-konvertierenden Enzyms (Endothelin converting enzyme, ECE). Darüber hinaus wurde eine Modifikation von ECE und des Insulin-degradierenden Enzyms (Insulin-degrading enzyme, IDE) durch HNE in neuronalen Zellen nachgewiesen (Wang et al. 2009). Es besteht die Möglichkeit, dass der amyloidogene Effekt neben den Lipid-Peroxidationsprodukten HHE und HNE, auch durch andere Oxidationsprodukte der ungesättigten Fettsäuren hervorgerufen werden kann, wie in Publikation 3 dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Das Auftreten von oxidierten Derivaten

nach Gabe von DHA hängt von der Form der Supplementierung ab. DHA als Phospholipid ist *in vitro* weniger anfällig für Oxidation als DHA-Triglyceride und verestertes DHA. Dies gilt auch für andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, allerdings wird DHA im Vergleich zur ω -6 Fettsäure AA schneller oxidiert. In einer Fütterungstudie am Mausmodell wurde gezeigt, dass DHA-Triglyceride und verestertes DHA die Lipidperoxidation im Blut und der Leber steigerten, während DHA als Phospholipid keinen derartigen Effekt verursachte (Song & Miyazawa 2001). In Retinazellen wurde demonstriert, dass DHA unter physiologischen Bedingungen protektiv wirkt, bei oxidativem Stress allerdings selbst die Lipidperoxidation und den ROS-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Dieser Stress wirkte sich auch auf die Integrität der Plasmamembran aus, diese Tatsache könnte die Prozessierung des APP beeinflussen (Liu et al. 2014). Im Gegensatz dazu ist nicht oxidiertes DHA in der Lage Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. In hippocampalen Mauszellen steigerte DHA die Expression der Glutathionperoxidase (PH-GPx/ GPx4), ein Enzym, das die Lipide der Plasmamembran vor Oxidation bewahrt. Zudem besitzt DHA die Fähigkeit neurotoxische Effekte durch A β , die auch oxidativen Stress hervorrufen können, in bestimmten Konzentrationen zu reduzieren (Casañas-Sánchez et al. 2014). Im Tierversuch führte die Fütterung von Mäusen mit einer DHA-reichen Diät zur Reduktion des A β -Gehalts im Kortex und Hippocampus, den Regionen des Gehirns die in der AD häufig betroffen sind. Marker für oxidativen Stress waren im Serum dieser Mäuse signifikant reduziert. Allerdings wurde in dieser Studie bei der Supplementierung des Futters mit DHA auf den Einsatz von Antioxidantien wie z.B. Zink, Selen und Vitamin E gesetzt, diese Vorgehensweise unterstreicht die Bedeutung der DHA Stabilisierung in Fütterungsstudien. Letztlich führte die Fütterung in dieser Studie auch zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse (Wang et al. 2015).

Der Schutz vor Lipidperoxidation kann auch durch andere ω -3 Fettsäuren gewährleistet werden. Dabei spielt die Anzahl der Doppelbindungen eine entscheidende Rolle. So ist im Rattenmodell EPA mit fünf Doppelbindungen protektiv, während α -LA mit drei Doppelbindungen keinen Schutz vor Lipidperoxidation bot (Saito & Kubo 2003). Im Vergleich zu EPA ist DHA länger und beinhaltet eine zusätzliche Doppelbindung, allerdings ist DHA im Gehirn die weitaus häufigere und wichtigste ω -3 Fettsäure, zusammengefasst in (Tassoni & Weisinger 2008; Bradbury 2011). Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass auch oxidierte DHA Derivate existieren, die sich positiv auf den A β -Gehalt und die Tau-Phosphorylierung auswirken können. Im Gehirn eines AD-Mausmodells (5xFAD) wurde gezeigt, dass mit der Nahrung aufgenommenes, oxidiertes DHA im Gehirn in Phospholipide, besonders PE,

eingebaut wird und dort auf biologische Prozesse wirkt (Torres et al. 2014). Ein anderes Derivat von DHA ist Neuroprotektin - D1 (NPD-1). Diesem Lipid wird eine anti-oxidative und anti-apoptische Wirkung zugeschrieben und es unterdrückt z.B. auch die A β ₄₂ induzierte Expression von pro-inflammatorischen Genen (Lukiw et al. 2005; Mukherjee et al. 2004).

(6) Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Lipiden auf die proteolytische Prozessierung des APP gezeigt und die daraus resultierenden Konsequenzen für die AD beschrieben.

In Publikation 1 wurde demonstriert, dass Phospholipide mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren und kurzkettige Phospholipide die α -Sekretase aktivieren. Dieser Effekt wurde in Zellkultur-basierten Versuchen und *ex vivo* in Membranen von humanen *post-mortem* Gehirnen nachgewiesen.

Publikation 2 verdeutlichte den Einfluss von PL auf die γ -Sekretase. Durch direkte Interaktion der PL mit der γ -Sekretase wurde die Aktivität des Enzyms reduziert und die Supplementierung von humanen *post-mortem* Gehirnproben von AD-Patienten ergab zudem eine Abnahme der γ -Sekretase Aktivität. Einzelne PL-Spezies mit ungesättigten Fettsäuren aktivierten außerdem die α -Sekretase.

Zuletzt wurde die Steigerung der A β -Produktion durch oxidierte DHA-Derivate und Lipid-Peroxidationsprodukte der ω -3 und ω -6 Fettsäuren in Publikation 3 gezeigt. Dieser Effekt resultiert aus einer Aktivierung der β - und γ -Sekretase im amyloidogenen Weg der APP Proteolyse. Verschiedene oxidierte Lipidspezies riefen diesen Effekt hervor und eine Supplementierung von DHA mit einer Mischung aus oxidierten Lipiden, kehrte sogar den protektiven Effekt von DHA für die AD um und ließ die A β -Produktion signifikant ansteigen.

In dieser Arbeit wurden, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, Wirkmechanismen von Lipiden aufgezeigt, welche die APP Prozessierung beeinflussen und dadurch die A β -Produktion reduzieren können.

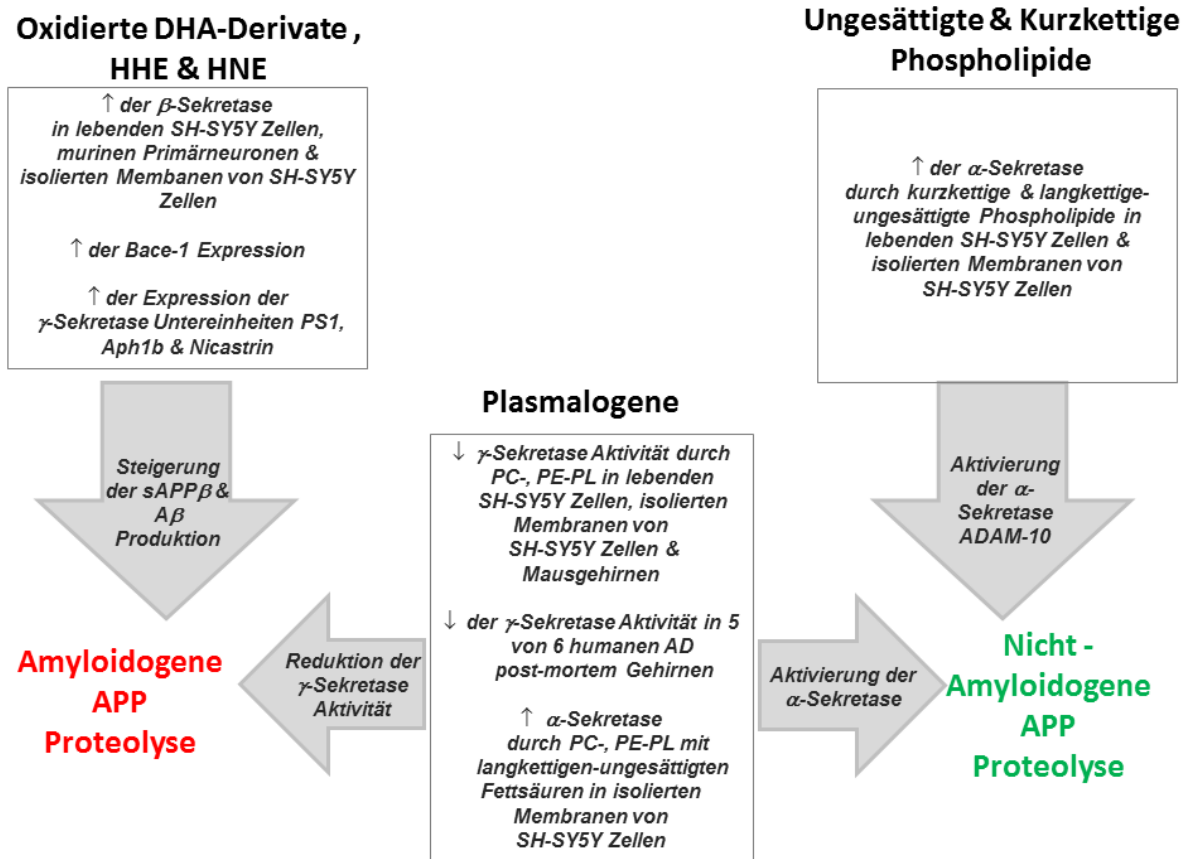


Abbildung 2 Schematischer Überblick der Ergebnisse ↓ Reduktion ↑ Aktivierung oder Steigerung

Abbildung 2 verdeutlicht die pleiotrope Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten Lipide auf die molekularen Grundlagen der AD. Die Zellkultur-basierten Versuche mit Phospholipiden und oxidierten Lipiden müssen im weiteren Vorgehen im Tiermodell analysiert werden und der Einfluss auf die A β -Produktion muss letztlich im Hinblick auf die Bildung von A β -Plaques und das Auftreten von Neurodegeneration untersucht werden. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung von präventiven Behandlungsansätzen, bevor der neuronale Zelltod eintritt und klinische Symptome der AD auftreten. Die Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit für die Therapie oder Prävention der AD, insbesondere das Auftreten oxidierten Derivate von DHA im humanen Gehirn, muss in zukünftigen Untersuchungen im Rahmen von klinischen Studien nachgewiesen werden.

(7) Beteiligung an weiteren Publikationen

Zusätzlich zu den Publikationen 1- 3 sind im Rahmen von Kooperationen weitere Projekte bearbeitet worden, die in wissenschaftlichen Journalen publiziert wurden. Diese Publikationen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Beteiligung an weiteren Publikationen

Publikation	Autoren	Journal
<i>(5) Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) increase Aβ-degradation by affecting insulin-degrading enzyme (IDE)</i> (Grimm, Mett et al. 2016)	Grimm MO*, Mett J*, Stahlmann CP, Haupenthal VJ , Blümel T, Stötzel H, Grimm HS, Hartmann T	Biochemistry and Cell Biology, April 2016, 10.1139/bcb-2015-0149 Impact factor 2,2 ⁺
<i>(6) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β- and γ-secretase cleavage regulates neprilysin expression.</i> (Grimm, Mett, et al. 2015)	Grimm MO*, Mett J*, Stahlmann CP, Grösgen S, Haupenthal VJ , Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T	Front Aging Neurosci. 2015 May 19;7:77 Impact factor 4,0 ⁺
<i>(7) Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of α-, γ- and δ-Tocopherol on Aβ Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells.</i> (Grimm, Stahlmann, et al. 2015)	Grimm MO*, Stahlmann CP*, Mett J, Haupenthal VJ , Zimmer VC, Lehmann J, Hundsdörfer B, Endres K, Grimm HS, Hartmann T	J Nutr Health Aging. 2015 Jun;19(6):646-56 Impact factor 3,0 ⁺
<i>(8) Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model: CD38 and AD Pathology.</i> (Blacher et al. 2015)	Blacher E, Dadali T, Bespalko A, Haupenthal VJ , Grimm MO, Hartmann T, Lund FE, Stein R, Levy A	Ann Neurol. 2015 Jul;78(1):88-103 Impact factor 10
<i>(9) PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease.</i> (Grimm, Hundsdörfer, et al. 2014)	Grimm MO*, Hundsdörfer B*, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Stahlmann CP, Haupenthal VJ , Rothhaar TL, Lehmann J, Pätzold A, Zinser EG, Tanila H, Shen J, Müller U, Grimm HS, Hartmann T	Cell Physiol Biochem. 2014;34(1):92-110. doi: 10.1159/000362987. Epub 2014 Jun 16. Impact factor 3,6 ⁺

weiter nächste Seite

Publikation	Autoren	Journal
<i>(10) Deficiency of sphingosine-1-phosphate lyase impairs lysosomal metabolism of the amyloid precursor protein.</i> (Karaca et al. 2014)	Karaca I, Tamboli IY, Glebov K, Richter J, Fell LH, Grimm MO, Haupenthal VJ , Hartmann T, Gräler MH, van Echten-Deckert G, Walter J	J Biol Chem, 2014, Jun 13;289(24):16761-72 Impact factor 4,6 ⁺
<i>(11) Nprilysin and Aβ Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease.</i> (Grimm, Mett, et al. 2013) - Übersichtsartikel -	Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ , Zimmer VC, Hartmann T	Front Aging Neurosci. 2013 Dec 23;5:98. doi: 10.3389/fnagi.2013.00098. Impact factor 4,0 ⁺
<i>(12) Upregulation of PGC-1α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP.</i> (Robinson et al. 2014)	Robinson A, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Haupenthal VJ , Hundsdörfer B, Stahlmann CP, Slobodskoy Y, Müller UC, Hartmann T, Stein R, Grimm MO	Aging Cell, 2014, Apr;13(2):263-72 Impact factor 6,3 ⁺
<i>(13) Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-β peptide degradation in Alzheimer's disease.</i> (Grimm, Lehmann, et al. 2014)	Grimm MO*, Lehmann J*, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Haupenthal VJ , Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann	Neurodegener Dis. 2014;13(2-3):75-81. doi: 10.1159/000355462. Epub 2013 Oct 30. Impact factor 2,9 ⁺
<i>(14) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study.</i> (Burg et al. 2013)	Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grösgen S, Hundsdörfer B, Haupenthal VJ , Zimmer VC, Mett J, Weingärtner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lütjohann D, Hartmann T, Grimm MO	J Neurosci. 2013 Oct 9;33(41):16072-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1506-13.2013. Impact factor 6,7 ⁺

* zu gleichen Teilen beteiligt

⁺ zum Zeitpunkt der Publikation

(8) Literaturverzeichnis

1. ADAPT Research Group, Lyketsos CG, Breitner JC, Green RC, Martin BK, Meinert C, Piantadosi S, Sabbagh M (2007) Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* 68, 1800–1808.
2. Adibhatla RM, Hatcher JF (2007) Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. *Future Lipidol.* 2, 403–422.
3. Alonso A del C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2, 783–787.
4. Alzheimer's Association (2014) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 10, 47–92.
5. Anand R, Gill K, Mahdi A (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *NP* 76, 27–50.
6. Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R (2007) Smoking as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Am. J. Epidemiol.* 166, 367–378.
7. Anttila T, Helkala E-L, Viitanen M, Kåreholt I, Fratiglioni L, Winblad B, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A, Kivipelto M (2004) Alcohol drinking in middle age and subsequent risk of mild cognitive impairment and dementia in old age: a prospective population based study. *BMJ Br. Med. J.* 329, 539.
8. Belyaev ND, Kellett K A B, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, Hooper NM, Turner AJ (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 41443–41454.
9. Bergstroem S, Danielsson H, Samuelsson B (1964) The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 10.
10. Bharadwaj PR, Dubey AK, Masters CL, Martins RN, Macreadie IG (2009) A β aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 412–21.
11. Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res.* 33, 2643–2652.
12. Blacher E, Dadali T, Bepalko A, Hauptenthal VJ, Grimm MOW, Hartmann T, Lund FE, Stein R, Levy A (2015) Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model. *Ann. Neurol.* 78, 88–103.
13. Black RA, White JM (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654–659.
14. Blenow K, Leon MJ De, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *368*, 387–403.
15. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
16. Bonarek M, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Iron A, Dubroca B, Dartigues JF (2000) Relationships between Cholesterol, Apolipoprotein E Polymorphism and Dementia: A Cross-Sectional Analysis from the PAQUID Study. *Neuroepidemiology* 19, 141–148.
17. Bradbury J (2011) Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain. *3*, 529–554.
18. Braverman NE, Moser AB (2012) Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1442–1452.
19. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated Intramembrane Proteolysis. *Cell* 100, 391–398.
20. Bruce-Keller AJ, Li YJ, Lovell MA, Kraemer PJ, Gary DS, Brown RR, Markesbery WR, Mattson MP (1998) 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 257–267.
21. Buffone MG, Verstraeten S V, Calamera JC, Doncel GF (2009) High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa Are Associated With Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J. Androl.* 30, 552–558.

22. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Gro S, Hundsdo B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weinga O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lu D, Hartmann T, Grimm MOW (2013) Plant Sterols the Better Cholesterol in Alzheimer ' s Disease ? A Mechanistical Study. 33, 16072–16087.
23. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black R a (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765–27767.
24. Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2016) M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice. *Neuron* 49, 671–682.
25. Casañas-Sánchez V, Pérez J a., Fabelo N, Herrera-Herrera A V., Fernández C, Marín R, González-Montelongo MC, Díaz M (2014) Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. *J. Neurochem.* 131, 470–483.
26. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, Wenk MR, Shui G, Di Paolo G (2012) Comparative Lipidomic Analysis of Mouse and Human Brain with Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 287, 2678–2688.
27. Chasseigneaux S, Allinquant B (2012) Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J. Neurochem.* 120, 99–108.
28. Chauhan A, Ray I, Chauhan VS (2000) Interaction of Amyloid Beta-Protein with Anionic Phospholipids: Possible Involvement of Lys28 and C-Terminus Aliphatic Amino Acids. *Neurochem. Res.* 25, 423–429.
29. Chiu C-C, Su K-P, Cheng T-C, Liu H-C, Chang C-J, Dewey ME, Stewart R, Huang S-Y (2008) The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1538–1544.
30. Choy RW, Cheng Z, Schekman R (2012) Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β (A β) production in the trans -Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2077-2082
31. Corder EH, Saunders a M, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses a D, Haines JL, Pericak-Vance M a (1993a) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
32. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2070–2075.
33. de la Monte SM, Wands JR (2008) Alzheimer ' s Disease Is Type 3 Diabetes — Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2, 1101–1113.
34. Ebert D, Haller RG, Walton ME (2003) Energy Contribution of Octanoate to Intact Rat Brain Metabolism Measured by 13C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Neurosci.* 23, 5928–5935.
35. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.
36. Endo A (2008) A gift from nature: the birth of the statins. *Nat Med* 14, 1050–1052.
37. Endres K, Fahrenholz F (2010) Upregulation of the α -secretase ADAM10-risk or reason for hope? *FEBS J.* 277, 1585–1596.
38. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Sci.* 248, 1122–1124.
39. Fabelo N, Martín V, Marín R, Moreno D, Ferrer I, Díaz M (2014) Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol. Aging* 35, 1801–1812.
40. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839–862.

41. Farooqui AA, Horrocks LA (2001) Plasmalogens , Phospholipase A 2 , and Docosaehaenoic Acid Turnover in Brain Tissue. 16, 263–272.
42. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lütjohann D, Keller P, Runz H, Kühl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K , Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 5856–5861.
43. Fernando WM, Martins IJ, Goozee KG, Brennan CS, Jayasena V , Martins RN (2015) The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. Br. J. Nutr., 1–14.
44. 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 , Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. Lancet 366, 2112–2117.
45. Finckh U (2006) Genetische Faktoren bei Alzheimer-Demenz. Dtsch. Arztebl. 103, A1010–A1016.
46. Frankel EN, Satué-Gracia T, Meyer AS , German JB (2002) Oxidative Stability of Fish and Algae Oils Containing Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Bulk and in Oil-in-Water Emulsions. J. Agric. Food Chem. 50, 2094–2099.
47. Freude KK, Penjwini M, Davis JL, LaFerla FM , Blurton-Jones M (2011) Soluble Amyloid Precursor Protein Induces Rapid Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. J. Biol. Chem. 286 , 24264–24274.
48. Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, Cederholm T , al et (2006) Ω -3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate alzheimer disease: Omegad study: a randomized double-blind trial. Arch. Neurol. 63, 1402–1408.
49. Fukaya T, Gondaira T, Kashiya Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, Kiso Y , Sakakibara M (2007) Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. Neurobiol. Aging 28, 1179–1186.
50. Galasko DR, Peskind E, Clark CM, Quinn JF, Ringman JM, Jicha GA, Cotman C, Cottrell B, Montine TJ, Thomas RG , Aisen P (2012) Antioxidants for Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial With Cerebrospinal Fluid Biomarker Measures. Arch. Neurol. 69, 836–841.
51. Galbete JL, Martin TR, Peressini E, Modena P, Bianchi R , Forloni G (2000) Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. Biochem. J. 348 Pt 2, 307–13.
52. Gandotra S KJ and VDWA (2014) Efficacy of Adjunctive Extra Virgin Coconut Oil Use in Moderate to Severe Alzheimer's Disease. Int. J. Sch. Cogn. Psychol. 1, 1–10.
53. Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI , Gershfeld NL (1995) Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. Brain Res. 698, 223–226.
54. Gladine C, Roy NC, Rigaudière J-P, Laillet B, Da Silva G, Joly C, Pujos-Guillot E, Morio B, Feillet-Coudray C, McNabb WC, Chardigny J-M , Comte B (2012) Increasing intake of long-chain n-3 PUFA enhances lipoperoxidation and modulates hepatic gene expression in a dose-dependent manner. Br. J. Nutr. 107, 1254–73.
55. Gomez-Brouchet A, Pchejetski D, Brizuela L, Garcia V, Altié M-F, Maddelein M-L, Delisle M-B , Cuvillier O (2007) Critical Role for Sphingosine Kinase-1 in Regulating Survival of Neuroblastoma Cells Exposed to Amyloid- β Peptide. Mol. Pharmacol. 72 , 341–349.
56. Goodenowe DB, Cook LL, Liu J, Lu Y, Jayasinghe DA, Ahiahonu PWK, Heath D, Yamazaki Y, Flax J, Krenitsky KF, Sparks DL, Lerner A, Friedland RP, Kudo T, Kamino K, Morihara T, Takeda M , Wood PL (2007) Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. J. Lipid Res. 48 , 2485–2498.
57. Grimm HS, Behr D, Lichtenthaler SF, Shearman MS, Beyreuther K , Hartmann T (2003) γ -Secretase Cleavage Site Specificity Differs for Intracellular and Secretory Amyloid β . J. Biol. Chem. 278 , 13077–13085.

58. Grimm MOW, Grimm HS, Patzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschape J-A, Strooper B De, Muller U, Shen J , Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-[beta] and presenilin. *Nat Cell Biol* 7, 1118–1123.
59. Grimm MOW, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T , Bergmann C (2008) Independent Inhibition of Alzheimer Disease beta- and gamma-Secretase Cleavage by Lowered Cholesterol Levels. *J Biol Chem.* 283, 11302–11311.
60. Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS , Hartmann T (2011) From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin–plasmalogens derivatives in Alzheimer’s disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 7713–7722.
61. Grimm MOW, Grösgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Müller U, Fassbender K, Riemenschneider M, Grimm HS , Hartmann T (2011) Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer’s Disease. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011, 695413.
62. Grimm MOW , Hartmann T (2013) Recent Understanding of the Molecular Mechanisms of Alzheimer’s Disease. *J. Addict. Res. Ther.* 0, 1–15.
63. Grimm MOW, Hundsdörfer B, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Lehmann J, Pätzold A, Zinser EG, Tanila H, Shen J, Müller U, Grimm HS , Hartmann T (2014) PS Dependent APP Cleavage Regulates Glucosylceramide Synthase and is Affected in Alzheimer’s Disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 92–110.
64. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B, Péter M, Vigh L, Grimm HS , Hartmann T (2011) Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid β Production via Multiple Pleiotropic Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 286, 14028–14039.
65. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Rothhaar TL, Grösgen S, Hundsdörfer B, Burg VK, Friess P, Müller U, Grimm HS, Riemenschneider M , Hartmann T (2011) Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* 116, 916–925.
66. Grimm MOW, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS , Hartmann T (2014) Impact of Vitamin D on Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid- β Peptide Degradation in Alzheimer’s Disease. *Neurodegener. Dis.* 13, 75–81.
67. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS , Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front. Aging Neurosci.* 7, 77.
68. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Blümel T, Stötzel H, Grimm HS, Hartmann T (2016) Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) increase A β -degradation by affecting insulin-degrading enzyme (IDE). *Biochem Cell Biol.* 2016 April [Epub ahead of print].
69. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC , Hartmann T (2013) Neprilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* 5, 98.
70. Grimm MOW, Rothhaar TL, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Kins S, Grimm HS , Hartmann T (2012) Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J. Nutr. Biochem.* 23, 1214–1223.
71. Grimm MOW, Stahlmann CP, Mett J, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Lehmann J, Hundsdörfer B, Endres K, Grimm HS , Hartmann T (2015) Vitamin E: Curse or benefit in Alzheimer’s disease? A systematic investigation of the impact of α -, γ - and δ -tocopherol on A β generation and degradation in neuroblastoma cells. *J. Nutr. Health Aging* 19, 646–654.
72. Grimm MOW, Tschäpe J-A, Grimm HS, Zinser EG , Hartmann T (2006) Altered membrane fluidity and lipid raft composition in presenilin-deficient cells. *Acta Neurol. Scand.* 114, 27–32.
73. Grimm MOW, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS , Hartmann T (2013) The Impact of Cholesterol , DHA, and Sphingolipids on Alzheimer ’ s Disease. *Biomed Res Int.* 2013,814390

74. Grimm MOW, Zinser EG, Grösgen S, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Burg VK, Kaestner L, Bayer TA, Lipp P, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2012) Amyloid Precursor Protein (APP) Mediated Regulation of Ganglioside Homeostasis Linking Alzheimer's Disease Pathology with Ganglioside Metabolism. *PLoS One* 7, e34095.
75. Grimm MOW, Rothhaar TL, Hartmann T (2012) The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Exp. Brain Res.* 217, 365–375.
76. Group AR (2007) Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* 68, 1800–1808.
77. Guan Z, Wang Y, Cairns NJ, Lantos PL, Dallner G, Sindelar PJ (1999) Decrease and Structural Modifications of Phosphatidylethanolamine Plasmalogen in the Brain with Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58.
78. Gwon a. R, Park JS, Arumugam T V., Kwon YK, Chan SL, Kim SH, Baik SH, Yang S, Yun YK, Choi Y, Kim S, Tang SC, Hyun DH, Cheng A, Dann CE, Bernier M, Lee J, Markesbery WR, Mattson MP, Jo DG (2012) Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 11, 559–568.
79. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Normal Cellular Processing of the β -Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid β Peptide and Related Molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 109–116.
80. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of cell-surface [beta]-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500–503.
81. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325.
82. Haeffner EW, Privett OS (1975) Influence of dietary fatty acids on membrane properties and enzyme activities of liver mitochondria of normal and hypophysectomized rats. *Lipids* 10, 75–81.
83. Hamberg M, Samuelsson B (1973) Detection and Isolation of an Endoperoxide Intermediate in Prostaglandin Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 899–903.
84. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1974) Prostaglandin Endoperoxides. A New Concept Concerning the Mode of Action and Release of Prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3824–3828.
85. Han X (2007) Potential mechanisms contributing to sulfatide depletion at the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: a tale of shotgun lipidomics. *J. Neurochem.* 103, 171–179.
86. Han X, Holtzman DM, McKeel DW (2001) Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.* 77, 1168–1180.
87. Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3, 1016–1020.
88. Hashimoto M, Hossain S, Katakura M, Al Mamun A, Shido O (2015) The binding of A β 1–42 to lipid rafts of RBC is enhanced by dietary docosahexaenoic acid in rats: Implicates to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 1402–1409.
89. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO (2011) Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog. Lipid Res.* 50, 62–74.
90. Hauser PS, Ryan RO (2013) Impact of apolipoprotein E on Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 18, 1199–1216.
91. Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2012) Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified γ -secretase. *Biochemistry* 51, 3565–75.
92. Horrocks LA, Sharma M (1982) Plasmalogens and O-alkyl glycerophospholipids. In *Phospholipids*. Hawthorne, JN, Ansell, GB, eds. pp. 51–93.

93. Horrocks LA , Yeo YK (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40, 211–225.
94. Huang W, Qiu C, Winblad B , Fratiglioni L (2002) Alcohol consumption and incidence of dementia in a community sample aged 75 years and older. *J. Clin. Epidemiol.* 55, 959–964.
95. Hullin-Matsuda F, Taguchi T, Greimel P , Kobayashi T (2014) Lipid compartmentalization in the endosome system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 31, 48–56.
96. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zerfass R, Förstl H, Sandbrink R, Masters CL , Beyreuther K (1996) Analysis of Heterogeneous β A4 Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Blood by a Newly Developed Sensitive Western Blot Assay. *J. Biol. Chem.* 271 , 22908–22914.
97. Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M , Fujino T (2012) Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J. Neuroinflammation* 9, 197.
98. Igarashi M, Ma K, Gao F, Kim H-W, Rapoport SI , Rao JS (2011) Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer disease prefrontal cortex. *J. Alzheimers. Dis.* 24, 507–517.
99. Janssen CI, Zerbi V, Mutsaers MP, de Jong BS, Wiesmann M, Arnoldussen IA, Geenen B, Heerschap A, Muskiet FA, Jouni ZE, van Tol EA, Gross G, Homberg JR, Berg BM , Kiliaan AJ (2015) Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 26, 24–35.
100. Kamal-Eldin A , Yanishlieva N V (2002) N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 825–836.
101. Karaca I, Tamboli IY, Glebov K, Richter J, Fell LH, Grimm MO, Hauptenthal VJ, Hartmann T, Gräler MH, Echten-deckert G Van , Walter J (2014) Deficiency of Sphingosine-1-phosphate Lyase Impairs Lysosomal Metabolism of the Amyloid Precursor Protein. 289, 16761–16772.
102. Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL , Klausner RD (1982) The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* 94, 1–6.
103. Katafuchi T, Ifuku M, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M , Fujino T (2012) Effects of plasmalogens on systemic lipopolysaccharide-induced glial activation and β -amyloid accumulation in adult mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1262, 85–92.
104. Kidd PM (2007) Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern. Med. Rev.* 12, 207–27.
105. Kim W-K , Pae Y-S (1996) Involvement of N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci. Lett.* 216, 117–120.
106. Kishimoto Y, Agranoff BW, Radin NS , Burton RM (1969) Comparison of the fatty acids of lipids of subcellular brain fractions. *J. Neurochem.* 16, 397–404.
107. Kivipelto M, Helkala E-L, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J , Nissinen A (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer`s disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451.
108. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L , al et (2005) Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 62, 1556–1560.
109. Koivisto H, Grimm MO, Rothhaar TL, Berkecz R, Lütjohann D, Giniatullina R, Takalo M, Miettinen PO, Lahtinen H-M, Giniatullin R, Penke B, Janáky T, Broersen LM, Hartmann T , Tanila H (2016) Special lipid-based diets alleviate cognitive deficits in the APPswe/PS1dE9 transgenic mouse model of Alzheimer`s disease independent of brain amyloid deposition. *J. Nutr. Biochem.* 25, 157–169.
110. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W , Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5815–5820.
111. Kojro E, Postina R, Buro C, Meiringer C, Gehrig-Burger K , Fahrenholz F (2006) The neuropeptide PACAP promotes the α -secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J.* 20 , 512–514.

112. Koo EH , Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269 , 17386–17389.
113. Kosicek M , Hecimovic S (2013) Phospholipids and Alzheimer’s Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1310–1322.
114. Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, Sakakibara M, Yoshimoto T, Guo J, Yamashima T (2006) Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* 56, 159–164.
115. Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Roßner S , Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29, 3020–3032.
116. Lahdo R, Coillet-Matillon S, Chauvet J-P , de La Fournière-Bessueille L (2002) The amyloid precursor protein interacts with neutral lipids. *Eur. J. Biochem.* 269, 2238–2246.
117. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C , Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 , 3922–3927.
118. LaPointe NE, Morfini G, Pigino G, Gaisina IN, Kozikowski AP, Binder LI , Brady ST (2009) The Amino Terminus of Tau Inhibits Kinesin-Dependent Axonal Transport: Implications for Filament Toxicity. *J. Neurosci. Res.* 87, 440–451.
119. Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR , Havlik RJ (2015) Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu, #x2013;Asia aging study^{#x2606;} *Neurobiol. Aging* 21, 49–55.
120. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH , Hwang D (2001) Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276 , 16683–16689.
121. Lee LK, Shahar S, Chin A-V , Yusoff NAM (2013) Docosahexaenoic acid-concentrated fish oil supplementation in subjects with mild cognitive impairment (MCI): a 12-month randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*. 225, 605–612.
122. Lenaz G (1987) Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Biosci. Rep.* 7, 823–837.
123. Llewellyn DJ, Lang IA, Langa KM, Muniz-Terrera G, Phillips CL, Cherubini A, Ferrucci L, Melzer D (2010) Vitamin d and risk of cognitive decline in elderly persons. *Arch. Intern. Med.* 170, 1135–1141.
124. Lichtenthaler SF (2011) Alpha-secretase in Alzheimer’s disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* 116, 10–21.
125. Lim WLF, Martins IJ , Martins RN (2014) The Involvement of Lipids in Alzheimer’s Disease. *J. Genet. Genomics* 41, 261–274.
126. Lin N, Qin S, Luo S, Cui S, Huang G , Zhang X (2014) Homocysteine induces cytotoxicity and proliferation inhibition in neural stem cells via DNA methylation in vitro. 281, 2088–2096.
127. Liu Y, Zhang D, Wu Y , Ji B (2014) Docosahexaenoic acid aggravates photooxidative damage in retinal pigment epithelial cells via lipid peroxidation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 140, 85–93.
128. Liu Z-H, Yip PK, Adams L, Davies M, Lee JW, Michael GJ, Priestley J V. , Michael-Titus AT (2015) A Single Bolus of Docosahexaenoic Acid Promotes Neuroplastic Changes in the Innervation of Spinal Cord Interneurons and Motor Neurons and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 35, 12733–12752.
129. Livak KJ , Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
130. Lue L-F, Kuo Y-M, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE , Rogers J (1999) Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer’s Disease. *Am. J. Pathol.* 155, 853–862.
131. Lukiw WJ, Cui J, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN , Bazan NG (2005) A role for docosahexaenoic acid – derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115, 2774–2783.

132. Mann DMA (1991) The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 83, 81–86.
133. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG (2003) Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 43807–43817.
134. Marenchino M, Williamson PTF, Murri S, Zandomenighi G, Wunderli-Allenspach H, Meier BH, Krämer SD (2008) Dynamics and Cleavability at the α -Cleavage Site of APP(684-726) in Different Lipid Environments. *Biophys. J.* 95, 1460–1473.
135. Markesbery WR, Lovell MA (1998) Four-Hydroxynonenal, a Product of Lipid Peroxidation, is Increased in the Brain in Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* 19, 33–36.
136. Mclean CA, RA C, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Vbeyreuther K, Bush AI, CL M (1999) Soluble Pool of Abeta Amyloid as a Determinant of Severity of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.
137. van Meer G, de Kroon AIPM (2010) Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* 124, 5–8.
138. Merched A, Xia Y, Visvikis S, Serot JM, Siest G (2000) Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 27–30.
139. Mezyk R, Bzowska M, Bereta J (2003) Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Acta Biochim. Pol.* 50, 625–645.
140. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8491–6.
141. Mulder M, Ravid R, Swaab DF, de Kloet ER, Haasdijk ED, Julk J, van der Boom J, Havekes LM (1998) Reduced Levels of Cholesterol, Phospholipids, and Fatty Acids in Cerebrospinal Fluid of Alzheimer Disease Patients Are Not Related to Apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12.
142. Müller T, Schrötter A, Loosse C, Pfeiffer K, Theiss C, Kauth M, Meyer HE, Marcus K (2013) A ternary complex consisting of AICD, FE65, and TIP60 down-regulates Stathmin1. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834, 387–394.
143. Müller U, Wild K (2013) Structure and Function of the APP Intracellular Domain in Health and Disease. *Intech, Rijeka*, 3–22. *Isbn* 978-953-51-1009-5
144. Nevin KG, Rajamohan T (2004) Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clin. Biochem.* 37, 830–835.
145. Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh ELK, Silver DL (2014) Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506.
146. Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ (1992b) Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1671–1675.
147. Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH (2000) The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total A β in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 48, 913–918.
148. Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. 580, 2994–3005
149. Onodera T, Futai E, Kan E, Abe N, Uchida T, Kamio Y, Kaneko J (2015) Phosphatidylethanolamine plasmalogen enhances the inhibiting effect of phosphatidylethanolamine on γ -secretase activity. *J. Biochem.* 157, 301–9.
150. Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S (2012) Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub* 24, 152–158.
151. Page KA, Williamson A, Yu N, McNay EC, Dzuira J, McCrimmon RJ, Sherwin RS (2009) Medium-Chain Fatty Acids Improve Cognitive Function in Intensively Treated Type 1 Diabetic Patients and Support In Vitro Synaptic Transmission During Acute Hypoglycemia. *Diabetes* 58, 1237–1244.

152. Pan Y , Nicolazzo HK and JA (2015) The Impact of Docosahexaenoic Acid on Alzheimer's Disease: Is There a Role of the Blood-Brain Barrier? *Curr. Clin. Pharmacol.* 10, 222–241.
153. Peters I, Igbavboa U, Schütt T, Haidari S, Hartig U, Rosello X, Böttner S, Copanaki E, Deller T, Kögel D, Wood WG, Müller WE , Eckert GP (2009) The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788, 964–972.
154. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL , McClure RJ (2001) Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 26, 771–782.
155. Pliássova A, Lopes JP, Lemos C, Oliveira CR, Cunha RA , Agostinho P (2015) The Association of Amyloid- β Protein Precursor With α - and β -Secretases in Mouse Cerebral Cortex Synapses Is Altered in Early Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.*
156. Polazzi E, Mengoni I, Peña-Altamira E, Massenzio F, Virgili M, Petralla S , Monti B (2015) Neuronal Regulation of Neuroprotective Microglial Apolipoprotein E Secretion in Rat In Vitro Models of Brain Pathophysiology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 818–834.
157. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F , Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113, 1456–1464.
158. Prasad MR, Lovell M a, Yatin M, Dhillon H , Markesbery WR (1998) Regional membrane phospholipid alterations in alzheimers-disease. *Neurochem. Res.* 23, 81–88.
159. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T , Prina M (2015) World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International, London
160. PS A, KA S, Grundman M , Al E (2003) Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on alzheimer disease progression: A randomized controlled trial. *JAMA* 289, 2819–2826.
161. Purves WK, Sadava D, Orians GH , Heller CH (2006) *Biologie*. Elsevier, München
162. Qiu C, Kivipelto M , von Strauss E (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* 11, 111–128.
163. Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Dyck C Van, Galvin JE, Emond J, Jack CR Jr, Weiner M, Shinto L , Aisen PS (2010) Docosahexaenoic Acid Supplementation and Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *JAMA* 304, 1903–1911.
164. Ramirez-Bermudez J (2012) Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Arch. Med. Res.* 43, 595–9.
165. Reed B, Villeneuve S, Mack W, DeCarli C, HC C , Jagust W (2014) Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* 71, 195–200.
166. Reid PC, Urano Y, Kodama T , Hamakubo T (2007) Alzheimer's Disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 383–392.
167. Reis A , Spickett CM (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 2374–2387.
168. Reitz C, Tang M-X, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R , Luchsinger JA (2010) Association of Higher Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Elderly Individuals and Lower Risk of Late-Onset Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* 67, 1491–1497.
169. Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL , Triller A (2010) Deleterious Effects of Amyloid β Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739–754.
170. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD , Morrow JD (1998) Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid . *J. Biol. Chem.* 273 , 13605–13612.
171. Robinson A, Mett J, Grösgen S, Zimmer VC, Hauptenthal VJ, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Hartmann T, Slobodskoy Y, Müller, Ulrike CM, Stein R , Grimm MOW (2014) *Aging Cell.* , 263–272.
172. Ruitenbergh A, van Swieten JC, Witteman JCM, Mehta KM, van Duijn CM, Hofman A , Breteler MMB (2002) Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet* 359, 281–286.

173. Saito M , Kubo K (2003) Relationship between tissue lipid peroxidation and peroxidizability index after α -linolenic, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid intake in rats. *Br. J. Nutr.* 89, 19–28.
174. Satpute-Krishnan P, DeGiorgis JA, Conley MP, Jang M , Bearer EL (2006) A peptide zipcode sufficient for anterograde transport within amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 , 16532–16537.
175. Selkoe DJ , Wolfe MS (2016) Presenilin: Running with Scissors in the Membrane. *Cell* 131, 215–221.
176. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G , Moussignac R-L (2002) Resolvins: A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin Treatment that Counter Proinflammation Signals. *J. Exp. Med.* 196, 1025–1037.
177. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D’Agostino RB, Wilson PWF , Wolf PA (2002) Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 346, 476–483.
178. Shen B, Wang Y, Wang X, Du Y, Guo S , Cong L (2016) Estrogen induced the expression of ADAM9 through estrogen receptor α but not estrogen receptor β in cultured human neuronal cells. *Gene* 576, 823–827.
179. Shinohara M, Sato N, Shimamura M, Kurinami H, Hamasaki T, Chatterjee A, Rakugi H , Morishita R (2014) Possible modification of Alzheimer’s disease by statins in midlife: interactions with genetic and non-genetic risk factors. *Front. Aging Neurosci.* 6, 71.
180. Simons K , Van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197–6202.
181. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG , Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6460–6464.
182. Simons M, Schwärzler F, Lütjohann D, Von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T , Schulz JB (2002) Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer’s disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* 52, 346–350.
183. Sims NR, Smith CCT, Davison AN, Bowen DM, Flack RHA, Snowden JS , Neary D (1980) Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer’s disease. *Lancet* 315, 333–336.
184. Singh M (2005) Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J. Pediatr.* 72, 239–242.
185. Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6075–9.
186. Słomnicki ŁP , Leśniak W (2008) A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 68, 219–228.
187. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ , Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
188. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K , Dallner G (1991) Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer’s disease. *Lipids* 26, 421–425.
189. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K , Dallner G (1990) Lipid Compositions of Different Regions of the Human Brain During Aging. *J. Neurochem.* 54, 415–423.
190. Song JH , Miyazawa T (2001) Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis* 155, 9–18.
191. Sonnino S, Aureli M, Grassi S, Mauri L, Prioni S , Prinetti A (2014) Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 50, 130-148.
192. Stokes CE , Hawthorne JN (1987) Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J. Neurochem.* 48, 1018–1021.
193. Strittmatter WJ , Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease. (1996) *Annu Rev Neurosci.* 19, 53-77.

194. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K , Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390.
195. Sun GY , Sun AY (1972) Phospholipids and acyl groups of synaptosomal and myelin membranes isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 280, 306–315.
196. Suzuki H, Park SJ, Tamura M , Ando S (1998) Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech. Ageing Dev.* 101, 119–128.
197. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J , Herrmann N (2015) A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer’s Disease. *Biol. Psychiatry* 68, 930–941.
198. Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T , Tomita T (2015) Synthetic ceramide analogues increase amyloid- β 42 production by modulating γ -secretase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 194–199.
199. Tamagno E (2002) Oxidative Stress Increases Expression and Activity of BACE in NT2 Neurons. *Neurobiol. Dis.* 10, 279–288.
200. Tappia P, Ladha S, Clark D , Grimble R (1997) The influence of membrane fluidity, TNF receptor binding, cAMP production and GTPase activity on macrophage cytokine production in rats fed a variety of fat diets. *Mol. Cell. Biochem.* 166, 135–143.
201. Tassoni D, Kaur G, Weisinger RS, Sinclair AJ (2008) The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac J Clin Nutr.* 17, 220–228.
202. Teunissen CE, Lütjohann D, von Bergmann K, Verhey F, Vreeling F, Wauters A, Bosmans E, Bosma H, van Boxtel MPJ, Maes M, Delanghe J, Blom HJ, Verbeek MM, Rieckmann P, De Bruijn C, Steinbusch HWM , de Vente J (2016) Combination of serum markers related to several mechanisms in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 24, 893–902.
203. Torres M, Price SL, Fiol-Deroque M a., Marcilla-Etxenike A, Ahyayauch H, Barceló-Coblijn G, Terés S, Katsouri L, Ordinas M, López DJ, Ibarburen M, Goñi FM, Busquets X, Vitorica J, Sastre M, Escribá P V. (2014) Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer’s disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1680–92.
204. Ulrich J, Burchett J, Restivo J, Schuler D, Verghese P, Mahan T, Landreth G, Castellano J, Jiang H, Cirrito J , Holtzman D (2013) In vivo measurement of apolipoprotein E from the brain interstitial fluid using microdialysis. *Mol. Neurodegener.* 8, 1–7.
205. Vanmierlo T, Popp J, Kölsch H, Friedrichs S, Jessen F, Stoffel-Wagner B, Bertsch T, Hartmann T, Maier W, von Bergmann K, Steinbusch H, Mulder M , Lütjohann D (2011) The plant sterol brassicasterol as additional CSF biomarker in Alzheimer’s disease. *Acta Psychiatr. Scand.* 124, 184–192.
206. VanRollins M , Murphy RC (1984) Autooxidation of docosahexaenoic acid: analysis of ten isomers of hydroxydocosahexaenoate. *J. Lipid Res.* 25 , 507–517.
207. Vassar R, Bennett BD, , Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999) β -Secretase Cleavage of Alzheimer’s Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* 286, 735–741.
208. Vina J, Lloret A, Giraldo E , Alonso MCB and MD (2011) Antioxidant Pathways in Alzheimers Disease: Possibilities of Intervention. *Curr. Pharm. Des.* 17, 3861–3864.
209. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG , Golde TE (2002) Cholesterol-Dependent γ -Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9, 11–23.
210. Wang R, Wang S, Malter JS , Wang D-S (2009) Effects of 4-Hydroxy-Nonenal and Amyloid- β on Expression and Activity of Endothelin Converting Enzyme and Insulin Degrading Enzyme in SH-SY5Y Cells. *J. Alzheimers. Dis.* 17, 489.

211. Wang S, Cu Y, Wang C, Xie W, Ma L, Zhu J, Zhang Y, Dang R, Wang D, Wu Y, Wu Q (2015) Protective Effects of Dietary Supplementation with a Combination of Nutrients in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 10, e0143135..
212. Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, Badmajew E, Tarnawski M, Reisberg B, Mlodzik B, De Leon MJ, Miller DC (1999) Cerebellar atrophy in Alzheimer's disease—clinicopathological correlations. *Brain Res.* 818, 41–50.
213. Wells K, Farooqui A, Liss L, Horrocks L (1995) Neural membrane phospholipids in alzheimer disease. *Neurochem. Res.* 20, 1329–1333.
214. Wenk MR (2005) The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* 4, 594–610.
215. Wolfe MS, Guénette SY (2007) APP at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 3157–3161.
216. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
217. Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung G-YR, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, Jia J, Gauthier S (2012) Early-Onset Familial Alzheimer's Disease (EOFAD). *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. des Sci. Neurol.* 39, 436–445.
218. Yadav R, Tiwari N (2014) Lipid Integration in Neurodegeneration: An Overview of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 50, 168–176.
219. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC-M (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem. Int.* 58, 321–329.
220. Yang X, Sun GY, Eckert GP, Lee JC-M (2014) Cellular Membrane Fluidity in Amyloid Precursor Protein Processing. *Mol. Neurobiol.* 50, 119–129.
221. Yoon I-S, Chen E, Busse T, Repetto E, Lakshmana MK, Koo EH, Kang DE (2007) Low-density lipoprotein receptor-related protein promotes amyloid precursor protein trafficking to lipid rafts in the endocytic pathway. *FASEB J.* 21, 2742–2752.
222. Zhou Y, Suram A, Venugopal C, Prakasam A, Lin S, Su Y, Li B, Paul SM, Sambamurti K (2008) Geranylgeranyl pyrophosphate stimulates γ -secretase to increase the generation of A β and APP-CTF γ . *FASEB J.* 22, 47–54.
223. Zuliani G, Cavalieri M, Galvani M, Volpato S, Cherubini a, Bandinelli S, Corsi a M, Lauretani F, Guralnik JM, Fellin R, Ferrucci L (2010) Relationship between low levels of high-density lipoprotein cholesterol and dementia in the elderly. The InChianti study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 65, 559–64.
224. Zylberstein DE, Lissner L, Björkelund C, Mehlig K, Thelle DS, Gustafson D, Östling S, Waern M, Guo X, Skoog I (2015) Midlife homocysteine and late-life dementia in women. A prospective population study. *Neurobiol. Aging* 32, 380–386.

(C) Danksagung

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Tobias Hartmann für seine Bereitschaft mich in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen und die Bereitstellung des finanziellen Rahmens, durch den die Durchführung dieser Arbeit erst möglich wurde. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Marcus Grimm möchte ich besonders für die wissenschaftliche Begleitung dieser Arbeit danken. Durch die unermüdliche und zielgerichtete Unterstützung seinerseits, durch die er mir immer mit fundiertem Rat zur Seite stand, wurde diese Arbeit maßgeblich beeinflusst. Nicht zuletzt möchte ich mich für das kritische Lesen dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Heike Grimm, Janine Mett und Sven Grösgen für die gute Zusammenarbeit im Labor und das sorgfältige Lesen dieser Arbeit.

Allen ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurologie danke ich, für die angenehme, freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre im Labor. Besonders herzlich bedanke ich mich bei Tatjana Rothhaar, Sven Grösgen, Janine Mett, Christoph Stahlmann und Tamara Blümel für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre. Ich bedanke mich auch herzlich bei Inge Tomic für ihre freundliche und unterhaltsame Art und nicht zuletzt für ihre Unterstützung im Labor.

Ich möchte persönlich meinen Freunden und besonders meiner Familie danken.

Meinen Eltern Maria Magdalena Hauptenthal und Manfred Norbert Hauptenthal danke ich für all die Unterstützung auf meinem Lebensweg und ihre offene Art. Meiner Schwester Frauke Denise Hauptenthal danke ich außerdem für die aufmunternden Worte in allen Lebenslagen und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Klaus Huthmacher möchte ich zudem für seine unendliche Geduld und nicht zuletzt die Unterstützung danken, die mir in all den Jahren zuteilwurde.

Ohne euch wäre ich nicht dahin gekommen wo ich jetzt bin. Von Herzen vielen Dank.