

AUS DEM BEREICH DER EXPERIMENTELLEN NEUROLOGIE UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES
SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

Der Einfluss AICD abhängiger
Lipidveränderungen auf die APP-
Prozessierung und die mögliche
Implikation der Methylxanthine bei
der Alzheimer Erkrankung

*Dissertation zur Erlangung eines Doktors der
Medizin*

*der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes*

2019

**vorlegt von: Christopher Nelke
geboren am 11. Dezember 1991 in Eckernförde**

Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion: 15.01.2020

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Hartmann

Prof Dr. Robert Ernst

“We are just an advanced breed of monkeys on a minor planet of a very average star. But we can understand the Universe. That makes us something very special.”

- Stephen Hawking

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1. Der Einfluss AICD abhängiger Lipidveränderungen auf die APP-Prozessierung und die mögliche Implikation der Methylxanthine bei der Alzheimer Erkrankung	1
1.2. The influence of AICD mediated lipid changes on APP processing and the implications of methylxanthines for Alzheimer dementia.....	3
2. Einleitung.....	5
2.1. Die Alzheimer Krankheit.....	5
2.1.1. Epidemiologie	5
2.1.2. Krankheitsbild.....	5
2.2. Histopathologische Veränderungen.....	7
2.2.1. A β -Plaques.....	7
2.2.2. TAU	9
2.3. Proteolytische Prozessierung des amyloiden Vorläufer Proteins APP	10
2.3.1. Das amyloide Vorläufer Protein APP	10
2.3.2. Die Sekretasen	12
2.3.3. Regulierte intramembran Proteolyse.....	14
2.3.4. Proteolytische Prozessierung von APP und die Entstehung von A β	15
2.4. Die Familie der Xanthin-Derivate.....	17
2.5. Fragestellung der Arbeit	19
3. Material und Methoden	22
3.1. Material	22
3.1.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	22
3.1.2. Zelllinien	25
3.1.3. Antikörper	26
3.1.4. Verwendete Plasmide.....	26
3.1.5. Zellkulturmedien	26
3.2. Eukaryotische Zellkultur	27
3.2.1. Kultivierung.....	27
3.2.2. Langzeitlagerung	28
3.2.3. Behandlung von Zellen mit Additiven.....	29
3.2.4. Transfektion eukaryotischer Zellen durch Lipofektion	30
3.2.5. Bestimmung der Proteinsekretion durch SEAP-Assay	31
3.2.6. LDH-Assay	31
3.3. Molekularbiologische Arbeiten.....	32
3.3.1. RNS Isolation.....	32
3.3.2. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	33
3.3.3. cDNS-Synthese	34
3.3.4. qRT-PCR.....	34
3.4. Proteinbiochemische Arbeiten	36
3.4.1. Zellaufschluss.....	36
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration durch den BCA-Tests	37
3.4.3. Immunpräzipitation	37
3.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	38
3.4.5. Western-Blot-Analyse	39
3.4.6. Proteinnachweis mit der ECL-Methode.....	40
3.4.7. Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität auf lebenden Zellen.....	41

3.4.8.	Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität auf Post-Nukleären-Fractionen (PNF) und Membranpräparation.....	42
3.5.	Arbeiten mit Lipiden.....	44
3.5.1.	Vorbereitung der Zellen	44
3.5.2.	Lipidextraktion	45
3.5.3.	Bestimmung des Lipid-assoziierten Phosphates.....	46
3.6.	ESI-Massenspektrometrie	47
3.6.1.	Ionisationsquelle.....	47
3.6.2.	Massenspektrometrie	48
3.6.3.	Vorbereitung der Proben	48
3.6.4.	Scanmodi und Einstellungen	50
3.6.5.	Molekülspezifische Parameter für die massenspektrometrische Analyse	51
3.6.6.	Statistische Auswertung	56
4.	Ergebnisse.....	57
4.1.	Einfluss von AICD auf die Lipidkomposition	57
4.1.1.	LDH-Assay der Lipidextrakte	58
4.1.2.	Analyse der Lipidspezies	58
4.1.3.	Massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylcholine	59
4.1.4.	Massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylethanolamine	64
4.1.5.	Massenspektrometrische Analyse der lysierten Phospholipide	69
4.1.6.	Massenspektrometrische Bestimmung der Gesamtplasmalogene	71
4.1.7.	Massenspektrometrische Analyse der Ceramide	72
4.1.8.	Auswertung der DHA-Konzentration	74
4.1.9.	Der Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine	76
4.1.10.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrie	139
4.2.	Lipid-vermittelter Einfluss von AICD auf die amyloidogene Prozessierung	78
4.2.1.	Einfluss der Lipidextrakte auf A β	79
4.2.2.	Einfluss der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die Sekretion der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP).....	84
4.2.3.	Einfluss von Lipiden auf sAPP β	85
4.2.4.	Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die A β -Degradation	86
4.2.5.	Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf β -CTF	88
4.2.6.	Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf Gesamt-A β in SH-SY5Y C99-Zellen	89
4.2.7.	Einfluss der Lipide auf die Sekretasenaktivität auf lebenden Zellen	90
4.2.8.	Einfluss der Lipidextrakte auf die Sekretasenaktivität auf PNF	97
4.2.9.	Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die Genexpression	102
4.2.10.	Zusammenfassung der Ergebnisse	104
4.3.	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die APP-prozessierenden Sekretasen	105
4.3.1.	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die nicht-amyloidogene Prozessierung.....	105
4.3.2.	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf Gesamt A β und die amyloidogene APP-Prozessierung.....	108
4.4.	Ergebnisse zu weiteren Projekten im Rahmen von Kooperationen.....	114
4.4.1.	Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Sekretasenaktivität auf PNF	114

4.4.2.	Einfluss von Vitamin D auf das Lipidprofil	117
5.	Diskussion	122
5.1.	Bedeutung und Funktion von AICD	122
5.2.	Lipide und AD.....	127
5.2.1.	Cholesterin und AD.....	129
5.2.2.	Fettsäuren und AD.....	131
5.2.3.	Plasmalogene und AD	135
5.2.4.	APP und die Lipid-Homöostase	137
5.3.	Einfluss von AICD auf die Lipidkomposition	139
5.4.	Einfluss von Lipidextrakten auf die APP-prozessierenden Sekretasen	144
5.5.	Überlegungen und therapeutisches Potenzial	153
5.5.1.	Die Studienlage und das therapeutischen Potential von PUFAs	153
5.5.2.	Überlegungen zur Rolle von Lipiden im Kontext der AD-Therapie	156
5.6.	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die APP-prozessierenden Sekretasen 158	
6.	Ausblick	160
6.1.	Die Familie der Xanthine	Error! Bookmark not defined.
7.	Appendix.....	191

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer´s disease
ADAM	engl. "a disintegrin and metalloprotease"
AFT-Komplex	AICD/Fe65/Tip60-Komplex
AG	Arbeitsgruppe
AICD	engl. "APP intracellular domain"
AJT-Komplex	AICD/JIP1/Tip60-Komplex
Aph1	engl. "anterior pharynx defective 1"
APOE	Apolipoprotein E
APP	engl. "amyloid precursor protein"
AA	engl. "amino acid", Aminosäure
Aβ	Amyloid-β
BACE	engl. "β-site APP cleaving enzyme"
BCA	engl. "bicinchoninic acid"
cDNS	engl. "complementary DNA", cDNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuSO ₄	Kupfersulfat
dd	bidestilliert
DHA	Docosaheaxen-Säure
FAD	engl. familial Alzheimer´s disease
DMEM	Dulbecco´s modified Eagels medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	engl. "enhanced chemo-luminescence"
EDTA	engl. "ethylenediaminetetraacetic acid"
ELISA	engl. "enzyme linked immunosorbent assay"
engl.	Englisch

et al.	und weitere
FAD	engl. "familial Alzheimer's disease"
FCS	engl. "fetal calf serum"
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
GCS	Glukosylceramid-Synthase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDAC	engl. "histone deacetylases"
HMGR	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
HPLC	engl. „high performance liquid chromatography“
HRP	engl. „horseradish peroxidase“
IDE	engl. „insulin degrading enzyme“
JIP1	engl. „Janus kinase interacting protein 1“
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LOAD	engl. „late onset Alzheimer's disease“
LRP1	engl. „low density lipoprotein receptor-related protein 1“
M	Molar
mA	Milliampere
männl.	Männlich
MCI	engl. "mild cognitive impairment"
MCT	engl. "medium chain triglycerides"
MED12	mediator complex subunit 12
MEF	engl. "mouse embryonic fibroblast"
MEM	engl. "minimum essential medium"
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MINT1	engl. "neuronal munc18-1-interacting protein 1"
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNS	engl. "messenger" RNS
MUFAs	engl. "monounsaturated fatty acids"
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimide
NEP	Neprilysin
NEXT	engl. "notch extracellular truncation"
ng	Nanogramm
NICD	engl. "notch intracellular domain"
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr	Nummer
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
OD	optische Dichte
PBS	engl. "phosphate buffered saline"
PC	Phosphatidylcholin
PCaa	Diacyl-Phosphatidylcholin
PCae	Phosphatidylcholin-Plasmalogen
PE	Phosphatidylethanolamin
PEN2	engl. "presenilin enhancer 2"
PGC1 α	engl. "peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α "
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPAR	engl. "peroxisome proliferator-activated receptors"
PS	Presenilin
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomänen
PUFAs	engl. "polyunsaturated fatty acids"
qRT-PCR	engl. "quantitative real time polymerase chain reaction"

RAGE	engl. "receptor for advanced glycation end products"
RIP	engl. "regulated intramembrane proteolysis"
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	engl. "reactive oxygen species"
RT	Raumtemperatur
sAPP α	engl. "soluble α -secreted APP"
sAPP β	engl. "soluble β -secreted APP"
SDS	engl. "sodium dodecyl sulfate"
SDS-Page	engl. "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SPT	Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase
swe	engl. "Swedish"
Tab.	Tabelle
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen /Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp
α -CTF	engl. " α -cleaved C-terminal fragment"
β -CTF	engl. " β -cleaved C-terminal fragment"

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Seite	Titel
1	7	Koronarer Schnitt eines Hochleistung MRT Scans
2	11	Architektur von APP und seinen proteolytischen Fragmenten
3	16	Schematische Darstellung der APP-Prozessierung
4	20	Fragestellung der Arbeit
5	60	Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC aa-Spezies der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15,
6	61	Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PC aa der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.
7	63	Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC ae-Spezies der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15
8	64	Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC ae-Spezies der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.
9	65	Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE aa der Lipidextrakte MEF AWT, MEF APP Δ CT15
10	66	Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE aa der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.
11	68	Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE ae der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15
12	69	Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE ae der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.
13	70	Mittelwert des C22:6/C18:1-Quotienten als Balkendiagramm der LysoPC
14	71	Gesamtsumme der PC-Plasmalogene der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15 als Balkendiagramm
15	73	Gesamtsumme der Ceramide der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock als relative Werte.
16	74	Gesamtsumme der Ceramide der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock
17	75	Auswertung der DHA-Konzentration der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen
18	77	Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine als Balkendiagramm
19	78	Darstellung der experimentellen Planung durch ein Fluss-Diagramm
20	80	Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
21	81	Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
22	83	Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
23	84	Quantifizierung der SEAP-Aktivität in konditionierten Zellkulturmedien durch SEAP-Assay
24	86	Westernblot-Analyse der sAPP β -Banden von SH-SY5Y-Zellen
25	88	Verbleibendes A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
26	89	β -CTF aus lysierten Zellen in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
27	90	Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes auf SH-SY5Y C99-Zellen
28	91	Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen
29	92	Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen
30	94	Einfluss der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen

31	95	Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der γ -Sekretase in lebenden Zellen
32	96	Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der γ -Sekretase in lebenden Zellen
33	98	Einfluss der Lipidextrakte (MEF AWT, MEF APP Δ CT15 (LE1)) auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF
34	99	Einfluss der Lipidextrakte (MEF AWT, MEF APP Δ CT15 (LE2)) auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF
35	100	Einfluss der Lipidextrakte (MEF $\Delta\Delta$ C50, MEF $\Delta\Delta$ mock) auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF
36	101	Einfluss der Lipidextrakte (MEF AWT und MEF APP Δ CT15) auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF
37	103	Quantifizierung der Genexpression durch RT-PCR in Abhängigkeit der inkubierten Lipidextrakte
37	106	Einfluss von PPF auf die Aktivität der α -Sekretase auf lebenden Zellen.
38	107	Einfluss von Propentofyllin und Coffein auf die sAPP α .
39	108	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf Gesamt A β .
40	110	Einfluss von PPF auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen
41	110	Einfluss von Coffein auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen.
42	111	Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf sAPP β .
43	112	Einfluss von PPF auf die Aktivität der γ -Sekretase auf lebenden Zellen.
44	115	Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF
45	116	Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF
46	128	Übersichtsdarstellung der in AD veränderten Lipide
47	142	Zusammenfassung der möglichen Mechanismen
48	143	Vereinfachte Darstellung der Ceramid de novo Synthese
49	144	Darstellung verschiedener Phospholipide
50	147	Die Doppellipidschicht: Effekt von ungesättigten Fettsäuren.
51	150	Zusammenfassung der möglichen Mechanismen
52	152	Ein sich selbst erhaltener Mechanismus
53	153	Bedeutung der Diät im Kontext eines Feed-Forward Mechanismus:
54	154	Zeitlicher Ablauf einer möglichen AD-Therapie.
55	157	Therapeutisches Potenzial ungesättigter Fettsäuren.

Tabellenverzeichnis

Nummer	Seite	Titel
1	22	Chemikalien
2	23	Verbrauchsmaterialien
3	24	Geräte/Zubehör
4	25	Zelllinien
5	26	Antikörper
6	26	Verwendete Kits
7	26	Verwendete Plasmide
8	26	Zellkulturmedien
9	52	Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der diacyl-Phosphatidylcholine
10	53	Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylcholin-Plasmalogene
11	54	Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Ceramide
12	55	Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Sulfatide
13	56	Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Sphingomyeline
14	59	Übersicht über die Diacyl-Phosphatidylcholine
15	103	Expressionsniveau MEF APP Δ CT15 im Vergleich zu MEF AWT
16	118	Einfluss von Vitamin D auf die PC aa
17	120	Einfluss von Vitamin D auf die PC ae
18	140	Übersicht über AICD-regulierte Gene

Kooperationsverzeichnis

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen von Kooperationen erarbeitet. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die entsprechenden Ergebnisse und den Anteil der betreffenden Personen.

Abbildung	Experiment/Tätigkeit	Kooperation
	Betreuung und Planung	PD Dr. M.O.W Grimm
39	RNS-Isolation cDNS-Synthese RT-PCR	Dr. Janine Mett (Vermittlung der Methode) Christopher Nelke (Durchführung)
5 bis 18	Massenspektrometrische Untersuchung der Lipidextrakte	Christoph Stahlmann (Vermittlung der Methode und Durchführung am Massenspektrometer) Christopher Nelke (Vorbereitung der Proben, Lipidextraktion und Auswertung der Ergebnisse)
26	Bestimmung der A β -Degradation	Dr. Janine Mett (Vermittlung der Methode) Christopher Nelke (Durchführung)

1. Zusammenfassung

1.1. Der Einfluss AICD abhängiger Lipidveränderungen auf die APP-Prozessierung und die mögliche Implikation der Methylxanthine bei der Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Krankheit (AD) ist die häufigste Form der Demenz und eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. AD ist durch neuronale Degeneration gekennzeichnet und führt so zum Verlust kognitiver Funktion. Die Pathogenese von AD ist unter anderem durch die Akkumulation extrazellulärer amyloider Plaques, bestehend aus Amyloid- β (A β), dem Auftreten intrazellulärer Neurofibrillenbündel sowie erhöhtem oxidativen Stress, einer Veränderung der Elektrophysiologie und einer veränderten Lipidkomposition charakterisiert. A β entsteht infolge der amyloidogenen Prozessierung des Vorläuferproteins APP. Die amyloidogene APP-Prozessierung erfolgt durch die proteolytische Aktivität der β - und γ -Sekretase, während die nicht-amyloidogene Prozessierung durch die α - und γ -Sekretase vermittelt wird und die Entstehung von A β unterbindet.

Es wird seit längerem eine genregulatorische Aktivität der intrazellulären Domäne von APP (AICD) diskutiert. Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, dass AICD durch die Aktivität der γ -Sekretase in das Zytosol freigesetzt wird und dort mit Adaptorproteinen interagieren kann, um schließlich in den Nukleus zu translozieren. Es wurde eine Vielzahl möglicher Zielgene postuliert.

Sowohl APP als auch die APP-prozessierenden Sekretasen sind membranständige Proteine. Ein Einfluss der Lipidumgebung auf die APP-Prozessierung konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden. Weiterhin konnten markante Veränderungen des Lipidprofils im Hirngewebe von AD-Patienten demonstrieren werden. Daher werden Veränderungen der Lipidkomposition sowohl in der Entstehung der AD als auch im Verlauf der Erkrankung diskutiert.

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von AICD auf die Lipidspezies der Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Ceramide und lysierten Phosphatidylcholine.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Lipidextrakte von AICD-defizienten Zellen und von Wildtyp-Zellen extrahiert, massenspektrometrisch analysiert und der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren der einzelnen Lipidspezies untersucht.

Die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen zeigten vor allem in der Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine ein erhöhtes Verhältnis von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren sowie eine erhöhte Konzentration von Docosahexaensäure. Außerdem wurde der bereits publizierte Einfluss von AICD auf die Ceramide und Plasmalogene bestätigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der generierten Lipidextrakte auf die β - und auf die γ -Sekretase untersucht. Hierfür wurden humane Neuroblastom-Zellen und murine Fibroblasten mit Lipidextrakten behandelt. Die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen führten zu einer signifikanten Reduktion des Gesamt-A β , während die Lipidextrakte von Wildtyp- und von AICD-überexprimierenden Zellen zu einer Erhöhung führten. Als Mechanismus konnte eine direkte, modifizierende Wirkung der Lipidextrakte sowohl auf die β - als auch auf die γ -Sekretase identifiziert werden.

Es besteht eine bidirektionale Wechselwirkung zwischen der APP-Prozessierung und der Lipidhomöostase. Das Verständnis dieser Interaktion soll in dieser Arbeit durch den Einfluss von AICD auf die mehrfach ungesättigten Fettsäuren ergänzt werden.

Abschließend untersucht diese Arbeit die Methylxanthine Coffein und Propentofyllin. Beide Substanzen werden als therapeutische Optionen für die Behandlung der AD diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein direkter Effekt der Methylxanthine auf die α - und β -Sekretase nachgewiesen werden.

1.2. The influence of AICD mediated lipid changes on APP processing and the implications of methylxanthines for Alzheimer dementia

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia and a leading cause of death in the first world. AD is defined by neuronal degeneration leading to a loss of cognitive function. The pathogenesis of AD is characterized by the accumulation of amyloid plaques, consisting of amyloid- β , the occurrence of intracellular neurofibrillary tangles, oxidative stress, alterations of the electrophysiology and a change in lipid composition. A β is produced as a result of the amyloidogenic processing of its precursor protein APP. The amyloidogenic proteolysis of APP is mediated by the β - and γ -secretase, while the non-amyloidogenic pathway mediated by α - and γ -secretase activity excludes the production of A β .

The intracellular domain of APP is discussed to have gene-regulatory properties. Various research teams demonstrated that AICD is liberated into the cytosol by γ -secretase activity and able to interact with adaptor proteins, finally translocating in to the nucleus. A multitude of possible target genes were postulated in this context.

Both APP and the APP-processing secretases are membrane bound proteins and an effect of the lipid environment on the processing of APP was demonstrated in multiple studies. Additionally, various research teams observed striking alterations of the lipid profile in the brain tissue of AD patients. As a result, changes of the lipid profile are discussed in the development and the course of AD.

This thesis studies the impact of AICD on phosphatidylcholin, phosphatidylethanolamin, ceramides and lysed phosphatidylcholin.

Lipid extractions of both AICD-deficient cells and wild type cells were generated and analyzed by mass spectrometry. The saturation level of each lipid was investigated.

The lipid extractions of AICD-deficient cells showed an increase in poly unsaturated phosphatidylethanolamine as compared to single unsaturated or saturated fatty acids and an increase in docosahexaenoic acid. Additionally the already published effect of AICD on ceramid and plasmalogen levels was reproduced.

The second part of the thesis studied the effect of the generated lipid extracts on the β - and γ -secretase. Humane neuroblastoma cells and murine fibroblasts were treated with

the lipid extracts and total A β was quantified using Western blotting. The incubation of lipid extracts from AICD-deficient cells resulted in a significant reduction of total A β levels, while the lipid extracts of AICD expressing cells lead to an increase. Mechanistically, this thesis demonstrates a direct modification of β - and γ -secretase activity by the lipid extractions. A bidirectional interaction between APP-processing and the lipid homeostasis has been described. The effect of AICD on poly unsaturated fatty acids additionally contributes to this interaction.

Lastly, this thesis examines the xanthine compounds Caffeine and Propentofylline. Both substances have been discussed as therapeutic options in the treatment of AD. The methylxanthine derivatives showed a direct effect on α - and β -secretase activity.

2. Einleitung

2.1. Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimersche Krankheit (engl. „*Alzheimer's disease*“, AD) ist eine multifaktorielle, neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für Demenz und eine der führenden Todesursache in Ländern mit hoher Lebenserwartung (Plassman et al. 2007, Prince et al. 2016).

AD ist durch einen progredienten Verlust der kognitiven Fähigkeiten, sowie einem eingeschränkten Erinnerungsvermögen und Veränderungen des Verhaltens und der Psyche gekennzeichnet (Alzheimer et al. 1991, Maurer et al. 1997).

2.1.1. Epidemiologie

AD ist vor allem mit einem höheren Lebensalter assoziiert und weist eine mit fortschreitendem Alter stetig zunehmende Prävalenz auf. Weltweit waren 2015 zirka 46,8 Millionen Menschen von Demenz betroffen (World Alzheimer Report 2015). Die Prävalenz von Demenzerkrankungen bei über 60 jährigen Patienten wird auf ca. 5% geschätzt, wobei AD für über 60% der Fälle verantwortlich ist (Ferri et al. 2005, Reitz and Mayeux 2014) und steigt auf ca. 30% bei 85-89 jährigen Patienten an (Ferri et al. 2005, Hofman et al. 1991, Ott et al. 1995).

AD ist eine signifikante Belastung für Gesundheitssysteme weltweit (World Alzheimer Report 2018). Die sozio-ökonomische und wirtschaftliche Bedeutung von AD wird durch die demographische Entwicklung, insbesondere in den Industrienationen, weiter akzentuiert (Brookmeyer et al. 2007, Reitz and Mayeux 2014). Es ist zu erwarten, dass bedingt durch den Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung, kombiniert mit einem Mangel einer adäquaten Früherkennung und Therapie, die Prävalenz und die verursachten Kosten maßgeblich steigen werden (Brookmeyer et al. 1998, Jankowiak et al. 2006). Der World Alzheimer Report 2015 geht davon aus, dass sich die Anzahl der Demenzkranken bis 2030 annähernd verdoppeln bzw. bis 2050 sogar verdreifachen wird.

2.1.2. Krankheitsbild

AD kann klinisch in mehrere Phasen unterteilt werden (Alzheimer's Disease Facts and Figures 2015). Die präsymptomatische Phase der Erkrankung kann der klinischen Manifestation und Diagnose von AD Jahre bis sogar Jahrzehnte vorrausgehen (Reiman et al. 2016, Twamley et al. 2006, Vlassenko et al. 2016).

Das Stadium der milden kognitiven Einschränkungen (engl. „*mild cognitive impairment*“, MCI) ist durch funktionelle Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten, insbesondere der Sprache, des Gedächtnisses, sowie der räumlichen und zeitlichen Orientierung gekennzeichnet (Dickerson et al. 2011, Garcia-Herranz et al. 2016, Iacono et al. 2014). Eine Beeinträchtigung des Kurzzeit-Gedächtnisses markiert häufig den klinischen Beginn der AD, wobei das Langzeit-Gedächtnis in der Regel lange funktionsfähig bleibt (Cook 1979, Ercoli et al. 2006). Die kognitiven Störungen gehen häufig mit einer Beeinträchtigung des Affekts wie Depression und Apathie einher (Bungener and Jouvent 2004, Leszek et al. 2016, Mahoney et al. 2005).

Die Spätphase der Erkrankung ist neben dem Verlust von Muskelmasse von einer starken Reduktion der sprachlichen Fähigkeiten und des Gedächtnisses charakterisiert, was den massiven Pflegebedarf des terminalen AD-Patienten begründet (Masters et al. 2006, Yeaman et al. 2013). AD führt in der Regel drei bis zehn Jahre nach der Diagnose durch sekundäre Erkrankungen wie Lungenentzündung oder Herzinfarkt zum Tode (Kukull et al. 1994, Stern et al. 1997).

Es werden zwei Formen von AD unterschieden:

Die deutlich häufigere, sporadische Form tritt normalerweise im höheren Lebensalter auf und wird auch als *Late Onset AD* (LOAD) bezeichnet (Kehoe et al. 1999, Lewis F. I. and Torgerson 2016). Ein hohes Lebensalter stellt den eindeutigsten Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenzerkrankung da (Carmona et al. 2018). Es wurden eine Reihe von Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Arteriosklerose, Übergewicht, Diabetes mellitus sowie Hypertonie identifiziert (Kivipelto et al. 2005, Shimizu et al. 2011, Whalley et al. 2013). Zusätzlich wurde das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E als bedeutender, genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer AD beschrieben (Hyman and Holtzman 2015, Marz et al. 1996, Pirttila et al. 1996, Tsai et al. 1994, von Strauss et al. 1999).

Die familiäre Form der AD (FAD), die 5% der Gesamtheit aller AD-Fälle ausmacht, ist mit einer genetischen Komponente assoziiert (Hirst et al. 1994, Lee J. H. et al. 2004a). Die Erkrankung tritt deutlich früher auf, zumeist vor dem 60. Lebensjahr, in seltenen Fällen sogar schon im Jugendalter (Brickell et al. 2006). Als Ursache gelten Mutationen in Genen, die an der proteolytischen Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) beteiligt sind. Hierzu zählen unter anderem Presinilin 1 und 2 (PS1/2) und APP selbst (Eckman et al. 1997, Nishiwaki et al. 1996, Scheuner et al. 1996).

2.2. Histopathologische Veränderungen

AD wird durch neuronale Degeneration in verschiedenen Hirnregionen, insbesondere des Cortexes, des Subcortexes und des Hippocampus, charakterisiert (Benes et al. 1991, Masters et al. 1985b, Mizutani et al. 1990). Zu den wichtigsten histopathologischen Veränderungen bei AD gehören die bereits 1906 von Alois Alzheimer beschriebenen, extrazellulären Amyloid-Plaques (engl. „*senile plaques*“), bestehend aus A β -Peptiden, sowie intrazelluläre, neurofibrilläre Bündel (engl. „*Neurofibrillary tangles*“, NFT), bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al. 1986, Kosik et al. 1986, Ksiezak-Reding et al. 1987, Masters et al. 1985b). Beide Veränderungen sind krankheitstypisch, jedoch nicht spezifisch.

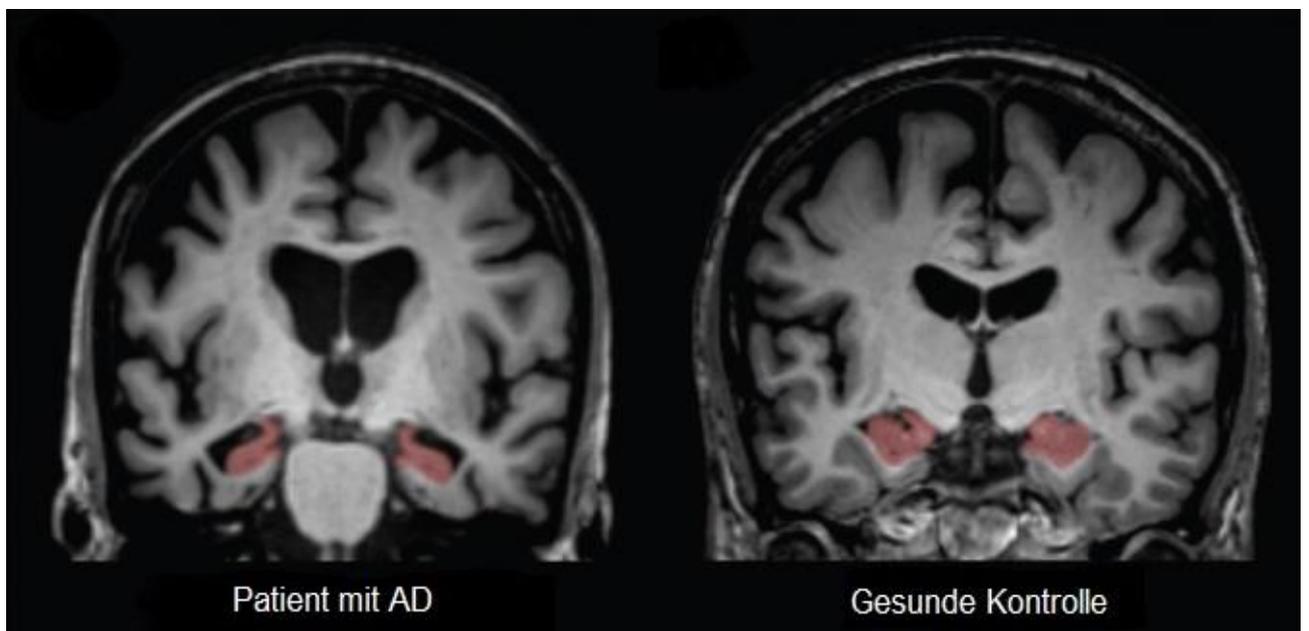


Abbildung 1: Koronarer Schnitt eines Hochleistung MRT Scans

In rot dargestellt ist der ventrale Anteil des Hippocampus. Hier ist eine deutliche Atrophie im Gehirn des AD Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson zu erkennen. Weiterhin kommen ein deutlich dilatiertes Ventrikelsystem, sowie eine Atrophie der Großhirnrinde im Gehirn des AD Patienten zur Darstellung.

Verändert nach Teipel et al. 2015

2.2.1. A β -Plaques

Amyloid-Plaques setzen sich aus hydrophoben Amyloid- β -Peptiden (A β) zusammen. A β seinerseits kommt in einer Reihe von Isoformen vor, wobei A β X-40 am häufigsten vorkommt und durch die proteolytische Spaltung von APP entsteht (Aguzzi and Haass 2003, Masters et al. 1985a). A β wird sowohl unter pathologischen Bedingungen, als auch im physiologischen Zellmetabolismus gebildet (Haass et al. 1992, Pardossi-Piquard and Checler 2012, Trabace 2014). Es wird angenommen, dass die APP-Prozessierung bei AD dysreguliert ist und es zu einer Akkumulation von A β im Hirngewebe kommt (Hilbich et al. 1991, Pike et al. 1991).

Weiterhin wurde demonstriert, dass A β an physiologischen Funktionen wie der Kommunikation zwischen Neuronen beteiligt ist (Abramov E. et al. 2009), aber in erhöhter Konzentration neurotoxisch wirkt (Ito et al. 2003, Kam et al. 2014, Tsay et al. 2013).

Es wurden verschiedene A β -Isoformen identifiziert, wobei A β 40 und A β 42 am häufigsten vorkommen (Henriques et al. 2007, Mawuenyega et al. 2013). A β 42 ist die Hauptkomponente amyloider Plaques (Portelius et al. 2010a). Längere Amyloid- β -Peptide gelten als amyloidogener und es wurde beschrieben, dass eine quantitative Verschiebung von kürzeren zu längeren A β , insbesondere A β 42, eine pathologische Bedeutung zukommt (Colaianna et al. 2010, Jarrett and Lansbury 1993, Rebeck et al. 2010). Zahlreiche weitere Isoformen wurden in den letzten Jahren identifiziert, wobei die Bedeutung dieser Isoformen in der Pathogenese von AD noch nicht vollständig verstanden wurde (Portelius et al. 2010a, Portelius et al. 2010b).

Die Aggregationsneigung von A β 42 ist in zwei zusätzlichen, hydrophoben Aminosäuren (Isoleucin an Position 41 und Alanin an Position 42) begründet und führt zu dem dominanten Vorkommen von A β 42 in amyloiden Plaques (Iwatsubo et al. 1994, Lippa et al. 1998, Shin R. W. et al. 1997). Es wurde demonstriert, dass insbesondere die oligomere Form von A β neurotoxische Eigenschaften besitzt (Lesne et al. 2006). Einige Studien gehen davon aus, dass es zu der Bildung von Hybrid-Aggregaten, die sich sowohl aus A β 42 als auch aus A β 40 zusammensetzen und sich durch eine gesteigerte Neurotoxizität auszeichnen, kommt (Bitan et al. 2003, Chang C. C. et al. 2013). Die Aggregationsfähigkeit der A β -Peptide ist in der sogenannten KLVFFA-Region begründet; diese Hexapeptid-Sequenz ermöglicht die Interaktion zweier A β -Monomere und führt zu der Formierung von Dimeren und schließlich komplexeren Aggregaten (Kino et al. 2015, Landau et al. 2011, Lowe et al. 2001, Moss et al. 2003).

Bei einem Großteil der FADs können ein Anstieg des Gesamt-A β oder des A β 42/A β 40 Quotienten nachgewiesen werden (Kowalska 2004, Mehta and Pirttila 2005, Tagami et al. 2014).

Der A β -Anabolismus bestimmt den zerebralen A β -Gehalt und seine Zusammensetzung (Hardy J. and Selkoe 2002). Gleichzeitig wird A β sowohl durch A β -degradierende Enzyme, insbesondere dem Insulin-degradierenden Enzym IDE und Nephrylisin, abgebaut und durch verschiedene Transportmechanismen beseitigt (Bulloj et al. 2010, Liu Y. et al. 2010, MA 2013).

Es konnte bisher keine eindeutige Korrelation zwischen A β -Plaques und der Entstehung und Progredienz von AD gezeigt werden, dennoch gelten A β -Oligomere aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften als einer der wichtigsten Faktoren in der multifaktoriellen Genese von AD (Hardy J. and Selkoe 2002).

Zahlreiche Studien zeigten aber auch, dass A β physiologische Funktionen erfüllt und nicht zwangsläufig toxisch ist (Pearson and Peers 2006). Es konnte demonstriert werden, dass A β eine Rolle in der Kontrolle der synaptischen Aktivität und des neuronalen Wachstums spielt, eine Schutzfunktion gegenüber oxidativen Stress und Toxinen erfüllt, die zerebrale Lipidhomöostase reguliert sowie über entzündungsfördernde Eigenschaften, die auch für die Pathogenese von Alzheimer bedeutsam sind, verfügt. (Azizi and Mirshafiey 2012, Du Yan et al. 1997, Holmes C. et al. 2011). Erst kürzlich wurde A β als antimikrobielles Peptid identifiziert (Tanzi et al. 2010).

Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ beschreibt die Formierung von A β als Initialereignis, das eine Kaskade einleitet, die zu zellulären Untergang und der Ablagerung von Tau führt (Barage and Sonawane 2015, Hardy J. A. and Higgins 1992, McGeer and McGeer 2013).

2.2.2. TAU

Das zeitliche Auftreten und die Verteilung der Taupathologie ist Grundlage für die sogenannten Braak-Stadien, welche die Einteilung der AD in sechs Verlaufsstadien erlauben (Gertz et al. 1996). Diese Verlaufsstadien werden analog zum Befall bestimmter Hirnregionen mit neurofibrillären Ablagerungen klassifiziert (Gertz et al. 1996, Jellinger 2000). Demnach sind neurofibrilläre Ablagerungen zunächst im transentorhinalen Kortex, anschließend im limbischen System und zuletzt neokortikal nachzuweisen (Corder et al. 2000, Gertz et al. 1996, Grober et al. 1999).

Das Tau-Protein selbst ist ein zytosolisches Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das Mikrotubuli bindet und an ihrer Formation beteiligt ist (Goedert et al. 1988, Papasozomenos 1989a, b).

Im Kontext der Alzheimer-Pathologie ist eine übermäßige Phosphorylierung der Tau-Proteine zu beobachten, was zu einer unkontrollierten Aggregation und schließlich zu der Bildung von NFTs führt (Lovestone et al. 1994). Diese NFTs lassen sich auch bei anderen Tauopathien nachweisen und haben zytotoxische Effekte (Lei et al. 2010). Die Beeinträchtigung der Mikrotubuli-Funktion führt zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts sowie einer Störung des axonalen Transportes (Garcia-Sierra et al. 2001, Novak 1994).

2.3. Proteolytische Prozessierung des amyloiden Vorläufer Proteins APP

A β entsteht aus der proteolytischen Prozessierung des amyloiden Vorläufer Proteins APP (engl. „*amyloid precursor protein*“) (Haass et al. 1992). APP kann über einen amyloidogenen und einen nicht-amyloidogenen Weg prozessiert werden (Haass and Selkoe 1993). Die Proteolyse von APP wird prinzipiell von drei Proteasen, die aufgrund ihrer Funktion im sekretorischen Zellkompartiment auch als Sekretasen bezeichnet werden, realisiert. Diese Enzyme werden als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet. Die amyloidogene Prozessierung führt zu der Formierung von A β und wird von der β - und γ -Sekretase katalysiert, während die nicht-amyloidogene Prozessierung die A β -Produktion ausschließt und α - und γ -Sekretase vermittelt ist (De Strooper 2003, Lammich et al. 1999, Steiner et al. 2008).

2.3.1. Das amyloide Vorläufer Protein APP

APP ist ein ubiquitär vorkommendes, integrales Transmembran-Protein. Strukturell setzt sich APP aus einer großen, N-terminalen Ektodomäne (Aminosäuren 1-624, basierend auf APP695), einer einfachen, hydrophoben Transmembrandomäne (AA 625-648) und einem kurzen, intrazellulären Abschnitt (AA 649-695) zusammen (Dyrks et al. 1988, Kang et al. 1987).

APP liegt in verschiedenen Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen von Exon 7 und 8 generiert werden. Die wichtigsten Isoformen sind APP770, APP751 und APP695 (Bezeichnung beschreibt Anzahl der Aminosäuren (Belyaev et al. 2010, Sandbrink et al. 1994). Im Gehirn kommt APP695 primär neuronal vor und wird im Verhältnis zu den anderen Isoformen APP770 und APP751 stärker exprimiert (Niederwolfsgruber et al. 1998, Thinakaran and Koo 2008). Das Verhältnis der mRNS der einzelnen APP Isoformen im Cortex des Menschen beträgt ungefähr APP770/APP751/APP695 = 1:10:20 (Nalivaeva and Turner 2013).

Die physiologische Funktion von APP ist nicht vollständig erklärt. APP wird aber eine Bedeutung für die Maturierung und Differenzierung von Neuronen, der Synaptogenese sowie der Zelladhäsion zugesprochen (Hung et al. 1992, Sabo et al. 2001, Soba et al. 2005, Wang P. et al. 2005, Zheng and Koo 2006). APP-knockout Mäuse zeigten altersabhängige kognitive Defizite und eingeschränkte Langzeitpotenzierung (Dawson et al. 1999).

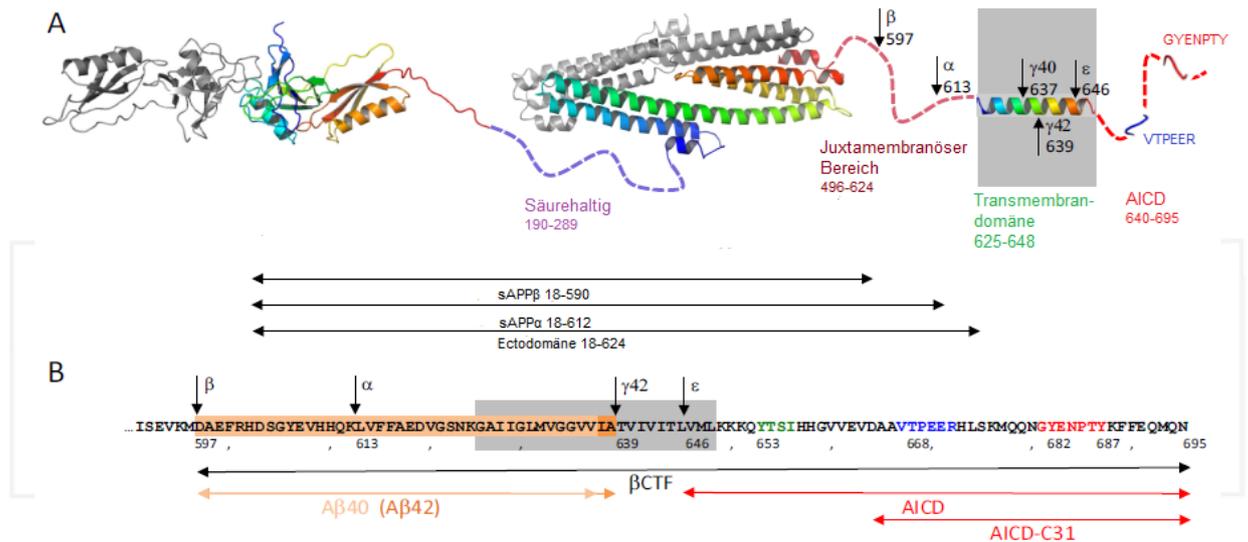


Abbildung 2: Architektur von APP und seinen proteolytischen Fragmenten

A: Struktur und räumliche Verteilung der APP-Domäne. Die Nummerierung bezieht sich auf APP695. Die Schnittstellen der Sekretasen und die Position der Motive sind beschriftet. Die Motive werden im Detail in 2.3.5 beschrieben. Die Transmembrandomäne ist grau unterlegt.

B: Sequenz und proteolytische Fragmente des C-Terminus. Nummerierung bezieht sich auf APP695. Die Motive innerhalb von AICD sind farblich markiert. Die Sequenz von 597 bis 639 entspricht Aβ42.

Abbildung verändert nach Müller und Wild 2013 (Wild 2013).

APP und die Proteine APP like protein 1 und APP like Protein 2 (APLP1 und APLP2) bilden zusammen eine Proteinfamilie, die bei allen Wirbeltieren vorkommt (Kang et al. 1987, Luo et al. 1990). Die physiologische Bedeutung der APP-Familie wird durch perinatale Letalität in Mäusen, die keines der APP-Homologe exprimieren, unterstrichen (Heber et al. 2000, Herms et al. 2004, Wang P. et al. 2005). APLP1 und APLP2 enthalten anders als APP keine Aβ-Domäne.

Die Proteine werden während ihres intrazellulären Transports zur Zelloberfläche posttranslational N- und O-glykosyliert und sind in der Plasmamembran als Typ I-Transmembranproteine verankert (Bayer et al. 1997, Paliga et al. 1997, Slunt et al. 1994). APLP1 wird im Gegensatz zu APP ausschließlich im Gehirn exprimiert (Lorent et al. 1995).

Das APP kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 21 und enthält 18 Exons (Goldgaber et al. 1987a, Goldgaber et al. 1987b, Yoshikai et al. 1990). Eine Überexpression von APP ist mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit mit AD, sowie einer früheren Manifestation der Erkrankung assoziiert (Chartier-Harlin et al. 1991, Games et al. 1995, Murrell et al. 1991). Bei der Trisomie 21, also dem dreifachen Vorliegen des Chromosoms 21, wird APP dementsprechend überexprimiert, wodurch das klinische Vorliegen einer Demenz ungefähr Drei mal so häufig wie in der allgemeinen Bevölkerung diagnostiziert wurde (Hamlett et al. 2016, Rasmussen and Sobsey 1994, Wisniewski et al. 1985, Yates et al. 1980).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ApoE die APP-Transkription stimulieren kann (Huang Y. A. et al. 2017). Es wurde beobachtet, dass humane Neurone, die zusammen mit Glia-Zellen inkubiert wurden 2 bis 3 Mal so viel A β 40 und A β 42 sekretierten, wie Neurone, die mit MEF-Zellen inkubiert wurden (Huang Y. A. et al. 2017).

Eine mechanistische Erklärung konnten Huang et. al durch die Inkubation von rekombinanten ApoE2, ApoE3 und ApoE4 auf humanen Neuronen erzielen und entdeckten folgenden Mechanismus: Glia-Zellen sekretieren ApoE, das an den ApoE-Rezeptor bindet; die Stimulierung des ApoE-Rezeptors führt zu der Aktivierung von DLK (engl. „*dual leucine-zipper kinase*“), einer MAP-Kinase Kinase Kinase, die wiederum MAP2K7 (engl. „*MAP kinase kinase 7*“) und ERK1/2 (engl. „*extracellular signal-regulated kinases*“) aktiviert (Huang Y. A. et al. 2017). ERK1/2 stimuliert über die Phosphorylierung von cFos und der damit einhergehenden Transkription von AP-1 die Transkription von APP (Huang Y. A. et al. 2017). Interessanterweise sind die einzelnen ApoE-Isoformen unterschiedlich potent in Bezug auf die Stimulation der APP-Transkription: ApoE4 stimuliert die APP-Transkription über den oben beschrieben Mechanismus deutlich stärker als ApoE2, wobei die Potenz von ApoE3 zwischen den beiden liegt (Huang Y. A. et al. 2017). Dies ist bemerkenswert, da ApoE4 als wichtigster genetischer Risikofaktor gilt und der dargestellte Mechanismus eine Erklärung liefert. Eine weitere Erklärung für die Rolle von ApoE4 bei AD liefert eine aktuelle Studie, die eine Assoziation zwischen ApoE4 und einem reduzierten Transport von DHA ins zentrale Nervensystem beobachtet hat (Yassine et al. 2016).

2.3.2. Die Sekretasen

Die α -Sekretase gehört zu einer großen Familie von proteolytischen Proteinen, die allgemein als ADAMs bezeichnet werden (engl. „*a disintegrin and metalloprotease*“) (Buxbaum et al. 1998, Lammich et al. 1999).

Bei dieser Familie handelt es sich um membrangebundene Metallo-Enzyme, die Zink als Ko-Faktor benötigen (Seals and Courtneidge 2003). Es sind mehr als 30 ADAMs bekannt von denen aber nur ADAM9, ADAM10 und ADAM17 eine relevante Aktivität bei der Prozessierung von APP zugesprochen wird (Asai et al. 2003, Fahrenholz et al. 2000, Gatta et al. 2002, Lammich et al. 1999, Schroeder et al. 2009, Tousseyn et al. 2009). ADAM10 ist dabei maßgeblich für die APP-Prozessierung verantwortlich (Kuhn et al. 2010). Wird die Aktivität von ADAM10 eingeschränkt, führt dies zu der Entwicklung einer AD-artigen Neuropathologie und erhöhten A β -Konzentrationen im ZNS (Epis et al. 2010). Die α -Sekretase realisiert die proteolytische Spaltung des extrazellulären Anteils von APP, wobei die Schnittstelle der α -Sekretase sehr nah an der Zellmembran zwischen Lys-16 und Leu-17 lokalisiert ist (Hooper N. M. and Turner 1995, Lichtenthaler and Haass 2004, Shin R. W. et al. 2005).

Diese Spaltung findet im Bereich der A β -Domäne statt und schließt eine anschließende Prozessierung durch die β -Sekretase aus und wird daher auch als nicht-amyloidogene Prozessierung denotiert. (Lichtenthaler and Haass 2004).

Die Prozessierung von APP durch die α -Sekretase führt zu der Freisetzung einer großen, extrazellulären APP-Domäne (engl. „*soluble α -secreted APP*“, sAPP α), die als neuroprotektiv gilt, sowie der Formierung eines membrangebundenen, C-terminalen Fragments, das als α -CTF bezeichnet wird (Furukawa et al. 1996, Mattson et al. 1999, Meziane et al. 1998).

Die Typ- 1 membrangebundene Aspartyl-Protease BACE-1 (engl. „ *β -site APP-cleaving enzyme*“) schneidet, ähnlich wie die α -Sekretase, die Ektodomän von APP (Marlow et al. 2003) und wurde zwischen 1999 und 2000 von fünf verschiedenen Forschungsgruppen als β -Sekretase identifiziert (Hussain et al. 1999, Lin et al. 2000, Sinha et al. 1999, Yan et al. 1999). Die Proteolyse von APP durch BACE1 resultiert in der Freisetzung einer extrazellulären APP-Domäne (engl. „*soluble β -secreted APP*“, sAPP β) und der Formation eines membrangebundenen, C-terminalen Fragments, das als β -CTF bezeichnet wird (Vassar et al. 1999).

Die Schnittstelle von BACE2, einem engen BACE1-Homolog, liegt innerhalb der A β -Region und schließt dementsprechend die Formierung von A β aus (Farzan et al. 2000). BACE1 verfügt über eine einzelne Transmembran-Domäne in der Nähe zu ihrem C-Terminus und einen palmitoylierten, zytoplasmatischen Schwanz (Benjannet et al. 2001). BACE1 ist besonders in Cholesterin-reichen Mikrodomänen, die im angelsächsischen als Lipid-Raft bezeichnet werden, lokalisiert und übt vorwiegend hier seine proteolytische Aktivität aus (Riddell et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Cholesterin als auch die Formierung von Glykosylphosphatidylinositol-Ankern für die enzymale Aktivität der β -Sekretase von Bedeutung sind (Marlow et al. 2003, Tun et al. 2002).

Als Initiator der amyloidogenen APP-Prozessierung ist BACE1 ein attraktives therapeutisches Ziel, das in zahlreichen klinischen und experimentellen Arbeiten untersucht wird (John S. et al. 2011, John V. et al. 2003). In diesem Kontext wurde die physiologische Bedeutung der β -Sekretase erforscht und es konnte gezeigt werden, dass durch den vollständigen Knockout der β -Sekretase kein A β gebildet wird, aber es auch zu Anomalien des Verhaltens und der kognitiven Fähigkeiten der betreffenden Mäuse kommt (Filser et al. 2015, Laird et al. 2005, Ohno et al. 2004). Diese Verhaltensanomalien können unter anderem durch die Bedeutung der β -Sekretase bei der Myelinisierung von peripheren Nerven und die Funktion der Schwann-Zellen erklärt werden (Farzan et al. 2000).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der β -Sekretase mit der Formierung von A β korreliert und dass die Enzymaktivität der β - Sekretase signifikant in Gehirnen von AD-Patienten erhöht war (Yang L. B. et al. 2003).

Die γ -Sekretase ist ein Multienzym-Komplex, dessen katalytisches Zentrum von Presenilin 1 (PS1) oder 2 (PS2) gebildet wird (Esler et al. 2002, Micchelli et al. 2003, Steiner et al. 1998, Wolfe 2012). Der komplette Funktionsverlust der γ -Secretase nach PS1 und PS2 Knockout identifiziert PS als katalytisches Zentrum (De Strooper 2003, Herreman et al. 2003). Neben PS1/PS2 ist die Funktion der γ -Sekretase von drei weiteren Proteinen abhängig: Nicastrin (NCT), anterior pharynx defective-1a oder b (APH-1a/b) und presenilin enhancer (PSENEN) (De Strooper 2003, Grimm M. O. et al. 2002, Sisodia and St George-Hyslop 2002). Als Aspartat-Protease prozessiert die γ -Sekretase zahlreiche Substrate, insbesondere APP und den Notch-Rezeptor (Olsauskas-Kuprys et al. 2013, Steiner et al. 2008). Die γ -Sekretase ist in verschiedenen, intrazellulären Kompartimenten sowie der Plasmamembran lokalisiert (Chyung et al. 2005, Iwatsubo 2004).

Die γ -Sekretase übt eine proteolytische Aktivität sowohl auf α -CTF als auch auf β -CTF aus und die Proteolyse von β -CTF durch die γ -Sekretase resultiert in der Bildung einer 48 oder 49 Aminosäuren langen Isoform von A β sowie einer intrazellulären Domäne (engl. „*APP intracellular domain*“, AICD) (Kimberly et al. 2001, McLoughlin and Miller 1996, Steiner et al. 2008). Mechanistisch beginnt die Proteolyse der APP-Fragmente durch die γ -Sekretase an der dem Zytosol zugewandten Zellmembran und setzt sich über mehrere sukzessive Schnittstellen bis zur Mitte der Zellmembran fort (Zhang Yunwu et al. 2011). Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase wird durch die Lipidkomposition und die Membranfluidität der Zellmembran beeinflusst (Di Paolo and Kim 2011, Grziwa et al. 2003).

2.3.3. Regulierte intramembran Proteolyse

Die Prozessierung von APP durch die γ -Sekretase wird als regulierte intramembranöse Proteolyse (engl. „*regulated intramembrane proteolysis*“, RIP) bezeichnet. Die regulierte intramembranöse Proteolyse setzt sich aus zwei Schritten zusammen: Der Proteolyse einer extrazellulären Domäne und der anschließenden Proteolyse des Substrates in der Mitte der transmembran-Domäne (Brown et al. 2000, Strooper and Annaert 2001). Im Kontext der amyloidogenen Prozessierung wird APP zuerst extrazellulär von der β -Sekretase proteolytisch geschnitten und dann anschließend von der γ -Sekretase innerhalb der Zellmembran weiter prozessiert (Fortini 2002).

Das RIP-System ist ebenfalls für die Kontrolle des Lipid-Haushalts innerhalb einer Zelle verantwortlich. Eine verringerte Verfügbarkeit von Sterolen führt zu der Aktivierung eines transmembran-Proteins des endoplasmatischen Retikulums, das als SCAP (engl. „*sterol regulatory- element-binding protein (SREBP) cleavage-activating protein*“) bezeichnet wird (Goldstein J. L. et al. 2002, Ye J. and DeBose-Boyd 2011). SCAP transportiert SREBP vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wo SREBP proteolysiert wird (Goldstein J. L. et al. 2002, Nohturfft et al. 1999, Yang T. et al. 2000). Diese Proteolyse führt zu der Freisetzung eines aktiven Transkriptions-Faktors namens *site-2 protease (S2P)* (Nohturfft et al. 1999). Das freigesetzte Fragment diffundiert zum Nukleus, wo es die Aktivität bestimmter Gene, welche die Lipid-Synthese und Aufnahme steuern, reguliert (Goldstein J. L. et al. 2002).

Der SREBP-Weg war das erste RIP-System, das als solches identifiziert wurde (Goldstein J. L. et al. 2002).

2.3.4. Proteolytische Prozessierung von APP und die Entstehung von A β

Die Proteolyse von APP im Bereich der A β -Domäne durch die α -Sekretase initiiert den nicht-amyloidgenen Weg und verhindert die spätere Formierung von A β (Lammich et al. 1999). Die proteolytische Spaltung durch die α -Sekretase führt zu der Formierung des extrazellulären sAPP α (engl. „*soluble α -secreted APP*“) und des membrangebunden, C-terminalen Fragments α -CTF (engl. „ *α -cleaved C-terminal fragment*“) (Hooper N. M. and Turner 2002, Lammich et al. 1999).

Die BACE-katalysierte Spaltung von APP durch die β -Sekretase führt zu der Formierung von A β und initiiert die amyloidgene Prozessierung (Vassar et al. 1999). Die amyloidogene Proteolyse resultiert in der Formierung von sAPP β (engl. „*soluble β -secreted APP*“) und β -CTF (engl. „ *β -cleaved C-terminal fragment*“) (Haass et al. 1992, Vassar et al. 1999). Es folgt die Prozessierung von α - und β -CTF durch die γ -Sekretase.

Die durch die γ -Sekretase katalysierte Proteolyse von α -CTF resultiert in der Formierung eines verkürzten, nicht-amyloidgenen Peptids, das als p3 bezeichnet wird, während die Proteolyse von β -CTF zu der Bildung von A β führt (Haass et al. 1992). Sowohl bei der amyloidogenen als auch bei der nicht-amyloidgenen Proteolyse durch die γ -Sekretase entsteht die intrazelluläre Domäne von APP, kurz AICD (engl. „*APP intracellular domain*“) (Passer et al. 2000). Es wurde die Formierung von A β und AICD-Peptiden unterschiedlicher Länge beobachtet (Sannerud et al. 2016). Diese Varianz wird durch das Vorkommen alternativer Schnittstellen der γ -Sekretase erklärt: Diese Schnittstellen sind innerhalb der Transmembrandomäne von APP gelegen, befinden sich aber im Vergleich zur konservativen Schnittstelle weiter C-terminal und werden als ϵ - und ζ -Schnittstellen bezeichnet (Gu Y. et al. 2001, Yu et al. 2001).

Es wird angenommen, dass zunächst der ϵ -Schnitt an Position 48/49 oder 49/50 stattfindet (Chavez-Gutierrez et al. 2012, Sastre et al. 2001). Die ϵ -Schnittstelle scheint flexibel bezüglich ihrer Position zu sein, was in verschiedenen A β und AICD-Isoformen resultiert. Neben dem häufig vorkommenden AICD50 (Die Zahl bezeichnet die Länge der Aminosäurekette), wurde auch die Existenz von AICD48 (Yu et al. 2001) und AICD51 (Qi et al. 2003, Sato T. et al. 2003) beschrieben.

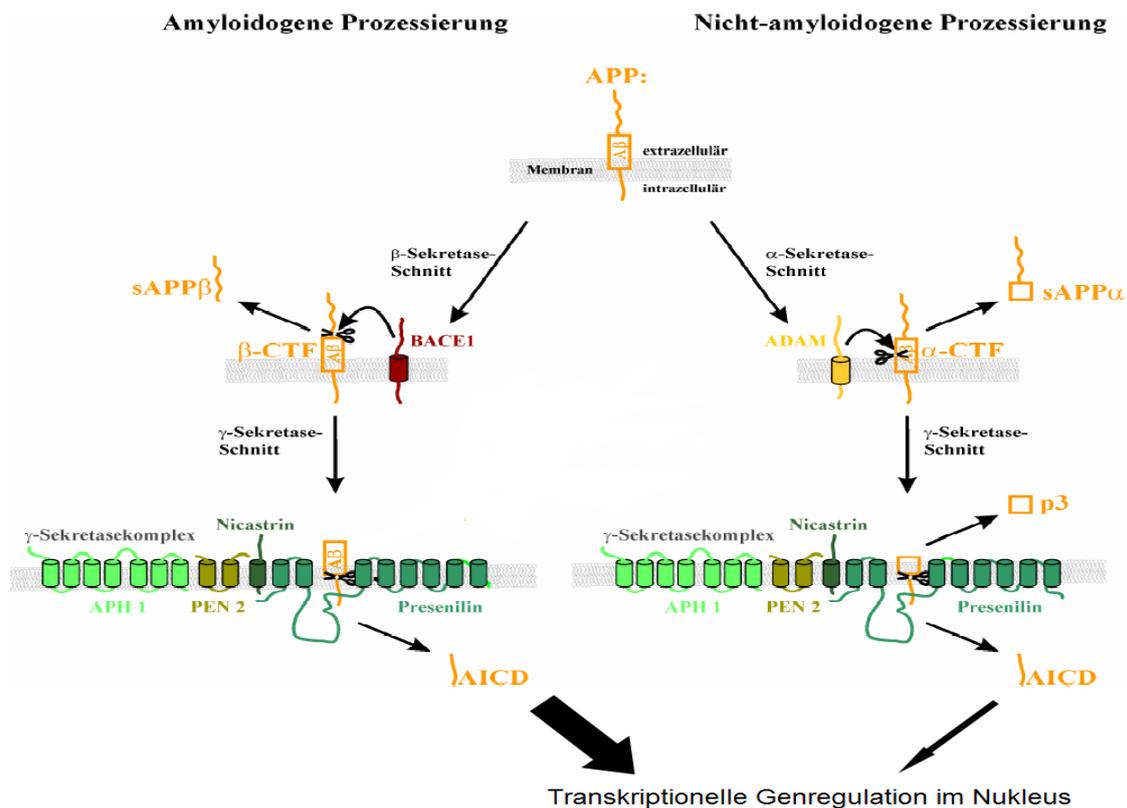


Abb. 3: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

Links: Die proteolytische Prozessierung von APP durch die β -Sekretase BACE1 führt zu der Formierung von sAPP β und β -CTF. β -CTF wird anschließend von der γ -Sekretase proteolysiert, wodurch A β und AICD entstehen. AICD wird in das Zytosol freigesetzt und kann mithilfe bestimmter Adapterproteine in die transkriptionelle Genregulation im Nucleus eingreifen.

Rechts: Die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP wird durch die Aktivität der α -Sekretase ADAM initiiert, wobei sAPP α und α -CTF entstehen. α -CTF wird von der γ -Sekretase proteolysiert und es entstehen das nicht-amyloidogene Peptid p3 und AICD. Das durch die nicht-amyloidogene Prozessierung produzierte AICD hat nur eine sehr geringe oder keine genregulatorische Wirkung.

Verändert nach Grimm et al. 2013

Die A β 48 und A β 49-Isoformen werden entsprechend des Modells der sukzessiven Prozessierung durch die γ -Sekretase nach je drei Aminosäuren proteolysiert (Chavez-Gutierrez et al. 2012, Qi-Takahara et al. 2005). A β 48 wird um insgesamt 6 Aminosäuren auf A β 42 und A β 49 um insgesamt 9 Aminosäuren auf A β 40 verkürzt (Qi-Takahara et al. 2005).

Qi-Takahara et al. postulieren ein Alpha-Helix-Modell für die γ -Sekretasen-abhängige Prozessierung (Qi-Takahara et al. 2005). Es wurde beschrieben, dass die transmembran-Domäne des β -CTFs die Form einer Alpha Helix annimmt und 3.6 Residuen für eine vollständige Windung benötigt (Lichtenthaler et al. 1999).

Entsprechend dieses Modells befinden sich die Schnittstellen für A β 49, 46, 43 und 40 auf der einen Seite der Alpha-Helix des β -CTFs, während sich die Schnittstellen für A β 48, 45 und 42 auf der anderen Seite befinden. Es wird weiterhin postuliert, dass die γ -Sekretase eine Seite der Alpha-Helix, entsprechend des Start-Peptids A β 48 oder A β 49, bevorzugt und das Peptid sukzessiv nach je drei Aminosäuren prozessiert (Qi-Takahara et al. 2005). Folglich führt sukzessive Proteolyse von A β 49 zur Bildung von A β 40, bzw. die Proteolyse von A β 48 zur Bildung von A β 42 (Funamoto et al. 2004, Qi-Takahara et al. 2005).

2.4. Die Familie der Xanthin-Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit soll zudem der Einfluss der Familie der Xanthine auf die APP-prozessierenden Sekretasen untersucht und ein möglicher Mechanismus der Einflussnahme identifiziert werden.

Propentofyllin (PPF) und Coffein gehören zur Familie der Xanthin-Derivate und agieren sowohl als unselektive, kompetitive Phosphodiesterase-Inhibitoren (Choi et al. 1988, Nagata et al. 1985, Numagami et al. 1998) als auch als Antagonisten an den Adenosin-Rezeptoren (Choi et al. 1988, Fredholm et al. 1992, Ribeiro and Sebastiao 2010). Aufgrund ihrer Unspezifität als Phosphodiesterase-Inhibitoren übt die Familie der Xanthine zahlreiche biologische Effekte aus. Zu diesen Effekten gehört unter anderem die Erhöhung des intrazellulären cAMP und die Aktivierung der Protein Kinase A, die Inhibition von immunologischen Botenstoffen wie TNF-Alpha und Leukotrienen sowie eine Regulation des Entzündungsprozesses (Banner and Page 1996, Deree et al. 2008, Fernandes et al. 2008, Sullivan et al. 1988, van Calker et al. 1979). Die stimulierende Wirkung der Xanthine kann weitgehend durch ihre Wirkung auf die Adenosin-Rezeptoren erklärt werden. Der Agonismus von Adenosin an Adenosin-Rezeptoren, insbesondere dem A2a-Rezeptor, verringert den neuronalen Metabolismus und induziert Müdigkeit (Davis et al. 2003, Porkka-Heiskanen et al. 1997). Die Xanthine als Adenosin-Rezeptor Antagonisten reduzieren dementsprechend die Müdigkeits-induzierende Wirkung von Adenosin (Huang Z. L. et al. 2005, Nehlig et al. 1992).

1987 wurden erstmals neuroprotektive Eigenschaften für PPF, damals als HWA 285 bezeichnet, beschrieben (DeLeo et al. 1987). Im selben Jahr beschrieb (Goto et al. 1987), dass PPF die Gedächtnisleistung in Ratten verbessern kann. Neuroprotektive Eigenschaften von PPF wurden seitdem in verschiedenen Studien bestätigt (Andine et

al. 1990, DeLeo et al. 1988, Dux et al. 1990, Saletu et al. 1990). PPF verbessert außerdem die Blutversorgung im ZNS sowie den Glukose Metabolismus (Grome et al. 1996, Kano et al. 1994, Mielke et al. 1998b).

Neben seinen neuroprotektiven Eigenschaften konnte PPF ebenso die Synthese des Nerven-Wachstums-Faktors NGF stimulieren (Nabeshima et al. 1993, Shinoda et al. 1990). Aufgrund seiner Eigenschaften wurde PPF in verschiedenen Interventionsstudien als mögliche Therapie für AD Patienten untersucht. Die Behandlung mit PPF zeigte sowohl einen statistisch als auch klinisch signifikanten Effekt in der Behandlung von AD Patienten (Kittner et al. 1997, Marcusson et al. 1997, Moller et al. 1994, Rother et al. 1996). Dennoch konnte eine retrospektive Cochrane Meta-Analyse nur begrenzte Evidenz für die Behandlung von AD Patienten mit PPF feststellen (Frampton et al. 2003). PPF wurde gut toleriert, zeigte wenig unerwünschte Arzneimittelwirkungen und verbesserte den Glukose Metabolismus (Mielke et al. 1998a, Mielke et al. 1998b, Rother et al. 1998).

Coffein, die am meisten verwendete psychoaktive Substanz der Welt, wird ebenfalls als therapeutische Option für die Behandlung der AD diskutiert. Verschiedene epidemiologische Studien konnten eine inverse Assoziation zwischen dem Konsum von Coffein und kognitiven Einschränkungen im Kontext einer Demenz beobachten (Cao C. et al. 2012, Eskelinen et al. 2009, Lindsay et al. 2002, Santos et al. 2010, Solfrizzi et al. 2017). Interessanterweise wurde dieser protektive Effekt verstärkt bei Frauen beobachtet (Driscoll et al. 2016, Ritchie et al. 2007).

2.5. Fragestellung der Arbeit

AD ist eine der führenden Todesursachen der Industrienationen (Prince et al. 2016, Reitz and Mayeux 2014).

AD ist durch die Degeneration von Neuronen in verschiedenen Hirnregionen, insbesondere des Cortexes, Subcortexes und des Hippocampus, charakterisiert und führt so zu einem Verlust kognitiver Funktion (Maurer et al. 1997). Histopathologisch zeichnet sich AD unter anderem durch die Akkumulation extrazellulärer amyloider Plaques, bestehend aus A β , und NFTs, bestehend aus hyperphosphorylierten Tau-Protein, sowie erhöhtem oxidativen Stress, einer Veränderung der Elektrophysiologie und einer veränderten Lipidkomposition aus (Fraering et al. 2004, Garcia-Blanco et al. 2017, Grundke-Iqbal et al. 1986, Hartmann et al. 2007, Kosik et al. 1986, Masters et al. 2006, Masters et al. 1985a, Perry et al. 2002, Ye C. et al. 2004).

AICD entsteht durch die Proteolyse von α -CTF als auch von β -CTF durch die γ -Sekretase (Bunnell et al. 1998, Fraering et al. 2004).

Die Bedeutung von AICD in der AD-Pathogenese und die Bedeutung von AICD als Genmodulator wird in der Literatur seit längerem diskutiert (Chang K. A. and Suh 2010, Muller et al. 2008, Nagase and Nakayama 2014). Es wurde eine Vielzahl potentieller Ziel-Gene postuliert, wobei insbesondere für AICD, das durch die amyloidogene Prozessierung entsteht, eine genregulatorische Wirkung angenommen wird (Belyaev et al. 2010, Cao X. and Sudhof 2001, Grimm M. O. et al. 2015). Zahlreiche Studien haben eine verändertes Lipidprofil im Kontext der AD-Pathologie beobachtet (Guan et al. 1999, Han 2005, Nasaruddin et al. 2016, Soderberg et al. 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, dass AICD sowohl die Genexpression der Fettsäure-Desaturasen als auch der Serinpalmitoyltransferase reguliert (Grimm M. O. et al. 2011b, Stahlmann 2017). Vor diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss AICD auf die Lipidspezies der Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine und insbesondere ihren Sättigungsgrad hat. Von besonderem wissenschaftlichem Interesse sind dabei der Sättigungsgrad und die Länge der Fettsäuren. Mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, wie zum Beispiel DHA oder EPA, konnten in experimentellen Arbeiten die APP-prozessierenden Sekretasen regulieren (Boudrault et al. 2009, Hooijmans et al. 2009). Daher wird in dieser Arbeit das Verhältnis der mehrfach-ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren in den einzelnen Lipidspezies untersucht. Weiterhin soll nachgewiesen werden, dass die Lipidspezies der Ceramide in einem AICD-defizienten Zellmodell erhöht ist, um sie die Richtigkeit des Modells zu prüfen.

Sowohl APP als auch die APP-prozessierenden Sekretasen sind transmembran Proteine und ein Einfluss der Lipidumgebung auf die APP-Prozessierung scheint daher naheliegend und konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden (Burg et al. 2013, Ghribi et al. 2006, Grimm M. O. et al. 2008, Grimm M. O. et al. 2011c, Grimm M. O. et al. 2016d, Grimm M. O. et al. 2012a, Grimm M. O. et al. 2013c, Grimm M. O. et al. 2012c, Refolo et al. 2000, Rothhaar et al. 2012).

Um die Frage zu beantworten, ob AICD über die Modifizierung der Lipidkomposition einen Einfluss auf die APP-Prozessierung nimmt, soll im zweiten Teil der Arbeit der Effekt der Lipidextrakte auf die β - und die γ - Sekretasen untersucht werden.

Aufgrund der bidirektionalen Wechselwirkung zwischen der APP-Prozessierung und der Lipidkomposition soll ein möglicher Regelkreis diskutiert werden.

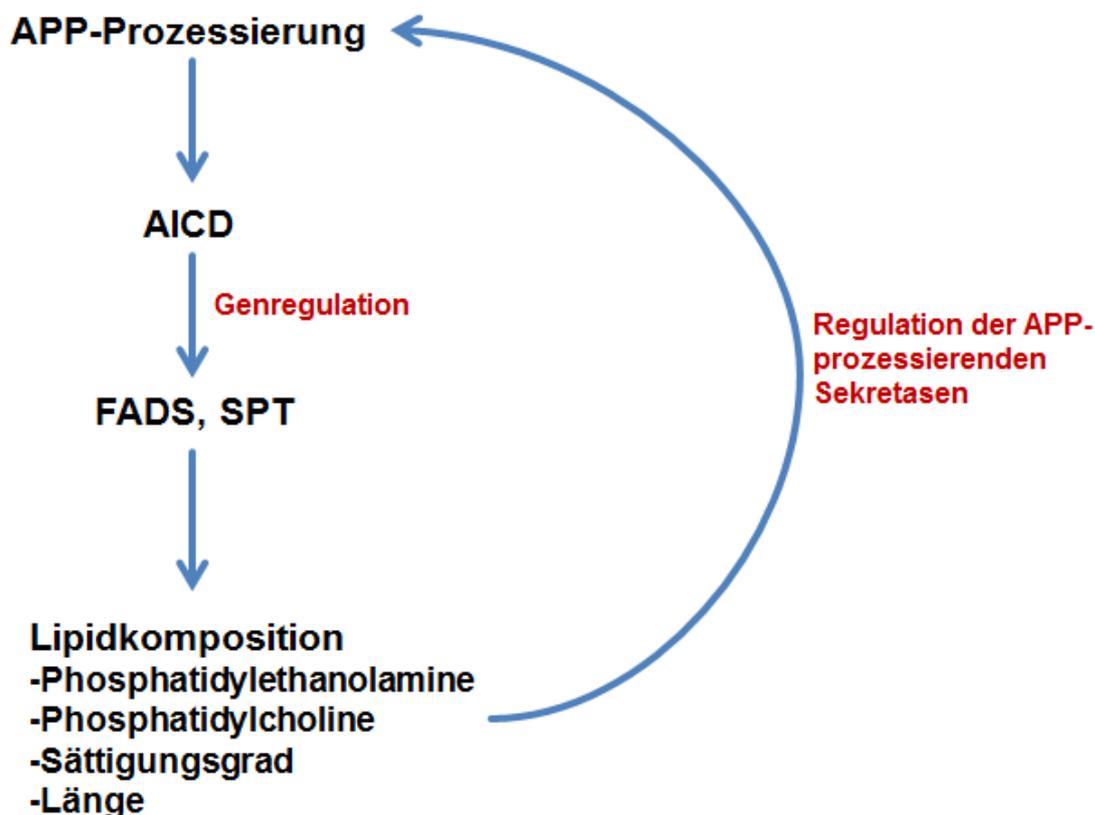


Abbildung 4: Fragestellung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht, ob AICD durch die Regulation der FADS und SPT einen Einfluss auf die Lipidkomposition hat. Es werden insbesondere die Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine, der Phosphatidylcholine und ihre Zusammensetzung untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Regulation der APP-prozessierenden Sekretasen durch die veränderte Lipidkomposition untersucht. Aufgrund der bidirektionalen Wechselwirkung ist das Vorliegen eines Regelkreises zu diskutieren.

Abschließend soll in dieser Arbeit der Einfluss der Familie der Xanthine auf die APP-prozessierenden Sekretasen untersucht werden. Zu den Xanthinen gehören sowohl, Coffein als auch Propentofyllin. Beide Substanzen wurden als therapeutische Optionen zur Behandlung der AD diskutiert (Arendash et al. 2006, Maia and de Mendonca 2002, Rother et al. 1998). Trotz therapeutischen Erfolgen in Studien, bleibt der Wirkungsmechanismus weitgehend unbekannt (Chauhan et al. 2005, Mielke et al. 1998b, Smith et al. 2005). Die Kenntnis der Wirkungsweise könnte sowohl das Verständnis der AD als auch möglicher therapeutischer Ansätze verbessern.

Die Fragestellung der Arbeit kann wie folgt zusammengefasst werden:

1. Welchen Einfluss hat AICD auf die Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine, ihren Sättigungsgrad und ihre Länge? Wie verändert sich das Verhältnis von mehrfach-ungesättigten zu einfach-ungesättigten und gesättigten Fettsäuren?
2. Welchen Einfluss hat das veränderte Lipidprofil auf die β - und die γ -Sekretasen?
3. Existiert eine bidirektionale Wechselwirkung zwischen der APP-Prozessierung und der Lipidkomposition?
4. Wie regulieren die Xanthine die APP-prozessierenden Sekretasen?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Herkunft
Bicinchoninsäure	Sigma Aldrich
BSA	Roth
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck Millipore Millipore
Chloroform, HPLC grade	Merck Millipore Millipore
Complete Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA	Roche
CuSO ₄ x 5H ₂ O	Roth
DAPT	Merck Millipore
DMEM	Sigma Aldrich
DMSO	Roth
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösungen (Western Lightning Plus ECL)	Perkin Elmer
EDTA	Roth
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol, HPLC grade	Sigma Aldrich
Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies
FCS	PAN Biotech
Fixiererlösung	Kodak
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl, rauchend	Merck Millipore
Hygromycin B	PAN Biotech
Isopropanol, HPLC grade	VWR
KCL	Merck Millipore
KH ₂ PO ₄ x 3H ₂ O	Merck Millipore
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000	Life Technologies
MEM Aminosäure-Lösung	Sigma Aldrich
Methanol, HPLC grade	VWR
MgCl ₂	Roth
Milchpulver, blotting grade	Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Roth
NaCl	AppliChem
NaOH	Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma Aldrich
NEM	Santa Cruz Biotechnology
Opti-MEM	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich
Proteingrößenmarker Page Ruler	Promega

Chemikalie	Hersteller/Herkunft
Protein-G-Sepharose	Sigma Aldrich
Saccharose	Sigma Aldrich
Saint PhD	Synvolux Therapeutics
SDS	Sigma Aldrich
Tricin	Biomol
Tris	Sigma Aldrich
Triton X-100	Merck Millipore
Trizima Base	Sigma Aldrich
TRIzol Reagenz	Life Technologies
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma Aldrich
Wasser, HPLC grade	VWR
Wasser, RNase-frei	Qiagen
Zeocin	Life Technologies
β -Sekretase-Inhibitor II	Merck Millipore
β -Sekretase-Substrat	Merck Millipore
γ -Sekretase Inhibitor IV	Merck Millipore
γ -Sekretase Inhibitor X	Merck Millipore
γ -Sekretase Substrat	Merck Millipore

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10cm-Schalen für Zellkultur	Sarstedt
12-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
24-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
6-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
96-DeepWell-Platte	Nunc
96-Well-Platte für RT-PCR, 6x16, weiß	Thermo Scientific
96-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
96-Well-Platte MaxiSorp, schwarz	VWR
96-Well-Sammelplatte	Nunc
ECL-Hyperfilm	Amersham
Cryoröhrchen, 1,8ml	Nunc
Falconröhrchen, 15ml	Sarstedt
Falconröhrchen, 50ml	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolien TypeC DinA4	Xerox
Glasflaschen, 2ml	NeoLab
Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 0,5mm	Peqlab
Glaspipetten	NeoLab
Glasröhrchen für Arbeit mit Lipiden	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein/Selbst konstruiert
Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4mm	Peqlab
Maushirn (Wildtyp) für PNFs	AG Bals
Nitrozellulosemembran 0,2 μ m Porengröße	Whatman
Nitrozellulosemembran, 0,45 μ m Porengröße	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 1,5ml, Schwarz	Eppendorf
Silikonmatte	Nunc

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Tris-Tricin-Gele, 10-20%, 10 oder 12 Bahnen	Anamed Gelelektrophorese
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Well-Platten	Peqlab
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Scientific
Geräte/Zubehör/Software	Hersteller
Analysenwaage ABS 80-4	Kern
8-Kanal-Pipette, elektronisch	Nunc
Brutschrank 37°C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipipette M4	Eppendorf
Fluorometer Safire2	Tecan
Fluorometer/Luminometer Infinite M1000 Pro	Tecan
Gefrierschrank -20°C Premium	Liebherr
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Hamilton Kapillare	Hamilton
Heizblock Thermoschüttler	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Massenspektrometer 4000 QTRAP	AB Sciex
Microplate Reader	LAB4you
Mikrowelle	Continent
Minilys Homogenisator	Peqlab
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific (Eigentum von AG Bals)
PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Präzisionswaage EW	Kern
Rotor TLA-55	Beckmann Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software Piko Real 2.1	Thermo Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Stickstoff-Abdampfvorrichtung	VLH
Stickstofftank -196°C GT 140	Air Liquide
TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Überkopftaumler Reax2	Heidolph Instruments
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Wasserbad	GFL
Wheaton-Schüttler Multi Reax	Heidolph Instruments
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus

3.1.2. Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung/Herkunft/Antibiotika-Resistenz
MEF $\Delta\Delta$ C50	Maus-Fibroblasten mit stabiler Überexpression der letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von APP (AICD-Rescue) aus MEF APP Δ CT15-Zellen Einbringung des pcDNA3.1(+) zeo-APPC50-Vektors Klonierung durch Christoph Stahlmann Zeocin resistent
MEF $\Delta\Delta$ mock	Maus-Fibroblasten mit Leervektor – die letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von APP werden nicht exprimiert Kontrolle zu MEF $\Delta\Delta$ C50 Von Christoph Stahlmann erstellt Zeocin resistent
MEF AWT	WT-Maus-Fibroblasten im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt
MEF APP/APLP2-/-	APP/ APLP2-defiziente Mausfibroblasten im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt
MEF APP Δ CT15	Maus-Fibroblasten mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus (inklusive des YENPTY-Motifs von AICD) im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Ring et al., 2007)
N2a WT	murine Neuroblastom-Zelllinie (Klebe et al., 1970) im Rahmen einer Kooperation von Janine Mett zur Verfügung gestellt
SH-SY5Y WT	humane Neuroblastom-Zelllinie (Ross et al., 1983)
SH-SY5Y APP (X1-Klon)	SH-SY5Y mit stabiler Expression von humanem APP695 von Dr. Heike Grimm erstellt Hygromycin B-resistent
SH-SY5Y APP ^{swe}	SH-SY5Y mit stabiler Expression von humanem APP695 mit der „swedish“ Doppelmutation (K670N/M671L) (Mullan et al., 1992) von Dr. Heike Grimm erstellt Hygromycin B-resistent

3.1.3. Antikörper

Bezeichnung	Epitop	Klonalität	Verwendung	Hersteller/Herkunft
Primäre Antikörper				
Anti-sAPP β	Aminosäuresequenz ISEVKM im C-terminus von sAPP β	Monoklonal	Detektion von sAPP β im Western Blot	Clontech Takara
W02	APP (human, Aminosäure 5-10 der A β -Sequenz)	Monoklonal	A β -Immunpräzipitation/ Detektion von sAPP α und Gesamt-A β	in AG Hartmann/ Multhaup/ Beyreuther (Heidelberg) hergestellt
Sekundäre Antikörper				
W4011	Kaninchen-IgG	Polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	Promega
P0260	Maus-IgG	Polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	DAKO

3.1.4. Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Hersteller/Herkunft
pcDNA3.1(+)-zeo-APPC50	C50-Expression in MEF APP Δ CT15	Klonierung durch Christoph Stahlmann
pVectOZ-SEAP	Messung der SEAP-Sekretion durch SH-SY5Y WT	OZ-Biosystems

3.1.5. Zellkulturmedien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Hygromycin B (400 μ g/ml)	Zeocin (300 μ g/ml)
MEF WT	DMEM +10% (v/v) FCS	-	-
MEF APP/APLP2 $^{-/-}$	DMEM +10% (v/v) FCS	-	-
MEF APP Δ CT15	DMEM +10% (v/v) FCS	-	-
MEF $\Delta\Delta$ C50	DMEM +10% (v/v) FCS	-	+
MEF $\Delta\Delta$ mock	DMEM +10% (v/v) FCS	-	+
N2a WT	DMEM +10% (v/v) FCS +0,1mM MEM Aminosäure-Lösung +100U/ml Penicillin	-	-

	0,1mg/ml Streptomycin +2mM L-Glutamin +1mM Natriumpyruvat		
SH-SY5Y WT	DMEM +10% (v/v) FCS +0,1mM MEM Aminosäure- Lösung	-	-
SH-SY5Y APP (X1-Klon)	DMEM +10% (v/v) FCS +0,1mM MEM Aminosäure- Lösung	+	-
SH-SY5Y APPswe	DMEM +10% (v/v) FCS +0,1mM MEM Aminosäure- Lösung	+	-

3.2. Eukaryotische Zellkultur

(nach Freshney, 2011)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Zelllinien verwendet. Alle Tätigkeiten im Rahmen der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank getätigt. Zudem wurden die Zelllinien regelmäßig auf eine Kontamination mit Mycoplasmen untersucht.

3.2.1. Kultivierung

PBS (pH von 7,5)

137mM NaCl

2,7mM KCl

8,1mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

1,5mM KH₂PO₄

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 10cm Schalen mit 10ml des entsprechenden Zellkultumediums (vgl. 3.1.6) in einem Zellinkubator kultiviert. Die Zellen wurden in gleichmäßigen Abständen auf Konfluenz, Aussehen und einen möglichen Farbumschlag des Mediums untersucht. Gegebenenfalls wurde das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden vorher auf 37° erwärmt. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2ml 1xPBS gewaschen und anschließend mit 2ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung gelöst.

Die Einwirkzeit der 1x Trypsin/EDTA-Lösung variiert in Abhängigkeit mit der Dichte des Zellrasens und der verwendeten Zellreihe und beträgt zwischen 1 und 2 Minuten.

Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 8ml Medium und dem darin enthaltenden Fetalen-Kälber-Serum (FCS) inaktiviert. Zur vollständigen Ablösung des Zellrasens wurde dieser mit Hilfe einer Pipette mobilisiert. 10ml dieser Zellsuspension wurden nun auf neue 10cm Schalen verteilt. Die Zellen wurden 1:2, 1:5 oder 1:10 passagiert, in Abhängigkeit der Zellreihe und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, sowie zeitlichen Gegebenheiten.

Für bestimmte Experimente wurden 6-Loch-, 24-Loch, und 96-Loch-Platten verwendet. Die Zellen wurden für die Kultivierung auf diesen Platten analog zum oben beschriebenen Vorgang mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und auf die entsprechenden Platten pipetiert. Die 6-Loch-Platten wurden mit 2ml Medium, die 24-Loch-Platten mit 350µl Medium und die 96-Loch-Platten mit 100µl Medium gefüllt und nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz inkubiert.

Miteinander zu vergleichende Zelllinien wurden immer im gleichen Abstand und gleich oft passagiert.

3.2.2. Langzeitlagerung

(nach Freshney, 2011)

Einfriermedium (50ml)

35ml des Zellkulturmediums

10ml FCS

5ml DMSO

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte als Suspension im Einfriermedium in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffes. Jede Probe wurde in einem Kryoröhrchen, das 1,5ml Zellsuspension enthält, gelagert. Diese Kryoröhrchen wurden im flüssigen Stickstoff bei circa -196° langfristig aufbewahrt.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen mit 2ml 1x PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in 5ml Zellkulturmedium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 15ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 4,5ml des Einfriermediums pro verwendete 10cm Schale resuspendiert. Das Zellsuspensat wurde zügig auf 1,5ml Kryoröhrchen verteilt.

Die Kryoröhrchen wurden anschließend in mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Gefrierkulturen in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs gelagert.

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte indem die Zellsuspension bei Raumtemperatur aufgetaut, in 5ml Zellkulturmedium in 15ml Falcon-Röhrchen gelöst und sofort bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in der Sterilbank abgesaugt, das verbleibende Zellpallet wurde in 5ml Medium resuspendiert und in eine 10cm Schale überführt. Die 10cm Schale wurde anschließend mit weiteren 5ml Medium aufgefüllt und kultiviert.

3.2.3. Behandlung von Zellen mit Additiven

(Grimm M. O. et al. 2013a, Grimm M. O. et al. 2016c, Grimm M. O. et al. 2012c)

Additiv	Finale Konzentration	Lösungsmittel	Inkubationsdauer In Stunden (H)	Inkubierte Zelllinien
AICD	2 μM	H ₂ O	12H + 12H	MEF APP Δ CT15
γ -Sekretase-Inhibitor DAPT	2,5 μM	DMSO, 1‰ (v/v)	12H + 12H	MEF WT
Lipidextrakte	10 μM / 5 μM für A β - Degradations- assay	Ethanol, 5‰ (v/v)	12H + 12H/ 18H+6H mit humanen A β 40 für A β - Degradationsassay	SH-SY5Y APP SH-SY5Y WT MEF WT MEF APP Δ CT15

Um den Effekt von Lipiden und anderen Additiven auf die A β -Synthese und die APP-Prozessierung zu untersuchen, wurden die zu untersuchenden Zelllinien mit den oben dargestellten Additiven behandelt.

Die Zellen wurden bei 100%iger Konfluenz zuerst mit 2ml 1x PBS gewaschen und dann mit 2ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Anschließend wurde das Trypsin mit einem der Zelllinie entsprechenden Kulturmedium inaktiviert. Die Menge des verwendeten Mediums war von den für den Versuch benötigten Schalen abhängig. Bei 96-Loch-Schalen wurden 7,6ml Medium, bei 6-Loch-Schalen 8ml verwendet. Der Trypsinverdau wurde mit der Pipette gründlich homogenisiert und auf die entsprechenden Vertiefungen verteilt. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die Zellen möglichst erfolgreich vereinzelt und homogenisiert wurden, da die Integrität der Ergebnisse maßgeblich von einer konstanten Zellmenge pro Vertiefung abhängt. Die Zellen wurden für 24 Stunden in einem Inkubator kultiviert. In dieser Zeit adhäreren die Zellen und es kommt zu der Bildung des Zellrasens. Anschließend wurden die Zellen mit einem 0,1% FCS-haltigen Medium behandelt.

Je nach Versuch wurden die Zellen entweder zuerst für 6 Stunden mit diesem Medium vorbehandelt oder direkt mit den entsprechenden Lipidextrakten, bzw. Additiven inkubiert.

Bei den Lipid-Proben handelt es sich um Lipidextrakte, die in 100% Ethanol gelöst worden sind. Die verwendeten Konzentrationen werden in den einzelnen Experimenten beschrieben. Die Zellen wurden zusammen mit den Lipidextrakten für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden abermals für 12 Stunden mit demselben Lipidextrakt und Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen für die folgenden Versuche verwendet.

Für die Inkubation von MEF APP Δ CT15 mit AICD wurde ein synthetisches AICD-Peptid, das die letzten 20 C-terminalen Aminosäuren von APP (Aminosäure-Sequenz: KMQQNGYENPTYKFFEQMQN) enthält verwendet.

Für die Untersuchung der A β -Degradation wurden Zellen wie in (Grimm M. O. et al. 2016c) beschrieben für 18H mit den Lipidextrakten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6H mit humanen A β 40 sowie den Lipidextrakten inkubiert.

3.2.4. Transfektion eukariotischer Zellen durch Lipofektion

(Nach Dissertation Dr. J. Mett 2016 und Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Plasmid-DNS wurde durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectin 2000 in eukaryotische Zellen eingebracht. Es wurden 10cm Schalen, die eine 70 bis 80 prozentige Konfluenz aufwiesen, verwendet.

Ein 1,5ml Reaktionsgefäß wurde mit 1200 μ l OptiMEM sowie 16 μ g DNS und ein weiteres 1,5ml Reaktionsgefäß mit 1200 μ l OptiMEM sowie 36 μ l Lipofectamine 2000 befüllt. Beide Reaktionsgefäße wurden für 5 Minuten bei RT inkubiert, miteinander vermengt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Die zu behandelnden Zellen wurden mit 2ml OptiMEM gewaschen und es wurden 7,5ml in jede 10cm Schale vorgelegt. Der Plasmid-DNS/OptiMEM/Lipofectamine 2000-Ansatz wurde zu jeder Schale hinzugefügt und für 6 Stunden bei 37° inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde entfernt und 10ml des entsprechenden Kulturmediums hinzugefügt. Die Zellen wurden abermals für 24 Stunden bei 37° inkubiert und anschließend wie in 3.2.1 beschrieben mit 1x Trypsin/EDTA gelöst und auf eine 24-Loch-Platte mobilisiert. Schlussendlich wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bei 37° inkubiert und die Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) wurde durch ein sekretorische, alkalische Phosphatase-Assay (SEAP-Assay, 3.2.5) quantifiziert.

3.2.5. Bestimmung der Proteinsekretion durch SEAP-Assay

(nach Herstellerprotokoll 1-Step PNPP, Thermo Scientific, Version 2012)

Die Proteinsekretion über das TGN wurde durch die Untersuchung der SEAP im Kulturmedium der in 3.2.4 transfizierten Zellen quantifiziert. Dieser Vorgang erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Alkalische Phosphatasen hydrolysieren Phosphatsäureester, wobei die sekretorische, alkalische Phosphatase eine verkürzte Form darstellt, die über das TGN sezerniert wird. Die Quantifizierung des sezernierten Enzyms erfolgt durch die Zugabe des SEAP-spezifischen Substrates para-Nitrophenyl Phosphat. Dieses Substrat wird von SEAP enzymatisch in p-Dinitrophenol – ein Farbstoff, der durch eine Absorptionswellenlänge von 405nm charakterisiert ist – umgesetzt.

Die verwendeten Zellen wurden auf 10cm Schalen kultiviert und bei 80%iger Konfluenz wie in 3.2.4 beschrieben transient transfiziert und anschließend auf 24-Loch-Platten ausgesät. Es wurde das SEAP-kodierende Plasmid pVectOZ-SEAP verwendet. Die 24-Loch-Platten wurden für 24 Stunden kultiviert und wie in 3.2.3 beschrieben mit Additiven behandelt. Die Zellen wurden für 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) mit dem entsprechenden Additiv inkubiert und nach Ablauf der Zeit wurde der Vorgang wiederholt.

Das konditionierte Medium wurde anschließend in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, 10 Minuten bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben wurden dann für 10 Minuten in einem Heizblock bei 65° erhitzt und 1 zu 5 verdünnt. 100µl der Verdünnung wurden in BCA-Platten pipettiert, mit 100µl der 1-Step-pNPP-Lösung vermischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100µl 1N NaOH beendet und das entstandene p-Dinitrophenols wurde in einem Mikroplatten Lesegerät ausgewertet. Es wurde die Absorption von p-Dinitrophenols bei 405nm gemessen.

3.2.6. LDH-Assay

(nach Herstellerprotokoll Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Version Mai 2012)

Die Zellreihen wurden mit additiven Substanzen behandelt. Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte in einer relevanten Differenz der Zytotoxizität besagter Substanzen begründet sind wurde ein LDH-Assay (Lactact-Dehydrogenase-Assay) für jedes Additiv durchgeführt. Für die Durchführung dieses Tests wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche gemäß Herstellerangaben verwendet.

Die Methode basiert auf der Quantifizierung der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium. LDH liegt physiologisch im Zytosol vor und kann infolge einer Schädigung der Membran in das Kulturmedium übergehen.

Dementsprechend ist die LDH-Enzymaktivität im Medium proportional zur Anzahl der geschädigten, bzw. abgestorbenen Zellen. LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat unter der Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$. Der Katalysator Diaphorase transferiert parallel dazu zwei Protonen von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), wodurch der Farbstoff Formazan entsteht. Dementsprechend korreliert die Farbintensität des entstandenen Formazans mit der LDH-Aktivität bzw. Konzentration im Kulturmedium.

Die Zytotoxizität wurde bestimmt, indem 100 μl des konditionierten Kulturmediums auf eine 96-Loch-Platte pipettiert wurde. Diese Proben wurden mit einer Standardreihe verglichen. Die Standardreihe wurde durch die Verdünnung des Kulturmediums von vergleichbar konfluenten Zellen, die durch die Zugabe von 1% (v/v) Triton-X100 abgetötet wurden, erstellt. Das weitere Vorgehen unter Verwendung des Cytotoxicity Detection Kits erfolgte analog zum Herstellerprotokoll. Es folgte die Messung der Absorption bei 491nm in einem Mikroplatten Lesegerät. Es wurde stets eine Dreifachbestimmung jeder Probe durchgeführt.

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Standardreihe erlaubt die Erstellung einer Geradengleichung. Die Zytotoxizität der Proben wurde anhand dieser Geradengleichung errechnet, wobei 0% Zytotoxizität einer 100% Zellviabilität entsprechen.

3.3. Molekularbiologische Arbeiten

Sowohl Zellen als auch Proben wurden stets auf Eis gelagert, um den Effekt von Proteasen und dem zelleigenen Metabolismus zu minimieren.

3.3.1. RNS Isolation

(nach Herstellerprotokoll TRIzol-Reagent, Life Technologies, Version Dezember 2012)

Die Bestimmung der Genexpression wurde mithilfe einer quantitativen Echtzeit PCR (engl. „*quantitative real time polymerase chain reaction*“, hier als RT-PCR abgekürzt) realisiert. Die RNS wurde mithilfe von Trizol isoliert.

Die Isolierung der RNS erfolgte aus Zellen, die in 6-Loch-Schalen kultiviert und mit einem Lipidextrakt behandelt wurden. Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen entfernt und die Zellen wurden mit 1000 μl TRIzol für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummispatel abgeschabt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Es wurden 200 μl Chloroform hinzupipettiert und die Proben wurden für 15 Sekunden kraftvoll geschüttelt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 15 Minuten bei 12000rpm und 4° zentrifugiert, was zu der Bildung von drei Phasen führt: die untere, rote Phase enthält DNS, die in der Mitte gelegene, weiße Phase enthält Proteine und die klare,

obere Phase enthält RNS. Letztere wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol vermengt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss für 10 Minuten bei 12000rpm und 4° zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 12000rpm und 4° zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde für 2 Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde das Pellet in 100µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 55° erwärmt.

Die Reinheit und Konzentration wurden – wie in 3.3.2 beschrieben – bestimmt und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80° gelagert.

3.3.2. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

(Nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der in 3.3.1 gewonnenen RNS-Proben erfolgte durch die Verwendung eines Nanodrops-8000. Der Nanodrop-8000 erlaubt die Quantifizierung der Absorption für die Wellenlängen 260nm und 280nm. Die Wellenlänge 260nm entspricht dem Maximum der Extinktion von Nukleinsäuren, die Wellenlänge 280nm dem Maximum der Extinktion von Proteinen. Eine Extinktion, die den Zahlenwert 1 annimmt, korrespondiert mit einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml. Die Konzentration einer beliebigen RNS-Konzentration wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50\mu\text{g/ml}$$

Die Proben wurden basierend auf den Ergebnissen auf 2µg RNS pro 10µl HPLC-H₂O normiert.

Der Quotient der beiden gemessenen Wellenlängen erlaubt eine Aussage über die Reinheit der RNS. Der Quotient 260nm/280nm sollte Werte zwischen 2,0 und 2,2 annehmen. Es wurden nur Proben verwendet, die diesen Quotienten erreichen.

3.3.3. cDNS-Synthese

(Nach Herstellerprotokoll High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, Version März 2016)

Programeinstellung für die cDNS-Synthese		
Schritt	Dauer	Temperatur
1	10min	25°C
2	120min	37°C
3	5min	85°C
4	konstant	8°C

Ansatz für cDNS-Synthese

10µl	RNS (normiert auf 0,2µg/µl)
2µl	10x RT-Puffer
0,8µl	25x dNTP Mix
2µl	10x RT Random Primer
1µl	MultiScribe Reverse Transkriptase
4,2µl	Nuklease-freies H ₂ O

Für die Transkription der RNS in komplementäre DNS (cDNS) wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Life Technologies verwendet. 2µg RNS wurden in einem PRIMUS 25 ADVANCED PCR-Cycler in cDNS umgeschrieben.

Es wurden 10µL des oben beschriebenen Ansatzes zu 10µL Probe gegeben. Der Ansatz wurde für eine Minute bei 13000rpm und 4° zentrifugiert und anschließend in den PCR-Cycler gegeben.

Die so gewonnene cDNS wurde 1 zu 10 in H₂O verdünnt und bei -20° bis zur weiteren Nutzung gelagert.

3.3.4. qRT-PCR

(Mullis K. et al. 1986, Mullis K. B. and Faloona 1987)

Gen	Vorwärts primer	Rückwärts primer
ACTB (β-Aktin)	5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3'	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
APH1a (APH1a)	5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3'	5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3'
APH1b (APH1b)	5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3'	5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3'
BACE1 (BACE1)	5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3'	5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3'
NIC (Nicastrin)	5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3'	5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3'
PSEN1 (PS1)	5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3'	5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3'
PSEN2 (PS2)	5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3'	5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3'
PSENEN (PEN2)	5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3'	5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3'

Ansatz für RT-PCR

2,5µl	cDNS
2µl	Nuklease-freies H ₂ O
0,25µl	Primer forward
0,25µl	Primer reverse
5µl	Fast SYBR Green Master Mix

Programm für die RT-PCR

Schritt	Ablauf	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
1	Denaturierung	20s	95°C	1
2	Denaturierung	3s	95°C	40
3	Elongation	30s	60°C	1
4	Schmelzkurvenanalyse	-	60-95°C	-

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion erlaubt die Bestimmung des Expressionsniveaus verschiedener Gene. Die RT-PCR amplifiziert das zu untersuchende Gen selektiv in Abhängigkeit des verwendeten Primers. Zudem wurde das Expressionsniveau der Housekeeping-Gene β -Aktin und TATA-box bindendes Protein (TBP) bestimmt, da von einer einheitlichen Expressionsstärke in allen Zell- und Gewebearten ausgegangen werden kann (Medrano et al. 2017, Rydbirk et al. 2016). Die untersuchten Gene wurden mit dem Expressionsniveau von β -Aktin und TBP verglichen. Es wurde die wie in 3.3.3 beschrieben gewonnene cDNA verwendet, wobei darauf geachtet wurde, nur Proben mit einem 260/280 Absorptionsquotienten von 2,0 bis 2,2 zu benutzen. Die verwendeten Primer sind in der oberen Tabelle dargestellt. Es wurde das PikoReal PCR System der Firma Thermo Scientific verwendet.

Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green erlaubt durch die Bindung von doppelsträngiger DNS die quantitative Bestimmung der Genexpression.

Für die Messung wurde eine 96-Loch-Platte entsprechend der Probenzahl pro Vertiefung mit 2,5 µL cDNA und 7,5 µL des oben dargestellten Ansatzes befüllt.

Es wurde das oben beschriebene Programm verwendet und die Fluoreszenz der jeweiligen Probe bestimmt. Für die Auswertung wurden die PikoReal Software (Version 2.1.158.545) und die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001) verwendet. Bei der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode wird das Expressionsniveau eines zu analysierenden Gens als Veränderung im Verhältnis zu einem nicht regulierten Gen – in diesem Fall β -Aktin und TBP – angegeben.

3.4. Proteinbiochemische Arbeiten

3.4.1. Zellaufschluss

(nach Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014)

Lysepuffer	
50mM	Tris/HCl pH7,4
150mM	NaCl
2mM	EDTA
0,1% (v/v)	Nonidet P-40
0,1% (v/v)	Triton X-100
10%	Protease-Inhibitor in EDTA

Für die Analyse von APP-Prozessierungsprodukten wurde die Western-Blot-Methode verwendet. Bei dieser Methode werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend entlang eines elektrochemischen Gradienten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die auf der Membran immobilisierten Proteine können durch immunochemische Nachweisverfahren dargestellt und quantifiziert werden.

Für diese Methode wurden die Zellen zunächst chemisch aufgeschlossen und ihre Proteinkonzentration wurde bestimmt. Für die Untersuchung von A β wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit Hilfe der ECL-Methode detektiert und quantifiziert. Die zu verwendenden Zellen wurden vorher auf 6-Loch-Schalen kultiviert und mit den zu untersuchenden Lipidextrakten inkubiert.

Das konditionierte Zellmedium wurde von den Zellen entfernt und in 2ml Reaktionsgefäße überführt, für 10 Minuten bei 13000rpm und 4° zentrifugiert und in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20° gelagert.

Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 1ml 1x PBS gewaschen und mit 500 μ l Lysepuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Der Zellrasen wurden mithilfe eines Gummischabers abgelöst, in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert und weitere 60 Minuten auf Eis gelöst. Die Reaktionsgefäße wurden in regelmäßigen Abständen mechanisch stimuliert. Die Proben wurden dann 10 Minuten bei 13000rpm und 4° zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde mittels der BCA-Methode bestimmt.

3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration durch den BCA-Tests

(nach Smith et al., 1985; Durchführung wie in Dissertation S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

BCA-Arbeitslösung

4% (w/v)	CuSO ₄
1:39 (v/v)	Bicinchoninsäure

Für den BCA-Test wurde eine Standardreihe der Konzentrationen 0,0 bis 1,1 µg/µl in eine 96-Loch-Platte vorgelegt. Es wurden 20 µl jeder Standardprobe aus Rinderserum-Albumin pro Vertiefung verwendet. Die Standardreihe erlaubt eine Gradengleichung für die Proteinkonzentration zu erstellen, wobei eine bestimmte Absorption bei der Wellenlänge 560 mit der entsprechenden Proteinkonzentration korreliert. Es wurden 2,5 µl der zu untersuchenden Proben in je eine Vertiefung der 96-Loch-Platte pipettiert. Es wurde stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Weiterhin wurden 200 µl BCA-Arbeitslösung auf jede Proteinprobe pipettiert. Die 96-Loch-Platte wurde dann für 15 Minuten bei 37° und anschließend weitere 15 Minuten bei RT inkubiert. In diesem Zeitraum reduzieren die Proteine Cu²⁺ zu Cu⁺, wobei die Quantität des reduzierten Kupfers proportional zur Proteinmenge in der Probe ist. Die Bicinchoninsäure führt zusammen mit dem reduzierten Kupfer zur Bildung eines violetten Komplexes. Die Absorption wurde mit Hilfe des Microplate Readers bestimmt und die Messwerte wurden anhand der oben beschriebenen Eichgerade in eine Proteinkonzentration umgerechnet. Die Kenntnis der Proteinkonzentration erlaubt die Normierung der Proben auf eine einheitliche, bekannte Proteinmenge.

3.4.3. Immunpräzipitation

(nach Dissertation Dr. J. Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Waschpuffer A (in ddH₂O)		Waschpuffer B (in ddH₂O)		Waschpuffer C (in ddH₂O)	
10mM	Tris/HCl pH7,5	10mM	Tris/HCl pH7,5	10mM	Tris/HCl pH7,5
150mM	NaCl	500mM	NaCl		
0,1% (v/v)	Nonidet P-40	0,1% (v/v)	Nonidet P-40		
0,1% (v/v)	Triton X-100	0,1% (v/v)	Triton X-100		
2mM	EDTA	2mM	EDTA		

Die Immunpräzipitation erlaubt den Nachweis von Aβ. Aβ ist ein ungefähr 4kDa schweres Molekül mit einer kurzen Halbwertszeit, dessen Nachweis durch die katalytische Wirkung von Proteasen erschwert ist.

Die Proben wurden anhand ihrer Proteinkonzentration angeglichen und anschließend in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Es wurde 1mg Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe verwendet. Zu dieser Probe wurden 10µg des W02-Antikörpers, sowie 20µl Protein-G-Sepharose pipettiert. Dieser Versuchsansatz wurde über Nacht bei 4° in einem Überkopftaumler mobilisiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000rpm und 4° für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde hintereinander mit 1ml von Waschpuffer A, B und C gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Probe invertiert und bei 13000rpm und 4° für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100µl, die im Reaktionsgefäß verblieben sind, verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die im Reaktionsgefäß verbliebene Flüssigkeit mit Hilfe einer Insulinkanüle entfernt.

3.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

(nach Schagger und von Jagow, 1987, Durchführung nach Dissertation V. Burg 2014, Universität des Saarlandes)

10x Kathodenpuffer (in ddH₂O)

100mM	Tris/HCl pH 8,25-8,5
100mM	Tricin
0,1% (w/v)	SDS

3x SDS-Proben-Puffer (in ddH₂O)

187,5mM	Tris/HCl pH 6,8
6% (w/v)	SDS
30% (v/v)	Glycerin
15% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,03% (w/v)	Bromphenolblau

Bevor das eigentliche Blotting durchgeführt werden kann, müssen die zu untersuchenden Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Hierzu wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. SDS denaturiert das Protein, zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein und überdeckt seine Eigenladung. So entstehen Komplexe, deren negative Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine in einem elektromagnetischen Feld ist proportional zu dieser negativen Ladung und antiproportional der Molekülgröße.

Die Proben wurden mit SDS-Proben-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 98° Celsius gekocht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzuheben.

Im Fall einer vorhergegangenen Immunpräzipitation wurden 20µl 1x SDS-Proben-Puffer verwendet, während alle anderen Proben mit 6µl des 3x SDS-Proben-Puffer versetzt wurden.

Anschließend wurden die aufgearbeiteten Proben in die Geltaschen eines 10-20% Tris-Tricine-Gradientengel pipettiert und in eine kommerziellen Gelkammer der Firma Invitrogen überführt. Die Gelkammer wurde mit 1x Kathodenpuffer gefüllt und bei RT für circa 1 Stunde bei 120V verwendet.

3.4.5. Western-Blot-Analyse

(nach Towbin et al., 1979, Durchführung nach Dissertation Dr. V. Burg 2014, Universität des Saarlandes)

10x Transferpuffer (in ddH₂O)

25mM	Tris/HCl pH8,7
192mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
0,025% (w/v)	SDS

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine müssen von dem verwendeten Polyacrylamidgel auf eine geeignete Membran, in diesem Fall 0,45µm dicke Nitrozellulose, übertragen werden. Dieser Transfer erfolgt durch die elektrophoretische Wirkung eines orthogonal zum Gel angelegten elektrischen Feldes. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich entsprechend des elektrischen Feldes zum positiven Pol. Das Gel befindet sich hierbei an der Anode und die Zielfolien an der Kathode. Das charakteristische und auf der Molekülgröße der einzelnen Proteine basierende Muster bleibt bei diesem Transfer erhalten.

Die Zielfolien und das Gel liegen bei dieser Methode direkt einander auf und werden sowohl in Richtung der Anode als auch der Kathode von zwei Whatman Blottingpapieren und einem Schwamm flankiert. Besondere Aufmerksamkeit gilt der Verhinderung von Luftblasen zwischen den einzelnen Komponenten des Sandwiches, da diese den Transfer und somit auch die Auswertung stören. Die Luftblasen werden durch mechanische Kompression der einzelnen Schichten des Sandwiches entfernt. Die Transferzeit und Stromstärke hängen von den zu untersuchenden Proteinen ab. Zur Untersuchung von Aβ wurden 380mA und eine Transferzeit von einer Stunde verwendet. Die Transferkammer wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt.

Die Untersuchung größerer Proteine, wie BACE1, ADAM10 oder sAPP α und sAPP β wurde durch eine Transferzeit von 4 Stunden bei 380mA ermöglicht. Alternativ können die Proteine auch bei 200mA über Nacht transferiert werden.

3.4.6. Proteinnachweis mit der ECL-Methode

(nach Ida et al., 1996, modifiziert nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Detektiertes Antigen	Blockierlösung und Inkubationsbedingungen	Primär-Antikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingungen	Sekundär-Antikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingungen
A β /sAPP α	10% Milchpulver (w/v) in PBS, über Nacht, 4°C 10% Milchpulver (w/v) in PBS über 1 Stunde bei 20°C	W02, 1 μ g/ml in 1% Milchpulver (w/v) in PBS, 90min, RT	P0260, 1:5000 in PBS, 1Std, RT
sAPP β	10% Milchpulver (w/v) in PBS, über Nacht, 4°C	Anti-sAPP β , 1 μ g/ml in 5% Milchpulver (w/v)	W4011, 1:5000 in PBS, 1Std, RT

Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden durch die ECL-Methode entsprechend ihrer Antigen-Beschaffenheit dargestellt. Die ECL-Methode basiert auf der Verwendung eines spezifischen Primär-Antikörpers und eines Spezies-spezifischen Sekundär-Antikörpers. Die Umsetzung von Luminol durch die an den Sekundär-Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (engl. „*horseradish peroxidase*“, HRP) führt zu einer Lichtemission, die durch entsprechende, lichtempfindliche Filme detektiert werden kann. Die verwendeten Antikörper sind in der vorangegangenen Tabelle dargestellt.

Die Membran wurde zuerst für 12 Stunden bei 4° mit in 1x PBS gelösten 10% Milchpulver (w/v) in 1x PBS auf einem Schüttler inkubiert. Alternativ wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 10% Milchpulver (w/v) inkubiert. Das Milchpulver besetzt unspezifische Bindungsstellen und verringert so die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung der verwendeten Antikörper. Bei Verwendung des W02-Antikörpers wurde die Membran vor der Blockierung für 5 Minuten bei 700 Watt in 1x PBS in der Mikrowelle aufgekocht (Ida et al., 1996). Anschließend wurde das Milchpulver entfernt und die Nitrozellulosemembran wurde entsprechend der oben beschriebenen Inkubationsbedingungen mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen und entsprechend der vorangegangenen Tabelle mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert.

Die Membran wurde abermals drei Mal für 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen und die ECL-Reaktionslösung (ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1) wurde auf die Membran pipettiert.

Die Membran wurde zwischen zwei Kopierfolien gelegt und etwaige Luftblasen wurden entfernt. Die Entwicklung des Filmes fand in einer Dunkelkammer statt: Ein ECL-Hyperfilm wurde auf die Membran aufgebracht und für verschiedene Zeiträume exponiert. Die Expositionsdauer wurde anhand der Signalstärke der Proben gewählt und lag zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten. Der Film wurde anschließend in die Entwicklerlösung mobilisiert, bis zum Erscheinen der ersten Banden dort belassen, in Wasser gewaschen und schließlich für 2 Minuten in die Fixierer-Lösung eingetaucht. Der Film wurde gewaschen und die Banden mit Image-Gauge V3.45 densitometrisch ausgewertet.

3.4.7. Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität auf lebenden Zellen

(nach Grimm M.O. et al 2015a und Grimm M. O. et al 2016d)

Cell-Imaging-Solution

140mM	NaCl
2,5mM	KCL
1,5mM	CaCl ₂
1,0mM	MgCl ₂
20mM	Hepes pH7,4

Enzym	Substrat	Messparameter	Zyklenzahl und Messintervall
α -Sekretase	α -Sekretase Substrat II (Calbiochem No. 565767) 12,5 μ M	Extinktionswellenlänge: 340 \pm 10nm Emissionswellenlänge: 490 \pm 10nm	180, 40sec
β -Sekretase	β -Sekretase Substrat IV (Calbiochem No. 565758) 30 μ M	Extinktionswellenlänge: 345 \pm 5nm Emissionswellenlänge: 500 \pm 5nm	180, 40sec
γ -Sekretase	γ -Sekretase Substrat (Calbiochem No. 565764) 12,5 μ M	Extinktionswellenlänge: 355 \pm 10nm Emissionswellenlänge: 440 \pm 10nm	50, 180sec

Die Enzymaktivität der β - und γ -Sekretase auf lebenden Zellen wurde mit Hilfe der Verwendung eines fluorometrischen Substrates bestimmt. Bei dieser Methode wird ein Substrat, das einen Quencher und eine Fluoreszenzquelle enthält, von dem zu untersuchenden Enzym gespalten, wodurch Quencher und Fluoreszenzquelle räumlich voneinander getrennt werden.

Die Enzymaktivität korreliert mit der gemessenen Fluoreszenz. Der Quencher und die Fluoreszenzquelle sind durch eine Aminosäuren-Sequenz, welche die Schnittstelle des analysierten Enzyms enthält, verbunden. Das intakte Substrat emittiert keine

Fluoreszenz, da der Quencher durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (Clegg 1995, Dewey and Hammes 1980) die Anregbarkeit des Fluorophors verhindert. Es wurde weiterhin für jeden Versuch ein Inhibitor für das zu entsprechende Enzym eingesetzt, da die verwendeten Substrate auch durch andere Mechanismen, wie zum Beispiel zelleigene Proteasen oder bedingt durch die Unspezifität anderer Enzyme, gespalten werden können. Diese Unspezifität kann durch die Subtraktion von Inhibitor-Kontrolle und Probe quantifiziert werden.

Die Zellen wurden für die Messung der Sekretasenaktivität wie in 3.2.1 beschrieben auf 96-Loch-Platten mobilisiert und für 24 Stunden in einem Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und mit 0,1% FCS-haltigem Medium ersetzt. Die Zellen wurden zusätzlich mit 10 μ M des zu untersuchenden Lipidextraktes behandelt. Die Zellen wurden insgesamt zwei Mal mit den Lipidextrakten inkubiert; das erste Mal für 8 Stunden, das zweite Mal für 16 Stunden.

Das Zellkulturmedium wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit warmer Cell-Imaging-Lösung gewaschen. Es wurde darauf geachtet, den Absaugvorgang stets an derselben Stelle durchzuführen um den Zellrasen nicht zu schädigen. Die verwendeten Substrate wurden wie oben dargestellt verwendet. Die Messung erfolgte in einem Sapphire2-Fluorometer. Die Messparameter wurden in der oberen Tabelle dargestellt.

Die Quantifizierung der enzymalen Aktivität erfolgte anhand der Bestimmung der Steigung. Es wurde dafür eine Kinetik aller untersuchten Proben gebildet. Anhand der Kinetik wurde der lineare Bereich der Messung bestimmt. In diesem Bereich der Linearität wurde eine Tangente angelegt und die Steigung der entsprechenden Probe bestimmt. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde der Startpunkt der Kinetiken auf einem gemeinsamen Wert zum Zeitpunkt 0 auf der y-Achse normiert.

3.4.8. Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität auf Post-Nukleären-Fraktionen (PNF) und Membranpräparation

(nach Grimm M.O. et al 2015a und Grimm M. O. et al 2016d)

β-/γ-Saccharose-Puffer	
200mM	Saccharose
10mM	Tris/HCL pH7,4
1mM	EDTA

Substrat	Konzentration	Proteinmenge	Zyklenzahl und Messintervall
α -Sekretase Substrat II (Calbiochem No. 565767)	3 μ M	125 μ g für SH-SY5Y und MEF Membranen 250 μ g für Membranen aus Gehirnen	180, 60sec
β -Sekretase Substrat IV (Calbiochem No. 565758)	20 μ M	125 μ g für SH-SY5Y und MEF Membranen 250 μ g für Membranen aus Gehirnen	180, 60sec
γ -Sekretase Substrat (Calbiochem No. 565764)	6,25 μ M	250 μ g für SH-SY5Y und MEF Membranen 500 μ g für Membranen aus Gehirnen	50, 180sec

Die Quantifizierung der Enzymaktivität der β - und γ -Sekretase auf Post-Nukleären-Fraktionen (PNF) erfolgte analog zu dem in 3.4.7 beschriebenen Verfahren. Statt lebenden Zellen wurden hier Membran-Fragmente verwendet.

Die Bestimmung der Enzymaktivität auf PNFs erlaubt eine Aussage über den direkten Effekt der Additive auf die Aktivität der entsprechenden Sekretase.

Für die Herstellung der PNF wurden eukaryote Zellen auf 10cm Schalen kultiviert. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem 1x PBS gewaschen und mechanisch unter der Zugabe von 800 μ l β -/ γ -Saccharose-Puffer und der Verwendung eines Gummispatels gelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, anschließend mit Keramik-Kugeln vermengt und auf Stufe 3 für 20 Sekunden in einem Minilyse-Gerät der Firma Bertin Technologies aufgeschlossen. Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mit der BCA-Methode (vgl. 3.4.2) bestimmt.

Die Proben wurden auf 2mg/ml und ein Volumen von 1,2ml normiert und bei 900g und 4° für 10 Minuten zentrifugiert.

1ml der Überstände wurde in ein Glasgefäß überführt und die Lipidproben wurden nach vorhergegangener Erwärmung und Homogenisierung zu den Proben hinzugefügt. Diese Emulsion wurde anschließend für 15 Minuten auf einem Schüttler bei 400/U und 37° inkubiert. Anschließend wurde 800 μ l der konditionierten PNF in spezielle Ultrazentrifugations-Reaktionsgefäße überführt und für 75 Minuten bei 75000rpm und 4° zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und das Pellet in 800 μ l β -/ γ -Saccharose-Puffer resuspendiert. Glass-Kügelchen wurden gleichmäßig auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt, welche dann auf Stufe 2 in dem Minilyse-Gerät lysiert wurden.

Die Suspension wurde mithilfe einer Insulinkanüle in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß mobilisiert, wobei 100 μ l der Probe 250 μ g Protein entspricht. 100 μ l der Proben wurden in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Well-Platte pipettiert.

Das β -Substrat wurde 1:3 in DMSO verdünnt, während das γ -Substrat 1:50 in DMSO verdünnt wurde. Die Substrate wurden entsprechend der zu untersuchenden Sekretase verwendet. Für die Bestimmung der Enzymaktivität der β -Sekretase wurden 2 μ l in jede Vertiefung und für die Bestimmung der Enzymaktivität der γ -Sekretase wurden 10 μ l in jede Vertiefung pipettiert. Die Messung erfolgte in einem Sapphire2-Fluorometer. Die Messparameter sind in der vorrangegangenen Tabelle dargestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte Analog zu 3.4.7. Es wurden ebenfalls nur die linearen Bereiche ausgewertet.

3.5. Arbeiten mit Lipiden

3.5.1. Vorbereitung der Zellen

Das Ziel der Lipid-Extraktion ist es eine Probe der Lipidkomposition der entsprechenden Zelle, bzw. Zelllinie zu erhalten. Bevor die Lipid-Extraktion durchgeführt werden kann, müssen die Zellen geerntet und mechanisch aufgeschlossen werden.

Die Zellen wurden wie in 3.2 beschrieben bis zur Konfluenz kultiviert. Die zu bearbeitenden Zellen wurden auf Eis gelagert, um den Effekt von Proteasen und dem zelleigenen Metabolismus zu minimieren.

Zuerst wurde das konditionierte Medium abgesaugt und anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 μ l PBS zu den Zellen und das mechanische Ablösen des Zellrasens mit Hilfe eines Gummispatels. Die gelösten und in PBS suspendierten Zellen wurden in 2ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden für fünf Minuten bei 13000rpm und 4° zentrifugiert, wodurch die Zellen auf den Boden des Röhrchens als festes Zellpellet sedimentieren. Dieses Zellpellet kann bei minus 20° gelagert und, sobald die nötige Menge an geernteten Zellen gewonnen wurde, weiterverwendet werden.

Die geernteten Zellen wurden mithilfe der Mini-Lyse Methode aufgeschlossen. Die zu lysierende Zellen wurden mit einer konstanten Menge Keramik Kügelchen und 600 μ l HPLC-grade H₂O versetzt und anschließend für 30 Sekunden auf der dritten Stufe in einem Minilyse-Gerät der Firma Bertin Technologies lysiert. Die Zellen sind jetzt mechanisch aufgeschlossen und in Flüssigkeit suspendiert.

3.5.2. Lipidextraktion

(nach Bligh and Dyer 1959, Durchführung nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Die Lipidextraktion (LE) basiert auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Fetten und anderen zellulären Bestandteilen in den Lösungsmitteln Chloroform und Methanol. Die lange Hydrocarbonkette von Lipiden begründet ihre Hydrophobie, was zu einer guten Löslichkeit in Chloroform führt. Polare Zellbestandteile, wie Proteine, Zucker und DNS, lösen sich eher in der Methanolphase. In der Interphase zwischen der Methanol- und der Chloroform-Phase finden sich denaturierte Proteine, die polare und unpolare Aminosäuren und Zelltrümmer enthalten.

Die Proben wurden mithilfe der BCA-Methode auf $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ normiert. 1ml der Probe wurde in ein Glasröhrchen pipettiert und mit 3,75ml eines Chloroform-Methanol-HCl Ansatzes ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}(37\%)$; (1/2/0,06; v/v/v)) vermischt. Die Proben wurden 60 Minuten bei 2000U/min und RT auf einem Schüttler geschüttelt und anschließend mit jeweils 1,25ml Chloroform vermengt. Die Proben wurden nun abermals für eine Stunde geschüttelt und anschließend jeweils mit 1,25ml Chloroform sowie 1,25ml Wasser vermischt und für weitere 10 Minuten geschüttelt. Es folgte die Zentrifugation der Glasröhrchen bei 5000rpm und RT für 10 Minuten. Die Zentrifugation führt zu der Bildung von drei Phasen, entsprechend der oben beschriebenen Löslichkeit der verschiedenen Stoffe. Die Lipid-haltige, untere Phase wurde vorsichtig isoliert, in ein neues Glasröhrchen überführt und bei 30° in Stickstoff eingedampft. Die Probe wurde anschließend abermals in 1ml Wasser aufgenommen und die oben beschriebene Prozedur wurde wiederholt, um die Reinheit der Lipide zu erhöhen. Nach dem wiederholten Abdampfen in Stickstoff wurden die Lipide entsprechend ihres Gewichtes in Ethanol gelöst. Die Lösung erfolgte indem die Lipide in einem Wasserbad für 10 Minuten sonifiziert wurden.

Es wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von 735g/mol (basierend auf Zilkha und Mc, 1963) angenommen und die Lipide wurden auf eine Konzentration von 10mM normiert.

Für Experimente wurden stets Lipidextrakte, die parallel extrahiert wurden, verwendet.

3.5.3. Bestimmung des Lipid-assoziierten Phosphates

(Piper and Lovell, 1981)

Waschpuffer

H ₂ SO ₄	5M 18% (v/v)
HClO ₄	2% (v/v)
ddH ₂ O	80% (v/v)

Ammoniummolybdat-Lösung

Ammoniummolybdat	0,9% (w/v)
ddH ₂ O	91,1 (v/v)

L-Ascorbinsäure-Lösung

L-Ascorbinsäure	10% (w/v)
ddH ₂ O	90% (v/v)

Die Bestimmung des Lipid-assoziierten Phosphates erlaubt eine Aussage über die quantitative Veränderung aller Phospholipide. Zusammen mit der Untersuchung der Lipidextrakte durch die Massenspektrometrie kann so eine Aussage über die Beschaffenheit der einzelnen Lipidextrakte getroffen werden.

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Phosphaten wurden alle verwendeten Geräte und Behältnisse gründlich gereinigt und von Phosphat-haltigen Spülmitteln befreit.

Die zu untersuchenden Lipidextrakte wurden in verschiedenen Konzentrationen in ein Glasröhrchen überführt und die lipophile Phase der Extrakte wurde im Stickstoffstrom evaporiert. Anschließend wurden die verbleibenden Lipide in 100µl Waschpuffer resuspendiert. Um die Löslichkeit zu garantieren wurden die Suspensate für 10 Minuten sonifiziert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden die Proben bei 130° C für 90 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden sie mit 150µl ddH₂O vermennt und für 30 Minuten auf einem Schüttler bei 8000/U mobilisiert.

Schließlich wurden 80µl der Ammoniummolybdat-Lösung sowie 32µl der L-Ascorbinsäure-Lösung hinzupipettiert und die Proben wurden für 30 Minuten bei 45° C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 800nm in einen SAFIRE II-Fluorometer. Die Ergebnisse wurden anhand einer Konzentrationsreihe NaH₂PO₄ quantifiziert.

3.6. ESI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung der Lipidextrakte erfolgte in Kooperation mit Christoph Stahlmann. Die Vorbereitung der Proben, die Lipidextraktion und die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgten im Rahmen dieser Arbeit.

Die Analyse wurde in einem 4000 QTRAP-Massenspektrometer der Firma AB Sciex durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Hybrid aus Quadrupol und „linear ion trap“ (LIT) Massenspektrometer. Für die Auswertung der Daten wurde die Software Analyst 1.4.2 verwendet. Die Software wurde ebenfalls von AB Sciex bezogen.

3.6.1. Ionisationsquelle

(nach Dissertation S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde von John B. Fenn 1984 etabliert und bildet die Basis für die in dieser Arbeit verwendete Ionenquelle. Hierbei wird die zu untersuchende Analytlösung durch eine Kapillare geleitet. Durch das Anlegen einer Spannung zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode entsteht ein elektrisches Feld. Als Trägergas wird Stickstoff verwendet. Durch die Wirkung von Spannung und Hitze entsteht ein feines Aerosol an der Spitze der Kapillare. Die verdampfende Analytlösung verringert dabei ihre Oberfläche und die Oberflächenladungsdichte nimmt stetig zu.

Da gleich geladene Teilchen sich gegenseitig abstoßen werden die einzelnen Tropfen zunehmend instabil. Die Ladungsgrenze, die ein bestimmter Tropfen aufnehmen kann, wird als Rayleigh-Limit bezeichnet. Diese Grenze wird durch die Größe des Tropfens und seine Oberflächenspannung definiert. Sobald die Rayleigh-Grenze erreicht wird, zerfällt der Tropfen in kleinere Tropfen in einer Coloumb-Explosion. Dieser Prozess setzt sich solange fort, bis nur noch einzelne Ionen verbleiben, da die Oberflächenspannung der resultierenden Tropfen stets geringer ist als die des Vorgängers (Taflin et al. 1989). Verschiedene Modelle beschreiben diesen Vorgang. Das Modell des geladenen Rückstands geht davon aus, dass die Größe der einzelnen Tropfen solange reduziert wird bis nur noch ein einzelnes ionisiertes Teilchen übrig ist. Das Ionenemissionsmodell führt die Entstehung einzelner Ionen hingegen auf die Freisetzung dieser Ionen aus größeren, geladenen Tropfen zurück.

Die ESI gilt als „sanfte“ Ionisierungstechnik. Die auf die Analytlösung wirkende Ladung ist vergleichsweise gering und es kommt zur Entstehung einfach positiv oder einfach negativ geladener Teilchen.

Charakteristisch für die ESI-Methode ist das Entstehen von Addukt-Ionen, also Anlagerungsprodukten, die durch die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und Bestandteilen der Puffer-Lösung oder dem Trägergas entstehen.

3.6.2. Massenspektrometrie

Als Analysator wurde in der vorliegenden Arbeit ein Quadrupol verwendet. Grundlegend ist ein Quadrupol ein Massefilter, der Teilchen einer definierten Masse m und Ladung z stabilisiert. Ein einzelner Quadrupol besteht aus vier parallel liegenden Stabelektroden. Die Polarität der gegenüberliegenden Stabelektroden ist dabei stets identisch. Das Anlegen eines Gleich- und eines hochfrequenten Wechelspannung-Anteils erlaubt es die Ionen entsprechend ihrer Ladung und Masse zu selektieren, da nur bestimmte Bahnen innerhalb des Quadrupols stabil sind. Diese stabilen Bahnen werden durch die Mathiesche Differentialgleichung beschrieben. Die Bahn eines Teilchens mit dem gewünschten Masse/Ladung-Verhältnis ist sinus-förmig und erreicht den Detektor. Ionen hingegen, die sich auf instabilen Bahnen bewegen, werden zunehmend stärker ausgelenkt und verlassen den Bereich des elektromagnetischen Feldes.

Das 4000 QTRAP-Massenspektrometer besteht aus vier Quadrupolen. Die Quadrupole werden als Q0, Q1, Q2 und Q3 bezeichnet. Q0 schließt sich direkt an die Ionisationsquelle an und bündelt die Analyte. Q1 agiert – wie oben beschrieben – als Massenfilter. Durch das Anlegen einer bekannten Spannung werden nur bestimmte Ionen stabilisiert und erreichen Q2. In Q2 kollidieren die Ionen mit einem Inertgas, in diesem Fall Stickstoff. Die Interaktion mit dem Inertgas führt durch die Zufuhr von Energie zur Fragmentation der Ionen, wobei dieser Zerfall spezifische Fragmente bildet. Q3 ist ein weiterer Massenfilter, der auf ein spezifisches Masse/Ladung-Verhältnis eingestellt ist. Diesen letzten Quadrupol ist eine Ionenfalle angegliedert. In der Ionenfalle können die Analyte „gespeichert“ und manipuliert werden. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode an der eine Wechelspannung angelegt ist sowie zwei Endkappen. Die Ionenfalle erlaubt es durch die Wahl einer geeigneten Spannung bestimmte Ionen zu stabilisieren, anzureichern und gezielt zu entlassen, um sie zu detektieren.

3.6.3. Vorbereitung der Proben

(nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes)

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie in 3.2 beschrieben kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen analog zu 3.6.1 für die Lipidextraktion vorbereitet und mechanisch aufgeschlossen.

Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 5mg/ml normiert (vgl. 3.5.2).

Anschließend wurde eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer wie in 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden auf 10mM normiert und in Ethanol durch Sonifizierung gelöst.

Für die Analyse der Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Carnitine und Sphingomyelin wurde eine 1ml 96-Loch-Sammelplatte mit einer entsprechenden 96-Loch-Sterilfilterplatte mit einer Porengröße von 0,45µm verschlossen. Whatman-Papier mit einem Durchmesser von 5mm wurde in jede Vertiefung gelegt und 10µl der Probe dazu pipettiert. Zusätzlich wurden 10pmol eines internen Standards, der aus einer humanen Gehirnprobe gewonnen wurde (bereitgestellt von Dr. J. Mett), zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden anschließend unter 1,5baren Stickstoffstrom für 45min bei RT getrocknet. Phosphoisoithiocyanat wurde 1:20 (v/v) in Ethanol/Wasser/Pyridin (1/1/1; v/v/v) verdünnt und 20µl dieser Lösung zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden anschließend für 20min bei RT inkubiert und unter Stickstoffstrom von 1,5bar für 45min bei RT getrocknet. 4,93mM Ammoniumacetat wurde in Methanol gelöst und zusammen mit den Proben für 30min auf dem Schüttler bei 450rpm und RT inkubiert. Schließlich wurden die Proben bei 500g für 2min durch die Sterilfilterplatte in die 96-Loch-Sammelplatte zentrifugiert, mit 600µl Laufpuffer (161,5mM Ammoniumacetat in Wasser/Methanol, 3/297, v/v) versetzt und für 2min bei 450rpm und RT auf dem Schüttler durchmengt. Der Autosampler wurde in der Zwischenzeit auf 10°C vorgekühlt. Die 96-Loch-Sammelplatte wurde mit einer Silikonmatte versiegelt und zur Analyse der Proben in den Autosampler gebracht.

Für die Analyse der Ceramide wurde ebenfalls eine 1ml 96-Loch-Sammelplatte mit einer entsprechenden 96-Loch-Sterilfilterplatte verwendet. 10µl der Probe wurde mit 10pmol eines Cer d18:1/6:0 Standards versetzt und für 1H bei RT unter 1,5bar Stickstoffstrom getrocknet. Ein Chloroform/Methanol Gemisch wurde im Verhältnis 95:5 (v/v) angesetzt und 300µl zu den Proben gegeben. Analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen wurden die Proben nun für 30min bei RT und 450rpm auf einem Schüttler durchmengt und für 2min bei 500g durch die Filterplatte zentrifugiert. 600µl 5mM Ammoniumacetat in Methanol/Wasser (97:3; v/v) wurde in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wurde mit einer Silikonplatte verschlossen und für 2min bei RT und 450rpm auf einem Schüttler durchmischt. Der Autosampler wurde auf 10°C vorgekühlt und die Proben zur Analyse eingebracht.

Es wurden die folgenden Lipid-Standards zur Normierung der Ergebnisse verwendet.

Lyso-PC-Standard	19:0 Lyso PC	Avanti Polar Lipids	855776
PCaa-Standard	06:0 PC (DHPC)	Avanti Polar Lipids	850305
PCae-Standard	12:0 Diether PC	Avanti Polar Lipids	999994
SM-Standard	06:0 SM (d18:1/6:0)	Avanti Polar Lipids	860582
PE-Standard	08:0 PE	Avanti Polar Lipids	850699
Sulfatid-Standard	C12 Mono-Sulfo Galactosyl(β)	Avanti Polar Lipids	860573
Ceramid-Standard	Cer d18:1/6:0	Humane Gehirn-Probe (von Dr. J. Mett bereitgestellt)	

3.6.4. Scanmodi und Einstellungen

(nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes, und Dissertation C. Stahlmann 2018, Universität des Saarlandes)

Grundsätzlich können verschiedene Scanmodi für die Analyse der Lipidextrakte verwendet werden. Für diese Arbeit sind die Neutralverlust-Analyse, die PIS-Analyse (engl. „*Precursor Ion Scan*“) und die MRM-Analyse (engl. „*Multi reaction monitoring*“) von Bedeutung.

Phosphatidylethanolamine wurden mittels kontinuierlicher Neutralverlust-Analyse untersucht. Bei der Neutralverlust-Analyse agiert Q01 als Massenanalysator. In der Kollisionszelle Q02 werden alle Analyte stoßfragmentiert. Charakteristisch für die Lipidspezies der PE ist der Verlust eines 141m/z Fragments. Die Messparameter wurden daher so eingestellt, dass Q03 alle PE-Analyte detektiert, die dieses spezifische Fragment verloren haben. Dieses Analyse-Verfahren wird als kontinuierlich bezeichnet, da die beiden Massenanalysatoren Q01 und Q03 parallel messen. Die Geräteeinstellung des 4000QTRAP zur Messung der PE wurde wie in der Dissertation von Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes beschrieben verwendet, und sind im folgenden wiedergegeben:

Massenbereich in m/z 600-900, Collision Energy (CE) 30, Curtain Gas (CUR) 10, Cell Exit Potential (CXP) 10, Collision Gas (CAD) Medium, Auflösung Q1 Unit, IonSpray Voltage (IS) 4500, Auflösung Q3 Unit, Temperatur (TEM) 200, Step size 0,1Da, Ion Source Gas 1 (GS1) 40, Injektionsvolumen 20 μ l, Ion Source Gas 2 (GS2) 50, Draw Speed 200 μ l/min, Declustering Potential (Goodpaster et al.) 60, Eject Speed 200 μ l/min, Entrance Potential (EP) 10, Reinigung der Nadel; Flush Port 10sek.

Die Lipidspezies der Phosphatidylcholine, Carnitine und Sphingomyeline wurde durch die MRM-Analyse untersucht.

Die MRM-Analyse verwendet die drei Quadrupole Q01, Q02 und Q03. Dabei wird werden die zu untersuchenden Analyte in Q01 gefiltert und anschließend in Q02 durch Interaktion mit dem Inertgas Stickstoff stoßfragmentiert. Die so entstehenden Fragmentationen können in Q03 für die Detektion spezifisch selektiert werden. Nur Analyte, die sowohl ein spezifisches Vorläuferion in Q01 und ein spezifisches Fragmentation in Q03 zeigen, werden detektiert. Die Geräteeinstellungen für die Analyse der Phosphatidylcholine, Carnitine und Sphingomyelin ist im Folgenden angegeben: Curtain Gas (CUR) 20, Cell Exit Potential (CXP) 15, Collision Gas (CAD) Medium, Auflösung Q1 Unit, IonSpray Voltage (IS) 5500, Auflösung Q3 Unit, Temperatur (TEM) 200, Injektionsvolumen 20µl, Ion Source Gas 1 (GS1) 40, Draw Speed 200µl/min, Ion Source Gas 2 (GS2) 50, Eject Speed 200µl/min, Entrance Potential (EP) 10, Reinigung der Nadel; Flush Port 10sek.

Die Analyse der Lipidspezies der Ceramide basiert auf der Methode von (Gu M. et al. 1997) und wurde in dieser Arbeit wie in der Dissertation C. Stahlmann 2018, Universität des Saarlandes, verwendet. Die Ceramide wurden mittels MRM-Analyse detektiert. Dabei wurde der Sphingosinanteil durch Stoßfragmentation in Q02 abgespalten und das resultierende Fragment der Masse/Ladung von 264,3 detektiert.

3.6.5. Molekülspezifische Parameter für die massenspektrometrische Analyse

(nach Dissertation Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes, und Dissertation C. Stahlmann 2018, Universität des Saarlandes)

Im Folgenden sind die molekülspezifischen Einstellungen der MRM-Analyse für die einzelnen Lipidspezies dargestellt. Dabei werden die folgenden Abkürzungen verwendet: Da: Dalton; DP: Declustering Potential; CE: Collision Energy.

Diacyl-Phosphatidylcholine werden als PCaa, Phosphatidylcholin-Plasmalogene als PCae, diacyl-Phosphatidylethanolamine als PEaa, Phosphatidylethanolamin-Plasmalogene als PEaa, Sulfatide als Su, Sphingomyelin als SM und Ceramide als Cer abgekürzt.

Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der diacyl-Phosphatidylcholine

Metabolit	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Zeit [ms]	DP [V]	CE [eV]
PCaa C24:0	622,4	184	10	98	33
PCaa C26:0	650,5	184	10	103	35
PCaa C28:1	676,5	184	10	106	35
PCaa C30:0	706,5	184	10	106	37
PCaa C30:2	702,5	184	10	111	37
PCaa C32:1	732,6	184	10	118	39
PCaa C32:2	730,5	184	10	117	38
PCaa C32:3	728,5	184	10	117	38
PCaa C34:1	760,6	184	10	125	41
PCaa C34:2	758,6	184	10	123	40
PCaa C34:3	756,6	184	10	123	40
PCaa C34:4	754,5	184	10	122	40
PCaa C36:0	790,6	184	10	131	43
PCaa C36:1	788,6	184	10	131	43
PCaa C36:2	786,6	184	10	130	43
PCaa C36:3	784,6	184	10	130	42
PCaa C36:4	782,6	184	10	129	42
PCaa C36:5	780,6	184	10	129	42
PCaa C36:6	778,5	184	10	128	42
PCaa C38:0	818,7	184	10	138	42
PCaa C38:1	816,7	184	10	138	45
PCaa C38:3	812,6	184	10	136	44
PCaa C38:4	810,6	184	10	136	44
PCaa C38:5	808,4	184	10	136	44
PCaa C38:6	806,6	184	10	135	44
PCaa C40:1	844,7	184	10	145	47
PCaa C40:2	842,7	184	10	144	47
PCaa C40:3	840,7	184	10	144	47
PCaa C40:4	838,6	184	10	144	47
PCaa C40:5	836,6	184	10	143	47
PCaa C40:6	834,6	184	10	143	46
PCaa C42:0	874,7	184	10	154	50

PCaa C42:1	872,7	184	10	153	50
PCaa C42:2	870,7	184	10	153	50
PCaa C42:4	866,7	184	10	152	50
PCaa C42:5	864,7	184	10	151	49
PCaa C42:6	826,7	184	10	150	49
PCaa C44:0	902,7	184	10	163	50
PCaa C48:0	958,8	184	10	170	50

Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylcholin-Plasmalogene

Metabolit	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Zeit [ms]	DP [V]	CE [eV]
PCae C30:0	692,6	184	10	111	37
PCae C30:1	690,5	184	10	109	36
PCae C30:2	688,5	184	10	108	36
PCae C32:1	718,6	184	10	115	38
PCae C32:2	716,6	184	10	114	37
PCae C34:0	748,6	184	10	120	40
PCae C34:1	746,6	184	10	121	39
PCae C34:2	744,6	184	10	120	39
PCae C34:3	742,6	184	10	120	39
PCae C36:0	776,7	184	10	128	42
PCae C36:1	774,6	184	10	127	41
PCae C36:2	772,6	184	10	127	41
PCae C36:3	770,6	184	10	126	41
PCae C36:4	768,6	184	10	126	41
PCae C36:5	766,6	184	10	125	41
PCae C38:0	804,7	184	10	135	44
PCae C38:1	802,7	184	10	133	44
PCae C38:2	800,7	184	10	133	43
PCae C38:3	798,6	184	10	133	43
PCae C38:4	796,6	184	10	133	43
PCae C38:5	794,6	184	10	132	42
PCae C38:6	792,6	184	10	132	43
PCae C40:0	832,7	184	10	142	46

PCae C40:1	830,7	184	10	141	46
PCae C40:2	828,7	184	10	141	46
PCae C40:3	826,7	184	10	141	46
PCae C40:4	824,7	184	10	140	45
PCae C40:5	822,6	184	10	139	45
PCae C40:6	820,6	184	10	139	45
PCae C42:0	836,6	184	10	150	49
PCae C42:1	858,7	184	10	141	46
PCae C42:2	856,7	184	10	149	48
PCae C42:3	854,7	184	10	148	48
PCae C42:4	852,7	184	10	148	48
PCae C42:5	850,7	184	10	147	48
PCae C44:3	882,7	184	10	156	51
PCae C44:4	880,7	184	10	150	51
PCae C44:5	878,7	184	10	153	51
PCae C44:6	876,7	184	10	154	51

Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Ceramide

Metabolit	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Zeit [ms]	DP [V]	CE [eV]
Cer d18:1/6:0 (Std.)	395,6	264,3	10	44	27
Cer d18:1/14:0	510,4	264,3	100	55	33
Cer d18:1/16:0	538,5	264,3	100	55	33
Cer d18:1/18:2	564,6	264,3	100	55	26
Cer d18:1/18:1	564,6	264,3	100	55	37
Cer d18:1/20:5	584,5	264,3	100	58	34
Cer d18:1/20:4	586,5	264,3	100	58	36
Cer d18:1/20:1	592,6	264,3	100	51	40
Cer d18:1/20:0	594,6	264,3	100	51	36
Cer d18:1/22:6	610,5	264,3	100	56	40
Cer d18:1/22:5	612,6	264,3	100	58	36
Cer d18:1/22:4	614,6	264,3	100	58	36
Cer d18:1/22:3	616,6	264,3	100	61	39

Cer d18:1/22:2	618,6	264,3	100	61	40
Cer d18:1/22:1	620,6	264,3	100	54	39
Cer d18:1/22:0	622,6	264,3	100	50	37
Cer 18:1/23:0	636,6	264,3	100	65	42
Cer d18:1/24:3	644,6	264,3	100	65	42
Cer d18:1/24:2	646,6	264,3	100	63	42
Cer d18:1/24:1	648,7	264,3	100	59	39
Cer d18:1/24:0	650,7	264,3	100	59	40
Cer d18:1/25:1	662,7	264,3	100	64	39
Cer d18:1/25:0	664,7	264,3	100	65	44
Cer d18:1/26:1	676,7	264,3	100	64	42
Cer d18:1/26:0	678,7	264,3	100	64	42

Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Sulfatide

Metabolit	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Zeit [ms]	DP [V]
Su d18:1/12:0 (Std.)	722,5	96,9	10	-200
Su d18:1/18:0	806,6	96,9	100	-200
Su d18:1/18:0 hydrox	822,6	96,9	100	-200
Su d18:1/20:0	834,7	96,9	100	-200
Su d18:1/20:0 hydrox	850,7	96,9	100	-200
Su d18:1/22:0	862,8	96,9	100	-190
Su d18:1/24:1	888,8	96,9	100	-215
Su d18:1/24:0	890,8	96,9	100	-220
Su d18:1/24:1 hydrox	904,8	96,9	100	-200
Su d18:1/24:0 hydrox	610,5	264,3	100	56

Molekülspezifischen Einstellungen für die massenspektrometrische Analyse der Sphingomyeline

Metabolit	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Zeit [ms]	DP [V]	CE [eV]
SM (18:1/14:1 OH)	689,6	184	10	108	36
SM (18:1/16:0)	703,6	184	10	112	37
SM (18:1/16:1)	701,6	184	10	111	37
SM (18:1/16:1 OH)	717,6	184	10	114	38

SM (18:1/18:1)	729,6	184	10	117	38
SM (18:1/20:2)	755,6	184	10	123	40
SM (18:1/22:1 OH)	801,7	184	10	134	43
SM (18:1/22:2 OH)	799,7	184	10	133	43
SM (18:1/22:3)	781,6	184	10	129	42
SM (18:1/24:0)	815,7	184	10	137	45
SM (18:1/24:1)	813,7	184	10	137	45
SM (18:1/24:1 OH)	829,7	184	10	141	48
SM (18:1/26:0)	843,7	184	10	144	47

Die Geräteeinstellungen für die MRM-Analyse der Sphingomyeline, Sulfatide und Ceramide wurde wie in der Dissertation von Dr. S. Grösgen 2013, Universität des Saarlandes, verwendet.

3.6.6. Statistische Auswertung

Die Daten wurden durch die SPSS Statistics 22-Software oder durch Microsoft Excel ausgewertet.

p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Um zu überprüfen ob die Grundgesamtheit der Stichprobe einer Normalverteilung entspricht, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet.

Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit das beobachtete Ergebnis oder ein extremeres zu erhalten, wenn die Nullhypothese, dass zwischen den Gruppen kein Unterschied besteht, zutrifft. Das Signifikanzniveau zwischen den Mittelwerten zweier unabhängigen Stichproben wurde durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-test errechnet. Für die Bestimmung des Signifikanzniveaus zwischen mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde wie folgt vorgegangen: Die Varianzhomogenität wurde durch den Levene-Test ermittelt. Zeigten die Stichproben eine Varianzhomogenität im Levene-Test wurde der Scheffé-Test verwendet. Waren die Stichproben im Levene-Test hingegen inhomogen wurde der *Least significant difference*-Bonferroni-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mittels ANOVA-Analyse (engl. „*analysis of variance*“) errechnet.

4. Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von AICD auf das Lipidprofil und die Lipidspezies der Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Plasmalogene und Ceramide. Im zweiten Teil der Ergebnisse wird die Regulation der β - und γ -Sekretase durch die Lipid-Extrakte untersucht.

4.1. Einfluss von AICD auf die Lipidkomposition

In dieser Arbeit soll der Einfluss von AICD auf das zelluläre Lipidprofil untersucht werden. Bereits bekannt ist, dass AICD die Alkyl-Dihydroxyacetonephosphate-Synthase (AGPS) reguliert und so zu erhöhten Plasmalogen-Spiegeln führt (Grimm M. O. et al. 2011d). Außerdem reguliert AICD die Spingolipid de novo Synthese über einen Einfluss auf die Genexpression der SPTLC2-Untereinheit der Serin-Palmitoyl-CoA Transferase (SPT) (Grimm M. O. et al. 2011b) und die Lipidspezies der Sphingomyeline über einen Einfluss auf die Spingomyelinase (Grimm M. O. et al. 2005). Erst kürzlich wurde eine Interaktion von AICD und den Fettsäure-Desaturasen FADS beschrieben (Dissertation C. Stahlmann 2018, Universität des Saarlandes).

Der Einfluss von AICD auf das Verhältnis von mehrfach-ungesättigten zu einfach-ungesättigten und gesättigten Fettsäuren ist unbekannt und wird in dieser Arbeit untersucht. Weiterhin werden die Ceramide und die Sphingomyeline untersucht um den bereits bekannten Einfluss von AICD auf die SPT zu bestätigen.

Wildtyp Maus-Fibroblasten exprimieren volllängen APP auf Wildtyp-Niveau. Die letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus wurden in Wildtyp Maus-Fibroblasten deletiert. Die Konsensussequenz YENPTY befindet sich im deletierten Bereich, sodass die funktionelle AICD-Domäne in diesem Zellmodell ausgeschaltet ist (Borg Jean-Paul et al. 1996a). Beide Zelllinien wurden im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Ring et al., 2007). Die Wildtyp Maus-Fibroblasten werden als MEF AWT bezeichnet. Die transgenen, AICD-defizienten Zellen werden als MEF APP Δ CT15 bezeichnet. Es wurde von beiden Zelllinien Lipidextrakte generiert, massenspektrometrisch analysiert und miteinander verglichen.

Zwei weitere Zellmodelle wurden aus den gerade beschriebenen MEF APP Δ CT15-Zellen generiert. Die Zellen wurden zum einem mit einem Leervektor transfiziert. Diese Zellen tragen weiterhin kein funktionales AICD und werden als MEF $\Delta\Delta$ mock bezeichnet. Zum anderen wurde durch das Einbringen eines Vektors in MEF APP Δ CT15-Zellen ein AICD-exprimierendes Zellmodell generiert. Diese Zellen überexprimieren die letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von APP. Dieses Zellmodell

wird als MEF $\Delta\Delta$ C50 bezeichnet und überexprimiert funktionales AICD. Aus diesen beiden Zellmodellen wurden ebenfalls Lipidextrakte gewonnen, massenspektrometrisch analysiert und miteinander verglichen.

Ein Überblick über die verwendeten Zelllinien ist in 3.1.2 gegeben. Es wurden zum einen MEF AWT mit MEF APP Δ CT15-Zellen und zum anderen MEF $\Delta\Delta$ C50 mit MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen verglichen.

Die Lipidextrakte wurden aus Zellen, die wie in 3.5 beschrieben kultiviert wurden, gewonnen. Die Lipidextrakte wurden in einer Konzentration von 10 μ M auf den Zellen inkubiert.

4.1.1. LDH-Assay der Lipidextrakte

Um eine mögliche Zytotoxizität der Lipidextrakte auszuschließen wurde ein LDH-Assay mit jedem verwendeten Lipidextrakt durchgeführt. Die Lipidextrakte wurden mit 10 μ M auf den Zellen inkubiert. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden SH-SY5Y APP-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden mit den zu untersuchenden Lipidextrakten unter Standardbedingungen zwei Mal für 12 Stunden inkubiert.

Die Ergebnisse des LDH-Assays (siehe 3.2.6) sind im Folgenden dargestellt.

Die Benennung der Lipidextrakte setzt sich aus den Zellen, aus denen sie gewonnen wurden, sowie einer organisatorischen Nummer zusammen.

Bestimmung der Zytotoxizität der Lipidextrakte durch LDH-Assay

Lipidextrakt	Toxizität (Anteil der verstorbenen Zellen in Prozent)
AWT	2,8 \pm 0,11%
APP Δ CT15	2,8 \pm 0,08%
$\Delta\Delta$ C50	2,7 \pm 0,09%
$\Delta\Delta$ mock	3,0 \pm 0,31%

Die Lipidextrakte zeigen eine Toxizität, die zwischen 2,7% und 3,0% schwankt. Statistisch zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Lipidextrakten, bzw. Gruppen.

4.1.2. Analyse der Lipidspezies

Die Lipide wurden anhand ihrer errechneten Kettenlänge und Sättigung innerhalb der entsprechenden Lipidspezies untersucht.

Es wurden die folgenden Lipidspezies analysiert: Diacyl-Phosphatidylcholine (PC aa), Phosphatidylcholin Plasmalogene (PC ae), Diacyl-Phosphatidylethanolamine (PE aa),

Phosphatidylethanolamin Plasmalogene (PE ae), Lysierte Phosphatidylcholine, Ceramide und Sphingomyeline.

Die Auswertung der Massenspektrometrie erfolgte, indem die Lipid-Spezies in Abhängigkeit zu ihrem Sättigungsgrad gruppiert wurden. Es wurden gesättigte, einfach- und mehrfach- ungesättigte Fettsäuren sowie die Anzahl der Doppelbindungen unterschieden.

Weiterhin wurden die Lipidextrakte durch die Bildung der folgenden Quotienten charakterisiert:

- PUFA /SFA (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren / gesättigte Fettsäuren)
- PUFA / MUFA (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren / einfach ungesättigte Fettsäuren)

4.1.3. Massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylcholine

Diacyl-Phosphatidylcholin ist eine der häufigsten Phospholipide im menschlichen Gehirn und macht 29% des Trockengewichts der Lipide in Neuronen aus (Calderon et al. 1995, O'Brien and Sampson 1965). PCs setzen sich aus Fettsäuren, Glycerin, Phosphorsäure und Cholin zusammen.

Eine Untergruppe der Phosphatidylcholine sind die Phosphatidylcholin-Plasmalogene. Plasmalogene sind Etherlipide, deren endständiges Kohlenstoffatom des Glycerins mit einem Enolether verbunden ist. Phosphatidylcholine werden hier als PC aa bezeichnet, während Phosphatidylcholin-Plasmalogene als PC ae bezeichnet werden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die jeweiligen Lipide der Phosphatidylcholine, die entweder zu den gesättigten (SFA), den einfach-ungesättigten (MUFA) und den mehrfach ungesättigten (PUFA) Fettsäuren zählen.

Übersicht über die Diacyl-Phosphatidylcholine

SFA	MUFA	PUFA
PC aa C24:0	PC aa C28:1	PC aa C30:2
PC aa C26:0	PC aa C32:1	PC aa C32:2
PC aa C28:0	PC aa C34:1	PC aa C32:3
PC aa C30:0	PC aa C36:1	PC aa C34:2
PC aa C32:0	PC aa C38:1	PC aa C34:3
PC aa C36:0	PC aa C40:1	PC aa C34:4
PC aa C38:0	PC aa C42:1	PC aa C36:2
PC aa C40:0		PC aa C36:3
PC aa C42:0		PC aa C36:4
PC aa C44:0		PC aa C36:5
PC aa C48:0		PC aa C36:6
		PC aa C38:3

PC aa C38:4
 PC aa C38:5
 PC aa C38:6
 PC aa C40:2
 PC aa C40:3
 PC aa C40:4
 PC aa C40:5
 PC aa C40:6
 PC aa C42:2
 PC aa C42:4
 PC aa C42:5
 PC aa C42:6

Die massenspektrometrisch untersuchten Lipidspezies wurden in die Gruppen MUFA, PUFA und SFA eingeteilt. Anschließend wurde der Quotient aus PUFA/SFA und PUFA/MUFA gebildet.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten

PC aa

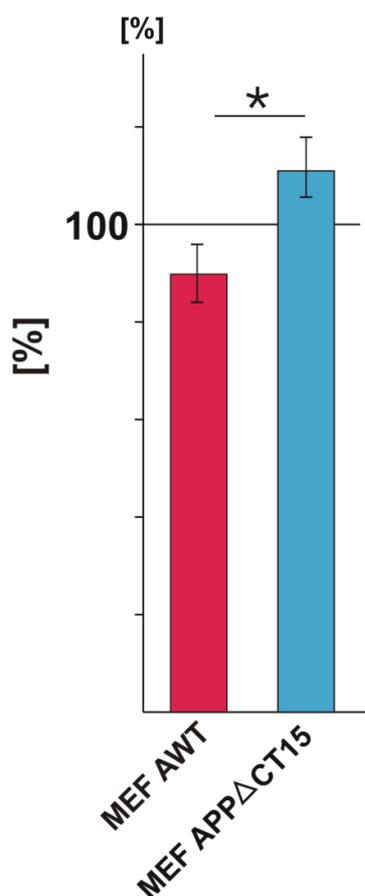


Abbildung 5: Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC aa-Spezies der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APPΔCT15,

Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten des Lipidextraktes MEF AWT beträgt 92% ($\pm 12,36\%$), für MEF APPΔCT15 107% ($\pm 12,41\%$). Die Differenz zwischen MEF AWT und MEF APPΔCT15 ist signifikant und beträgt 15% bei einem $p \leq 0,05$. Die Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen T-Test errechnet. Es wurde der Quotient zwischen der Summe aller PC PUFAs und PC SFAs gebildet. Es wurden 7 Lipidextrakte untersucht ($n = 7$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Es kann eine signifikante Erhöhung des PUFA/SFA-Quotienten der Lipidextrakte der MEF APPΔCT15-Zellen im Vergleich zu den MEF AWT-Zellen beobachtet werden.

Der PUFA/MUFA-Quotient der PCaa war hingegen nicht signifikant verändert.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten PC aa

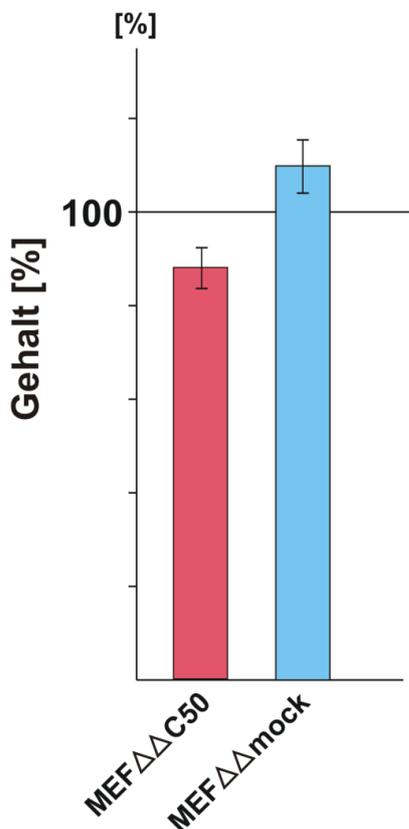


Abbildung 6: Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PC aa der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock.

Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock zeigten keine signifikante Veränderung ($p = 0,09$). Es wurden 3 Lipidextrakte untersucht ($n = 3$). Die Signifikanz wurde mittels zwei-seitigem T-Tests errechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der PUFA/SFA-Quotient der Lipidextrakte MEF ΔΔ mock war im Vergleich zu MEF ΔΔ nicht signifikant verändert. Der PUFA/MUFA-Quotient war ebenfalls nicht signifikant verändert.

Es wurden ebenfalls die PCae massenspektrometrisch untersucht und nach ihren Quotienten charakterisiert. Die Lipidspezies der jeweiligen Gruppen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Phosphatidylcholin-Plasmalogene

SFA	MUFA	PUFA
PC ae C34:0	PC ae C30:1	PC ae C30:2
PC ae C36:0	PC ae C32:1	PC ae C32:2
PC ae C38:0	PC ae C34:1	PC ae C34:2
PC ae C40:0	PC ae C36:1	PC ae C34:3
PC ae C42:0	PC ae C38:1	PC ae C36:2
	PC ae C42:1	PC ae C36:3
		PC ae C36:4
		PC ae C36:5
		PC ae C38:2
		PC ae C38:3

PC ae C38:4
 PC ae C38:5
 PC ae C40:2
 PC ae C40:4
 PC ae C40:5
 PC ae C40:6
 PC ae C42:2
 PC ae C42:3
 PC ae C42:4
 PC ae C42:5
 PC ae C44:3
 PC ae C44:4
 PC ae C44:5 / PC ae C44:12
 PC ae C44:6

Die Auswertung der PC ae der Lipidextrakte von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen zeigte keine signifikante Veränderung der Verhältnisse der PUFAs zu MUFAs oder SFA. (MEF AWT: 101% \pm 9,23%, MEF APP Δ CT15 98% \pm 9,38%, n = 7, p = 0,97).

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten

PC ae

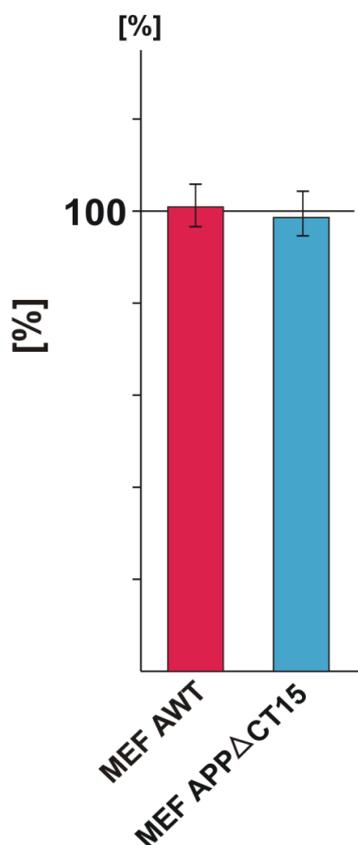


Abbildung 7: Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC ae-Spezies der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15

Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten des Lipidextraktes MEF AWT beträgt 101% (\pm 9,23%) während der PUFA/SFA Quotientz der aus MEF APP Δ CT15 gewonnen Lipidextrakte 98% (\pm 9,38%) beträgt. Es wurden 7 Lipidextrakte untersucht. (n = 7, p= 0,97). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Auswertung der PC ae der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock zeigt eine signifikante Erhöhung des

PUFA/SFA Quotienten der AICD-defizienten Zellen von 33% bei einem $p < 0,01$ ($n = 3$). Weiterhin ist der PUFA/MUFA-Quotient signifikant um 26% bei einem $p < 0,05$ erhöht ($n = 3$).

Das Verhältnis der PUFAs zu MUFAs bzw. SFA hat also in der Zelllinie MEF $\Delta\Delta$ mock im Vergleich zu MEF $\Delta\Delta$ C50 deutlich zugenommen. Die MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen konnten diesen Effekt nicht reproduzieren. Diese Diskrepanz kann in der unterschiedlichen Expressionsstärke von AICD begründet sein.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten PC ae

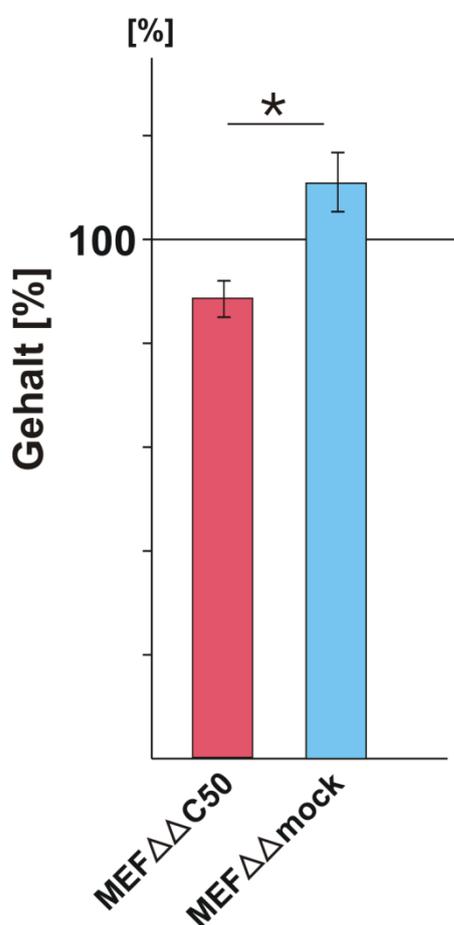


Abbildung 8: Mittelwerte des PUFA/SFA Quotienten als Balkendiagramm für die PC ae-Spezies der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.

Die Lipidextrakte der Zellen MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock wurden massenspektrometrisch analysiert. Der PUFA/SFA-Quotienten der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ mock war auf 113% ($\pm 9,1\%$) im Vergleich zu 87% ($\pm 7,16\%$) der MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen erhöht, wobei $p < 0,05$ ($n = 3$).

Die Signifikanz wurde durch einen zwei-seitigen T-Test errechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Insgesamt zeigt die Auswertung der PCaa und PCae eine Erhöhung der PUFAs im Verhältnis zu den SFA bei AICD-defizienten Zellen. Diese Verschiebung ist signifikant bei den Lipidextrakten der PC ae der MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen, sowie bei den PC aa der MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen.

4.1.4. Massenspektrometrische Analyse der Phosphatidylethanolamine

Phosphatidylethanolamine unterscheiden sich von Phosphatidylcholinen aufgrund ihrer Kopfgruppe. PEs setzen sich aus zwei Fettsäuren, Glycerin, einem Monoalkylphosphat und einer Aminogruppe zusammen. Sie sind elementarer Bestandteil von Zellmembranen. PEs werden – wie PCs auch – im Kennedy-Stoffwechselweg synthetisiert (Gibellini and Smith 2010).

PEs reichern sich vermehrt an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an (Emoto and Umeda 2000).

Das zentrale Nervensystem ist besonders reich an PEs. Sie machen hier 45% der Phospholipide aus (Vance and Tasseva 2013).

Die Auswertung der PEaa erfolgte anhand ihres Sättigungsgrades. Die einzelnen Lipidspezies sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Diacyl-Phosphatidylethanolamine

SFA	MUFA	PUFA
PE aa 32:0	PE aa 32:1	PE aa 32:2
PE aa 34:0	PE aa 34:1	PE aa 34:2
PE aa 36:0	PE aa 36:1	PE aa 34:3
PE aa 38:0	PE aa 38:1	PE aa 34:4
PE aa 40:0	PE aa 40:1	PE aa 36:2
PE aa 42:0	PE aa 42:1	PE aa 36:3
		PE aa 36:4
		PE aa 36:5
		PE aa 36:6
		PE aa 38:2
		PE aa 38:3
		PE aa 38:4
		PE aa 38:5
		PE aa 38:6
		PE aa 40:2
		PE aa 40:3
		PE aa 40:4
		PE aa 40:5
		PE aa 40:6
		PE aa 42:2
		PE aa 42:4
		PE aa 42:5
		PE aa 42:6
		PE ae 42:0/PE aa 42:7

Der PUFA/SFA-Quotient der AICD-defizienten Lipidextrakte MEF APP Δ CT15 ist signifikant um 28% im Vergleich zu den AWT Lipidextrakten erhöht. Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten der MEF APP Δ CT15-Lipidextrakte beträgt 85%, während der Mittelwert der MEF AWT-Lipidextrakte 114% misst.

Der PUFA/MUFA-Quotient ist ebenfalls signifikant um 24% erhöht, bei einem $p < 0,001$. Die Mittelwerte des PUFA/MUFA-Quotienten betragen 112% und 87% für die Lipidextrakte MEF APP Δ CT15 und MEF AWT respektiv. Es wurden 7 Lipidextrakte untersucht ($n = 7$). Die Signifikanz wurde durch einen zwei-seitigen T-Test ermittelt.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten

PE aa

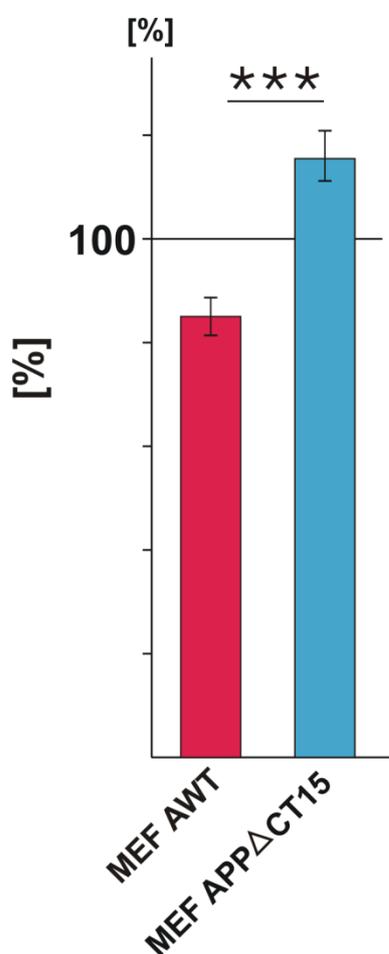


Abbildung 9 Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE aa der Lipidextrakte MEF AWT, MEF APP Δ CT15

Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten des Lipidextraktes MEF AWT beträgt 85% ($\pm 3,20\%$) im Vergleich zu MEF APP Δ CT15 mit 114% ($\pm 3,18$). Die Differenz zwischen den Lipidextrakten MEF AWT und MEF APP Δ CT15 ist hochsignifikant und beträgt 28% bei einem $p < 0,001$ ($n = 7$). Die Signifikanz wurde durch einen zwei-seitigen T-Test errechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Analyse der PE aa der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock zeigt analog zu den oben beschriebenen Lipidextrakten ebenfalls eine signifikante Erhöhung des PUFA/SFA- und des PUFA/MUFA-Quotienten in den AICD-defizienten Zellen.

Der PUFA/SFA-Quotient ist signifikant um 11% ($p < 0,01$), und der PUFA/MUFA-Quotient ist signifikant um 15% erhöht ($p < 0,01$). Die Effekte der beiden Zellreihen sind vergleichbar, wobei die Effektstärke im Vergleich von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 um 13% stärker ausgeprägt ist. Unterschiedliche Effektstärken der einzelnen Zelllinien können durch die klonale Heterogenität bedingt sein. Zudem kann die Überexpression von AICD durch einen Vektor den Transport und die Sortierung von AICD stören.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten PE aa

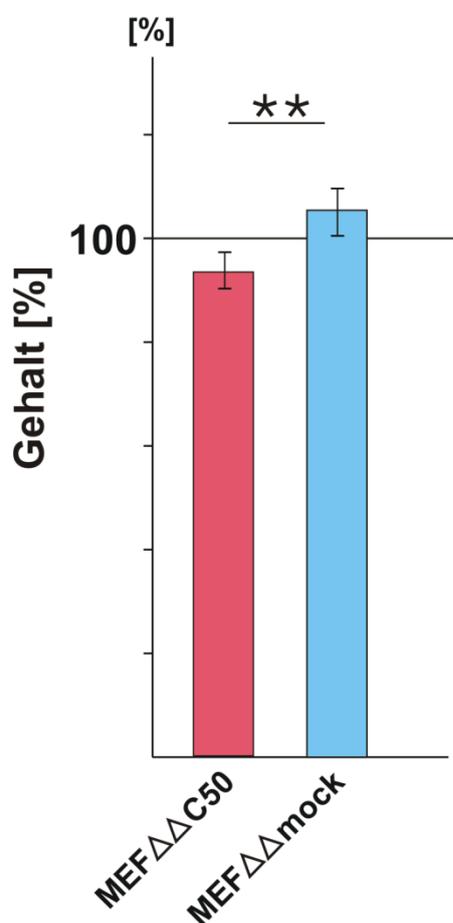


Abbildung 10: Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE aa der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock.

Die Lipidextrakte der MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen wurden massenspektrometrisch untersucht. Basierend auf dem Sättigungsgrad der Lipide wurde der PUFA/SFA-Quotient gebildet. Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten des Lipidextraktes MEF $\Delta\Delta$ C50 beträgt 94% ($\pm 1,97\%$), während MEF $\Delta\Delta$ mock auf 105% ($\pm 3,09\%$) erhöht ist. Die Effektstärke beträgt 11% und ist signifikant ($p < 0,01$, $n = 3$). Die Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen T-Test errechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Lipidspezies der PEaa zeigt insgesamt deutliche Effekte: Sowohl der PUFA/SFA- als auch der PUFA/MUFA-Quotient beider Zelllinien-Paare ist in den AICD-defizienten Zelllinien signifikant erhöht. Dieser Effekt kann durch die inhibitorische Wirkung von AICD auf die FADS erklärt werden. In AICD-defizienten Zelllinien fällt diese Hemmung der FADS weg und es werden verstärkt Fettsäuren desaturiert und das Verhältnis verschiebt sich zu den PUFAs. Der beobachtete Effekt steht im Einklang mit dem Modell, dass AICD die Fettsäurenverteilung der PEaa über eine Wirkung auf die FADS reguliert.

Abschließend wurde die Lipidspezies der PE_{ae} untersucht. Die Zuordnung der einzelnen Lipide zu den entsprechenden Gruppen kann aus der folgenden Tabelle entnommen werden.

Phosphatidlethanolamin-Plasmalogene

SFA	MUFA	PUFA
PE ae 34:0	PE ae 32:1	PE ae 32:2
PE ae 36:0	PE ae 34:1	PE ae 34:2
PE ae 38:0	PE ae 36:1	PE ae 34:3
PE aa 38:0	PE ae 38:1	PE ae 36:2
PE aa 40:0	PE ae 40:1	PE ae 36:3
PE aa 42:0	PE ae 42:1	PE ae 36:4
		PE ae 36:5
		PE ae 38:2
		PE ae 38:3
		PE ae 38:4
		PE ae 38:5
		PE ae 38:6
		PE ae 40:2
		PE ae 40:3
		PE ae 40:4
		PE ae 40:5
		PE ae 40:6
		PE ae 42:2
		PE ae 42:3
		PE ae 42:4
		PE ae 42:5
		PE ae 44:2
		PE ae 44:3
		PE ae 44:4
		PE ae 44:5

Die Auswertung der PE_{ae} der AWT- und APPΔCT15-Extrakte erfolgte analog zu den PC_{ae}. Der PUFA/SFA Quotient nimmt bei den Lipidextrakten der MEF APPΔCT15-Zellen um 12% ab (MEF AWT: 106% ±7,74%, MEF APPΔCT15: 94% ±7,67%). Der PUFA/MUFA Quotient ist hingegen in allen Lipidextraktionen von MEF APPΔCT15-Zellen signifikant erhöht. Die Signifikanz wurde durch einen zwei-seitigen T-Test errechnet.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten PE ae

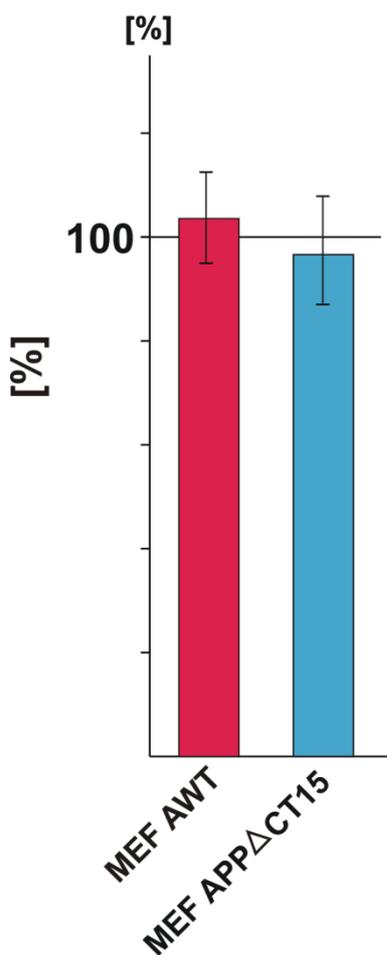


Abbildung 11: Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE ae der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APPΔCT15

Die Lipidspezies der PEae der Zelllinien MEF AWT und MEF APPΔCT15 wurde massenspektrometrisch analysiert. Der Mittelwert des PUFA/SFA-Quotienten des Lipidextraktes MEF AWT beträgt 106% ($\pm 7,74\%$) im Vergleich zu 94% ($\pm 7,67\%$) für MEF APPΔCT15. Es wurden 7 Lipidextrakte untersucht ($n = 7$, $p = 0,88$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Es zeigt sich ein heterogenes Bild bei der Auswertung der PE ae der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock. Keiner der Quotienten verändert sich signifikant.

Der Mittelwert des PUFA/SFA Quotienten der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 beträgt 102% und 97% für ΔΔ mock (MEF ΔΔ C50: 102% $\pm 22,22\%$, MEF ΔΔ mock: 97% $\pm 27,16\%$, $p = 0,87$, $n = 3$). Der MUFA/SFA Quotient der MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock-Lipidextrakte ist ebenfalls nicht signifikant beeinflusst.

Zusammenfassend ist die Lipidspezies der PEae in Bezug auf die Verteilung der Sättigungsgrade der einzelnen Fettsäure nicht maßgeblich verändert. Beide Zelllinienpaare verhalten sich ähnlich. In einem AICD-defizienten Zellmodell sind die PEaa im Vergleich zu einem AICD-(über)exprimierenden Zellmodell signifikant verändert. Dieser Effekt lässt sich bei den PEae nicht beobachten und deutet darauf hin, dass AICD spezifische Desaturasen, die Diacyl-Fettsäuren bevorzugen, reguliert.

Mittelwerte der PUFA/SFA Quotienten PE ae

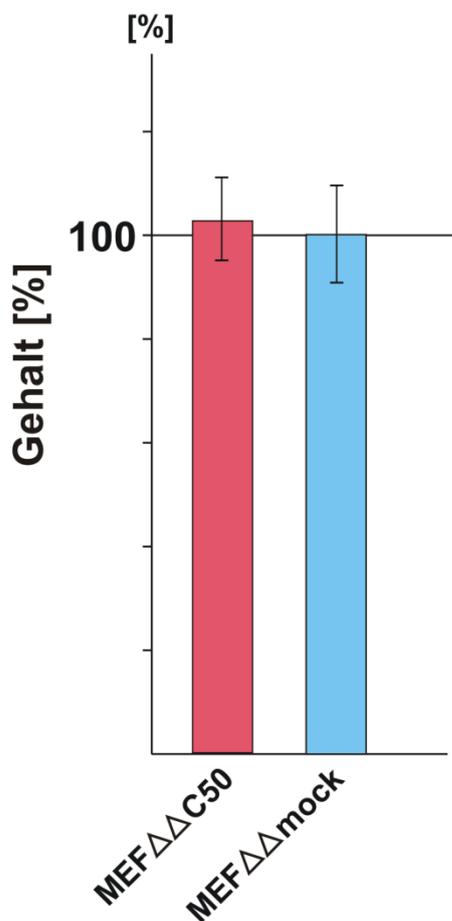


Abbildung 12: Mittelwerte des PUFA/SFA-Quotienten als Balkendiagramm für die PE ae der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock.

Die Mittelwerte der PUFA/SFA-Quotienten der Lipidextrakte MEF ΔΔ C50 und MEF ΔΔ mock betragen 102% ($\pm 22,22\%$) und 97% ($\pm 27,16\%$) respektiv. Es wurden 3 Lipidextrakte untersucht ($n = 3$, $p = 0,96$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.1.5. Massenspektrometrische Analyse der lysierten Phospholipide

Bei den lysierten Phospholipiden handelt es sich um Phospholipide die durch die Wirkung verschiedener kataboler Enzyme. Insbesondere die Phospholipase PLA2 spaltet Fettsäuren an der sn-2 Acyl-Position (Dennis 1994, Mallat et al. 2010). Die Kopfgruppe und eine Fettsäure bleiben dabei erhalten, während die zweite Fettsäure am endständigen Kohlenstoff abgespalten wird.

Es wurde die Lipidspezies der lysierten PCs massenspektrometrisch analysiert. Dabei sind die Lipide LysoPC C18:1 und LysoPC C22:6 von besonderem Interesse. C18:1 ist eine häufige, einfach gesättigte Omega-9 Fettsäure, während C22:6 als DHA einen der wichtigsten Vertreter der Omega-3 Fettsäuren darstellt, wobei ein Mangel an Omega-3 Fettsäuren in epidemiologischen Studien mit einer erhöhten Inzidenz von AD assoziiert ist (Quinn et al. 2010, Tocher and Dick 2001, Wang R. et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund wurden der Quotient aus C22:6/C18:1 der Lipidspezies der LysoPC bestimmt. Basierend auf den vorrausgegangenen Ergebnissen wurde das Modell entwickelt, dass AICD über einen inhibitorischen Effekt auf Genebene die FADS reguliert und so den PUFA-Anteil beeinflusst. Der C22:6/C18:1-Quotient sollte dem Modell folgend in einem AICD-defizienten Zellmodell erhöht sein. Tatsächlich ist der massenspektrometrisch bestimmte C22:6/C18:1-Quotient in den Lipidextrakten AICD-defizienter MEF APP Δ CT15-Zellen um $142,4\% \pm 2,87\%$ im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen erhöht ($n = 3$, $p < 0,001$). MEF AWT wurde auf $100\% \pm 1,51\%$ normiert.

Mittelwerte des C22:6/C18:1-Quotienten Lyso-PC

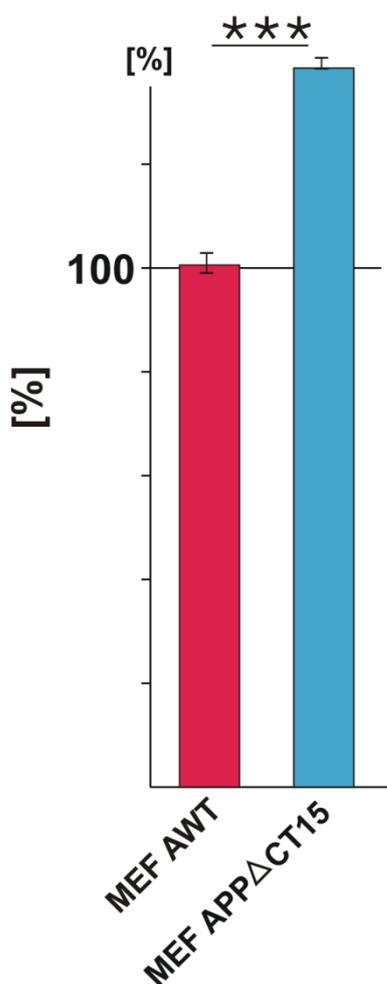


Abbildung 13: Mittelwert des C22:6/C18:1-Quotienten als Balkendiagramm der LysoPC
Der C22:6/18:1-Quotient der MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen wurde massenspektrometrisch aus den Lipidextrakten der Zellen gewonnen. Der C22:6/C:18:1-Quotient der MEF APP Δ CT15-Zellen ist im Vergleich zu MEF AWT auf $142,4\% \pm 2,87\%$ erhöht wobei MEF AWT auf $100\% \pm 1,51\%$ normiert wurde ($n = 3$, $p < 0,001$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der beobachtete Effekt ist mit dem Modell einer AICD-abhängigen Regulation der FADS vereinbar.

4.1.6. Massenspektrometrische Bestimmung der Gesamtplasmalogene

AICD reguliert die Plasmalogene de novo Synthese über die AGPS (Grimm M. O. et al. 2011d). Auf dieser Grundlage ist zu erwarten, dass in einem AICD-defizienten Zellmodell die Summe aller Plasmalogene reduziert ist. Die Lipidextrakte der MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen wurden vor diesem Hintergrund massenspektrometrisch analysiert und die Summe der PC-Plasmalogene bestimmt. Die Gesamt PC-Plasmalogene der MEF APP Δ CT15-Zellen war auf $76,47\% \pm 16,8\%$ ($n = 5$, $p < 0,05$) im Vergleich zu MEF AWT-Zellen reduziert. Die Lipidextrakte der MEF AWT-Zellen wurden auf $100\% \pm 19,59\%$ normiert.

Gesamtsumme der PC-Plasmalogene

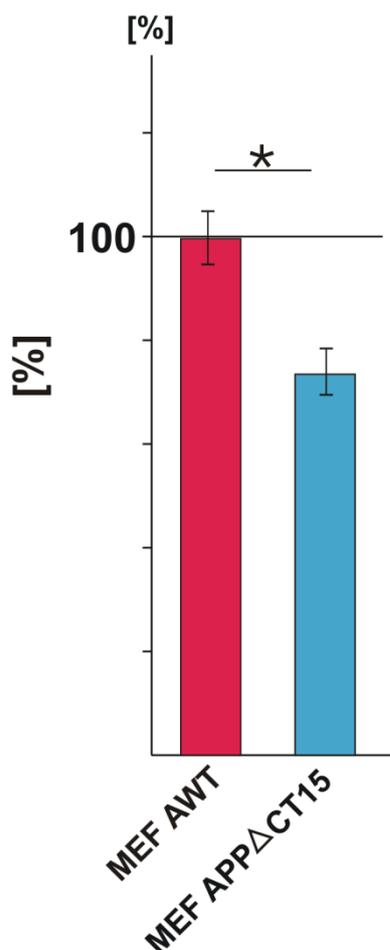


Abbildung 14: Gesamtsumme der PC-Plasmalogene der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15 als Balkendiagramm

Die Gesamtsumme der PC-Plasmalogene wurde massenspektrometrisch in den Lipidextrakten von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen bestimmt. Die PC-Plasmalogene war in den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen auf $76,47\% \pm 16,8\%$ im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen reduziert ($n = 5$, $p < 0,05$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die folgenden Lipidspezies sind in die Gesamtsumme der PC-Plasmalogene eingegangen: PC ae C30:0, PC ae C30:1, PC ae C30:2, PC ae C32:1, PC ae C32:2, PC ae C34:0, PC ae C34:1, PC ae C34:2, PC ae C34:3, PC ae C36:0, PC ae C36:1, PC ae

C36:2, PC ae C36:3, PC ae C36:4, PC ae C36:5, PC ae C38:0, PC ae C38:1, PC ae C38:2, PC ae C38:3, PC ae C38:4, PC ae C38:5, PC ae C38:6, PC ae C40:0, PC ae C40:2, PC ae C40:4, PC ae C40:5, PC ae C40:6, PC ae C42:0, PC ae C42:1, PC ae C42:2, PC ae C42:3, PC ae C42:4, PC ae C42:5, PC ae C44:3, PC ae C44:4, PC ae C44:6.

Der bereits publizierte Einfluss von AICD auf die AGPS konnte bestätigt werden. Die Gesamtsumme der Plasmalogene war in den Lipidextrakten AICD-defizienter Zellen um 24% reduziert.

Die Gesamtsumme der PC-Plasmalogene wurde ebenfalls in den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ mock- und MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen bestimmt. Die Plasmalogene waren in diesem Zellmodell nicht signifikant verändert (MEF $\Delta\Delta$ C50: 100% \pm 12,43%, MEF $\Delta\Delta$ mock: 98% \pm 14,87%, n = 3, p = 0,91).

4.1.7. Massenspektrometrische Analyse der Ceramide

Ceramide stellen eine Untergruppe der Sphingolipide da und bestehen aus Sphingosin und einer Fettsäure. Ceramide nehmen eine Schlüsselposition in der Sphingolipid Biosynthese und dem Sphingolipid Katabolismus ein (Hannun and Obeid 2008). Ceramide werden aufgrund ihrer pro-apoptischen Eigenschaften in der Pathogene von AD diskutiert (Spiegel and Kolesnick 2002). Die Ceramid-Synthese ist im Kontext von AD durch mehrere Mechanismen dysreguliert: Eine direkte Interaktion von A β 42 mit der Sphingomyelinase steigert ihre Aktivität und somit die *Synthese* (Grimm M. O. et al. 2005). Außerdem reguliert AICD die SPT und damit das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym der Ceramid *de novo* Synthese (Grimm M. O. et al. 2011b).

Daher ist zu erwarten, dass in einem AICD-defizienten Zellmodell die Ceramid-Level verändert sind.

Tatsächlich zeigt die Auswertung der Ceramide eine Erhöhung der Ceramide in den Lipidextrakten der AICD-defizienten Zellen.

Die Ceramide der Lipidextrakte von MEF APP Δ CT15-Zellen sind im Mittel auf 365% (\pm 17,91%) erhöht, während Lipidextrakte von MEF AWT-Zellen auf 100% (\pm 18,41%) normiert wurde. Diese Veränderung ist signifikant (p < 0,001) und beträgt 265%.

Die folgenden Ceramid-Spezies sind die in die Gesamtsumme eingegangen: 18:1/14:0, 18:1/16:0, 18:1/18:0, 18:1/18:1, 18:1/18:2, 18:1/20:0, 18:1/20:1, 18:1/20:4, 18:1/20:5, 18:1/22:0, 18:1/22:1, 18:1/22:2, 18:1/22:3, 18:1/22:4, 18:1/22:5, 18:1/22:6, 18:1/23:0, 18:1/24:0, 18:1/24:1, 18:1/24:2, 18:1/24:3, 18:1/25:0, 18:1/25:1, 18:1/26:0, 18:1/26:1, 18:2/16:0, 18:2/18:0, 18:2/20:0, 18:2/24:1

Auswertung der Lipidextrakte AWT und APP Δ CT15 Ceramide (Summe)

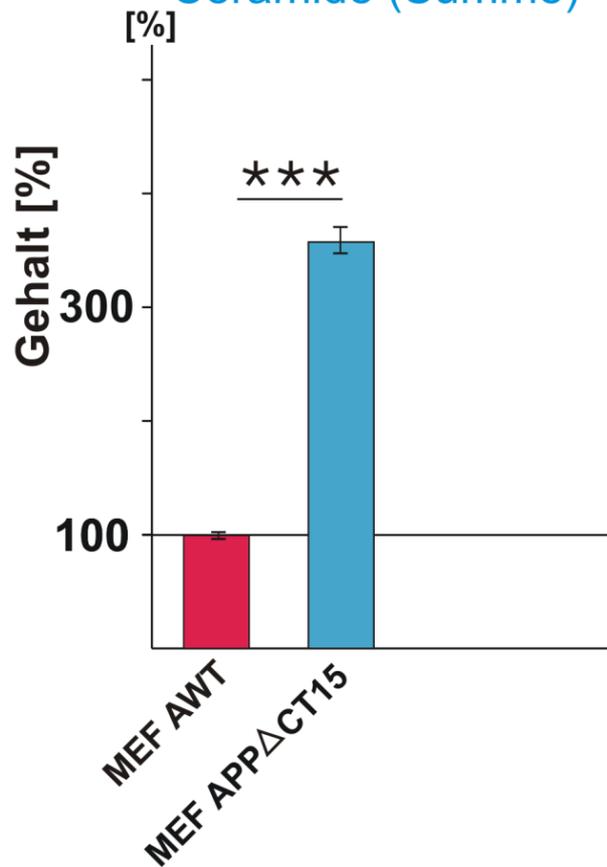


Abbildung 15: Gesamtsumme der Ceramide der Lipidextrakte AWT und APP Δ CT15.

Es wurde der Mittelwert der Summen der Ceramide für den jeweiligen Lipidextrakt errechnet. Die Lipidextrakte wurden aus MEF APP Δ CT15-Zellen und MEF AWT-Zellen generiert und massenspektrometrisch analysiert.

Der Lipidextrakt MEF AWT wurde auf 100% ($\pm 18,41\%$) normiert, während der Lipidextrakt MEF APP Δ CT15 auf 365% ($\pm 17,91\%$) anstieg. Dies entspricht einer Effekstärke von 265% bei einem $p < 0,001$ und einem $n = 8$. Die Signifikanz wurde durch den zweiseitigen T-Test bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Um zu untersuchen ob dieser Effekt Zelllinien unspezifisch ist wurden ebenfalls die Lipidextrakte der MEF $\Delta\Delta$ mock- und MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen untersucht.

Die Ceramide der Lipidextrakte $\Delta\Delta$ mock sind ebenfalls signifikant erhöht. Der Mittelwert der Gesamtsummen der Ceramide beträgt 236% ($\pm 33,05\%$) für den Lipidextrakt MEF $\Delta\Delta$ mock, während der Lipidextrakt MEF $\Delta\Delta$ C50 auf 100% ($\pm 33,06\%$) normiert wurde.

Auswertung der Lipidextrakte $\Delta\Delta$ C50 und $\Delta\Delta$ mock Ceramide (Summe)

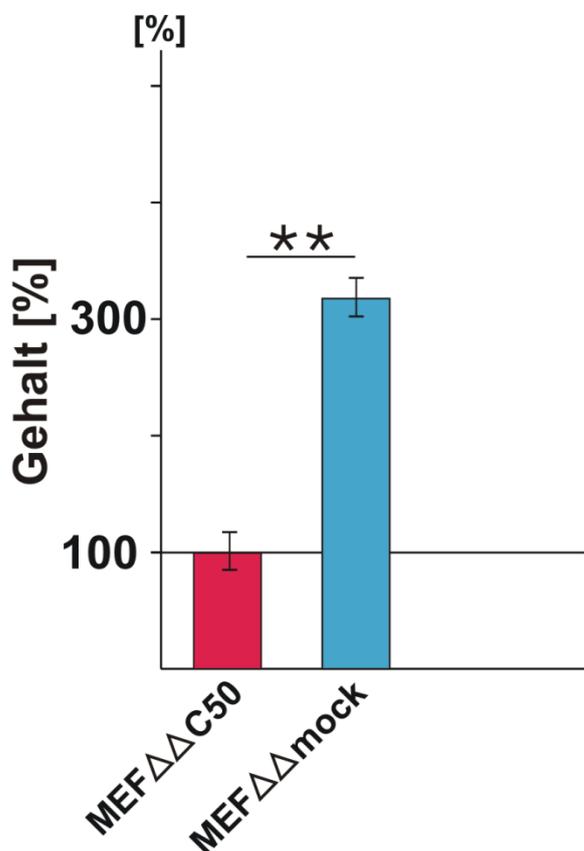


Abbildung 16: Gesamtsumme der Ceramide der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock

Es wurde die Gesamtsumme der Ceramide für den jeweiligen Lipidextrakt errechnet. Der Lipidextrakt der MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen wurde auf 100% ($\pm 33,06\%$) normiert, während der Lipidextrakt der MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf 236% ($\pm 33,05\%$) anstieg. Dies entspricht einer Effekstärke von 136% bei einem $p < 0,01$ und einem $n=3$. Die Signifikanz wurde durch den zweiseitigen T-Test bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

AICD reguliert die Lipidspezies Ceramide. Die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen zeigten signifikant erhöhte Ceramid-Konzentrationen. Der Effekt von AICD in retransfizierten Zellen auf die Ceramid-Konzentration wurde bislang nicht untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der regulatorische Effekt von AICD auf die Ceramide in retransfizierten Zellen erhalten bleibt.

4.1.8. Auswertung der DHA-Konzentration

Aufgrund der besonderen Stellung und des wissenschaftlichen Interesses an DHA wurde diese Fettsäure zusätzlich einzeln ausgewertet. Die Auswertung erfolgte hierbei in der Lipidspezies der PE aa, da diese Lipidspezies am stärksten durch AICD beeinflusst wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Intensität von PE aa C40:7 um die Fettsäuren 18:1 (Stearinsäure) und 22:6 (DHA) handelt. Außerdem wurden die Lipide PE aa C42:6 und PE aa C38:6 bestimmt, da sie als DHA vorliegen können.

Eine geninhibitorische Wirkung von AICD auf die FADS sollte zu einem erhöhten DHA-Spiegel in AICD-defizienten Zellen führen.

Auswertung der Lipidextrakte AWT und APP Δ CT15 DHA-Konzentration

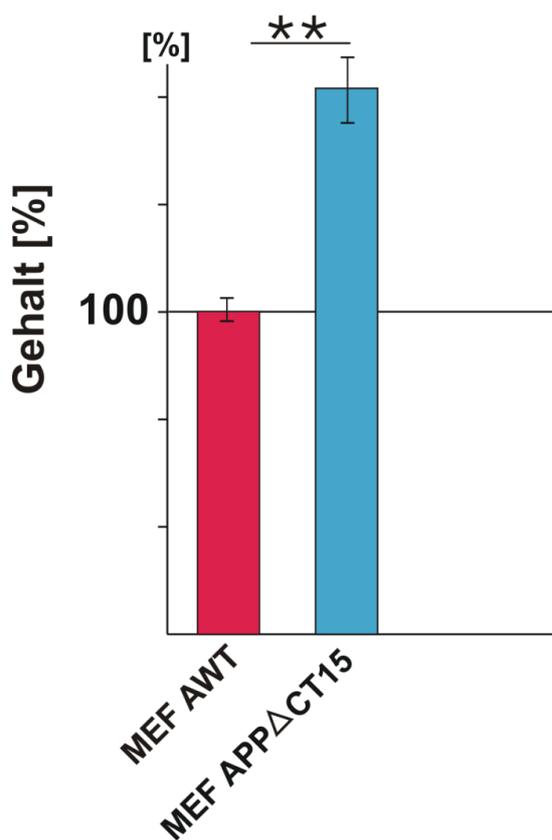


Abbildung 17: Auswertung der DHA-Konzentration der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen

Die durchschnittliche DHA-Konzentration der MEF APP Δ CT15-Lipidextrakte war auf 163% ($\pm 35,22\%$) erhöht, während die Lipidextrakte der MEF AWT-Zellen auf 100% ($\pm 9,97\%$) normiert wurde, wobei $p < 0,01$ und $n=5$. Diese Auswertung erfolgte in der Lipidspezies der PE aa und inkludierte die Lipidspezies PE aa C40:7, PE aa C42:6 und PE aa C:38:6. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Auswertung zeigt eine signifikante Erhöhung der DHA-Konzentration der APP Δ CT15-Lipidextrakte im Vergleich zu den AWT-Lipidextrakten. Die Effektstärke beträgt hierbei 63%.

Die DHA-Konzentration wurde ebenfalls in den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen bestimmt. Die DHA-Konzentration zeigte keine signifikante Veränderung zwischen den beiden Lipidextrakten (MEF $\Delta\Delta$ C50: 100% $\pm 18,97\%$, MEF $\Delta\Delta$ mock 113% $\pm 24,55\%$, $n = 3$, $p = 0,56$).

Zusammenfassend wurde somit eine signifikante Erhöhung der DHA-Konzentration in den Lipidextrakten des MEF APP Δ CT15-Zellmodells im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet, wobei dieser Effekt im Vergleich der MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellmodelle nicht repliziert werden konnte.

4.1.9. Der Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine

Omega-3 Fettsäuren wie EPA und DHA gelten als protektiv gegenüber der Entwicklung einer AD (Mohajeri et al. 2015, Sun et al. 2018). Omega-6 Fettsäuren wie die Arachidonsäure hingegen werden in der Pathogenese der AD diskutiert (Rapoport 2008, Sanchez-Mejia and Mucke 2010).

Ein erniedrigter Omega-3/Omega-6 Index gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer AD (Cole et al. 2009, Coley et al. 2018, Grimm M. O. W. et al. 2017b, Kyle et al. 1999). Aufgrund der Bedeutung des Omega-3/Omega-6 Index im Kontext von AD wurde die Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine massenspektrometrisch analysiert und anhand der CX:4 und CX:6 Lipide untersucht. Die Phosphatidylethanolamine wurden gewählt, da diese Lipidspezies die deutlichsten Effekte zeigte.

Omega-6 Fettsäuren werden in der massenspektrometrischen Analyse als CX:4 Fettsäuren detektiert. Die folgenden Fettsäuren wurden als Omega-6 Fettsäuren identifiziert: PE aa 36:4, PE aa 38:4, PE aa 40:4, PE aa 42:4. Omega-3 Fettsäuren wie EPA und DHA werden massenspektrometrisch als CX:6 Fettsäuren detektiert. Es wurden die folgenden Omega-3 Fettsäuren untersucht: PE aa 36:6, PE aa 38:6, PE aa 40:6, PE aa 42:6 und PE aa 40:27.

Dem Modell, dass AICD die FADS über die Gexpression reguliert, entsprechend ist ein erhöhter Omega-3/Omega-6 Index in den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen zu erwarten.

Tatsächlich ist der Omega-3/Omega-6 Index der MEF APP Δ CT15-Zellen auf 107,42% (\pm 2,74%) im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen, die auf 100% (\pm 2,56%) normiert wurden, erhöht ($n = 4$, $p < 0,001$). Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem T-Tests errechnet. Die Effektstärke beträgt 7%.

AICD reguliert den Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine. Der erhöhte Omega-3/Omega-6 Index der Lipidextrakte AICD-defizienter MEF APP Δ CT15-Zellen lässt einen Einfluss auf die APP-prozessierenden Sekretasen erwarten.

Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine

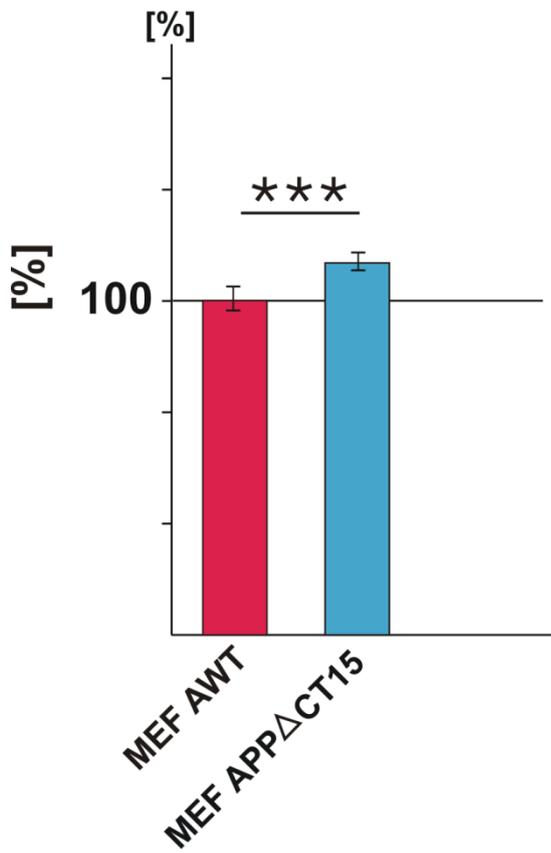


Abbildung 18: Omega-3/Omega-6 Index der Phosphatidylethanolamine als Balkendiagramm

Dargestellt ist der Mittelwert des errechneten Omega-3/Omega-6 Index der PEs. Die Lipidextrakte von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen wurden massenspektrometrisch analysiert. CX:4 Lipide gingen dabei in die Omega-6 Fettsäuren, CX:6 Lipide hingegen in die Omega-3 Fettsäuren ein. Der Omega-3/Omega-6 Index der Lipidextrakte der MEF APP Δ CT15-Zellen war auf 107,42% ($\pm 2,74\%$) im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen, die auf 100% ($\pm 2,56\%$) normiert wurden, erhöht ($n = 4$, $p < 0,001$). Die Signifikanz wurde mittels zwei-seitigen T-Tests errechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.2. Lipid-vermittelter Einfluss von AICD auf die amyloidogene Prozessierung

Die amyloidogene Prozessierung führt zu der Freisetzung von A β aus dem Vorläuferprotein APP und ist von Bedeutung für die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit.

Die Produktionsrate von A β wird durch die Aktivität der β - und γ -Sekretase bestimmt. Neben A β wird auch AICD durch die Sekretasen erzeugt. Die Sekretasen sind Membranproteine, deren Aktivität und Stabilität durch Lipide modifiziert werden (Hartmann et al. 2007, Holmes O. et al. 2012). Im Folgenden wird der Einfluss der AICD-bedingten Veränderungen des Lipidprofils auf die Aktivität der Sekretasen sowie anderer die A β -Menge bestimmender Prozesse untersucht.

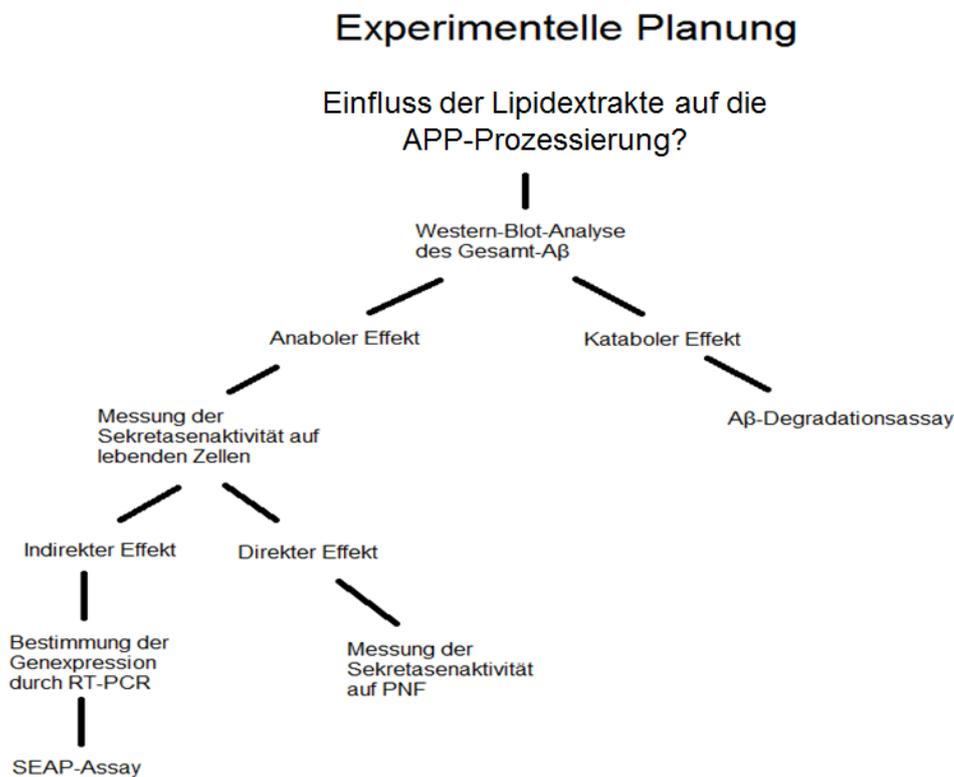


Abbildung 19: Darstellung der experimentellen Planung durch ein Fluss-Diagramm

4.2.1. Einfluss der Lipidextrakte auf A β

Das Lipidprofil beeinflusst die APP-prozessierenden Sekretasen. Die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran, ihre Fluidität und der Anteil der Lipid-Flöße regulieren die Aktivität der Sekretasen (Grziwa et al. 2003, Lingwood and Simons 2010). Außerdem konnte DHA die β - und γ -Secretase-Aktivität durch pleiotrope Mechanismen wie die reduzierte BACE1-Internalisation, Erhöhung der ADAM17-Proteinstabilität und einen Cholesterin-reduzierenden Effekt regulieren (Green et al. 2007, Grimm M. O. et al. 2011c).

Der erhöhte PUFA-, bzw DHA-Gehalt und der Sättigungsgrad der AICD-defizienten Lipidextrakte sollten zu einer reduzierten Aktivität der β - und γ -Secretase führen.

Um zu untersuchen, ob die Lipidextrakte die APP-prozessierenden Sekretasen regulieren wurde Gesamt-A β durch eine Western-Blot Analyse quantifiziert.

Hierfür wurden SH-SY5Y APP-Zellen, die APP695 stabil überexprimieren, mit Lipidextrakten inkubiert. Es wurde wie in 3.4.1 bis 3.4.6 beschrieben vorgegangen.

Die Inkubationszeit betrug zwei Mal 12 Stunden und es wurde zwei Mal mit 10 μ M des jeweiligen Lipid-Extraktes inkubiert. Parallel wurden Zellen ebenfalls mit der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Da mehr als zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden, wurde das Signifikanzniveau mittels Post-Hoc Analyse berechnet (vgl. 3.6.6).

4.2.1.1. Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf A β

Durch die Quantifizierung des Gesamt-A β konnte eine signifikante Reduktion durch die Inkubation des Lipidextraktes von MEF APP Δ CT15 im Vergleich zu MEF AWT beobachtet werden. Die Quantifizierung erfolgte durch die densitometrische Auswertung der A β -Banden, die durch eine Western-Blot-Analyse aus den Zellkulturmedien von zuvor mit Lipidextrakten inkubierten Zellen gewonnen wurden (vgl. 3.4.1 bis 3.4.6). Als Zelllinie wurde SH-SY5Y Zellen, die APP695 stabil überexprimieren (SH-SY5Y APP), verwendet. Diese Zellen wurden nach Erreichen der 100% Konfluenz mit 10 μ M des Lipidextraktes von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 zwei Mal für 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert. Weiterhin wurde eine Gruppe als Kontrolle verwendet und parallel für 12 Stunden mit der gleichen Menge Ethanol wie die anderen Gruppen behandelt. Es wurde eine 10 μ M Konzentration der eingesetzten Lipidextrakte gewählt, da eine höhere Konzentration bedingt durch das Lösungsmittel Ethanol zu einer erhöhten Zytotoxizität geführt hat.

Die Quantifizierung ergab als Mittelwert für die mit einem MEF AWT-Lipidextrakt inkubierten Zellen 136% (\pm 13,51%) und für MEF APP Δ CT15 82% (\pm 11,15%).

Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 10,65\%$) normiert. Die Differenz zwischen MEF AWT und MEF APP Δ CT15 ist signifikant ($p < 0,001$, $n = 9$) und wurde mittels Post-Hoc-Test ermittelt.

Die MEF AWT-Zellen exprimieren AICD auf einem physiologischen Niveau, während die MEF APP Δ CT15-Zellen AICD defizient sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass AICD über die Modifizierung der Lipidkomposition die A β -Homöostase beeinflusst.

Gesamt A β in Abhängigkeit des Lipidextraktes

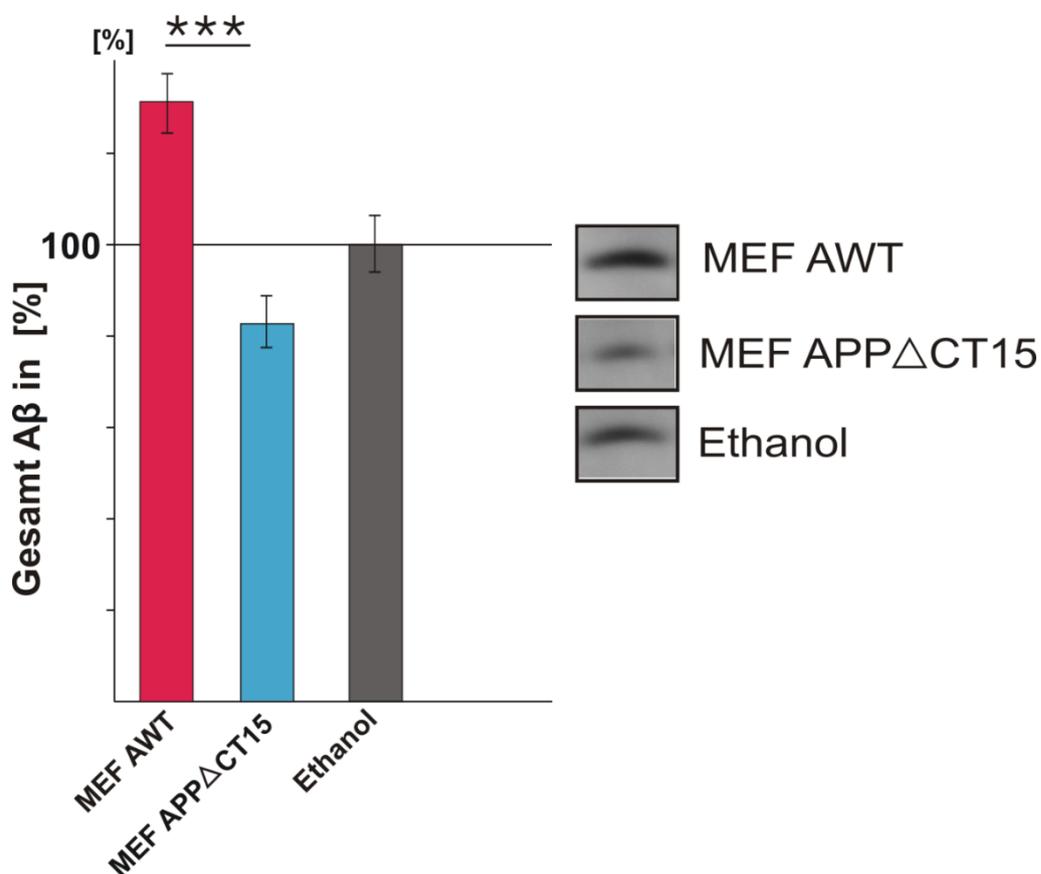


Abbildung 20:

Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes

Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der A β -Bande durch Imagegauge 3.45. Der Mittelwert für MEF AWT beträgt 136% ($\pm 13,51\%$), für MEF APP Δ CT15 82% ($\pm 11,15\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 10,65\%$) normiert, wobei $n=9$ für alle Gruppen. Die Signifikanz zwischen MEF AWT und MEF APP Δ CT15 wurde mittels Post-Hoc-Test ermittelt und beträgt $p \leq 0,001$. Die Zellen wurden zwei Mal für 12 Stunden mit 10 μ M des jeweiligen Lipidextraktes in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.2.1.2. Einfluss der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock auf A β

Im vorhergegangenen Experiment wurde der Effekt des Lipidextraktes einer monoklonalen Zellreihe mit einem Wildtyp verglichen. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt in der Zelllinien-unabhängig ist, wurden die LE von MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock auf SH-SY5Y APP-Zellen inkubiert und A β im konditioniertem Zellkulturmedium analog zu 4.2.1.1 mit einer Western-Blot-Analyse quantifiziert. Für den Versuch wurden ebenfalls SH-SY5Y APP-Zellen zwei Mal mit 10 μ M der Lipidextrakte für je 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert und mit einer Ethanol-Kontrolle verglichen.

Gesamt A β in Abhängigkeit des Lipidextraktes

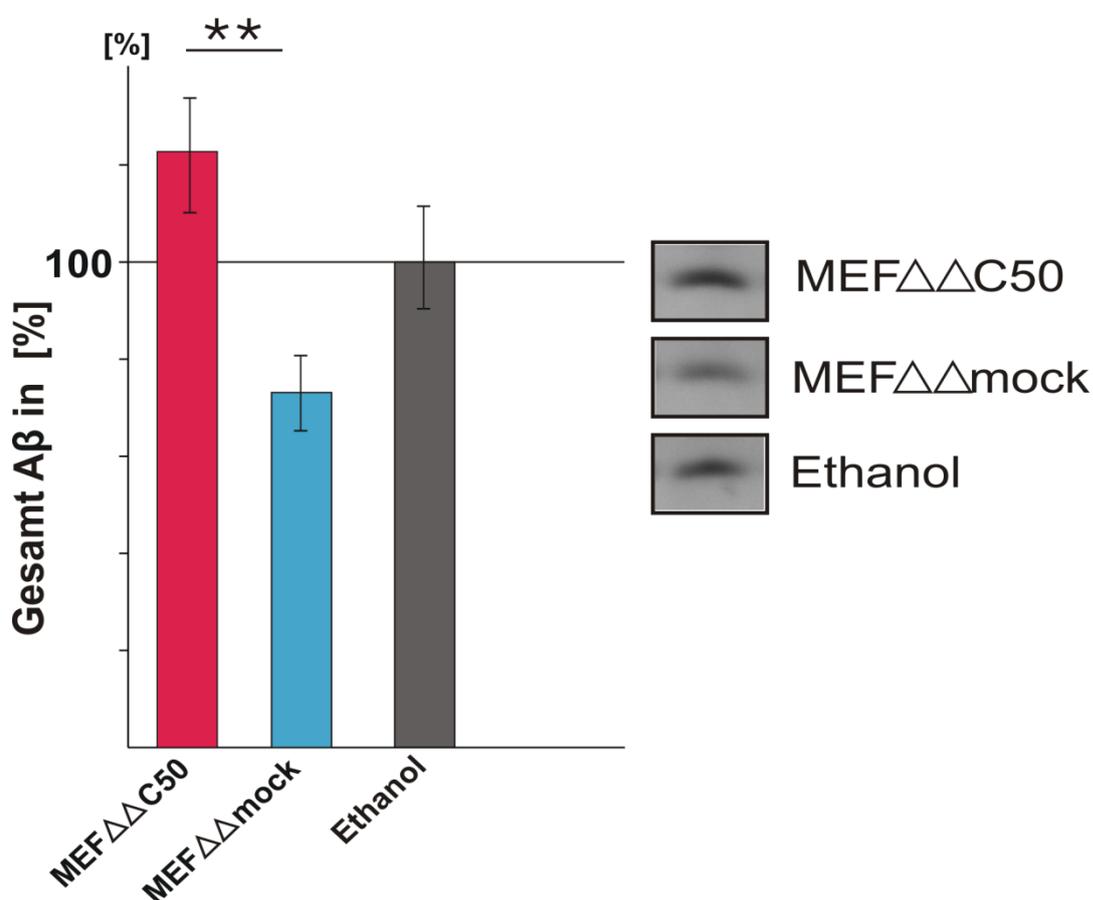


Abbildung 21: Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes. Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der A β -Bande durch Imagegauge 3.45. Der Mittelwert für MEF C50 beträgt 123% (\pm 26,34%), für MEF $\Delta\Delta$ mock 74% (\pm 8,96%). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% (\pm 10,65%) normiert, wobei n=6 für alle Gruppen. Die Signifikanz zwischen MEF C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock wurde mittels Post-Hoc-Test ermittelt und beträgt $p \leq 0,01$. Die Zellen wurden zwei Mal für 12 Stunden mit 10 μ M des jeweiligen Lipidextraktes in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen überexprimieren AICD. Sie wurden generiert, indem ein Vektor, der die letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von APP enthält, in MEF APP Δ CT15 eingebracht wurde.

Die MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen wurden parallel zu MEF $\Delta\Delta$ C50 generiert, aber exprimieren kein AICD, da ein Leervektor eingebracht wurde.

Es wurde eine signifikante Reduktion des Gesamt-A β beobachtet. Die Quantifizierung ergab als Mittelwert für Gesamt-A β für die mit LE MEF $\Delta\Delta$ C50 inkubierten Zellen 123% ($\pm 26,34\%$) und für MEF $\Delta\Delta$ mock 74% ($\pm 8,96\%$) ($p < 0,05$, $n = 6$). Das konditionierte Medium wurde ebenfalls von SH-SY5Y APP-Zellen, die für 24H mit $10\mu\text{M}$ des jeweiligen Lipidextraktes inkubiert wurden, gewonnen.

In 4.1. wurde gezeigt, dass die Lipidextrakte grundlegend ähnliche Eigenschaften, wie einen erhöhten PUFA-Gehalt zeigen, aber sich auch in ihrer Komposition signifikant unterscheiden. Unterschiedliche Effekte auf die APP-Prozessierung können durch die potentiellen Unterschiede zwischen den einzelnen Lipidextrakten entstehen. Diese Unterschiede sind aber nicht für die Gesamt A β -Konzentration entscheidend, da hier ähnliche Effekte beobachtet worden sind.

4.2.1.3. Einfluss der Lipidextrakte von AICD-inkubierten Zellen auf A β

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt durch AICD verursacht wird, wurden MEF APP Δ CT15-Zellen zwei Mal für 12 Stunden mit $2,5\mu\text{M}$ AICD unter Standardbedingungen in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) inkubiert. Anschließend wurde eine Lipidextraktion wie in 3.5.2. beschrieben durchgeführt. Die gewonnen Lipide wurden in Analogie zu den vorhergegangenen Experimenten in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ auf SH-SY5Y APP-Zellen inkubiert und das Gesamt-A β wurde aus den Zellkulturmedien bestimmt.

Die Inkubation mit AICD stellt eine zusätzliche Kontrolle des Modells da. MEF APP Δ CT15-Zellen zeigen einen veränderten A β -Metabolismus und können darüber die Lipid-Homöostase beeinflussen (Ring et al 2007). Durch die Inkubation von MEF MEF APP Δ CT15-Zellen mit AICD und die anschließende Gewinnung eines Lipid-Extraktes kann der Effekt des AICDs isoliert betrachtet werden.

Die Inkubation mit dem Lipidextrakt von MEF APP Δ CT15-Zellen, die mit AICD inkubiert wurden, führte zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamt-A β auf 108% ($\pm 4,79\%$, $n = 6$, $p < 0,05$).

Der Effekt ist deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Inkubation eines Lipidextraktes von Zellen, die durch eine stabile Expression von AICD charakterisiert sind.

Die Effektstärke der Lipidextrakte von MEF AWT-Zellen beträgt 36%, von MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen 23% und von MEF APP Δ CT15-Zellen, die mit AICD inkubiert, 8% im Vergleich zur jeweiligen Ethanol-Kontrolle.

Die beobachtete Effektstärke korreliert nur bedingt mit der zu erwartenden AICD-Konzentration. Die mit AICD inkubierten MEF APP Δ CT15-Zellen lassen die geringste AICD-Konzentration erwarten und zeigen auch den schwächsten Effekt auf Gesamt-A β . MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen überexprimieren AICD und gehen dementsprechend mit einer höheren, zu erwartenden AICD-Konzentration im Vergleich zu Wildtyp-Zellen einher. Dennoch zeigten die Wildtyp-Zellen einen stärkeren Effekt auf das Gesamt-A β . Es ist somit nicht von einem streng Dosis-abhängigen Effekt von AICD auf die Lipide auszugehen. AICD ist durch eine sehr kurze Halbwertszeit charakterisiert. Die Expression von AICD ist in MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen höher als in MEF AWT-Zellen. Die Funktionalität des AICD scheint aber in den Wildtyp-Zellen höher zu sein.

Gesamt A β in Abhängigkeit des Lipidextraktes

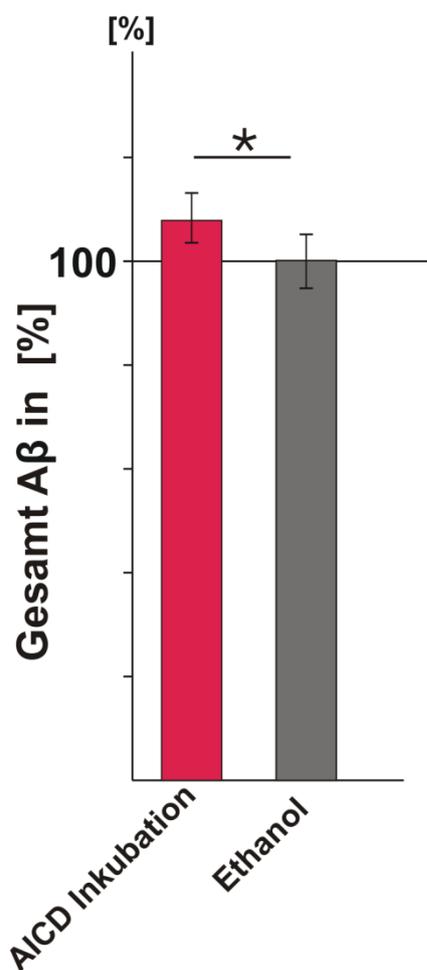


Abbildung 22:

Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängigkeit des inkubierten Lipidextraktes

Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der A β -Bande durch Imagegauge 3.45.

Es wurde ein Lipidextrakt aus der Inkubation von MEF APP Δ CT15 mit 2,5 μ M AICD mit einer dem Lipidextrakt einer Ethanol-Kontrolle verglichen. Der Mittelwert für LE AICD beträgt 108% (\pm 4,79%). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% (\pm 5%) normiert, wobei n=6 für alle Gruppen.

Die Signifikanz zwischen dem AICD Lipidextrakt und dem Lipidextrakt der Ethanol-Kontrolle wurde mittels Post-Hoc-Test ermittelt und beträgt $p \leq 0,05$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.2.2. Einfluss der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die Sekretion der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP)

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte der Lipidextrakte auf Gesamt-A β auf einer gesteigerten Proteinsekretion durch die Lipidextrakte beruhen, wurde ein SEAP-Assay durchgeführt. Hierfür wurden SH-SY5Y Wildtyp-Zellen transient mit einem SEAP-kodierenden Plasmid transfiziert (3.2.4) und mit 10 μ M des jeweiligen Lipidextraktes für zwei Mal 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert. Die alkalische Phosphatase über das Trans-Golgi-Netzwerk sezerniert. Durch die Zugabe eines SEAP-spezifischen Substrates Phosphates kann die sezernierte SEAP quantifiziert werden. Das Phosphat wird durch SEAP enzymatisch in p-Dinitrophenol – einen Farbstoff, der durch eine Absorptionswellenlänge von 405nm charakterisiert ist – umgesetzt.

Einfluss der Lipidextrakte MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die Aktivität der SEAP

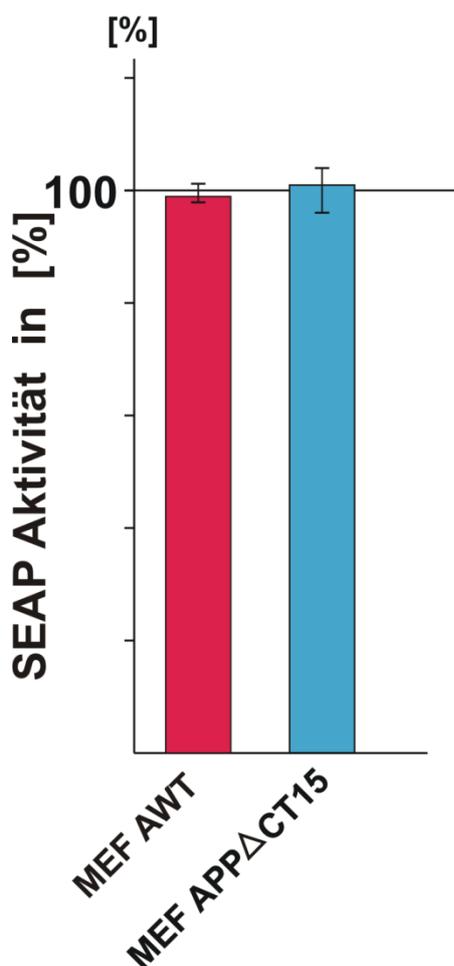


Abbildung 23: Quantifizierung der SEAP-Aktivität in konditionierten Zellkulturmedien durch SEAP-Assay
SH-SY5Y WT-Zellen wurden transient mit einem SEAP-kodierenden Plasmid transfiziert und anschließend mit 10 μ M der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 inkubiert, wobei MEF AWT als Kontrolle designiert wurde. Die Absorption von p-Dinitrophenols wurde bei 405nm gemessen. Der Mittelwert für die Inkubation mit Lipidextrakt MEF AWT beträgt 99% (\pm 1,23%) und für MEF APP Δ CT15 101% (\pm 4,51%) (n = 6, p = 0,97). Es wurde kein signifikanter Effekt beobachtet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Bestimmung der Aktivität der SEAP in den konditionierten Zellkulturmedien wurde wie in 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Absorption von p-Dinitrophenols wurde in einem Mikropplatten Lesegerät bei 405nm gemessen.

Die Inkubation von SH-SY5Y Wildtyp-Zellen mit den Lipidextrakten von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen führte zu keiner signifikanten Veränderungen der SEAP-Sekretion (MEF AWT: 99% \pm 1,23%, MEF APP Δ CT15: 101% \pm 4,51%, n = 6, p = 0,97).

Die Proteinsekretion wird durch die verwendeten Lipidextrakte nicht reguliert.

4.2.3. Einfluss von Lipiden auf sAPP β

Neben A β wurde auch sAPP β detektiert. A β entsteht durch die proteolytische Aktivität der β - und γ -Sekretase und bildet den Effekt von beiden Enzymen ab. Die Konzentration von sAPP β hingegen hängt maßgeblich von der Aktivität der β -Sekretase ab und ermöglicht somit eine Aussage über die Aktivität dieses Enzyms. Die initiale Proteolyse von APP durch die β -Sekretase führt zu der Freisetzung des extrazellulären sAPP β und der Formierung des membrangebunden β -CTF.

Die Quantifizierung von sAPP β erfolgte aus den Zellkulturmedien, die in 4.2.1.1, bzw. 4.2.1.3 durch Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 10 μ M der LE von MEF AWT/MEF APP Δ CT15, bzw. MEF $\Delta\Delta$ C50/MEF $\Delta\Delta$ mock gewonnen wurden.

Die Zellen wurden zwei Mal für 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1% FCS) unter Standardbedingungen inkubiert. Es wurde weiterhin eine Ethanol-Kontrolle inkubiert.

Die densitometrische Auswertung der sAPP β -Banden ergab als Mittelwert für MEF AWT 167% (\pm 22,3%), für MEF APP Δ CT15 89% (\pm 11,1%), für MEF $\Delta\Delta$ C50 185% (\pm 39,86%) und für MEF $\Delta\Delta$ mock 84% (\pm 8,5%) während die Ethanol-Kontrolle auf 100% (\pm 2,65%) normiert wurde. Die Effektstärke für MEF AWT gegen MEF APP Δ CT15 beträgt 77% und die Effektstärke für MEF $\Delta\Delta$ C50 gegen MEF $\Delta\Delta$ mock beträgt 100%.

Die Ergebnisse suggerieren einen starken Einfluss den AICD über die Regulation der Lipidkomposition auf den Initiator der amyloidogenen Prozessierung, die β -Sekretase, ausübt.

Als mechanistische Erklärung für die beobachteten Effekte kommen die anabole sowie die katabole Achse des A β -Metabolismus in Frage. Die Effekte, die für sAPP β beobachtet wurden, deuten auf eine Potenzierung der β -Sekretase-Aktivität durch einen Lipid-vermittelten Einfluss von AICD hin. Um den Effekt der Lipidextrakte auf die katabole Achse zu untersuchen, wurde ein A β -Degradations-Assay durchgeführt.

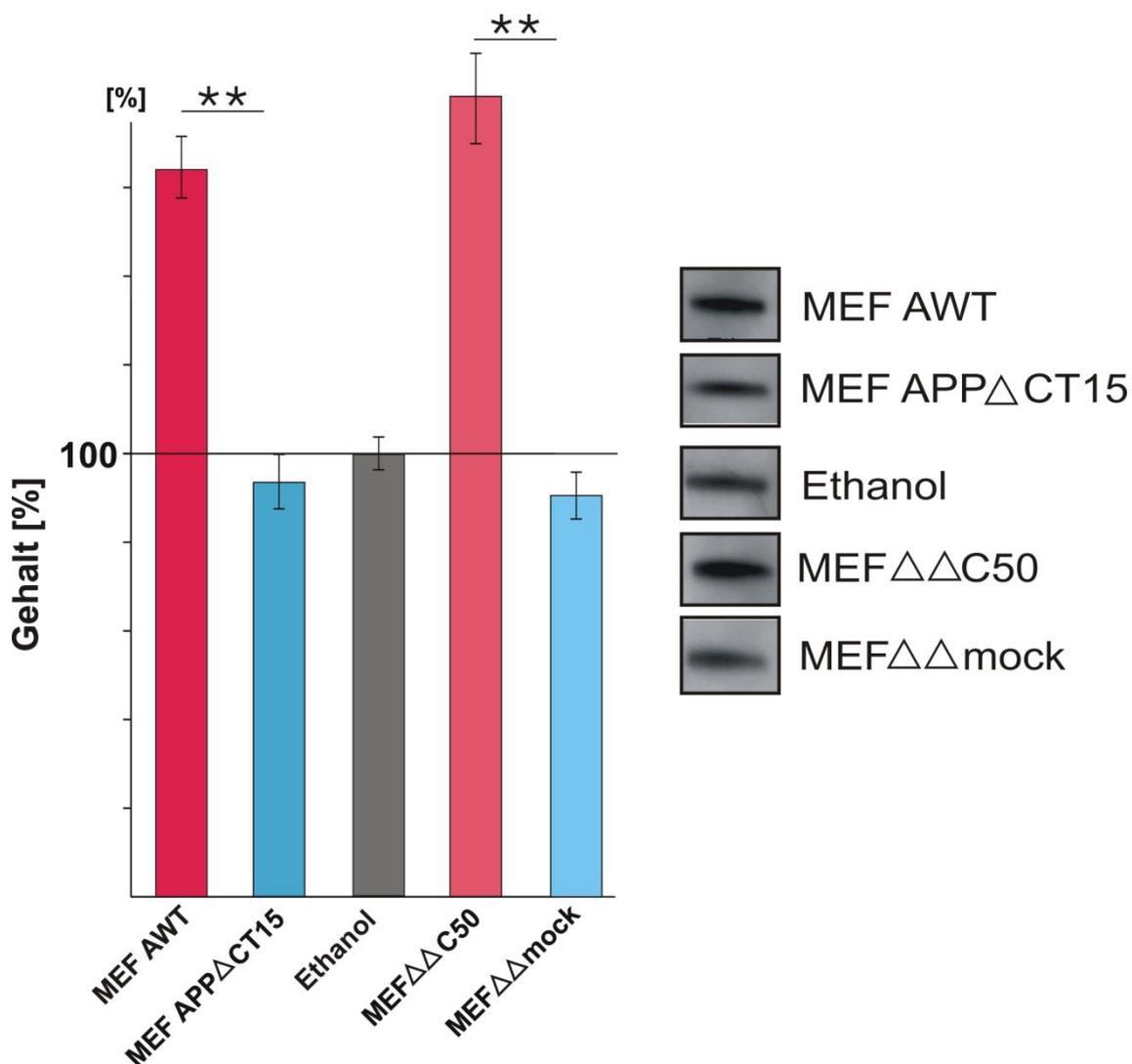


Abbildung 23:

sAPP β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes

Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Anti-sAPP β -Antikörpers und densitometrischer

Auswertung der sAPP β -Bande durch Imagegauge 3.45. Der Mittelwert für MEF AWT beträgt 167% ($\pm 22,3\%$), für MEF APP Δ CT15 89% ($\pm 11,1\%$), für MEF C50 185% ($\pm 39,86\%$) und für MEF C50 mock 84% ($\pm 8,5\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 2,65\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Signifikanz zwischen MEF AWT und MEF APP Δ CT15, bzw. MEF C50 und MEF C50 mock wurde mittels Post-Hoc-Test ermittelt und beträgt für beide Paare $p \leq 0,01$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.2.4. Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die A β -Degradation

Die omega-3 Fettsäuren EPA und DHA verstärken den A β -Katabolismus über die Regulation des Insulin-degradierenden Enzyms (Grimm M. O. et al. 2016c). Dementsprechend wurde untersucht, ob ein ähnlicher Effekt durch die Lipidextrakte von AICD-defizienten Zellen erzeugt werden kann. Als Unterschied zu den bereits publizierten Effekten ist festzuhalten, dass hier ein Lipid-Gemisch, das von der Regulation durch AICD abhängt, und nicht einzelne Lipidspezies eingesetzt werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der AICD-bedingten Veränderungen des Lipidprofils wurden N2a-Zellen mit den Lipidextrakten von MEF AWT oder MEF APP Δ CT15, bzw. MEF $\Delta\Delta$ C50 oder MEF $\Delta\Delta$ mock inkubiert, um anschließend die A β -Konzentration mit einem Western-Blot zu analysieren. Hierfür wurden N2a-Zellen zuerst 18 Stunden lang mit 5 μ M der Lipidextrakte von MEF AWT oder MEF APP Δ CT15 in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 Stunden mit 5 μ M des jeweiligen Lipidextraktes sowie 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Das murine A β wird durch die Verwendung des W02-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse nicht detektiert. Daher korreliert die beobachtete Signalstärke des humanen A β invers mit der Aktivität der A β -degradierenden Enzyme.

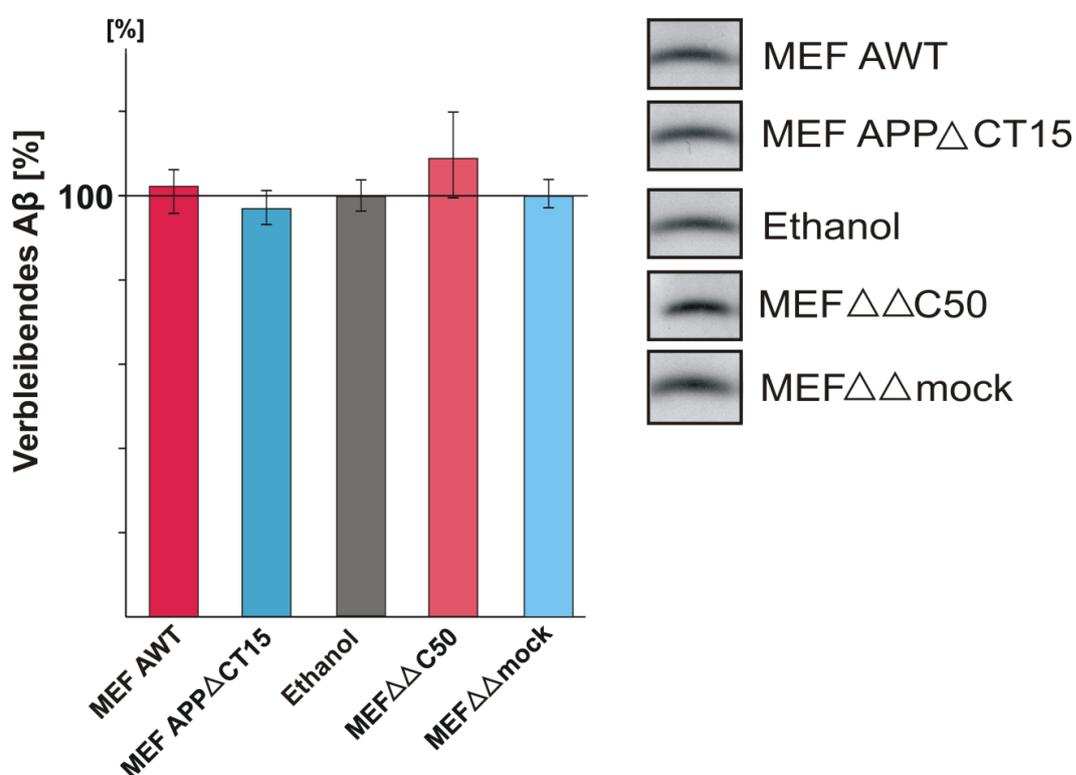


Abbildung 25: Verbleibendes A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes
Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der A β -Bande durch Imagegauge 3.45. Der Mittelwert für MEF AWT beträgt 105% ($\pm 8,3\%$), für MEF APP Δ CT15 96% ($\pm 7,2\%$) für MEF $\Delta\Delta$ C50 109% ($\pm 10,5\%$) und für MEF $\Delta\Delta$ mock 100 ($\pm 6,6\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 7,2\%$) normiert, wobei n=6 für alle Gruppen. Es wurde kein signifikanter Effekt beobachtet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Quantifizierung von A β in Abhängigkeit der jeweiligen Lipidextrakte ergab keinen signifikanten Effekt. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Effekt auf das Gesamt-A β nicht hauptsächlich in einer Inhibition der katabolen Achse begründet ist.

Die Supplementation von N2a-Zellen mit DHA- und EPA-haltigen Phosphatidylcholinen führte zu einer verstärkten A β -Degradation durch IDE (Grimm M. O. et al. 2016c). In dieser Arbeit hingegen wurde keine Regulation des A β -Katabolismus durch das

verwendete Lipidgemisch beobachtet. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Lipidspezies der PCs deutlich schwächere Veränderungen als die PEs zeigte. Die Lipidextrakte bilden als Lipidgemisch die Summe der Wirkung von AICD und beeinflussen die A β -Degradation nicht im selben Maßstab wie die einzelnen Lipidspezies der DHA- und EPA-Phosphatidylcholine.

4.2.5. Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf β -CTF

Der Arbeitshypothese eines direkten oder indirekten Effektes der durch AICD regulierten Lipidextrakte auf die A β -Synthese entsprechend, wurde β -CTF untersucht.

Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen zwei Mal mit 10 μ M des Lipidextraktes von MEF AWT oder MEF APP Δ CT15 für je 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in 3.4.1 beschrieben aufgeschlossen und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

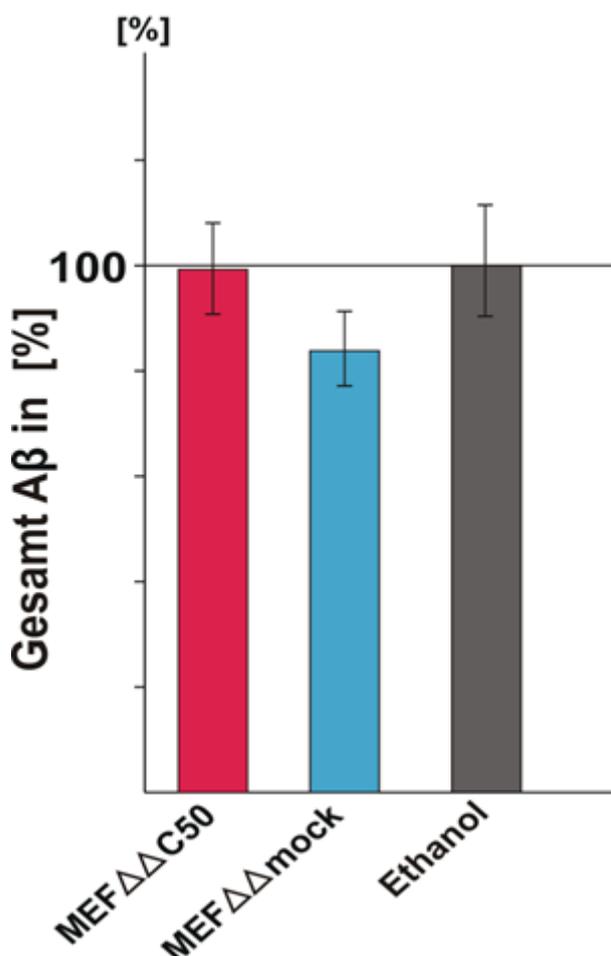


Abbildung 26:
 β -CTF aus lysierten Zellen in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes

Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der β -CTF-Bande durch Imagegauge 3.45. Der Mittelwert für MEF AWT beträgt 99% (\pm 12,98%), für MEF APP Δ CT15 86% (\pm 10,2%). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% (\pm 10,63%) normiert, wobei n=6 für alle Gruppen. Es wurde kein signifikanter Effekt beobachtet. Die Signifikanz wurde mittels Post-Hoc Test errechnet ($p = 0,12$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Quantifizierung von β -CTF zeigte keinen signifikanten Effekt. Die β -CTF-Konzentration wird sowohl durch die β - als auch durch die γ -Sekretase bestimmt: Eine

erhöhte Aktivität der β -Sekretase führt zu einem vermehrten Anfall von β -CTF, während eine erhöhte Aktivität der γ -Sekretase die Konzentration durch Proteolyse reduziert. Dieses Ergebnis deutet daher – im Kontext der anderen Ergebnisse – auf eine simultane Aktivitätssteigerung der β - und γ -Sekretase hin.

4.2.6. Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf Gesamt-A β in SH-SY5Y C99-Zellen

Um den Effekt der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem Lipidextrakt von MEF AWT oder MEF APP Δ CT15 inkubiert und das Gesamt-A β wurde aus dem Zellkulturmedium quantifiziert. Es wurden dieselben Inkubationsbedingungen wie in 4.2.1 gewählt: Zwei Mal 12 Stunden mit jeweils 10 μ M des jeweiligen Lipidextraktes in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%).

Gesamt-A β in Abhängigkeit
des Lipidextraktes auf SH-SY5Y C99-Zellen

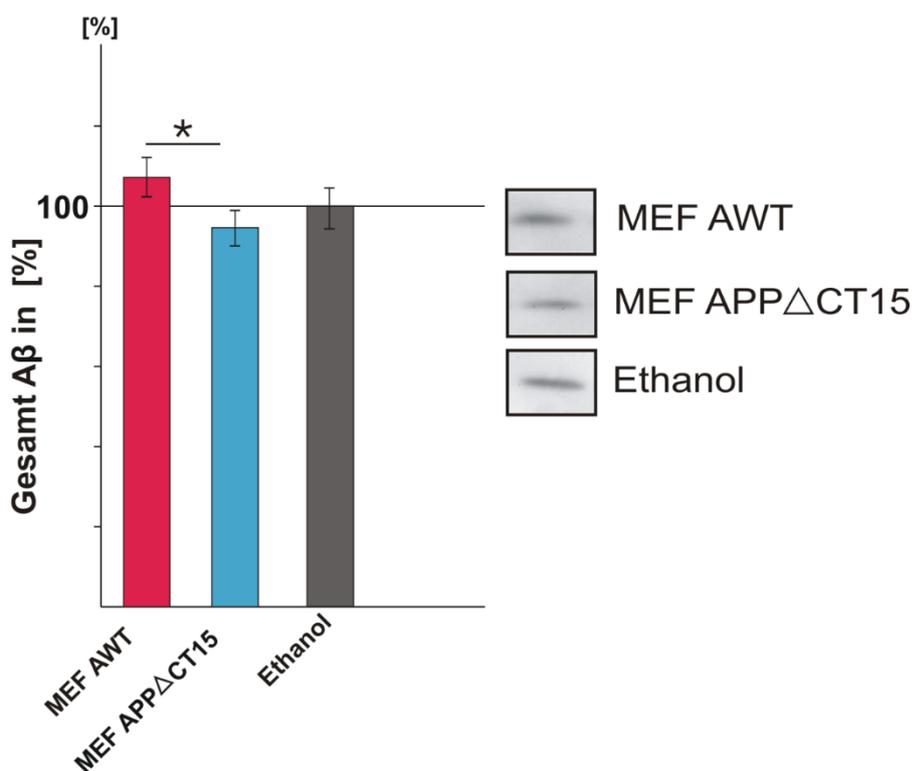


Abbildung 27:

Gesamt-A β im Zellkulturmedium in Abhängig des inkubierten Lipidextraktes auf SH-SY5Y C99-Zellen

Dargestellt ist die Quantifizierung durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers und densitometrischer Auswertung der A β -Bande durch Imagegauge 3.45. SH-SY5Y-Zellen überexprimieren die letzten 99 C-terminalen Aminosäuren von APP. Diese Zellen wurden mit den Lipidextrakten von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen inkubiert. Der Mittelwert für MEF WT beträgt 107% (\pm 10%), für MEF APP Δ CT15 95% (\pm 5,3%). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% (\pm 9,09%) normiert, wobei n=6 für alle Gruppen. Die Effekstärke beträgt 12%, wobei die Signifikanz zwischen den Lipidextrakten der MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und p \leq 0,05 beträgt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

SH-SY5Y C99-Zellen bilden den Effekt der γ -Sekretase auf die A β -Synthese verstärkt ab, da sie die letzten 99 C-terminalen Aminosäuren von APP überexprimieren.

Die Quantifizierung von β -CTF ergab eine Effektstärke von 12%, wobei der Mittelwert der mit dem Lipidextrakt von MEF AWT inkubierten Zellen 107% ($\pm 10\%$) und für mit den Lipidextrakt von MEF APP Δ CT15 95% ($\pm 5,3\%$) betrug ($n = 6$, $p < 0,05$).

Der beobachtete Effekt auf SH-SY5Y C99-Zellen ist geringer als auf SH-SY5Y APP-Zellen und deutet daher darauf hin, dass der Effekt der β -Sekretase stärker ist.

4.2.7. Einfluss der Lipide auf die Sekretasenaktivität auf lebenden Zellen

Zur Untersuchung eines Effektes der Lipide auf die Sekretasenaktivität wurde die Aktivität der β - und γ -Sekretase auf lebenden Zellen bestimmt. Es wurde wie in 3.4.7 beschrieben vorgegangen. Die Lipidextrakte wurden sowohl auf MEF AWT- als auch auf MEF APP Δ CT15-Zellen inkubiert.

Der beobachtete Effekt erlaubt eine Aussage über die anabole Achse des A β -Metabolismus und wird sowohl durch den direkten Effekt der Lipidextrakte auf die Sekretasenaktivität als auch über indirekte Effekte wie eine Modifizierung der Transkription, Translation oder Expression reguliert.

Gesamt-A β war im Zellkulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen, die mit dem Lipidextrakt von MEF APP Δ CT15-Zellen inkubiert wurden, im Vergleich zum Lipidextrakt von MEF AWT-Zellen reduziert. Da der A β -Katabolismus durch die Lipidextrakte nicht reguliert wurde, kann dieser Effekt durch einen Einfluss der Extrakte auf die β - und/oder γ -Sekretase zu erklären.

Die Kinetiken wurden graphisch dargestellt. Es wurde bewusst in einzelnen Graphen auf die Fehlerbalken der Lösungsmittelkontrolle verzichtet, um die Kinetik überschaubar zu machen. Die Standardabweichung ist in der Beschriftung der Graphik angegeben.

4.2.7.1. Einfluss der Lipide auf die Aktivität der β -Sekretase

Im Folgenden wird zuerst der Effekt der Lipide auf die β -Sekretase beschrieben. Es wurden MEF AWT-Zellen mit Lipidextrakten aus MEF AWT und MEF APP Δ CT15 inkubiert. Die Zellen wurden auf 96-Well-Platten mit $10\mu\text{M}$ des jeweiligen Lipidextraktes für zwei Mal 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert. Parallel wurde eine Kontroll-Gruppe mit derselben Menge Ethanol inkubiert.

Die Messung erfolgte in einem SAFIRE II-Fluorometer unter dem Einsatz von $30\mu\text{M}$ des β -Sekretase Substrates IV. Anhand der Fluoreszenz-Messung konnte der Kinetik der Enzymaktivität bestimmt werden.

Grundlegend für die fluorometrische Bestimmung der Enzymaktivität ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (Clegg 1995, Dewey and Hammes 1980). Das Substrat enthält eine Aminosäuren-Sequenz, welche die Schnittstelle des analysierten Enzyms

enthält, und von einem Quencher und einer Fluoreszenzquelle flankiert wird. Um die Enzymaktivität zu bestimmen wird das Substrat von dem zu untersuchenden Enzym gespalten, wodurch Quencher und Fluoreszenzquelle räumlich voneinander getrennt werden.

Durch die Trennung von Quencher und Fluoreszenzquelle wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer aufgehoben. Die gemessene Fluoreszenz ist dementsprechend proportional zu der enzymalen Aktivität.

Für jede Probe wurde eine Steigung errechnet. Diese Steigung wurde anhand des durchschnittlichen Mittelwertes aller Proben in eine relative Prozentzahl umgerechnet. Die Auswertung der Enzym-Aktivität erfolgte im linearen Bereich. Die vollständige Messung wird in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen

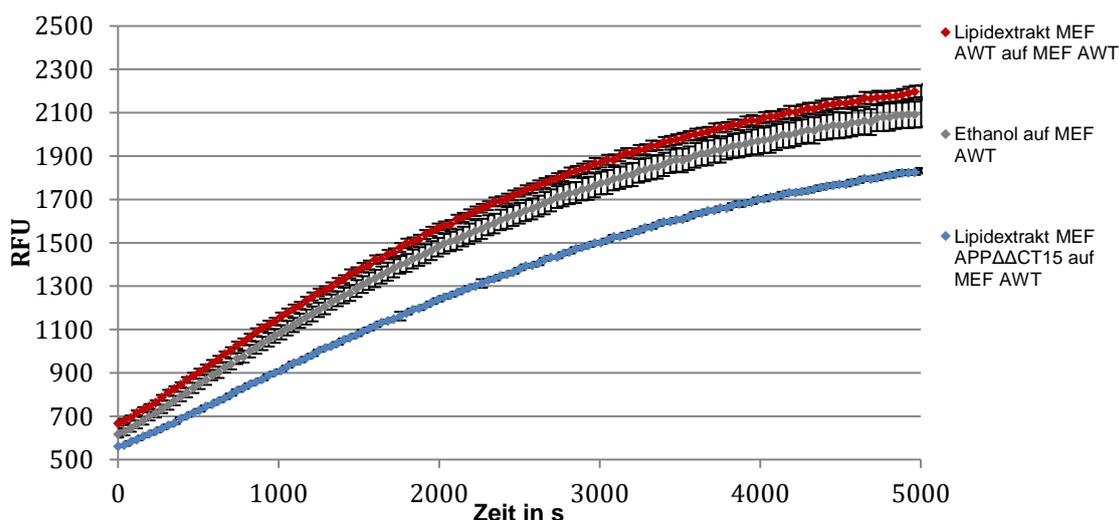


Abbildung 28: Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des β -Sekretase Substrates IV auf MEF AWT-Zellen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF WT beträgt 104% ($\pm 3,79\%$), für MEF APP Δ CT15 88% ($\pm 4,02\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 9,09\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 16%, wobei die Signifikanz zwischen MEF WT und MEF APP Δ CT15 mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,001$ beträgt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung-

Die Auswertung ergab für die Inkubation mit den Lipidextrakten von MEF AWT- 104% ($\pm 3,79\%$) und für MEF APP Δ CT15-Zellen 88% ($\pm 4,02\%$) bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ($n = 6$). Die Effektstärke beträgt 16%.

In Analogie zu diesem Versuch wurde eine weitere Inkubation mit denselben Lipidextrakten und denselben Inkubationsbedingungen auf MEF APP Δ CT15-Zellen

durchgeführt, um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt von der inkubierten Zellreihe sowie der vorherrschenden Lipidkomposition abhängt.

Hierbei wird untersucht, ob das Lipidprofil der MEF APP Δ CT15-Zellen durch die Zugabe der Lipidextrakte auf das Niveau von Wildtyp-Zellen verändert werden kann. Weiterhin wurden Wildtyp-Zellen mit den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen inkubiert um zu untersuchen, ob das Lipidprofil der Wildtyp-Zellen zu dem Lipidprofil von AICD-defizienten Zellen verschoben werden kann.

Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen

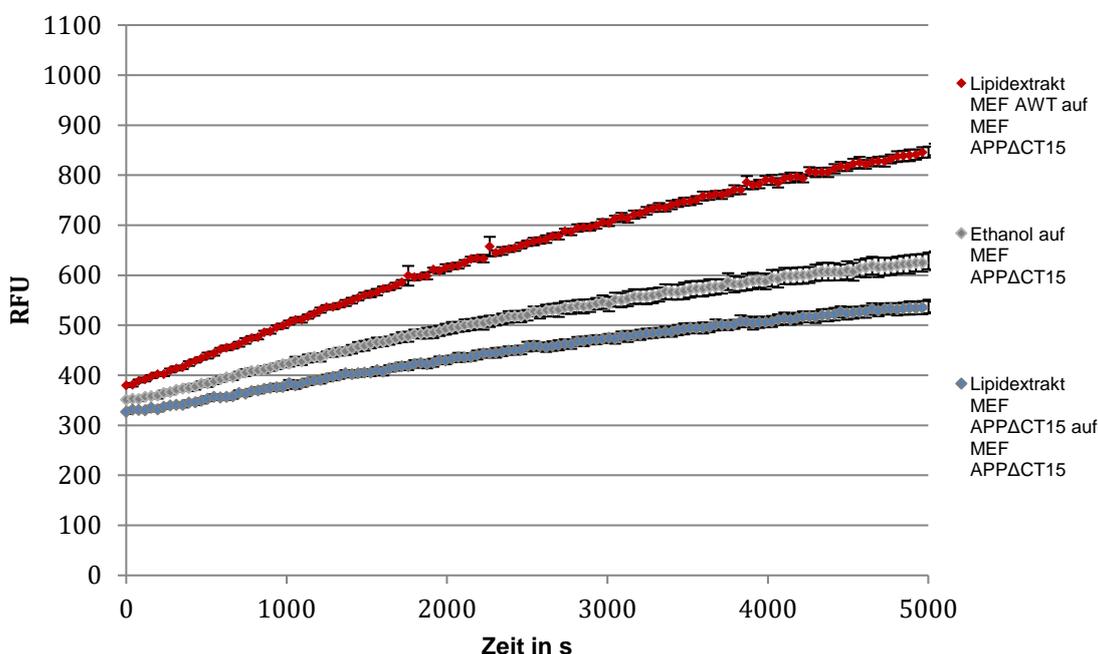


Abbildung 29: Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des β -Sekretase Substrates IV auf MEF APP Δ CT15-Zellen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF WT beträgt 177% ($\pm 9,42\%$), für MEF APP Δ CT15 80% ($\pm 8,15\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 14,87\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 96%, wobei die Signifikanz zwischen MEF WT und MEF APP Δ CT15 mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und beträgt $p \leq 0,001$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die MEF APP Δ CT15-Zellen, die mit einem Lipidextrakt von MEF AWT inkubiert wurden zeigten eine Aktivitätssteigerung auf 177% ($\pm 9,42\%$). Die MEF APP Δ CT15-Zellen, die mit einem Lipidextrakt von MEF APP Δ CT15 inkubiert wurden lagen bei 80% ($\pm 8,15\%$). Hieraus ergibt sich eine Effektstärke von 96% ($n = 6$, $p < 0,001$).

Auffällig ist, dass die Kinetik der inkubierten MEF APP Δ CT15-Zellen deutlich flacher ist als die Kinetik der MEF AWT-Zellen. Dies kann dadurch begründet werden, dass AICD die Genexpression von BACE1 reguliert (von Rotz et al. 2004). Die reduzierte β -

Sekretase Aktivität der MEF APP Δ CT15-Zellen könnte auf den Wegfall von AICD und die dadurch resultierende Regulation der BACE1-Genexpression erklärt werden.

Die Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 zeigten einen signifikanten Einfluss auf die β -Sekretase auf lebenden Zellen.

Der Effekt der Lipidextrakte ist auf MEF APP Δ CT15-Zellen stärker ausgeprägt als auf MEF AWT. Das in MEF APP Δ CT15-Zellen vorherrschende Lipidprofil kann folglich durch den Lipidextrakt von AICD-exprimierenden MEF AWT-Zellen verändert und die Aktivität der β -Sekretase deutlich gesteigert werden. Das Lipidprofil der MEF APP Δ CT15-Zellen kann durch Inkubation der Lipidextrakte von MEF AWT-Zellen zum Wildtyp verschoben werden. Andersherum konnte das Lipidprofil der MEF AWT-Zellen durch die Inkubation der Lipidextrakte von MEF APP Δ CT15-Zellen in Richtung des Lipidprofils AICD-defizienter Zellen verschoben werden.

Weiterhin wurde der Effekt der Lipidextrakte von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf die β -Sekretase untersucht.

Die Lipidextrakte wurden unter denselben Inkubationsbedingungen, 10 μ M des jeweiligen Lipidextraktes für zwei Mal 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%), eingesetzt und die Messung erfolgte abermals im Safire II-Fluorometer unter der Verwendung des β -Sekretase Substrates IV.

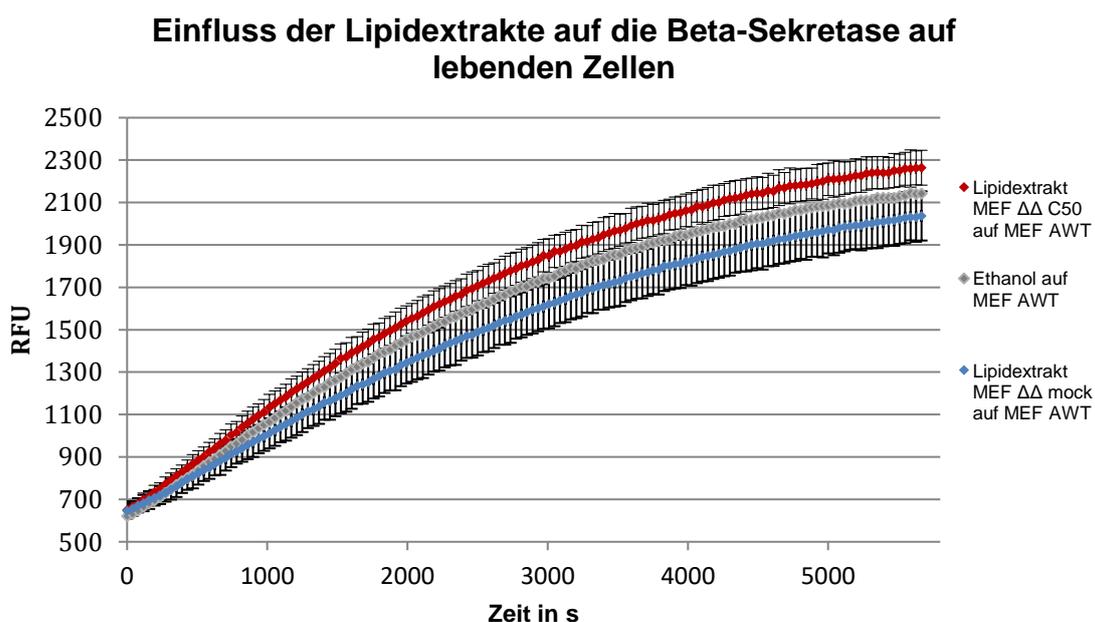


Abbildung 30: Einfluss der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des β -Sekretase Substrates IV auf MEF AWT-Zellen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF $\Delta\Delta$ C50 beträgt 106% ($\pm 3,62\%$), für MEF $\Delta\Delta$ mock 93% ($\pm 5,48\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 5,89\%$) normiert, wobei $n=8$ für alle Gruppen.

Die Effekstärke beträgt 13%, wobei die Signifikanz zwischen MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,05$. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es wurde bewusst auf die Fehlerbalken der Ethanol-Kontrolle verzichtet. Die Standardabweichung der Ethanolkontrolle beträgt $\pm 5,89\%$.

Die Auswertung zeigte für die MEF AWT-Zellen die mit dem Lipidextrakt von MEF $\Delta\Delta$ C50 inkubiert wurden einen Mittelwert von 106% ($\pm 3,62\%$) und für die mit MEF $\Delta\Delta$ mock inkubierten Zellen von 93% ($\pm 5,48\%$).

Sowohl die MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Lipidextrakte als auch die MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Lipidextrakte zeigten eine signifikante Regulation der β -Sekretase auf lebenden Zellen.

4.2.7.2. Einfluss der Lipide auf die Aktivität der γ -Sekretase

Neben der β -Sekretase wurde auch der Effekt der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase untersucht. Entsprechend der Arbeitshypothese ist eine isolierte Modifizierung sowohl der β - als auch der γ -Sekretase oder eine Modifizierung beider Sekretasen denkbar.

Hierfür wurde in Analogie zu 3.4.7 und 4.2.6.1 vorgegangen, wobei $10\mu\text{M}$ des jeweiligen Lipidextraktes für zwei Mal 12 Stunden in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/0,1%) inkubiert wurden.

Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase in lebenden Zellen

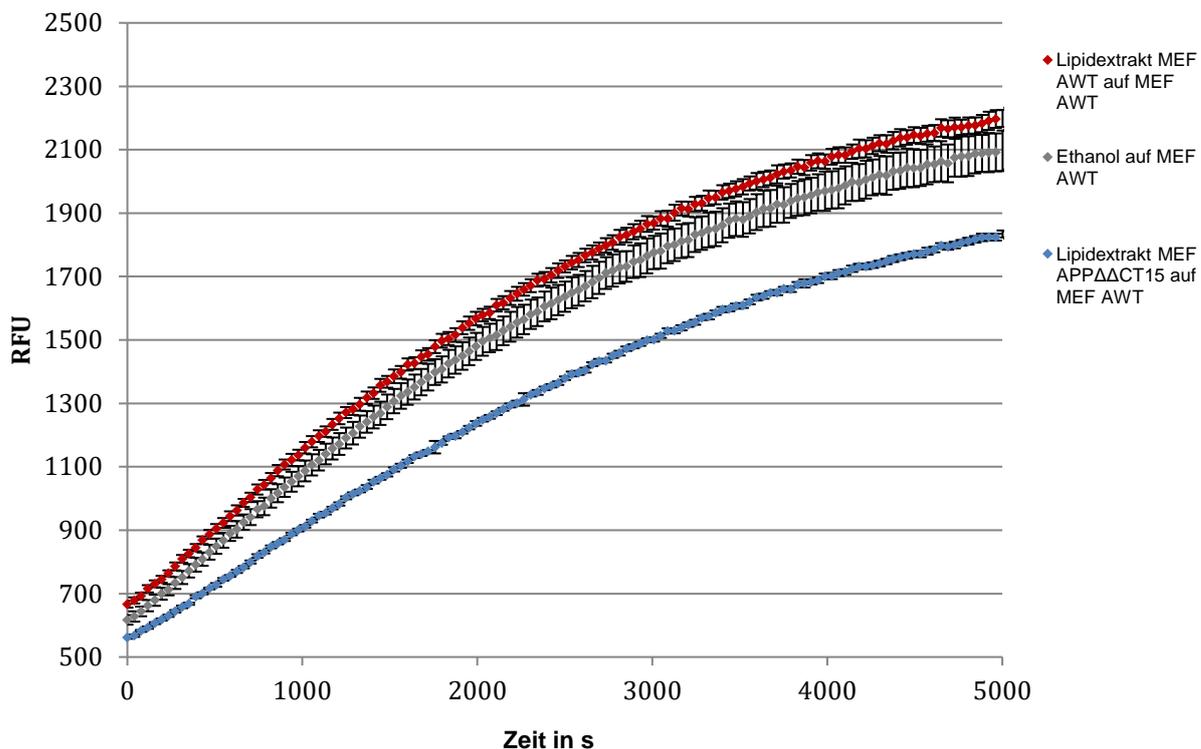


Abbildung 31: Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der γ -Sekretase in lebenden Zellen

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des γ -Sekretase Substrates auf MEF AWT-Zellen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF AWT beträgt 107% ($\pm 4,74\%$), für MEF APP Δ CT15 80% ($\pm 6,95\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 9,17\%$) normiert, wobei $n=12$ für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 27%, wobei die Signifikanz zwischen MEF WT und MEF APP Δ CT15 mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,001$.

Die Messung erfolgte unter der Verwendung von $12,5\mu\text{M}$ des γ -Sekretase Substrates in einem Safire II-Fluorometer mit den in 3.4.7 dargestellten Messparametern.

Es wurden sowohl die Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 als auch von MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock in jeweils separaten Experimenten untersucht.

Die Lipidextrakte von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen wurden auf MEF AWT-Zellen inkubiert. Um zu überprüfen ob die Lipidextrakte von MEF AWT-Zellen das bestehende Lipidprofil von APP Δ CT15-Zellen in Richtung des Wildtyps verändern können, wurden diese Lipidextrakte ebenfalls auf APP Δ CT15-Zellen inkubiert.

Der Mittelwert für die Inkubation von MEF AWT-Zellen mit dem Lipidextrakt aus MEF AWT beträgt 107% ($\pm 4,74\%$) und für den Lipidextrakt aus MEF APP Δ CT15 80% ($\pm 6,95\%$). Die Lipidextrakte führen zu einer signifikanten Regulation der proteolytischen Aktivität der γ -Sekretase ($n = 12$, $p < 0,001$).

Kongruent hierzu konnte ein Effekt der MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Lipidextrakte auf MEF APP Δ CT15-Zellen beobachtet werden.

Die Inkubation erfolgte wie oben beschrieben. Die mit einem MEF AWT-Lipidextrakt inkubierten MEF APP Δ CT15-Zellen zeigten eine gesteigerte Proteolyse durch die γ -Sekretase auf 106% ($\pm 9,2\%$), während die MEF APP Δ CT15-Zellen, die mit einem Lipidextrakt von MEF APP Δ CT15-Zellen inkubierten wurden, bei 87% ($\pm 8,2\%$) lagen. Dies entspricht einer Effekstärke von 19% ($n = 10$, $p < 0,05$). Demzufolge kann das Lipidprofil von MEF APP Δ CT15-Zellen durch die Inkubation mit einem Lipidextrakt von Wildtyp-Zellen verändert werden und es kommt zu einer Steigerung der γ -Sekretase Aktivität. Im Vergleich zum Effekt der Lipidextrakte auf die β -Sekretase war der Effekt der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase weniger stark ausgeprägt.

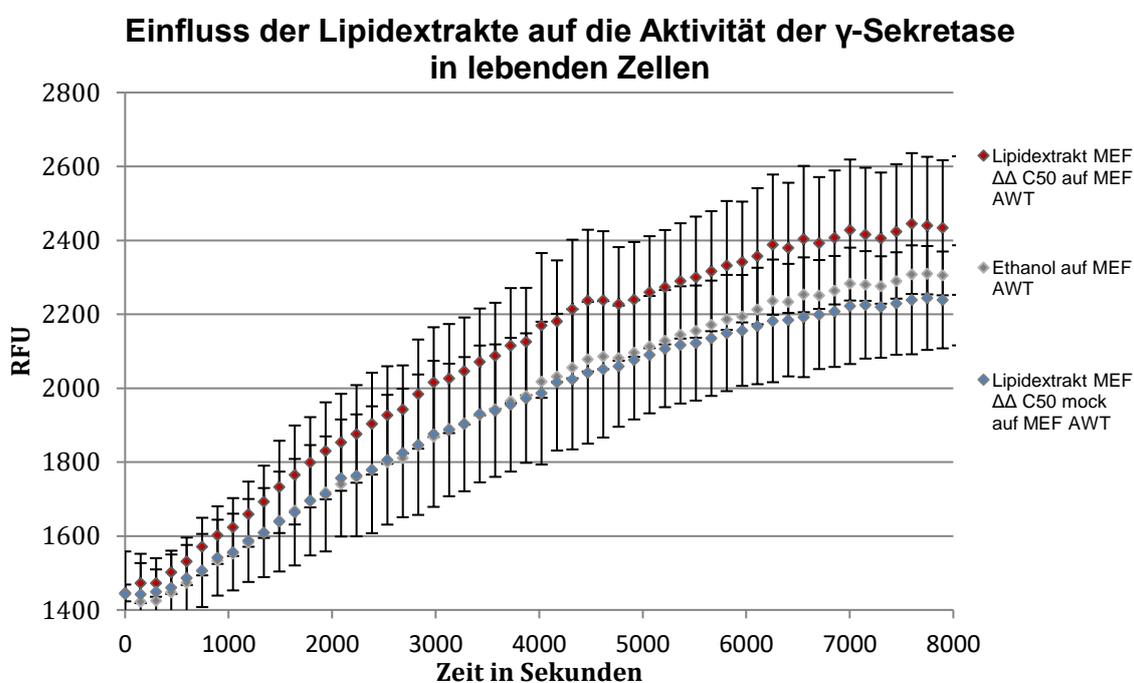


Abbildung 32: Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der γ -Sekretase in lebenden Zellen

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des γ -Sekretase Substrates auf MEF AWT-Zellen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF $\Delta\Delta$ C50 beträgt 109% ($\pm 15,03\%$), für MEF $\Delta\Delta$ mock 91% ($\pm 6,82\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 7,23\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Effekstärke beträgt 18%, wobei die Signifikanz zwischen MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,05$. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es wurde bewusst auf die Fehlerbalken der Ethanol-Kontrolle verzichtet.

Weiterhin wurden für die Untersuchung des Einflusses der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase MEF AWT-Zellen mit den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen inkubiert. Die Inkubation und Messung erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen. MEF AWT-Zellen, die mit dem Lipidextrakt von MEF $\Delta\Delta$

C50-Zellen inkubiert wurden, zeigten eine Aktivitätssteigerung der γ -Sekretase auf 109% ($\pm 15,03\%$), während für MEF AWT-Zellen, die parallel mit einem Lipidextrakt von MEF $\Delta\Delta$ mock, eine γ -Sekretase Aktivität von 91% ($\pm 6,82\%$) bestimmt wurde. Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 7,23\%$) normiert. Die Inkubation der Lipidextrakte von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf MEF AWT-Zellen führt zu einer signifikanten Regulation der γ -Sekretase Aktivität ($n = 6, p < 0,05$). Der Einfluss der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase ist Zelllinien unabhängig.

Insgesamt zeigt die Auswertung einen klaren Einfluss der Lipidextrakte auf die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase. Der beobachtete Effekt auf die Sekretasenaktivität auf lebenden Zellen ist bei der β -Sekretase stärker ausgeprägt als bei der γ -Sekretase.

Es ist von einem anabolen Effekt der Lipide durch Modifikation der β - und γ -Sekretase auf den A β -Metabolismus auszugehen. Grundlegend kann diese Regulation auf einen direkten oder einen indirekten Einfluss der Lipidextrakte auf die β - und γ -Sekretase zurückgeführt werden. Um den zugrundeliegenden Mechanismus des beobachteten Effektes zu untersuchen wurde der direkte Einfluss der Lipide auf die Sekretasen durch die Bestimmung der Sekretasenaktivität auf Post-nuklearen Fraktionen (PNF) untersucht. Ein direkter Effekt lässt sich auf die direkten Interaktion der Lipide mit den Sekretasen oder eine Veränderung der unmittelbaren Lipidumgebung des Enzyms zurückführen.

Indirekte Effekte hingegen hängen von dem Nukleus der Zelle ab und umfassen Veränderungen der Genexpression, der Translation und Transkription und des Proteintransportes.

4.2.8. Einfluss der Lipidextrakte auf die Sekretasenaktivität auf PNF

Um eine direkte Modifizierung der Sekretasen durch die Lipidextrakte zu untersuchen, wurde die proteolytische Aktivität der Sekretasen auf PNF bestimmt. PNF sind aufgereinigte Membranfragmente, deren Enzymaktivität unabhängig vom Nukleus ist. Somit werden indirekte Effekte, wie Veränderungen der Gen-Expression oder der Translation und Transkription nicht abgebildet.

4.2.8.1. Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der β -Sekretase

Für die fluorometrische Messung der Sekretasenaktivität auf PNF wurden MEF AWT-Zellen wie in 3.4.8 beschrieben aufgearbeitet. Die PNF wurden mit 10 μ M des jeweiligen Lipidextrakts für 15 Minuten bei 37° auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung erfolgte

unter der Verwendung von 20 μ M des β -Sekretase Substrat IV in einem Safire II-Fluorometer mit den in 3.4.8 dargestellten Messparametern.

Auf den lebenden Zellen wurde gezeigt, dass sich das Lipidprofil von Wildtyp-Zellen durch die Inkubation eines Lipidextraktes von AICD-defizienten Zellen beeinflussen lässt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich das Lipidprofil von MEF APP Δ CT15-Zellen durch die Inkubation von Lipidextrakten von Wildtyp-Zellen zu verändern lässt. Für die Untersuchung der Enzymaktivität auf PNF wurden aus MEF AWT-Zellen wie in 3.4.8 beschrieben PNF generiert. Obwohl stärkere Effekte auf den MEF APP Δ CT15-Zellen beobachtet wurden, wurden MEF AWT-Zellen verwendet, da diese Wildtyp-Zellen ein physiologischeres System abbilden.

Die Inkubation der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf PNF zeigte eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität durch MEF APP Δ CT15 im Vergleich zu MEF AWT ($n = 6$, $p < 0,05$).

Als Mittelwert wurde für die Inkubation mit dem Lipidextrakt von MEF AWT ein Mittelwert von 115% ($\pm 13,99\%$) und für MEF APP Δ CT15 von 93% ($\pm 3,82\%$) errechnet, wobei $n = 6$.

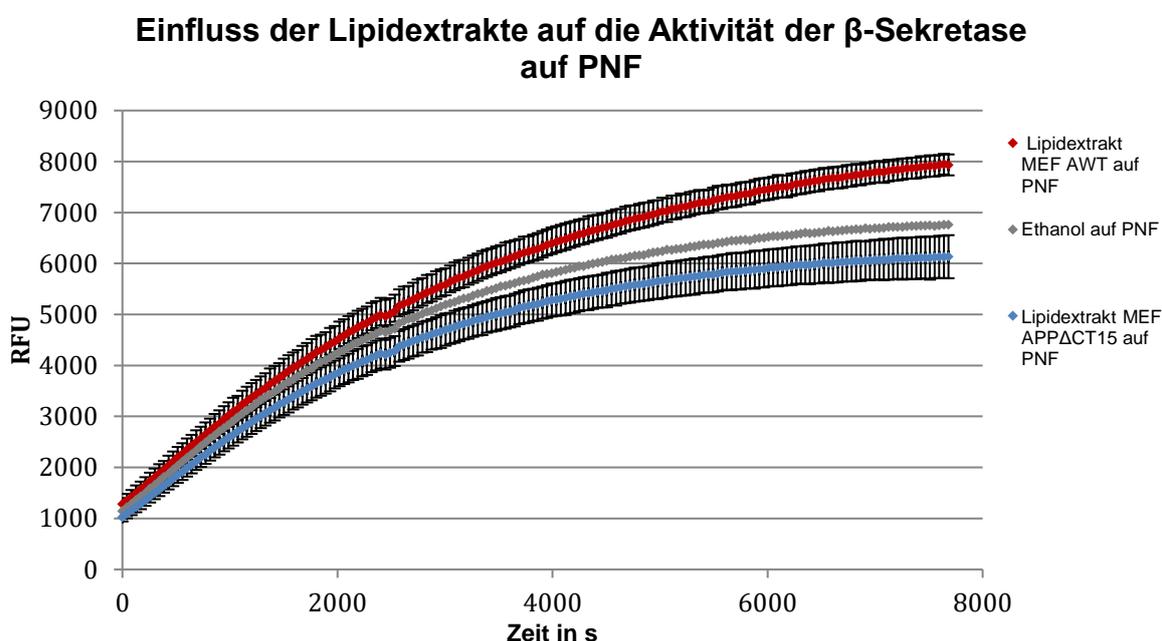


Abbildung 33:
Einfluss der Lipidextrakte (MEF AWT, MEF APP Δ CT15) auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF von MEF AWT-Zellen

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des β -Sekretase Substrat IV auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF AWT beträgt 115% ($\pm 13,99\%$), für MEF APP Δ CT15 93% ($\pm 3,82\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 7,97\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 22%, wobei die Signifikanz zwischen MEF AWT und MEF APP Δ CT15 mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,05$. Es wurde bewusst auf die Fehlerbalken der Lösungsmittelkontrolle verzichtet.

Dieses Ergebnis deutet auf eine direkte Beeinflussung der β -Sekretase durch die Lipidextrakte hin. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität der β -Sekretase in Abhängigkeit der inkubierten Lipidextrakte auf lebenden Zellen im Vergleich zu PNF. Die Regulation der β -Sekretase durch die Lipidextrakte kann durch eine direkte Interaktion zwischen den Lipiden und der Sekretase erklärt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss der Lipidextrakte aus MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf die proteolytische Aktivität der β -Sekretase auf PNF bestimmt.

Die Auswertung der Fluoreszenzmessung liefert einen Mittelwert von 113% ($\pm 7,51\%$) für PNF, die mit dem Lipidextrakt von MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen inkubiert wurden. Im Vergleich wurde die Aktivität der β -Sekretase auf PNF 85% ($\pm 6,4\%$) durch die Inkubation mit einem Lipidextrakt aus MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen reduziert ($n=6$, $p < 0,001$).

Dies entspricht einer signifikanten Reduktion der Aktivität der β -Sekretase auf PNF durch den Einfluss des AICD-defizienten Lipidextraktes aus MEF $\Delta\Delta$ mock- im Vergleich zu MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen.

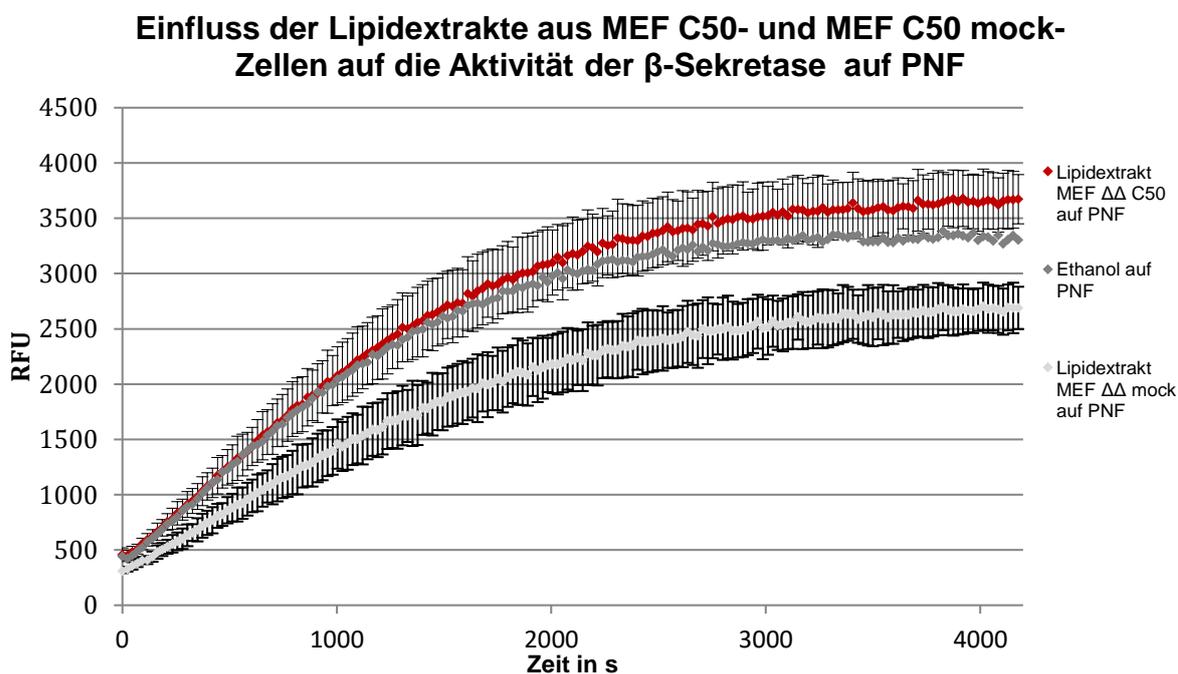


Abbildung 34:

Einfluss der Lipidextrakte (MEF $\Delta\Delta$ C50, MEF $\Delta\Delta$ mock) auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF aus MEF AWT-Zellen.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des β -Sekretase Substrat IV auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF $\Delta\Delta$ C50 beträgt 113% ($\pm 7,51\%$), für MEF $\Delta\Delta$ mock 85% ($\pm 6,4\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 6,2\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 28%, wobei die Signifikanz zwischen MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,001$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es wurde bewusst auf die Fehlerbalken der Lösungsmittelkontrolle verzichtet.

Es ist somit von einer direkten Regulation der β -Sekretase durch die eingesetzten Lipidextrakte auszugehen. Die Aktivität der β -Sekretase wurde durch die Inkubation von PNF mit den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen durchschnittlich um 23% im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen reduziert. Die Inkubation von PNF mit den Lipidextrakten aus MEF $\Delta\Delta$ mock- und MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen konnten diesen Einfluss mit einer größeren Effektstärke von 28% reproduzieren.

4.2.8.2. Einfluss der Lipidextrakte auf die Aktivität der γ -Sekretase

Neben der β -Sekretase wurde auch der Einfluss der Lipidextrakte auf die γ -Sekretase auf PNF untersucht. Hierfür wurde wie in 3.4.8 und 4.2.7 beschrieben vorgegangen. Die PNF wurden mit 10 μ M der Lipidextrakt von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 für 15 Minuten bei 37° auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung erfolgte unter der Verwendung von 6,25 μ M des γ -Sekretase Substrat in einem Safire II-Fluorometer mit den in 3.4.8 dargestellten Messparametern.

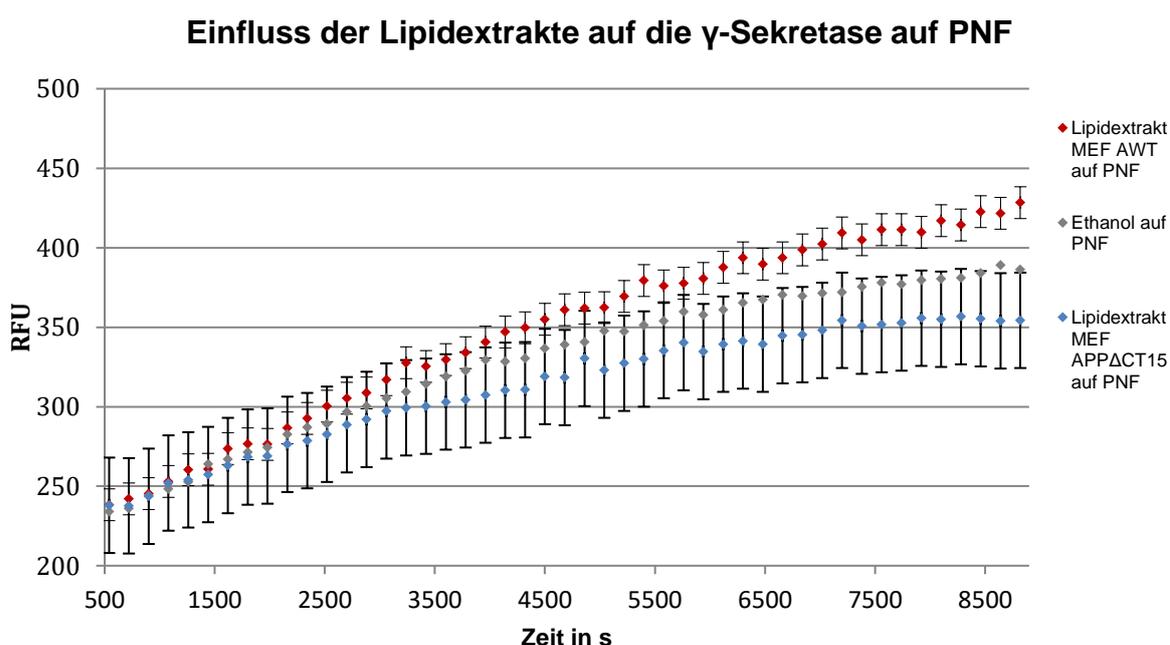


Abbildung 35:

Einfluss der Lipidextrakte (MEF AWT und MEF APP Δ CT15) auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF, die aus MEF AWT-Zellen generiert wurden.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des γ -Sekretase Substrats auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF AWT beträgt 125% (\pm 1,01%), für MEF APP Δ CT15 80% (\pm 5,98%). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% (\pm 12,1%) normiert, wobei n=3 für alle Gruppen.

Die Effektstärke beträgt 20%, wobei die Signifikanz zwischen MEF AWT und MEF APP Δ CT15 mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,001$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es wurde bewusst auf die Fehlerbalken der Lösungsmittelkontrolle verzichtet.

Es konnte ein signifikanter Effekt auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF durch die Inkubation mit Lipidextrakten beobachtet werden.

Die Inkubation der Lipidextrakte ergab für MEF AWT 125% ($\pm 1,01\%$) und für MEF APP Δ CT15 80% ($\pm 5,98\%$), was einer Effekstärke von 20% entspricht ($n = 3$, $p < 0,001$).

Die Lipidextrakte von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen regulieren also sowohl die Aktivität der β -Sekretase als auch der γ -Sekretase durch einen direkten Effekt.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt Zelllinien unabhängig ist, wurde der Einfluss der Lipidextrakte von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf die γ -Sekretase untersucht. Diese Lipidextrakte wurden abermals mit 10 μ M inkubiert und es wurde wie in 3.4.8 beschrieben vorgegangen.

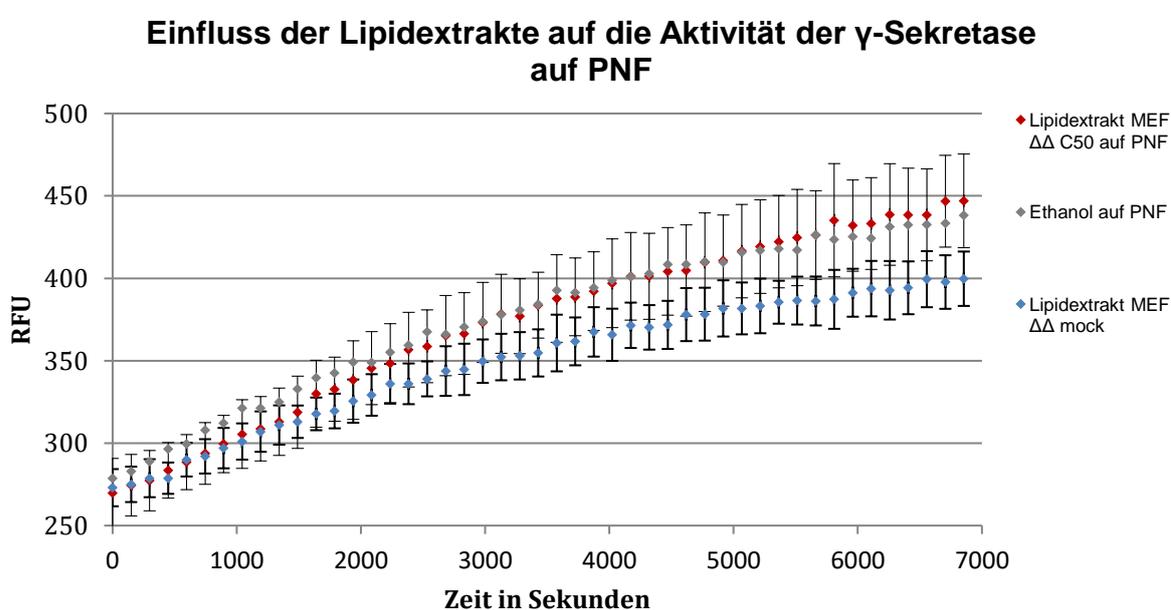


Abbildung 36:

Einfluss der Lipidextrakte MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF, die aus MEF AWT-Zellen generiert wurden.

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Lipidextrakte unter Verwendung des γ -Sekretase Substrats auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit MEF $\Delta\Delta$ C50 beträgt 115% ($\pm 8,18\%$), für MEF $\Delta\Delta$ mock 82% ($\pm 5,16\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 5,5\%$) normiert, wobei $n=4$ für alle Gruppen.

Die Effekstärke beträgt 33%, wobei die Signifikanz zwischen MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock mittels Post-Hoc-Test ermittelt wurde und $p \leq 0,001$. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

Die Lipidextrakte von MEF $\Delta\Delta$ C50- und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen haben einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF. Die Inkubation der PNF mit dem MEF $\Delta\Delta$ C50 Lipidextrakt führte zu einer Steigerung der proteolytischen Aktivität der γ -Sekretase auf 115% ($\pm 8,18\%$). Während die γ -Sekretase durch die Inkubation des Lipidextraktes aus MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen auf 82% ($\pm 5,16\%$) reduziert wurde ($n = 4$, $p < 0,001$).

Die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen reduzieren Gesamt-A β signifikant im Vergleich zu den Lipidextrakten von Wildtyp-Zellen und AICD-überexprimierenden Zellen. Passend zu einer Regulation der β -Sekretase wurde die sAPP β -Konzentration signifikant in abhängig der inkubierten Lipidextrakte beeinflusst. β -CTF zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen. Eine gleichzeitige Aktivitätssteigerung der β - und γ -Sekretase kann die beobachteten Effekte erklären. Tatsächlich lässt sich der Einfluss der Lipidextrakte auf die β - und γ -Sekretase auf lebenden Zellen und auf PNF beobachten. Die Effektstärke beträgt dabei in beiden Systemen ungefähr 20%. Eine direkte Regulation der β - und γ -Sekretase durch die Lipidextrakte liefert somit eine Erklärung für die beobachteten Effekte.

Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung der Genexpression nicht notwendig um den Effekt zu erklären. Die Genexpression der β -Sekretase und des γ -Sekretase wurden dennoch untersucht, da einzelne Lipidspezies einen publizierten Einfluss auf die Genexpression zeigen.

4.2.9. Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 auf die Genexpression

Der Einfluss der Lipidextrakte von MEF AWT- und MEF APP Δ CT15-Zellen auf die Genexpression wurde durch die Durchführung einer RT-PCR untersucht.

Linolsäure reduzierte die Presenelin1-Expression in einem Zellmodell (Liu Y. et al. 2004). Ebenso DHA führte in einem Zellmodell zu einer verringerten Expression von Presenelin1, während die Konzentration der Linolsäure nicht signifikant verändert war (Green et al. 2007).

Um zu überprüfen welchen Einfluss die Lipidextrakte auf die Genexpression der β -Sekretase und den γ -Sekretase Komplex haben, wurden SH-SY5Y WT-Zellen mit 10 μ M der Lipidextrakt von MEF AWT und MEF APP Δ CT15 für zwei Mal 12H inkubiert. Anschließend wurde die RNS aus den Zellen isoliert, ihre Konzentration und Reinheit wurde bestimmt und sie wurde in cDNS umgeschrieben (vgl. 3.3). Die Genexpression in der cDNS wurde wie in 3.3.4 beschrieben durch eine RT-PCR quantifiziert.

Die Quantifizierung der Genexpression zeigte eine signifikante Steigerung der Expression des Presenelin Enhancer-Gens auf 142% (\pm 27%) durch die Inkubation mit MEF APP Δ CT15 im Vergleich zu MEF AWT (n = 9, p = 0,0025).

Genexpression in Abhängigkeit der inkubierten Lipidextrakte

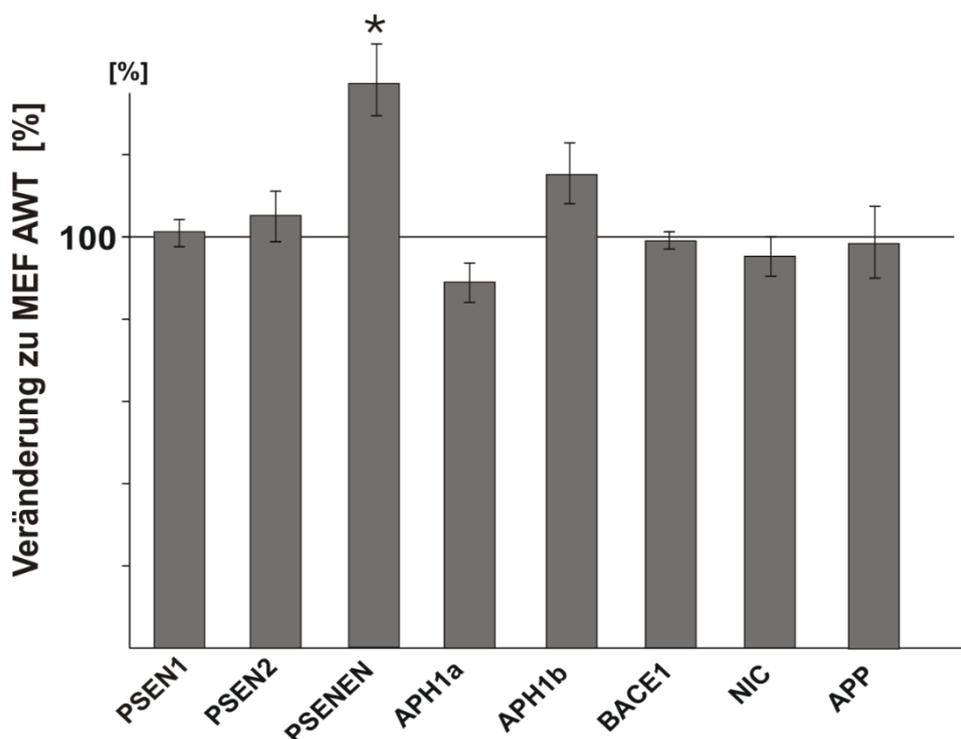


Abbildung 37:

Quantifizierung der Genexpression durch RT-PCR in Abhängigkeit der inkubierten Lipidextrakte

SH-SY5Y Wildtyp-Zellen wurden mit 10µM der Lipidextrakt von MEF AWT- und MEF APPΔCT15-Zellen inkubiert, wobei MEF AWT als Kontrolle designiert wurde. Die Ergebnisse wurden auf das Expressionsniveau von Actin normiert. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Inkubation des Lipidextraktes von MEF APPΔCT15-Zellen im Vergleich zu der Inkubation mit dem Lipidextrakt von MEF AWT-Zellen. Die Genexpression von PSENEN wurde durch die Inkubation auf 142% (±27%) im gesteigert, (n = 9, p < 0,05). Alle anderen Effekte sind nicht signifikant.

Die weiteren Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Gen	Expressionsniveau MEF APPΔCT15 im		
	Vergleich zu MEF AWT	Signifikanz	n-Zahl
Presenelin1 (PSEN1)	103% (±6,6%)	p= 0,54	9
Presenelin2 (PSEN2)	109% (±17,1%)	p= 0,54	9
Presenelin Enhancer (PSENEN)	142% (±27%)	p= 0,0025	9
Anterior pharynx defective 1 homolog A (APH1a)	88% (±11%)	p= 0,25	9

Anterior pharynx defective 1 homolog B (APH1b)	116% ($\pm 22,9\%$)	p= 0,2	9
β -site of APP cleaving enzyme (BACE1)	98% ($\pm 3,1\%$)	p= 0,28	9
Nicastrin (NIC)	94% ($\pm 12,6\%$)	p= 0,65	4
Amyloid precursor protein (APP)	98% ($\pm 25,4\%$)	p= 0,92	9

Die Auswertung zeigt eine isolierte Erhöhung der Genexpression des Presenelin Enhancer-Gens durch Inkubation mit dem Lipidextrakt der MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu der Inkubation mit dem Lipidextrakt von MEF AWT-Zellen. PSEN1 wurde hingegen durch die Inkubation mit den Lipidextrakten nicht signifikant reguliert.

Der isolierte Effekt der Lipidextrakte auf PSENEN macht einen Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase unwahrscheinlich. Zudem wurden keine Steigerung der Aktivität des γ -Sekretase Komplexes durch die Inkubation mit den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen beobachtet. Der Effekt war gegenteilig. Die Lipidextrakte von MEF APP Δ CT15-Zellen reduzierten die γ -Sekretase Aktivität

4.2.10. Zusammenfassung der Ergebnisse

AICD reguliert das Lipidprofil. Die massenspektrometrische Auswertung der Lipidextrakte zeigt, dass das Verhältnis der Fettsäuren in der Lipidspezies der Phosphatidylcholine in den Lipidextrakten von den AICD-defizienter Zellen zu den ungesättigten Fettsäuren verschoben ist. Ebenso ist die Konzentration der Plasmalogene reduziert, die DHA-Konzentration und der C22:6/C18:1-Quotient erhöht.

Sowohl die Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen als auch von MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen zeigten einen Einfluss auf das A β -Level, die sAPP β -Konzentration und die Sekretasenaktivität. Dieser Effekt konnte durch die Inkubation eines Lipidextraktes, der durch die Inkubation von APP Δ CT15-Zellen mit AICD50 gewonnen wurde, reproduziert werden.

Lipidextrakte von AICD-defizienten Zellen führten zu einer verringerten Aktivität der β - als auch der γ -Sekretase, während Lipidextrakte, die von AICD-(über)exprimierenden Zellen gewonnen wurden, zu einer Potenzierung der Sekretasenaktivität führten.

Dieser Effekt konnte sowohl auf lebenden Zellen als auch auf PNF demonstriert werden. Die Effektstärke des direkten und indirekten Effektes ist vergleichbar.

Bemerkenswerterweise konnte das Lipidprofil von MEF APP Δ CT15-Zellen durch die Inkubation von Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen verändert soweit verändert werden, dass die gemessene β - und γ -Sekretase Aktivität der von Wildtyp-Zellen entspricht. Gleichzeitig führte die Inkubation von MEF AWT-Zellen mit den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen zu einer Reduktion der β - und γ -Sekretase Aktivität auf das APP Δ CT15-Niveau. Die Genexpression der β -Sekretase wird nicht durch die Lipidextrakte reguliert. Die Genexpression des Presenelin-Enhancer Gens des γ -Sekretase-Komplexes wurde durch die Inkubation von SH-SY5Y Wildtyp-Zellen mit dem Lipidextrakt von APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu dem Lipidextrakt von MEF AWT-Zellen erhöht. Der A β -Katabolismus wurde durch die verwendeten Lipidextrakte nicht reguliert. Ebenso zeigten die Lipidextrakte keinen Einfluss auf die Proteinsekretion.

Die Lipidextrakte regulieren die β - und die γ -Sekretase vor allem über einen direkten Einfluss.

4.3. Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die APP-prozessierenden Sekretasen

4.3.1. Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die nicht-amyloidogene Prozessierung

Um den Einfluss der Xanthin-Derivate auf die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Wildtyp Zellen mit 100 μ M Caffein oder PPF inkubiert. Die Zellen wurden zwei Mal für je 12 Stunden mit den Additiven wie in 3.2.3 beschrieben inkubiert. Anschließend wurde die α -Sekretasen Aktivität kontinuierlich in Analogie zu 3.5.7 in einem Fluorometer bestimmt.

Es wurden 3 μ M des α -Substrates (Calbiochem, San Diego) eingesetzt und die folgenden Messparameter verwendet:

Erregung 340 \pm 10nm, Emission 490 \pm 10nm, 180 kinetische Zyklen, 37°C

In Anwesenheit von 100 μ M PPF oder Coffein war die Aktivität der α -Sekretase auf 127,22% \pm 6,01% ($p \leq 0,001$) und 127,51% \pm 11,57% ($p \leq 0,05$) respektiv erhöht im Vergleich zu Zellen, die nur mit Lösungsmittel inkubiert wurden.

Dieser Effekt konnte auf Cos7-Wildtyp Zellen, die von afrikanischen Grünaffen-Nieren gewonnen wurden (Grimm M. O. et al. 2005), reproduziert werden.

In Cos7-Wildtyp Zellen, die mit 100 μ M PPF inkubiert wurden, war die Aktivität der α -Sekretase im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf 118.9% \pm 5.2%, bei einem $p \leq 0.05$, gesteigert.

Alpha Sekretase Aktivität auf lebenden Zellen

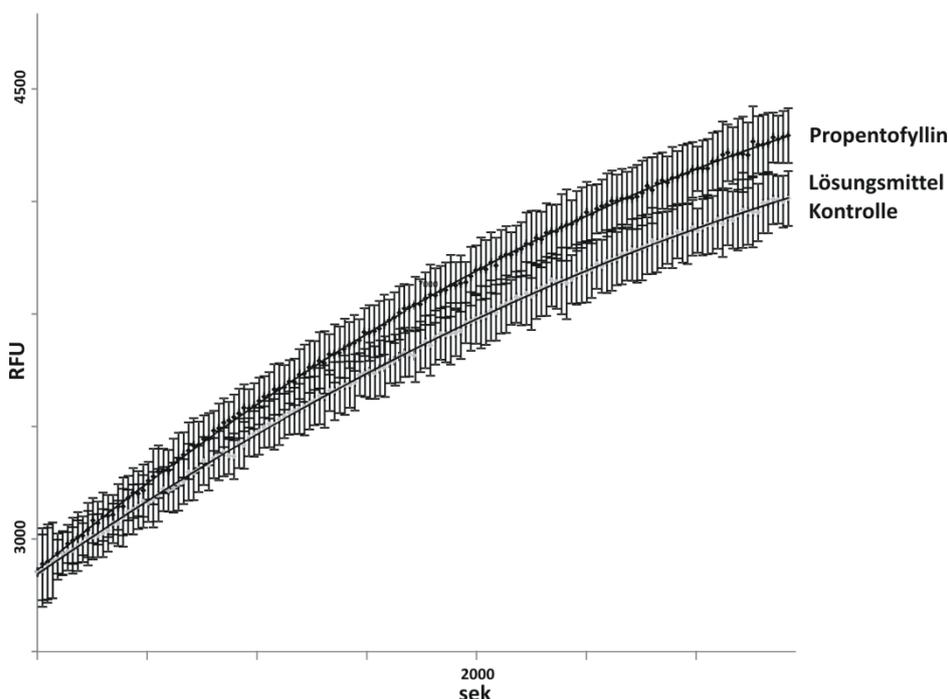


Abbildung 37: Einfluss von PPF auf die Aktivität der α -Sekretase auf lebenden Zellen.

SH-SY5Y-Wildtyp Zellen, die für 24H mit 100 μ M PPF inkubiert wurden, zeigten eine gesteigerte α -Sekretasen Aktivität auf 127,22% \pm 6,01% ($p \leq 0,001$, $n = 24$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Um den vermuteten Einfluss von Coffein und PPF auf die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP weiter zu untersuchen, wurde der sAPP α -Gehalt aus dem konditionierten Medium von behandelten und unbehandelten SH-SY5Y APP-Zellen (vgl. 3.1.2) durch eine Western-Blot Analyse bestimmt. Die Western-Blot Analyse und die Vorbereitung der Zellen wurden wie in 3.5 beschrieben durchgeführt. Die Inkubation von SH-SY5Y APP-Zellen mit Coffein führte zu einer erhöhten sAPP α -Konzentration auf 134,95% \pm 10,69% ($p \leq 0.001$), während PPF den sAPP α -Gehalt auf 138,79% \pm 5.7% ($p \leq 0.001$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte.

Cos7 Zellen, die stabil mit APP695 transfiziert und mit 100 μ M PPF inkubiert wurden, zeigten einen signifikant erhöhten sAPP α -Gehalt von 121.2% \pm 5.1%, wobei $p \leq 0,05$. Dies erhärtet einen Zelllinien unabhängigen Effekt.

sAPP-a Protein-Konzentration

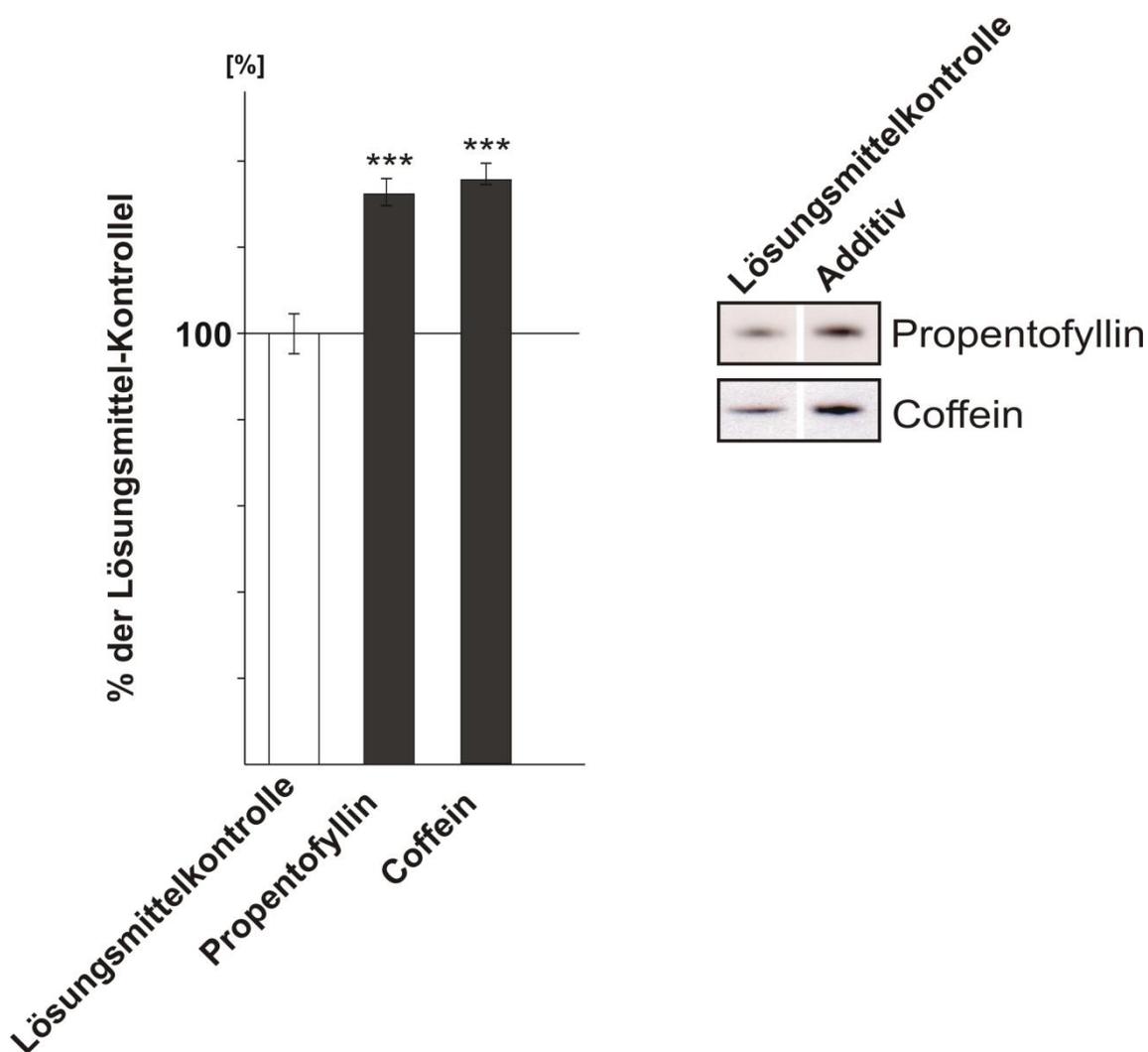


Abbildung 38: Einfluss von Propentofyllin und Coffein auf die sAPP α .

SH-SY5Y APP-Zellen, die für 24H mit 100 μ M PPF oder Coffein inkubiert wurden, zeigten einen signifikant erhöhten sAPP α -Gehalt von 138,79% \pm 5,7% ($p \leq 0,001$, $n = 8$) und 134,95% \pm 10,69% ($p \leq 0,001$) respektiv im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Um herauszuarbeiten, ob der beobachtete Effekt auf die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung auf einen direkten oder indirekten Einfluss der Derivate auf die α -Sekretase beruht wurde die α -Sekretasen Aktivität auf post-nukleären Membran Fraktionen, wie in 3.5.8 beschrieben, bestimmt. Es wurden die identischen Messparameter wie oben beschrieben verwendet.

Die Inkubation zellulärer Fragmente mit 100 μ M PPF führte zu einer Aktivitätssteigerung der α -Sekretase auf 127,76% \pm 5,26% ($p \leq 0,01$), während die Inkubation mit Coffein die Aktivität auf 127,64% \pm 8,78% ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte. Da die Funktion des Nukleus in PNF ausgeschaltet ist, sind die beobachteten Effekte auf einen direkten Effekt der Derivate auf die α -Sekretase zurückzuführen.

4.3.2. Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf Gesamt A β und die amyloidogene APP-Prozessierung

Die Konzentration von Gesamt A β wird durch die A β -Synthese durch die amyloidogene Prozessierung und durch A β -abbauende Mechanismen wie A β -degradierende Enzyme oder Transportmechanismen bestimmt. Basierend auf den beobachteten Effekten der Xanthine auf die nicht-amyloidogene Prozessierung durch die α -Sekretase ist eine Reduktion des Gesamt A β zu erwarten, vorausgesetzt A β -degradierende Mechanismen sind unverändert und die Aktivität der β -Sekretase ist unverändert oder verringert.

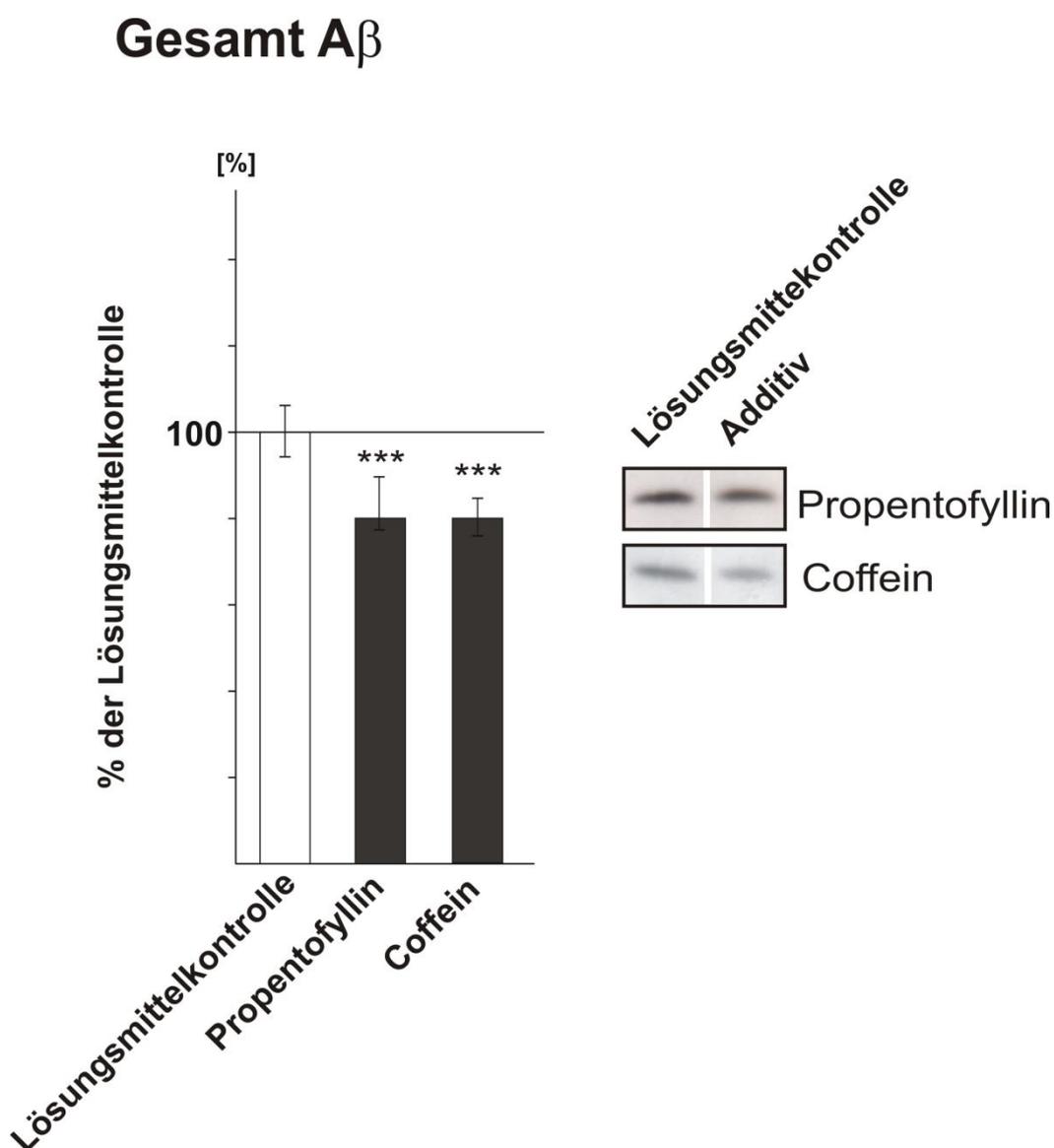


Abbildung 39: Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf Gesamt A β .

SH-SY5Y APP-Zellen wurden für 24H mit 100 μ M Coffein oder PPF inkubiert. Eine Immunpräzipitation und anschließende Quantifizierung des Gesamt A β durch Western-Blot Analyse bestätigten, dass Coffein und PPF Gesamt A β auf 80,41% \pm 6,53% ($p \leq 0,05$, $n = 12$) und 80,26% \pm 17,7% ($p \leq 0,001$) respektiv im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduzieren.

Tatsächlich ist die Gesamt A β -Konzentration in Zellen, die mit 100 μ M Coffein oder PPF inkubiert wurden reduziert.

SH-SY5Y APP-Zellen wurden für 24H wie in 3.2.3 beschrieben inkubiert und eine Western-Blot Analyse mit vorrausgegangener Immunpräzipitation wurde analog zu 3.5.1 bis 3.5.5 durchgeführt. Das gemessene Gesamt A β der mit Coffein inkubierten Zellen war auf 80,41% \pm 6,53% ($p \leq 0,05$) reduziert während PPF zu einer Reduktion des Gesamt A β auf 80,26% \pm 17,7% ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führte. In Analogie führte die Inkubation mit PPF in Cos7-Zellen, die stabil mit APP695 transfiziert wurden, zu einer Reduktion des Gesamt A β auf 70.8% \pm 6.5%, wobei $p \leq 0.05$. Zur Detektion von A β wurde der W02-Antikörper verwendet. W02 erkennt die Aminosäuren 1 bis 10 des A β -Peptides und unterscheidet somit nicht zwischen A β 40 und A β 42. Da die A β Synthese sowohl durch die β - als auch durch die γ -Sekretase reguliert wird, wurden beide Enzym individuell untersucht.

Die Aktivität der β -Sekretase wurde wie in 3.5.7 beschrieben in lebenden Zellen bestimmt. Dafür wurden SH-SY5Y Wildtyp-Zellen für 24H mit den Additiven behandelt und die β -Sekretase Aktivität wurde fluorometrisch quantifiziert. Zellen, die mit PPF oder Coffein behandelt wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Aktivität der β -Sekretase. Die Behandlung mit PPF reduzierte die Enzym-Aktivität auf 73.8% \pm 3.2% ($p \leq 0.001$), Coffein auf 83,15% \pm 12,2% ($p \leq 0.001$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Um zu zeigen, dass der beobachtete Effekt nicht auf eine Zelllinie begrenzt ist wurden ebenfalls Cos7 Wildtyp-Zellen mit PPF inkubiert und die β -Sekretase Aktivität gemessen. PPF verringerte dabei die Enzym-Aktivität auf 70.0% \pm 4.8% ($p \leq 0.001$). Der Effekt auf die β -Sekretase ist ebenfalls Zelllinien unabhängig.

Beta-Sekretase Aktivität auf lebenden Zellen

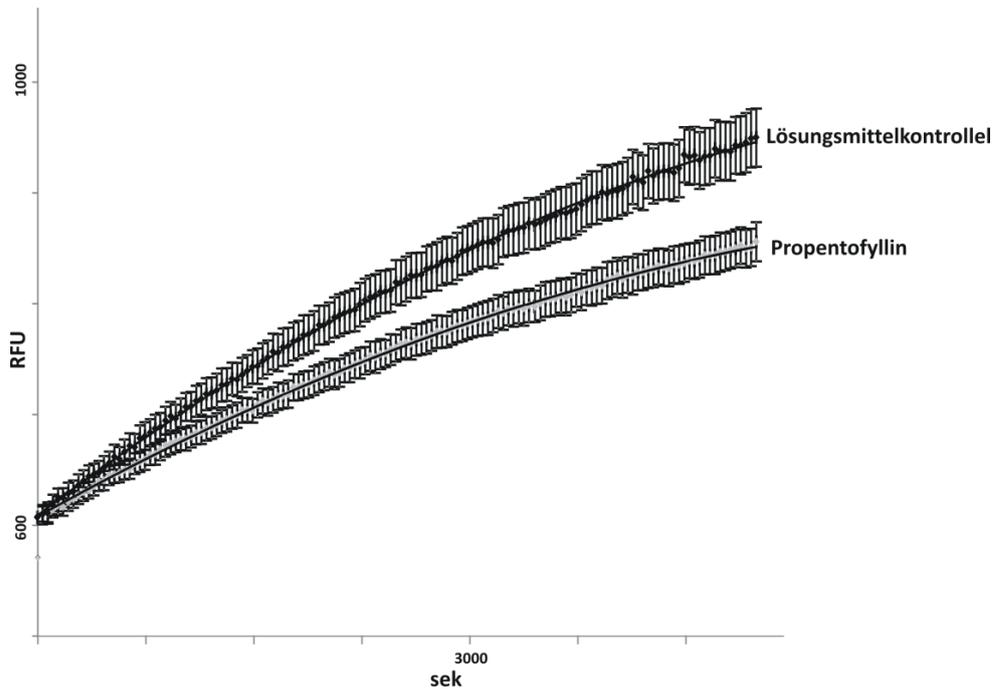


Abbildung 40: Einfluss von PPF auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen. SH-SY5Y-Wildtyp Zellen, die für 24H mit 100 μ M PPF inkubiert wurden, zeigten eine reduzierte β -Sekretasen Aktivität auf 73,8% \pm 3,2% ($p \leq 0.001$, $n = 20$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Beta-Sekretasen Aktivität auf lebenden Zellen

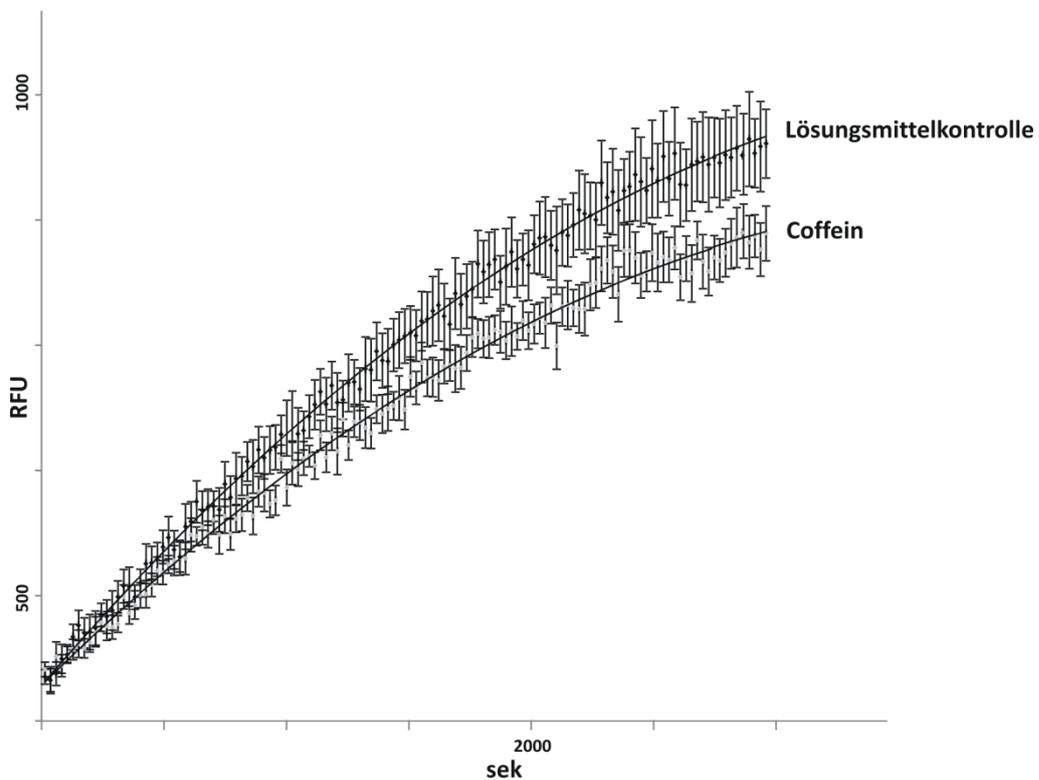


Abbildung 41: Einfluss von Coffein auf die Aktivität der β -Sekretase auf lebenden Zellen. SH-SY5Y-Wildtyp Zellen, die für 24H mit 100 μ M Coffein inkubiert wurden, zeigten eine reduzierte β -Sekretasen Aktivität auf 83,15% \pm 12,2% ($p \leq 0.001$, $n = 20$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

In Analogie zu den beobachteten Effekten auf die β -Sekretase wurde ebenfalls sAPP β bestimmt. Der sAPP β -Gehalt wurden aus konditioniertem Medium von SH-SY5Y APP695-Zellen, die für 24H mit 100 μ M des jeweiligen Additives behandelt wurden, detektiert. Als Antikörper wurde der in 3.1.3 beschriebene Anti-sAPP β Antikörper verwendet. Dieser Antikörper erkennt das ISEVKM-Peptid, das im C-Terminus von humanem sAPP β situiert ist. Die Behandlung der Zellen mit PFF führte zu einer signifikanten Reduktion von sAPP β auf 84.9% \pm 2.2%, wobei $p \leq 0.001$. Coffein verringerte ebenfalls sAPP β auf 84,25 % \pm 2.64%, wobei $p \leq 0.01$.

sAPPb Protein Konzentration

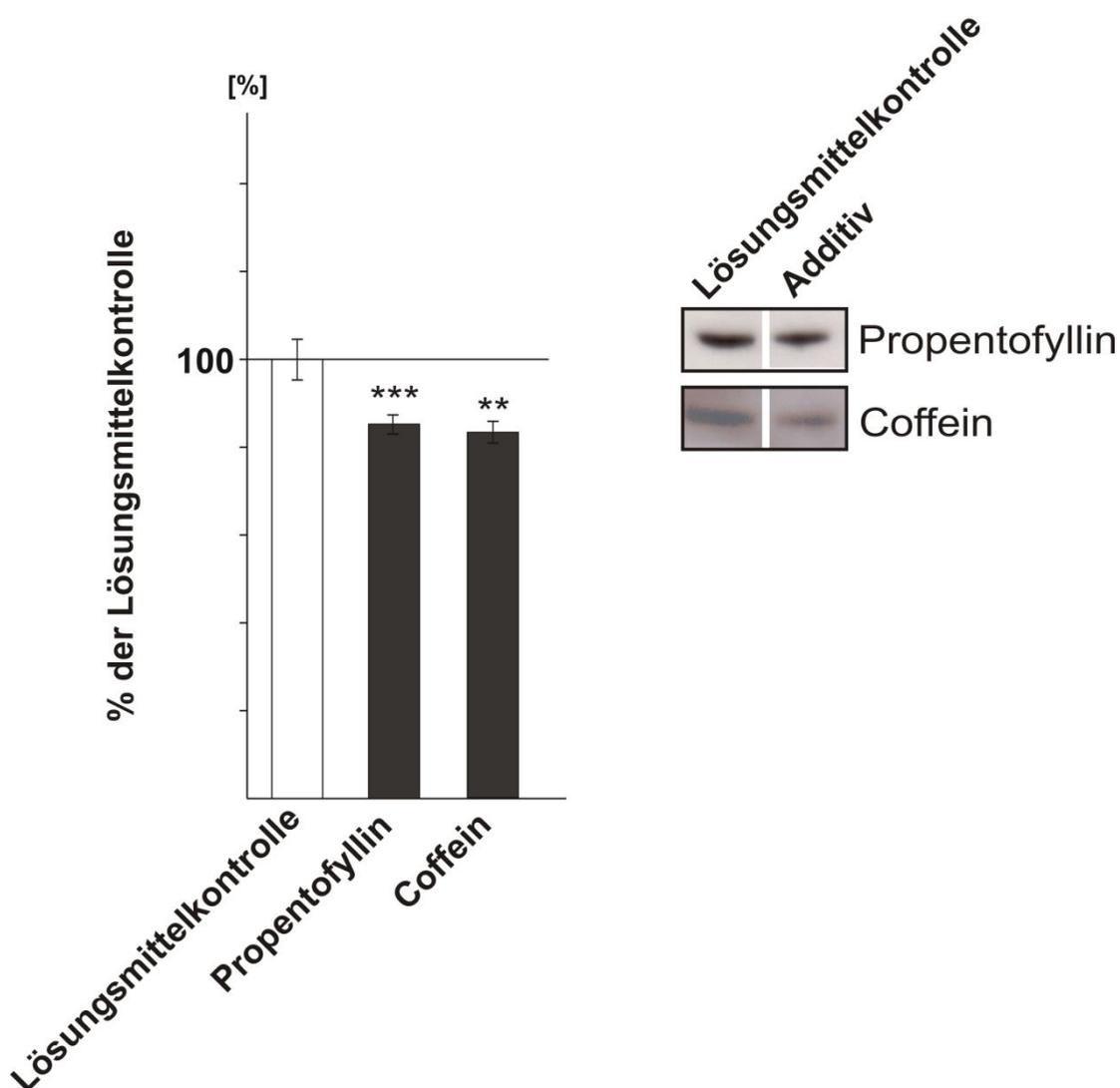


Abbildung 42: Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf sAPP β .

SH-SY5Y APP-Zellen wurden für 24H mit 100 μ M Coffein oder PPF inkubiert. sAPP β wurde mittel Western-Blot Analyse aus konditioniertem Medium quantifiziert. PPF und Coffein reduzierten sAPP β auf 84.9% \pm 2.2% ($p \leq 0.001$) und 84,25 % \pm 2.64% ($p \leq 0.01$, n =8) respektiv.

Um den beobachteten Effekt mechanistisch aufzuarbeiten, wurde die Aktivität der β -Sekretase ebenfalls auf PNF bestimmt. Die analog zu 3.5.8 bestimmte Aktivität der β -Sekretase wurde durch Coffein und PPF respektiv auf $83,04\% \pm 1,67\%$ ($p \leq 0,05$) und $83,57\% \pm 12,08\%$ ($p \leq 0,001$) reduziert und impliziert einen direkten Einfluss der Xanthin Derivate auf die APP-prozessierenden Sekretasen.

Weiterhin wurde die γ -Sekretaseaktivität auf lebenden Zellen, wie in 3.5.7 beschrieben, bestimmt. SH-SY5Y Wildtyp-Zellen wurden für 24H mit $100\mu\text{M}$ der beiden Additive inkubiert. Bemerkenswerterweise blieb die Aktivität der γ -Sekretase durch die Behandlung mit Coffein und PPF weitgehend unverändert (PPF: $100,4\% \pm 11,7\%$, $p = 0,9777$, Caffeine: $95,07\% \pm 17,11\%$, $p = 0,3905$).

Gamma Sekretase Aktivität auf lebenden Zellen

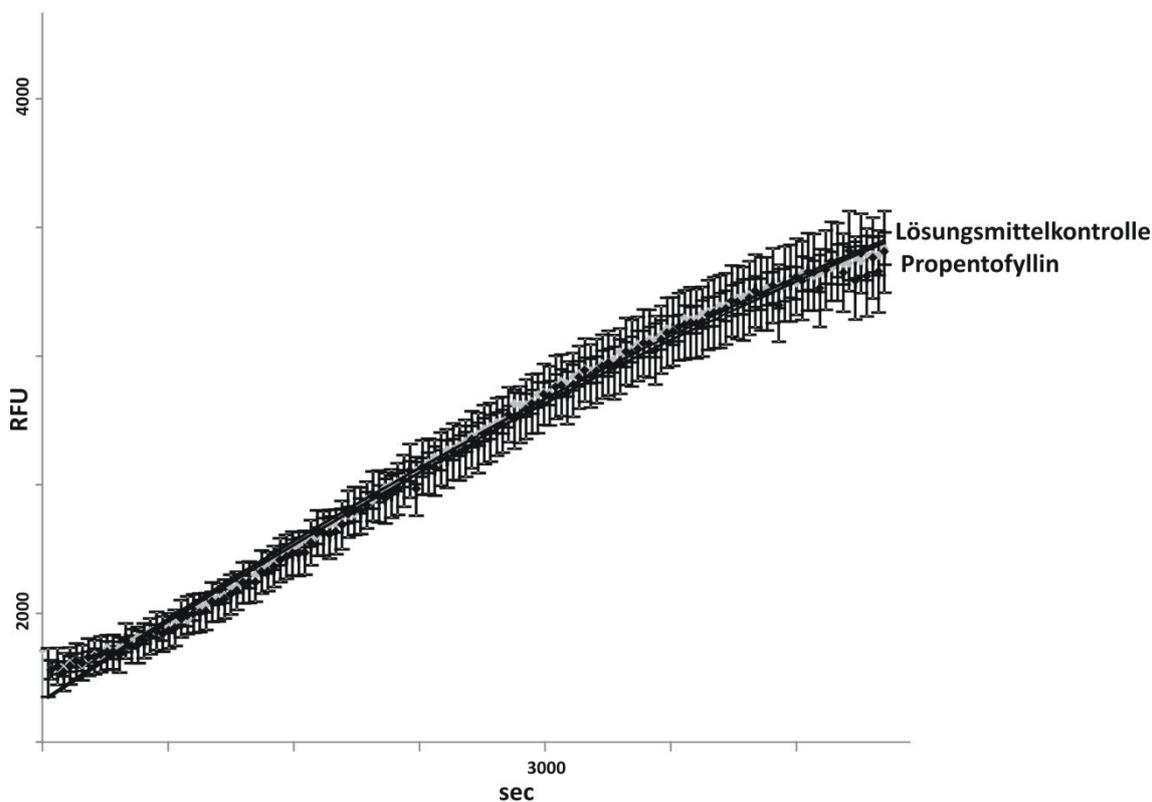


Abbildung 43: Einfluss von PPF auf die Aktivität der γ -Sekretase auf lebenden Zellen.

SH-SY5Y-Wildtyp Zellen, die für 24H mit $100\mu\text{M}$ PPF zeigten keine signifikante Veränderung der γ -Sekretasenaktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (PPF: $100,4\% \pm 11,7\%$, $p = 0,9777$, $n = 20$).

Wie bereits beschrieben ist die Gesamt $A\beta$ -Konzentration nicht nur von dem $A\beta$ -Anabolismus durch die amyloidogene APP-Prozessierung, sondern auch von dem $A\beta$ -Katabolismus abhängig. Eine erhöhte $A\beta$ -Degradation könnte daher auch zu der beobachteten Reduktion von $A\beta$ führen.

Daher wurde die Gesamt A β -Degradation analog zu der Dissertation von Dr. J. Mett 2017, Universität des Saarlandes, quantifiziert. 100 μ M PPF oder Coffein wurden zusammen mit synthetischem, humanen A β 40 für 6 Stunden auf N2a-Zellen (vgl. 3.1.2) inkubiert. Anschließend wurde der W02-Antikörper eingesetzt um das synthetische A β 40 Peptid zu detektieren. Da der W02-Antikörper das endogene Maus A β nicht bindet, wird nur das hinzugefügte, humane A β detektiert. Das verbleibende A β 40 war in N2a-Zellen, die mit PPF oder Coffein inkubiert wurden nicht signifikant beeinflusst.

4.4. Ergebnisse zu weiteren Projekten im Rahmen von Kooperationen

Im folgenden Kapitel werden Ergebnisse dargestellt, die im Rahmen weiterer, kooperativer Projekte generiert und teilweise bereits publiziert wurden.

4.4.1. Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Sekretasenaktivität auf PNF

Die im folgenden Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert:

Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's disease

Marcus O. W. Grimm*, Liesa Regner*, Janine Mett, Christoph P. Stahlmann, Pascal Schorr, **Christopher Nelke**, Olga Streidenberger, Hannah Stoetzel, Jakob Winkler, Shatha R. Zaidan, Andrea Thiel, Kristina Endres, Heike S. Grimm, Dietrich A. Volmer and Tobias Hartmann. *Int. J. Mol. Sci.* 2016 Nov; 17(11): 1809.

**Erst-Autoren*

AD zeichnet sich neben amyloiden Ablagerungen durch den vermehrten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies (engl. „Reactive oxygen species“, ROS) aus.

Vitamin E hat neuroprotektive Eigenschaften und verschiedene Studien suggerieren, dass Vitamin E mit einem protektiven Effekt in Bezug auf AD assoziiert ist (La Fata et al. 2014, Mangialasche et al. 2009, Ricciarelli et al. 2007, Xia and Mo 2016). Dennoch ist die epidemiologische Studienlage in Bezug auf Vitamin E und AD heterogen.

Um den Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase zu untersuchen wurden PNF, die aus SH-SY5Y WT-Zellen gewonnen wurden, entweder mit 10 μ M α -Tocotrienol oder Tocopherol inkubiert und mit einer Ethanol-Kontrolle verglichen. (vgl. 3.4.8).

Die Aktivität der β - und γ -Sekretase wurde durch die Zugabe des entsprechenden Substrates und anschließender Messung quantifiziert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

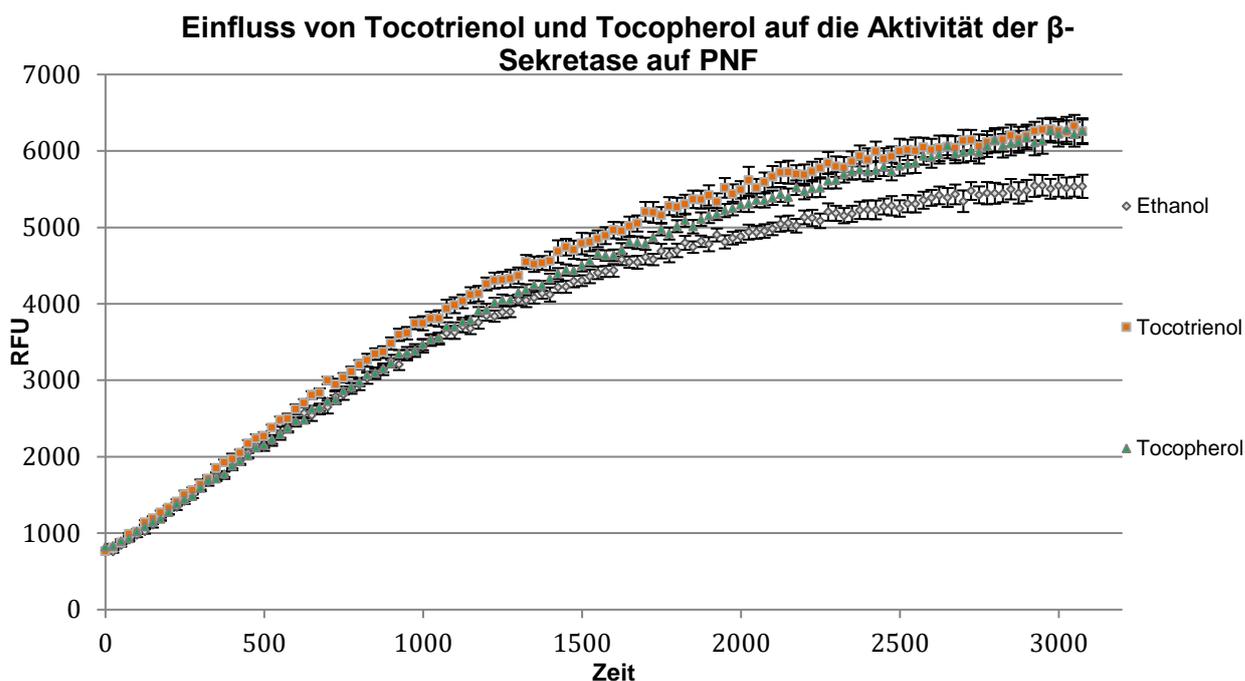


Abbildung 44: Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Aktivität der β -Sekretase auf PNF

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Additive unter Verwendung des β -Sekretase Substrat IV auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit Tocotrienol beträgt 116% ($\pm 7,34\%$), für Tocopherol 117% ($\pm 8,03\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 9,4\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Signifikanz zwischen Tocotrienol und Ethanol, sowie Tocopherol und Ethanol wurde mittels zweiseitigen T-Test ermittelt und beträgt jeweils $p < 0,01$.

Sowohl α -Tocopherol als auch α -Tocotrienol zeigten einen direkten Einfluss auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase. α -Tocopherol und α -Tocotrienol steigerten die Aktivität der β -Sekretase um 17% im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle ($p < 0,01$), während die Aktivität der γ -Sekretase um 19% für Tocotrienol und um 23% für Tocopherol im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle ($p < 0,05$, $n = 6$) gesteigert wurde.

α -Tocopherol als auch α -Tocotrienol üben also einen signifikanten, direkten Effekt auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase aus.

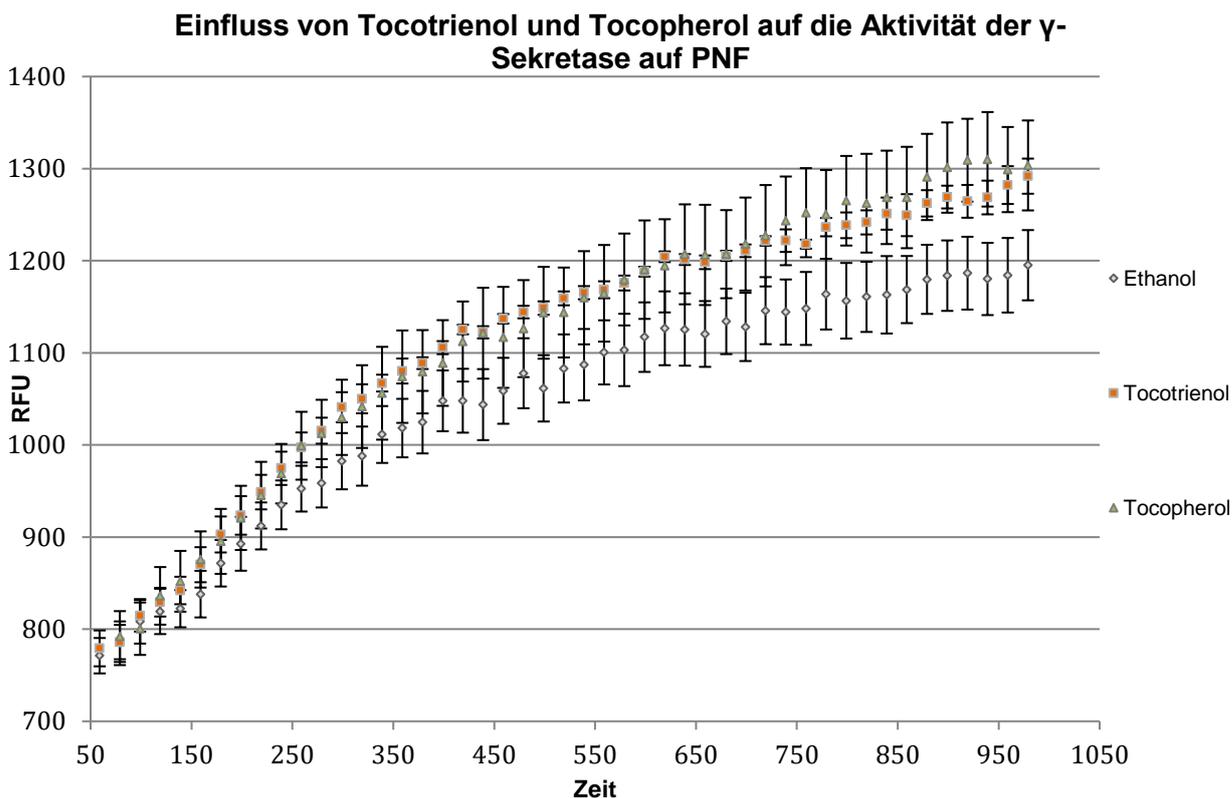


Abbildung 45: Einfluss von Tocotrienol und Tocopherol auf die Aktivität der γ -Sekretase auf PNF

Dargestellt ist die Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Zeit und der inkubierten Additive unter Verwendung des γ -Sekretase Substrats auf Post-Nuklearen-Fractionen.

Die Mittelwerte wurden anhand der Steigung errechnet. Der Mittelwert für die Inkubation mit Tocotrienol beträgt 118% ($\pm 11,17\%$), für Tocopherol 123% ($\pm 12,61\%$). Die Ethanol-Kontrolle wurde auf 100% ($\pm 12,71\%$) normiert, wobei $n=6$ für alle Gruppen.

Die Signifikanz zwischen Tocotrienol und Ethanol sowie Tocopherol und Ethanol wurde mittels zweiseitigen T-Test ermittelt und beträgt $p < 0,05$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass α -Tocopherol und α -Tocotrienol die Formation von ROS und die Cholesterin-Konzentration reduzierten, wobei der Effekt von α -Tocotrienol stärker ausgeprägt war. Es ist anzunehmen, dass sowohl eine Reduktion des ROS- als auch des Cholesterin-Levels einen protektiven Effekt gegenüber AD ausüben. Gleichzeitig stimulieren α -Tocopherol und α -Tocotrienol aber auch die amyloidogene Prozessierung und führen so zu einer verstärkten Amyloid-Belastung. Diese gegensätzlichen Effekte können eine Erklärung für die heterogene Studienlage liefern.

4.4.2. Einfluss von Vitamin D auf das Lipidprofil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss von Vitamin D sowohl auf die APP-Prozessierung als auch auf das Lipidprofil untersucht.

Die Ergebnisse, die den Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung beschreiben, wurden im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert:

Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β ($A\beta$) Formation and Increase $A\beta$ -Degradation

Marcus O. W. Grimm*, Andrea Thiel*, Anna A. Lauer, Jakob Winkler, Johannes Lehmann, Liesa Regner, **Christopher Nelke**, Daniel Janitschke, Céline Benoist, Olga Streidenberger, Hannah Stötzel, Kristina Endres, Christian Herr, Christoph Beisswenger, Heike S. Grimm, Robert Bals, Frank Lammert, and Tobias Hartmann. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec; 18(12): 2764.

*Erst-Autoren

Die Vitamin D Hypovitaminose betrifft bis zu 85% der älteren Bevölkerung und wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien in Zusammenhang mit AD gebracht (Aghajafari et al. 2018, Annweiler et al. 2011, Balion et al. 2012, Dickens et al. 2011, Grimm M. O. et al. 2016b, Lopes da Silva et al. 2014, Mangialasche et al. 2012, Owusu et al. 2018). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Vitamin D Defizit zu einer erhöhten $A\beta$ -Akkumulation, aufgrund einer Potenzierung der amyloidogenen APP-Prozessierung und einer gleichzeitig verringerten $A\beta$ -Degradation, führt (Grimm M. O. et al. 2014).

Trotz der steigenden – und kontrovers diskutierten – Bedeutung von Vitamin D ist immernoch wenig über den Zusammenhang von Vitamin D und der Lipidhomöostase bekannt. Daher wurden SH-SY5Y wt-Zellen für zwei Mal 12 Stunden mit 100nM 25-OH Vitamin D3 (Calcifediol) inkubiert und analog zu 4.1.2 massenspektrometrisch analysiert.

Hierbei wurden die Lipidspezies der Phosphatidylcholine (PC aa), Phosphotidylcholin Plasmalogene (PC ae), Carnitine, lysierten Phosphatidylcholine und Sphingomyeline untersucht.

Die Carnitine, Sphingomyeline und lysierten Phosphatidylcholine zeigten keine signifikanten Veränderungen und wurden deshalb aufgrund der Fülle an Daten im Anhang dargestellt.

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung der massenspektrometrisch erhobenen Daten der Phosphatidylcholine tabellarisch dargestellt.

Einfluss von Vitamin D auf die PC aa

	Kontrolle			Vitamin D			p-Wert
	Intensität	%	SEM %	Intensität	%	SEM %	
PC aa total	47,40	100,00	23,86	32,21	67,95	16,05	0,085
PC aa saturiert	7,64	100,00	23,73	5,04	65,97	14,02	0,061
PC aa unsaturiert	38,00	100,00	24,00	26,03	68,49	16,45	0,091
PC aa CX:1	22,50	100,00	24,86	15,60	69,33	17,52	0,111
PC aa CX:2	11,46	100,00	22,63	7,87	68,68	15,68	0,081
PC aa CX:3	1,93	100,00	23,86	1,25	64,74	14,36	0,059
PC aa CX:4	1,37	100,00	24,89	0,88	64,19	14,68	0,061
PC aa CX:5	0,56	100,00	26,95	0,32	58,07	10,94	0,034*
PC aa CX:6	0,18	100,00	30,89	0,10	57,20	10,64	0,041*
PC aa C20:0	0,01	100,00	11,67	0,01	76,81	10,55	0,040
PC aa C24:0	0,01	100,00	48,32	0,01	50,59	9,52	0,095
PC aa C26:0	0,04	100,00	38,87	0,02	52,30	5,59	0,054
PC aa C28:0	0,26	100,00	25,82	0,16	62,94	11,97	0,049*
PC aa C28:1	0,07	100,00	25,49	0,04	58,06	6,23	0,022*
PC aa C30:0	2,25	100,00	25,04	1,46	65,22	14,67	0,067
PC aa C30:2	0,15	100,00	27,22	0,09	62,07	10,73	0,048*
PC aa C32:0	4,74	100,00	22,99	3,13	66,08	13,27	0,055
PC aa C32:1	7,06	100,00	23,46	4,66	65,92	14,14	0,060
PC aa C32:2	1,51	100,00	22,52	0,98	65,05	11,20	0,041*
PC aa C32:3	0,14	100,00	26,28	0,08	57,60	7,16	0,025*
PC aa C34:1	12,75	100,00	25,09	8,89	69,67	17,91	0,118
PC aa C34:2	4,80	100,00	23,59	3,16	65,83	15,25	0,066
PC aa C34:3	0,72	100,00	26,09	0,45	62,68	11,16	0,047
PC aa C34:4	0,07	100,00	25,99	0,04	59,36	12,50	0,038
PC aa C36:0	0,25	100,00	24,81	0,19	78,21	28,61	0,342
PC aa C36:1	2,45	100,00	28,02	1,89	77,40	25,48	0,315
PC aa C36:2	4,93	100,00	22,05	3,58	72,65	17,65	0,126
PC aa C36:3	1,65	100,00	24,64	1,08	65,59	13,60	0,062
PC aa C36:4	0,36	100,00	26,81	0,22	62,23	13,38	0,055
PC aa C36:5	0,08	100,00	29,17	0,04	53,96	7,88	0,027*
PC aa C36:6	0,03	100,00	23,08	0,02	59,66	10,26	0,025*
PC aa C38:0	0,07	100,00	37,47	0,04	61,21	17,31	0,121
PC aa C38:1	0,13	100,00	25,00	0,10	73,64	24,88	0,225
PC aa C38:3	0,89	100,00	21,38	0,59	65,53	18,34	0,070
PC aa C38:4	0,64	100,00	26,07	0,41	64,48	15,78	0,073
PC aa C38:5	0,27	100,00	29,43	0,15	56,46	11,60	0,040*

PC aa C38:6	0,11	100,00	32,03	0,06	53,33	10,25	0,038*
PC aa C40:0	0,02	100,00	25,07	0,01	59,40	14,90	0,042*
PC aa C40:1	0,02	100,00	26,16	0,02	72,41	23,22	0,199
PC aa C40:2	0,06	100,00	23,59	0,05	77,78	20,86	0,243
PC aa C40:3	0,18	100,00	22,21	0,13	74,83	20,59	0,182
PC aa C40:4	0,28	100,00	21,25	0,19	66,82	14,16	0,054
PC aa C40:5	0,17	100,00	23,66	0,10	61,00	10,67	0,031*
PC aa C40:6	0,12	100,00	32,44	0,07	55,86	11,06	0,048*
PC aa C42:0	0,00	100,00	26,45	0,00	59,65	13,30	0,043*
PC aa C42:1	0,01	100,00	10,11	0,01	79,43	20,22	0,172
PC aa C42:2	0,01	100,00	27,64	0,01	73,21	21,70	0,208
PC aa C42:4	0,03	100,00	19,04	0,02	67,93	17,48	0,068
PC aa C42:5	0,04	100,00	21,11	0,03	63,96	14,55	0,043*
PC aa C42:6	0,03	100,00	30,50	0,02	59,81	11,44	0,056
PC aa C44:0	0,00	100,00	12,72	0,00	84,50	31,54	0,466
PC aa C48:0	0,00	100,00	20,62	0,00	73,28	14,95	0,101

Die erste Spalte denotiert die untersuchten Lipidspezies. Dabei wird werden die Anzahl der Kohlenstoffatome vor dem Doppelpunkt, die Anzahl der Doppelbindungen hinter dem Doppelpunkt angegeben. Spalte 2 und 5 zeigen die gemessene Intensität als absoluten Wert; Spalte 3 und 6 als relativen Wert. In Spalte 4 und 7 ist die Standardabweichung vom Mittelwert angegeben und in Spalte 8 der durch einen Student´s T-Test bestimmte p-Wert. Signifikante Ergebnisse wurden rot unterlegt. Es wurden jeweils 4 Proben untersucht.

Die einzelnen Lipidextrakte wurden unter Beigabe eines Lipid-Standards gemessen und auf selbigen normiert.

Die massenspektrometrische Auswertung der PC aa zeigt, dass einzelne Lipidspezies signifikant verändert sind. Interessanterweise konnte eine signifikante Reduktion der fünf- und sechsfach ungesättigten Fettsäuren in Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, beobachtet werden. Die Effektstärke beträgt dabei 41,03% für fünffach ungesättigte Fettsäuren und 42,8% für sechsfach ungesättigte Fettsäuren. Neben den mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind auch kurze, gesättigte Fettsäuren wie C20:0 und C28:0 signifikant reduziert. Ebenfalls sind die Lipidspezies C30:2 und C32:2 verändert. Dabei handelt es sich um kurze Lipide, die am ehesten aus C16:1, bzw. C14:1 Fettsäuren bestehen. Einzelne signifikant veränderte Lipidspezies, die keiner Systematik folgen, sollten kritisch betrachtet werden, da die massenspektrometrisch detektierten PC aa der Vitamin D behandelten Zellen insgesamt um circa 30% reduziert sind und Signifikanzen einen mathematischen und keinen biologischen Ursprung haben könnten.

Einfluss von Vitamin D auf die PC ae

	Kontrolle			Vitamin D			p
	Intensität	%	SEM %	Intensität	%	SEM %	
PC ae total	72,23	100,0 0	5,10	67,02	92,79	6,03	0,083
PC ae saturated	6,96	100,0 0	9,58	6,68	96,08	7,60	0,083
PC ae unsaturated	65,30	100,0 0	4,58	60,27	92,29	5,86	0,084
PC ae CX:1	30,19	100,0 0	10,33	28,45	94,24	6,87	0,103
PC ae CX:2	17,75	100,0 0	7,55	16,78	94,52	7,07	0,104
PC ae CX:3	8,80	100,0 0	4,48	8,14	92,50	4,31	0,113
PC ae CX:4	4,36	100,0 0	7,94	3,76	86,30	4,15	0,119
PC ae CX:5	2,89	100,0 0	8,65	2,17	75,00	3,61	0,107
PC ae CX:6	1,31	100,0 0	12,01	0,97	73,92	3,20	0,118
PC ae C30:0	2,42	100,0 0	14,09	1,86	76,72	6,25	0,051
PC ae C30:1	0,86	100,0 0	15,41	0,69	80,71	7,92	0,124
PC ae C30:2	0,11	100,0 0	20,49	0,07	60,69	4,13	0,022*
PC ae C32:1	12,23	100,0 0	14,93	9,68	79,18	7,29	0,138
PC ae C32:2	2,14	100,0 0	5,79	1,75	82,19	6,36	0,025
PC ae C34:0	6,65	100,0 0	9,32	5,18	77,80	8,70	0,114
PC ae C34:1	28,48	100,0 0	7,84	22,24	78,08	6,61	0,076
PC ae C34:2	9,13	100,0 0	8,35	7,55	82,68	4,76	0,101
PC ae C34:3	1,54	100,0 0	3,95	1,19	77,10	4,59	0,026*
PC ae C36:0	1,49	100,0 0	16,58	1,21	81,20	10,30	0,151
PC ae C36:1	5,87	100,0 0	14,26	4,77	81,38	9,53	0,249
PC ae C36:2	9,14	100,0 0	7,65	7,61	83,19	10,38	0,181
PC ae C36:3	6,13	100,0 0	6,56	4,72	76,93	5,30	0,095
PC ae C36:4	1,99	100,0 0	9,78	1,34	67,34	3,29	0,120
PC ae C36:5	0,49	100,0 0	4,61	0,31	64,29	2,47	0,077
PC ae C38:0	0,48	100,0 0	1,78	0,38	79,06	6,54	0,204
PC ae C38:1	1,54	100,0 0	5,47	1,30	84,54	13,07	0,342
PC ae C38:2	2,68	100,0 0	5,40	2,09	78,04	7,73	0,091

PC ae C38:3	4,87	100,0 0	5,24	3,50	71,85	2,84	0,181
PC ae C38:4	4,05	100,0 0	6,44	2,76	68,05	4,00	0,138
PC ae C38:5	2,75	100,0 0	10,16	1,81	65,99	4,92	0,114
PC ae C38:6	1,17	100,0 0	11,15	0,74	63,70	2,46	0,140
PC ae C40:0	0,84	100,0 0	9,83	0,56	66,01	5,62	0,121
PC ae C40:1 / PC aa C40:8	0,29	100,0 0	0,18	0,22	75,52	3,01	0,126
PC ae C40:2	0,58	100,0 0	7,08	0,47	80,64	6,78	0,067
PC ae C40:3 / PC aa C40:10	1,76	100,0 0	3,96	1,43	81,17	6,54	0,155
PC ae C40:4	2,68	100,0 0	8,98	1,94	72,37	5,64	0,107
PC ae C40:5	1,82	100,0 0	9,88	1,14	62,96	3,68	0,110
PC ae C40:6	1,02	100,0 0	13,20	0,63	61,29	4,12	0,100
PC ae C42:0	0,18	100,0 0	12,10	0,11	62,53	6,54	0,057
PC ae C42:1	0,14	100,0 0	7,74	0,08	60,90	4,25	0,035*
PC ae C42:2	0,15	100,0 0	7,94	0,12	78,89	2,86	0,281
PC ae C42:3	0,37	100,0 0	0,52	0,31	82,50	7,78	0,298
PC ae C42:4	0,27	100,0 0	5,30	0,20	73,56	4,36	0,069
PC ae C42:5	0,31	100,0 0	1,02	0,23	74,66	7,28	0,241
PC ae C44:3	0,04	100,0 0	21,26	0,03	69,32	13,85	0,113
PC ae C44:4	0,04	100,0 0	16,57	0,03	75,48	17,98	0,152
PC ae C44:5 / PC aa C44:12	0,04	100,0 0	30,90	0,02	68,60	13,99	0,126
PC ae C44:6	0,04	100,0 0	6,54	0,03	87,24	7,71	0,104

Die Auswertung der PC ae zeigt – kongruent zu den beobachteten Veränderungen der PC aa – eine verstärkte Reduktion fünf- und sechsfach gesättigter Fettsäuren, wobei dieser Trend keine Signifikanz erreicht. Interessanterweise ist die Lipidspezies C30:2 analog zu den PC aa um 39,31% reduziert. Die Lipidspezies C30:2 setzt sich aus zwei C16:1 Fettsäuren, also Palmitoleinsäure, zusammen.

Insgesamt suggerieren die dargestellten Daten, dass Vitamin D einen Einfluss auf das Lipidprofil und insbesondere die mehrfach ungesättigten Fettsäuren haben könnte. Bevor eine robuste Aussage getroffen werden kann, sollte die Hypothese durch weitere Experimente erhärtet und in einem Tiermodell bewiesen werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die bidirektionelle Wechselwirkung zwischen den APP-prozessierenden Sekretasen und AICD sowie dem Lipidprofil insbesondere der Lipidspezies der Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine untersucht.

5.1. Bedeutung und Funktion von AICD

AICD wird durch die Prozessierung von α - und β -CTF durch die γ -Sekretase in das Zytosol freigesetzt (Ozaki et al. 2006). AICD spielt eine Rolle für physiologische Funktionen sowie in der Entwicklung, der synaptischen Plastizität und der Funktion verschiedener Rezeptoren (Cho et al. 2010, Kyratzi et al. 2015, Muller et al. 2007, Sabo et al. 2003). Es wird angenommen, dass überwiegend das AICD-Fragment, welches aus der proteolytischen Prozessierung von β -CTF durch die γ -Sekretase entsteht, eine genregulatorische Aktivität mediiert (Turner et al. 2010). Es wurde eine regulatorische Funktion von AICD in Bezug auf die Expression verschiedener Zielgene beschrieben (Konietzko 2012, Muller et al. 2013, Pardossi-Piquard and Checler 2012).

Diese Wirkung auf die Gen-Expression wurde schon sehr früh postuliert, da markante Ähnlichkeiten zwischen der Prozessierung von APP und dem Notch-Rezeptor, einem weiteren Substrat der γ -Sekretase, beobachtet wurden (Sastre et al. 2001). Notch-Proteine koordinieren Gewebe Homöostase durch Rezeptor-Liganden Interaktionen angrenzender Zellen (Wilson and Radtke 2006). In Analogie zu AICD wird bei der Notch-Prozessierung auch eine Intrazelluläre Domäne (engl. „*Notch intracellular domain*“, NICD) in das Zytosol freigesetzt, welche anschließend in den Nukleus translokalisiert um dort in die Genregulation einzugreifen (Frykman et al. 2012, Kimberly et al. 2001, McLoughlin and Miller 1996, Weidemann et al. 2002).

Der Notch-Rezeptor wird, in Analogie zu APP, ebenfalls durch ein RIP-System prozessiert: Die Ektodomäne des Typ-1 Transmembranrezeptor Notch wird an der S2-Position von Proteasen der ADAM-Proteinfamilie proteolytisch gespalten, wodurch ein extrazelluläres Fragment sowie das membranständige Fragment NEXT (engl. „*notch extracellular truncation*“) entstehen (Kopan and Ilagan 2009, van Tetering and Vooijs 2011). NEXT wird, ebenso wie AICD, innerhalb der Transmembrandomäne durch die γ -Sekretase prozessiert (De Strooper et al. 1999).

Diese RIP-Prozessierung führt zu der Freisetzung von NICD, welches zum Nukleus translokalisiert um dort über die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren CBF1/Su(H)/Lag-1 seine Zielgene zu aktivieren (Christensen et al. 1996, Schroeter et al. 1998, Stifani et al. 1992).

Die Notch Signal-Kaskade ist in verschiedenen humanen Neoplasien dereguliert und daher Gegenstand aktueller Forschung (Goldshtein and Berger 2014, O'Neil et al. 2006, Weng et al. 2004).

Die transkriptionelle Potenz von AICD wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Das präferierte Modell, das auch die Grundlage für diese Arbeit bildet, wird im Folgenden dargestellt.

Es wird angenommen, dass vor allem AICD, das aus der Proteolyse von β -CTF resultiert, eine genregulatorische Bedeutung zukommt (Belyaev et al. 2010, Goodger et al. 2009). Turner et al. postulierten ein kontrovers diskutiertes Modell, in welchem die unterschiedliche genregulatorische Potenz der AICD-Fragmente, die entweder durch die amyloidogene oder die nicht-amyloidogene Prozessierung entstehen, in räumlichen Unterschieden begründet ist. Hiernach wird β -CTF primär durch die β - und γ -Sekretase in azidischen, intrazellulären Kompartimenten prozessiert, während die nicht-amyloidogene Prozessierung vor allem an der Zelloberfläche stattfindet und hier AICD freisetzt (Belyaev et al. 2010). AICD ist durch eine sehr kurze Halbwertszeit charakterisiert, welche durch die Wirkung von zelleigenen Proteasen und Enzymen wie IDE und Cathepsin B begründet wird (Edbauer et al. 2002, Nunan et al. 2003, Wang H. et al. 2015). Aufgrund dessen wird angenommen, dass an der Zelloberfläche freigesetztes AICD degradiert wird, bevor es den Nukleus erreichen kann, während das durch die Prozessierung von β -CTF freigesetzte AICD mit Fe65 interagieren kann und aufgrund der Nähe zum Nukleus eher in der Lage ist diesen zu erreichen (Belyaev et al. 2010).

AICD interagiert nach seiner Freisetzung in das Zytosol mit bestimmten Adapterproteinen, die über eine Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB) verfügen (Muller et al. 2013). Diese Interaktion wird durch das GYENPTY-Motiv, das in der AICD-Sequenz in den C-terminalen 9 bis 14 Aminosäuren lokalisiert ist, realisiert (Borg J. P. et al. 1996b, King et al. 2003). Das GYENPTY-Motiv enthält eine NPXY-Sequenz; eine etablierte Sequenz, die für die Internalisierung von Membran-Proteinen sowie die Interaktion mit Adapterproteinen verantwortlich ist (Chen W. J. et al. 1990, Li Y. et al. 2000).

Ein weiteres Motiv ist das VTPEER-Motiv, welches vor allem mit Adapterproteinen der Fe65-Familie (Fe65, Fe65L1 und Fe65L2) interagiert (McLoughlin and Miller 2008, Suh et al. 2011).

Ein weiterer Interaktionspartner des VTPEER-Motiv ist das dimerische Adapterprotein 14-3-3 γ , welches die AICD/Fe65-Interaktion stabilisiert (Sumioka et al. 2005).

AICD wird durch zytoplasmatische Proteasen und IDE degradiert, wobei die AICD-Degradation schneller abläuft als die AICD *de novo* Synthese (Edbauer et al. 2002).

Es kann Komplexe mit Adapterproteinen bilden und so seine Halbwertszeit und Stabilität erhöhen. Cao und Südhof beschrieben 2001 erstmals die Formation des transkriptionell aktiven AFT-Komplexes, der sich aus AICD, Fe65 und Tip60 zusammensetzt (Cao X. and Südhof 2001). Die Existenz und die Bedeutung des AFT-Komplexes konnte in späteren Studien bestätigt werden und es wurden weitere Adapter-Proteine, welche die transkriptionelle Potenz von AICD modifizieren, identifiziert (Minopoli et al. 2012, Müller et al. 2013, von Rotz et al. 2004).

Es wurde beschrieben, dass AICD nach seiner Freisetzung in das Zytosol an die PTB2-Sequenz des Adapterproteins Fe65 bindet und anschließend in den Zellkern transloziert (Cao X. and Südhof 2001, Ermekova et al. 1998, Sabo et al. 2001). Dort kommt es durch die Interaktion mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 zur Bildung des AICD/Fe65/Tip60-Komplexes (Cao X. and Südhof 2001, Kim S. Y. et al. 2007). Die Bedeutung von Fe65 für die AICD-vermittelte Genregulation wird durch den Phenotyp von Fe65/Fe65L1 Doppelknockout-Mäusen, welche dieselbe kortikale Dysplasie wie APP/APLP1/APLP2 Dreifachknockout-Mäuse aufweisen, unterstrichen (Guenette et al. 2006). Die Interaktion von AICD mit Fe65 ist insofern besonders, als dass Fe65 sowohl mit dem VTPEER-Motiv, dem GYENPTY-Motiv als auch der Schnittstelle zwischen den beiden Motiven interagiert, während die meisten anderen Interaktionspartner von AICD nur das GYENPTY-Motiv und die benachbarten Aminosäuren erkennen (Wild 2013).

Neben AFT-Komplexen konnten auch Komplexe aus AICD/JIP1/Tip60 im Nukleus nachgewiesen werden, was eine Interaktion von AICD mit JIP1, einem Strukturprotein der JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Kinase Kaskade, suggeriert (Scheinfeld et al. 2003, von Rotz et al. 2004).

Alternativ zu Tip60 kann der Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 an Fe65 binden und mit den Promotor-Regionen von potentiellen Zielgenen interagieren (Standen et al. 2003, Zambrano et al. 1998).

Das Protein Mediator Komplex subunit 12 (MED12) ist ein Bestandteil des eukaryoten Proteinaggregats Mediator, welches an der Initiation der Transkription beteiligt ist und eine Rolle in der kognitiven Entwicklung spielt (Philibert and Madan 2007, Shin C. H. et al. 2008).

MED12 bindet in der Präsenz von AICD an Fe65 und vermittelt so eine direkte Interaktion des AFT-Komplexes mit der RNA Polymerase II (Kornberg 2005). Xu et al. konnten 2011 zeigen, dass die Störung der AICD/MED12 Interaktion die AICD-Transkription sowie

Expression der Zielgene von AICD inhibiert (Xu et al. 2011). Dies impliziert MED12 als Bindeglied zwischen dem AFT-Komplex und dem DNA-abhängigen RNA-Polymerase II-Kernkomplex (Xu et al. 2011).

Es wurden ebenfalls Adaptorproteine beschrieben, welche eine inhibierende Wirkung auf die AICD-vermittelte Genregulation ausüben.

Hierzu zählt MINT1 (engl. „*neuronal Munc18-1-interacting protein 1*“), das die APP-Prozessierung und die A β 40- und A β 42-Sekretion reduziert (Mueller et al. 2000, Saito et al. 2008). Die Funktion von Mint1/X11 α ist noch nicht vollständig verstanden, aber es wird angenommen, dass Mint1/X11 α mit dem YENPTY-Motif interagiert und die zelluläre Prozessierung von APP inhibiert und somit A β 40 sowie A β 42 Level reduziert, indem es die Translokation von APP in Lipid-Rafts verhindert (Matos et al. 2012, Mueller et al. 2000, Wang Z. et al. 2009).

Es wurden insgesamt mehr als 20 Adaptorproteine beschrieben, die mit AICD interagieren und die Regulation von Zielgenen beeinflussen können. Zu diesen Zielgenen gehört unter anderem BACE1: AICD stimuliert die Transkription von BACE1 und reguliert so die Verfügbarkeit von β -CTF (von Rotz et al. 2004). Neben BACE1 stimuliert AICD auch die Transkription der Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) (Kim H. S. et al. 2003). GSK3 β phosphoryliert Tau und trägt so maßgeblich zu der übermäßigen Phosphorylierung von Tau im Kontext von AD bei (Lovestone et al. 1994). Die Regulation von GSK3 β durch AICD stellt daher einen Zusammenhang zu der Pathologie von AD da (Grimm M. O. et al. 2012b).

AICD wird weiterhin in der Pathogenese von AD diskutiert. AICD-Transgene Mäuse zeigten AD-assoziierte Veränderungen wie eine Tauopathie, abnormale neuronale Aktivität, Gedächtnisstörungen und Neurodegeneration (Ghosal et al. 2016). Interessanterweise zeigten AICD-transgene Mäuse in Abwesenheit von endogenem Tau ein Wachstum der Hippocampus Vorläufer Zellen (HPC, engl. „*Hippocampal progenitor cell*“) auf dem Niveau von Wildtyp-Mäusen (Ghosal et al. 2016).

Eine Übersicht über die bekannten Gene, die von AICD reguliert werden, ist auf der folgenden Seite dargestellt.

Übersicht über AICD-regulierte Gene

Reguliertes Gen	Quelle	Wirkung (↑ hochreguliert ↓ runterreguliert)
APP (Amyloid precursor protein)	(von Rotz et al. 2004)	↑
BACE (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme)	(von Rotz et al. 2004)	↑
Tip60 (Histone acetyltransferase KAT5)	(von Rotz et al. 2004)	↑
GSK3β (Glycogen synthase kinase 3 beta)	(Ryan and Pimplikar 2005, von Rotz et al. 2004)	↑
KAI/CD82 (Metastase Suppressor)	(Baek et al. 2002, McLoughlin and Miller 1996, von Rotz et al. 2004)	↑
TP53 (Tumor Suppressor)	(Alves da Costa et al. 2006)	↑
NEP (Proteolytisches Enzym)	(Belyaev et al. 2009, Grimm M. O. et al. 2015, Grimm M. O. et al. 2013b)	↑
CHOP/DDIT3 (Antwort auf DNS-Schäden)	(Takahashi et al. 2009)	↑
PTCH1 (Sonic Hedgehog Rezeptor)	(Trazzi et al. 2011)	↑
Tp53 (Tumor protein 53)	(Wang J. et al. 2014)	↑ (Nur zusammen mit TDP-43)
p44 (Verkürzte Form von Tp53)	(Li M. et al. 2015)	↑
EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor)	(Zhang Y. W. et al. 2007)	↓
LRP1 (“Low density lipoprotein receptor- related protein 1”)	(Liu Q. et al. 2007)	↓
SPT (Serine-Palmitoyl-CoA Transferase)	(Grimm M. O. et al. 2011b)	↓

Anders als die allgemein anerkannte transkriptionelle Funktion von NICD wird die Bedeutung von AICD für die Genregulation weiterhin kontrovers diskutiert. Dies ist in einer heterogenen Studienlage in Bezug auf AICD begründet. Widersprüchliche Ergebnisse können durch die Verwendung verschiedener Zell- oder Maus-Modelle oder durch die sehr kurze Halbwertszeit von AICD begründet sein (Muller et al. 2008).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Gen-regulatorische Wirkung von AICD auf zuvor postulierte Zielgene nicht reproduzieren (Hebert et al. 2006, Muller et al. 2008).

Im Kontext dieser Arbeit wurde der Einfluss von AICD auf die Lipidhomöostase eukaryoter Zellen untersucht. Die Arbeitshypothese geht von einer AICD-abhängigen Veränderung der Lipidkomposition aus, die auf Gen-Ebene vermittelt wird. Es kommen zahlreiche Gene in Betracht, insbesondere Desaturasen, wie FADS1, FADS2, FADS3, FADS6, die an der Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie auch DHA, beteiligt sind (Huang Y. S. et al. 2004).

Hierfür wurden AICD-defiziente Zell-Modelle mit Wildtyp-Zellen oder mit AICD-überexprimierenden Zellen verglichen. Die Zell-Modelle werden in 3.1.2 beschrieben. Es wurde eine Probe der Lipidkomposition des entsprechenden Zell-Modells durch eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer gewonnen (Bligh and Dyer 1959). Die gewonnenen Lipidextrakte wurden Massenspektrometrisch analysiert (vgl. 3.6).

In dieser Arbeit wurden Zell-Modelle untersucht. Daher sind unterschiedliche Lipidprofile auf Veränderungen auf der Protein- oder Gen-Ebene begründet und nicht in diätetischen Faktoren.

5.2. Lipide und AD

Ein Einfluss von Lipiden auf die A β -Synthese ist naheliegend, da die APP-prozessierenden Sekretasen und APP selbst Transmembran-Proteine sind und somit durch die Lipid-Umgebung beeinflusst werden. Lipide und Proteine konstituieren den Großteil von Zellmembranen und beeinflussen die Aktivität von Membranproteinen (Keelan et al. 1997). Für zahlreiche Lipide wurde ein Einfluss auf die APP-Prozessierung demonstriert und es konnte gezeigt werden, dass Lipide die Quantität und die Länge der A β -Peptide, als auch ihre Aggregationsneigung beeinflussen (Ginsberg et al. 1993, Grimm M. O. et al. 2007, Grimm M. O. et al. 2016a, Grosgen et al. 2010, Hartmann et al. 2007, Hooijmans and Kiliaan 2008, Terzi et al. 1997).

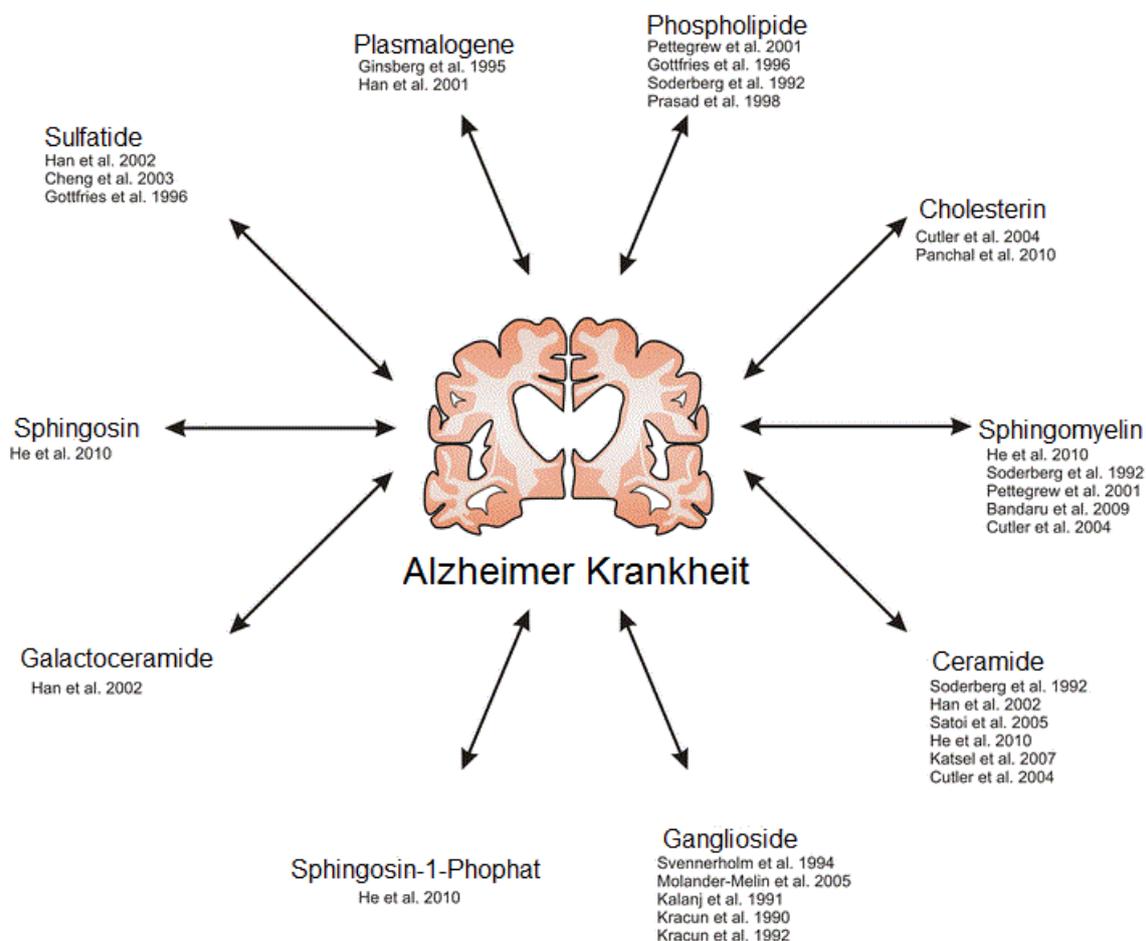


Abb. 46: Übersichtsdarstellung der in AD veränderten Lipide

AD beeinflusst die Homöostase zahlreicher Lipidklassen. Umgekehrt beeinflussen aber auch verschiedene Lipide die Pathogenese von AD. Es ist von bidirektionalen Regulationsmechanismen auszugehen.

Verändert nach Grimm et al. 2016

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die Lipidkomposition in AD-Gehirnen verändert ist. Bereits 1992 demonstrierte Nitsch et al., dass sowohl die Phosphocholin- als auch die Phosphatidylethanolamin-Konzentration in Gehirnen von AD Patienten reduziert, während die katabolen Abbauprodukte der Lipide erhöht waren (Nitsch et al. 1992). Eine Verminderung bestimmter Phospholipide, insbesondere Phosphatidylethanolamin Plasmalogenen, konnte von weiteren Forschungsgruppen bestätigt werden (Han et al. 2001, Mapstone et al. 2014).

Lipide, insbesondere DHA, wurden in verschiedenen „Lipidomic“ Studien als Biomarker für die AD-Progression vorgeschlagen, was die Bedeutung des Lipidstoffwechsels für die Alzheimer Erkrankung unterstreicht (Han et al. 2011, Meikle et al. 2014, Sato Y. et al. 2012, Wang D. C. et al. 2012).

Die Literatur scheint sich einig, dass es Veränderungen des Fettstoffwechsels in Assoziation mit AD gibt; die Art der Veränderungen ist aber äußerst uneinheitlich. Dies könnte darin begründet sein, dass sich Veränderungen des Lipidprofils je nach untersuchtem Hirnareal drastisch unterscheiden, so war die EPA-Konzentration in einer metabolomischen Studie im Cerebellum und im Gyrus temporalis inferior vermindert, während sie im Gyrus frontalis medius erhöht war (Snowden et al. 2017).

5.2.1. Cholesterin und AD

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil zellulärer Membranen und relevant für die Entwicklung und Erhaltung neuronaler Funktion (Koudinov and Koudinova 2005, Pfrieger 2003). Das Gehirn ist das Cholesterin-reichste Organ des Menschen und enthält circa 25% des Gesamt-Cholesterins des Körpers (Hartmann et al. 2007). Der Großteil des zerebralen Cholesterins wird im zentralen Nervensystem synthetisiert, da Cholesterin die Blut-Hirn-Schranke nahezu nur in seiner oxidierten Form von 27-Hydroxycholesterin und 24S-Hydroxycholesterin überwinden kann (Pardridge et al. 1980, Shobab et al. 2005). Es wird angenommen, dass weniger als 1% des peripheren Cholesterins die Blut-Hirn-Schranke pro Tag überwinden kann und die Cholesterin Homeostase des zentralen Nervensystems somit autonom, aber nicht vollständig unabhängig vom Plasma-Cholesterin ist (Dietschy and Turley 2004).

Die Cholesterin-Homeostase ist streng reguliert, wobei die 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMGR) eine Schlüsselposition einnimmt und die Formierung von Mevalonat katalysiert (Prabhakar et al. 1989).

Epidemiologische Studien konnten Cholesterin als Risikofaktor für AD identifizieren und zeigten eine Korrelation zwischen einem erhöhten Cholesterin-Spiegel und einem früheren, durchschnittlichen Erkrankungsalter mit AD (George et al. 2004, Goldstein F. C. et al. 2008, Kivipelto et al. 2005, Pappolla et al. 2003).

Zusätzlich wurde das ϵ 4-Allel von ApoE als bedeutendster genetischer Risikofaktor für das familiär unabhängige Auftreten von AD identifiziert (Strittmatter et al. 1993). Homozygotie für das ϵ 4-Allel von ApoE erhöht das relative Risiko für AD 15 bis 18-fach, das ϵ 4-Allel von ApoE korreliert mit der Bildung von amyloidogenen Plaques und das durchschnittliche Erkrankungsalter sinkt stark (Buttini et al. 2002, Corder et al. 1993, Fryer et al. 2003, Hartmann et al. 2007). Das ϵ 2-Allel wird hingegen als protektiv angesehen, während das ϵ 3-Allel die häufigste Form darstellt (Corder et al. 1994, Kim J. et al. 2012, Strittmatter et al. 1994). Es ist hervorzuheben, dass ApoE, ein bedeutender Bestandteil von Low-density-lipoprotein (LDL) und very low-density-lipoprotein (VLDL), die Aufnahme dieser Lipoproteine in Zellen über die Bindung an ApoE-Rezeptoren,

insbesondere den LDL-Rezeptor, reguliert (Goldstein J. L. and Brown 2015). Die Relevanz von ApoE als genetischer Risikofaktor akzentuiert die Bedeutung von Cholesterin und Lipiden in der AD-Pathogenese.

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Cholesterin einen direkten Einfluss auf die AD-Pathogenese hat und so, zum Beispiel, die β - und γ -Sekretase abhängige A β -Synthese potenziert (Fassbender et al. 2001, Grimm M. O. et al. 2008, Grimm M. O. et al. 2013c, Simons et al. 1998, Zhang B. et al. 2004).

Dies wird auch dadurch unterstützt, dass die amyloidogene Prozessierung von APP durch die β - und γ -Sekretase präferenziell in sogenannten Lipidrafts, speziellen Bereichen in Zellmembranen, die sich durch einen hohen Gehalt an Lipiden, insbesondere Cholesterin, Sphingomyelinen und Glycosphingolipiden auszeichnen, erfolgt, während die Aktivität der α -Sekretase nicht in Lipid-Rafts stattfindet (Cordy et al. 2003).

Auf der Suche nach einer mechanistischen Erklärung für die beobachtete Cholesterin-Sensitivität der A β -Synthese hat die Forschungsgruppe um Ghribi den Effekt einer niedrig dosierten, langfristigen, Cholesterin-reichen Diät auf den neuronalen Cholesterin-Gehalt, BACE1 und A β 42 im Hippocampus von Hasen untersucht (Ghribi et al. 2006): Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten die mit einer Cholesterin-reichen Diät gefütterten Tiere eine erhöhte Cholesterin-Konzentration im zentralen Nervensystem. Zudem wurde beobachtet, dass das Cholesterin sich zusammen mit BACE1 in Lipid-Rafts anlagerte. Die erhöhte BACE1-Konzentration war mit einem Anstieg von sAPP β , β -CTF und A β 42 assoziiert (Ghribi et al. 2006).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Cholesterin in der Lage ist APP und β -CTF zu binden, wodurch diese Proteine in die Cholesterin-reichen Mikrodomäne des Lipid-Rafts eingelagert und der amyloidogenen Prozessierung zugeführt werden (Barrett et al. 2012, Beel et al. 2010).

Es ist auch hervorzuheben, dass Cholesterin die Dicke der Zellmembran modifiziert und so direkten Einfluss auf die Aktivität und Spezifität der γ -Sekretase nimmt; mit zunehmender Dicke der Zellmembran wurden präferenziell kürzere A β -Formen produziert, während die Anzahl der längeren A β -Formen abnahm (Winkler et al. 2012). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Cholesterin in der Lage ist mit der Phe19-Aminosäure von A β zu interagieren und zu der Formierung von β -Faltblättern und schließlich von toxischen A β -Oligomeren beitragen kann (Abramov A. Y. et al. 2011, Schneider et al. 2006, Zhou and Xu 2012).

Diese Daten deuten darauf hin, dass der Vermeidung einer Cholesterin-Akkumulation, bzw. einer Cholesterin-Senkung ein therapeutischer Nutzen in Bezug auf AD zukommen könnte. HMGR stellt daher ein interessantes therapeutisches Ziel in Bezug auf AD da. Die Inhibition von HMGR durch Statine führt zu einer drastischen Reduktion der Cholesterin-Level (Li D. Y. et al. 2001, Perchellet et al. 2009). Dieser therapeutische Ansatz für die Behandlung der AD wird durch die Ergebnisse verschiedener, epidemiologischer Studien unterstützt (Jick et al. 2000, Paris et al. 2002, Rockwood et al. 2002, Wolozin et al. 2000), wobei spätere Studien diese Daten nicht reproduzieren konnten (Cibickova et al. 2009, Feldman et al. 2010, Park I. H. et al. 2003).

5.2.2. Fettsäuren und AD

Fettsäuren unterscheiden sich durch die Kettenlänge ihrer Kohlenstoffatome und durch das Vorhandensein von Doppelbindungen. Gesättigte Fettsäuren verfügen über keine Doppelbindungen, während ungesättigte Fettsäuren mindestens eine Doppelbindung aufweisen. Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen werden als mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. „*polyunsaturated fatty acids*“, PUFA) beschrieben.

Das zentrale Nervensystem ist reich an PUFAs, insbesondere an Docosahexaensäure (DHA), welches mehr als 17% des Gewichtes der Gesamtheit aller Fettsäuren in den Gehirnen von erwachsenen Ratten ausmacht (Hashimoto et al. 2002).

Es wird angenommen, dass AD mit der Oxidation von PUFAs assoziiert ist und es konnte ein Mangel an DHA und Arachidonsäure in Gehirnen, die von AD betroffen waren, beobachtet werden (Soderberg et al. 1991, Tully et al. 2003). Das wissenschaftliche Interesse war deshalb vor allem auf diese beiden PUFAs konzentriert. Aufgrund seiner Doppelbindungen ist DHA anfällig für oxidativen Stress (Sakai et al. 2017).

DHA kann endogen aus Linolsäure (18:2, n-6, LA) oder α -Linolensäure (18:3 n-3, ALA) synthetisiert werden (Sprecher 1981). Die Konversionsrate von LA und ALA zu DHA liegt zwischen 1% bis 3% (Gibson et al. 2011, Huang Y. S. et al. 2004), sodass nur ein kleiner Anteil des Gesamt-DHAs vom Körper aus α -Linolensäure synthetisiert werden kann, während der Großteil durch die Nahrung, insbesondere durch den Verzehr von Fettfischen, wie zum Beispiel Lachs, zugeführt wird, bzw. zugeführt werden sollte (Pawlosky et al. 2001).

Sowohl LA als auch ALA werden als essentielle, diätarische Fettsäuren bezeichnet, da sie im menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden können und durch die Nahrung zugeführt werden müssen (Huang Y. S. et al. 2004).

ALA wird zunächst zu Stearidonsäure (18:4 ω -3) umgewandelt, welche anschließend zu Eicosatetraensäure (20:4 ω -3) durch Elongasen-Aktivität um zwei Kohlenstoffatome verlängert wird.

Die enzymatische Aktivität der delta-5 Desaturase führt durch die Einführung einer Doppelbindung zu der Formation von Eicosapentaensäure (20:5 ω -3, EPA), welche anschließend durch weitere Desaturasen-Wirkung und β -Oxidation zu DHA umgewandelt werden kann, wobei nur ein sehr geringer Teil von unter 1% des DHAs endogen synthetisiert wird (Ferdinandusse et al. 2003, Ferdinandusse et al. 2001, Infante et al. 2002, Sprecher et al. 1999).

Die FADS-Gene (engl. „*Fatty acid desaturases*“) kodieren Enzyme, die für die PUFA Synthese und Regulation verantwortlich sind (Nakamura and Nara 2004). Das humane Chromosom 11 enthält drei FADS-Gene, FADS1, FADS2 und FADS3, wobei FADS1 auch als delta-5 Desaturase und FADS2 als delta-6 Desaturase bezeichnet wird (Nakamura and Nara 2004). Eine Delta Desaturase fügt eine Doppelbindung an einer bestimmten Position vom Carboxyl-Ende einer Fettsäure ein.

Die Biosynthese von delta-4 desaturierten Docosanoid-Fettsäuren (also Fettsäuren mit 22 Kohlenstoffatomen) erfordert die wiederholte enzymatische Aktivität des FADS2-Enzyms: FADS2 führt eine delta-6 Desaturation an C:24 Fettsäuren im endoplasmatischen Retikulum durch, gefolgt von einer einfachen Beta-Oxidation in den Peroxisomen (Guillou et al. 2003, Park W. J. et al. 2009). H.G Park et al. konnten kürzlich demonstrieren, dass das FADS2 Genprodukt eine direkte delta-4 Desaturation von 22:5n-3 zu 22:6n-3 (DHA) ermöglicht (Park H. G. et al. 2015).

Weiterhin konnte aktuell gezeigt werden, dass FADS2 als delta-8 und delta-4 Desaturase auf Palminsäure und 20-Kohlenstoffatom Fettsäuren wirkt (Guillou et al. 2003, Park H. G. et al. 2015).

FADS1 und FADS2 beeinflussen die Lipidkomposition und sind in diesem Kontext für diese Arbeit von Bedeutung (Park H. G. et al. 2015).

DHA spielt eine wichtige Rolle für die neuronale Integrität, da es an der Neurotransmission, der Funktion von Ion-Kanälen, der synaptischen Plastizität sowie der Neurogenese beteiligt ist (Dagai et al. 2009, McNamara et al. 2016, Ozkan et al. 2016). In jungen Ratten führt die Nahrungsergänzung mit DHA zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit des Gedächtnisses (Gamoh et al. 1999).

DHA ist aufgrund seiner sechs Doppelbindungen anfällig für oxidative Vorgänge und es konnten erhöhte Konzentrationen von oxidierten DHA in AD-Gehirnen festgestellt werden (Montine and Morrow 2005, Sakai et al. 2017).

Dies lässt vermuten, dass DHA als Konsequenz der AD, bzw. durch oxidativen Stress oxidiert wird. Interessanterweise konnten diese Veränderungen aber auch in der Frühphase der Erkrankung beobachtet werden, was die Oxidation von DHA als bloße Folge der Alzheimer Erkrankung konterkariert und darauf hindeutet, dass DHA auch eine Rolle in der Pathogenese spielt (Markesbery et al. 2005). Die Studienlage ist in Bezug auf die DHA-Konzentration in AD Gehirnen heterogen und es wurden sowohl Verringerungen als auch Erhöhungen der DHA-Konzentration berichtet (Nasaruddin et al. 2016, Stuart G. Snowden 2017).

Tiermodelle und in vitro Experimente implizieren, dass eine erhöhte DHA-Aufnahme mit einem erniedrigten AD-Risiko assoziiert ist: in einem AD-Model an Ratten konnte DHA die Lernfähigkeit steigern (Hashimoto et al. 2006) und in APP-Schwedisch transgenen Mäusen konnte DHA-Supplementation die A β -Last im Hippocampus und im parietalen Cortex signifikant reduzieren (Lim G. P. et al. 2005).

Diese Ergebnisse konnten durch einige epidemiologische Studien unterstützt werden. Im Rahmen der Rotterdam Studie wurde eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von Fisch – und somit auch DHA – und dem Auftreten von Demenz beobachtet (Kalmijn et al. 1997). Dieser Effekt konnte aber nach einer längeren Laufzeit der Studie (6 Jahre zum Zeitpunkt der Studie) nicht mehr beobachtet werden und es wurde keine signifikanten Korrelationen bei den 5395 Probanden zwischen der Einnahme von bestimmten Fettsäuren bzw. Cholesterin und dem Auftreten von Demenz beobachtet (Engelhart et al. 2002). Aktuellere epidemiologische Studien konnten aber zeigen, dass die Zufuhr von Fisch und DHA einen protektiven Effekt in Bezug auf die Entwicklung einer Demenz aufweist (Barberger-Gateau et al. 2002, Morris et al. 2003). Weiterhin konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die mediterrane Diät, die reich an Fisch und PUFAs ist, mit einem verringerten Risiko für die Inzidenz von MCI (Gardener et al. 2012, Roberts et al. 2010, Scarmeas et al. 2009) und AD (Gardener et al. 2012, Gu Y. et al. 2010, Scarmeas et al. 2006) assoziiert ist.

Eine aktuelle Cochrane-Metaanalyse, die 632 Patientin in drei Studien hoher methodischer Qualität inkludierte, hat den Einfluss von omega-3 PUFAs (vor allem Ecosapentaensäure und Docosahexaensäure) auf milde bis moderate AD über 6, 12 und 18 Monate untersucht und keinen eindeutigen Einfluss von DHA auf die Verlaufparameter oder die Lebensqualität von Demenz-Patienten feststellen können (Burckhardt et al. 2016, Phillips 2017).

Protektive Effekte von DHA wurden hauptsächlich in Tiermodellen und präklinischen Studien beobachtet (Burckhardt et al. 2016).

Der molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Dennoch konnte dargelegt werden, dass DHA die Aktivität der β - und γ -Sekretase dosisabhängig reduziert und so zu einer geringeren A β -Synthese führt und gleichzeitig den nicht-amyloidogenen Weg stimuliert (Grimm M. O. et al. 2011c). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DHA die A β 42 induzierte Toxizität in allen Zelllinien, die mit einem Viabilitäts-Assay gemessen wurden, reduzierte und zusätzlich die Integrität und Funktion von Endothel-Zellen des zentralen Nervensystem schützen konnte (Veszelka et al. 2013).

Eine typische westliche Diät, bei der ungefähr 40% gesättigte Fettsäuren und 1% Cholesterin aufgenommen werden, führte bei transgenen APP/PS1 Mäusen zu einer erhöhten A β -Akkumulation, während Mäuse, die mit DHA supplementiert wurden, verringerte A β -Konzentrationen präsentierten (Oksman et al. 2006).

Zudem wurde beschrieben, dass DHA die Degradation von A β über eine Aktivitätssteigerung von IDE begünstigt (Grimm M. O. et al. 2016c). Zusätzlich führte DHA zu einer erhöhten ADAM17 Proteininstabilität und folglich zu erhöhten sAPP α -Konzentrationen (Grimm M. O. et al. 2011c).

Zahlreiche epidemiologische Studien deuten auf einen protektiven Effekt einer DHA-Supplementation hin (Barberger-Gateau et al. 2002, Cole and Frautschy 2010, Cole et al. 2009, 2010, Morris et al. 2003).

Die Bedeutung von DHA für AD wird durch zahlreiche Studien, die einen veränderten DHA-Gehalt in AD-Gehirnen und Patienten fanden, unterstrichen: Mehrere Studien beobachteten einen verringerten DHA-Gehalt in Hirngewebe von AD Patienten (Soderberg et al. 1991, Tully et al. 2003). Dieser Effekt konnte aber nur in einigen Hirnregionen repliziert werden (Cunnane et al. 2012). Wang et al. konnte eine verringerte Plasma-Konzentration von DHA sowie Stearinsäure zeigen (Wang D. C. et al. 2012). Eine weitere Studie demonstrierte ergänzend eine verringerte Stearin- und Arachidonsäuren Konzentration im Gehirn von AD Patienten, während sich aber kein Effekt für den durchschnittlichen DHA-Gehalt zeigte (Fraser et al. 2010). Eine aktuelle Studie, die Gas Chromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) nutzte, beobachtete hingegen eine erhöhte DHA-Konzentration von 47% und konterkariert die bisher dargestellten Studien (Nasaruddin et al. 2016).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass Trans-Fettsäuren, also Fettsäuren, die über eine Trans-konfigurierte Doppelbindung verfügen, die amyloidogene Prozessierung potenzieren (Grimm M. O. et al. 2012a).

Dies ist zum einen bedeusam, da der von industriell-zubereiteten Nahrungsmitteln geprägte, westliche Ernährungsstil reich an Trans-Fettsäuren ist und zum anderen, da sowohl Trans-Fettsäuren als auch DHA die Membranfluidität modifizieren: Die Trans-Konfiguration von Fettsäuren verringert die Membranfluidität, während DHA die Membranfluidität erhöht.

Qualitative Veränderungen der Lipidkomposition, insbesondere Verschiebungen des PUFA/SFA Verhältnisses, sind weniger gut erforscht.

Dennoch konnte Nakada et al. zeigen, dass es zu signifikanten Veränderungen der n-6 Fettsäuren im Kontext der Alzheimer Erkrankung kommt (Nakada et al. 1990). Die 18:2 (n - 6) Fettsäuren waren erhöht, während 20:4 (n-6) und 22:4 (n-6) abnahmen. Nakada et al. postulierten in diesem Kontext Anomalien der delta-6 Desaturase (Nakada et al. 1990). FADS2 codiert die delta-6 Desaturase (Nakamura and Nara 2004).

Soderberg et al. untersuchte 1991 die Lipidkomposition von PCs und PEs und beobachtete, dass der Alterungsprozess die Lipidkomposition nicht veränderte, während in AD Gehirnen die Konzentration der saturierten Fettsäuren 14:0, 16:0 und 18:0 zunahm und die Konzentration der polyunsaturierten Fettsäuren 20:4, 22:4 und 22:6 abnahm (Soderberg et al. 1991). Diese Ergebnisse konnten in einer späteren Studie erhärtet werden. Guan et al. demonstrierte eine signifikante Abnahme der polyunsaturierten Fettsäuren und eine Verschiebung des Aldehyd Musters von 18:1 zu 18:0 (Guan et al. 1999). Diese Veränderung war nur bei den Phosphatidylethanolamin Plasmalogenen zu beobachten (Guan et al. 1999).

Grimm et al. demonstrierte 2011, dass AICD zu einer verringerten Expression der Serine-Palmitoyl-CoA Transferase (SPT) Untereinheit SPTLC2 führt (Grimm M. O. et al. 2011b). SPTLC2 bildet die katalytische Untereinheit des SPT Heterodimers und reguliert die Aktivität der SPT und somit auch die Sphingolipid-Synthese (Grimm M. O. et al. 2011b, Hojjati et al. 2005, Weiss and Stoffel 1997).

5.2.3. Plasmalogene und AD

Plasmalogene sind Etherlipide und stellen eine Unterklasse der Glycerolphospholipide da (Nagan and Zoeller 2001). Plasmalogene sind durch die Bindung eines Enolethers am endständigen Kohlenstoffatom des Glycerins charakterisiert (Nagan and Zoeller 2001).

Mehr als 10% der Phospholipide des Gehirns gehören zur Klasse der Plasmalogene (H. Harper, Physiologische Chemie: Einführung in die medizinische Biochemie, 1975). Phospholipide regulieren den Cholesterin Metabolismus und es ist daher anzunehmen, dass sie an der AD-Pathologie beteiligt sind (Grimm M. O. et al. 2012b).

Die Bedeutung der Plasmalogene in der AD-Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass ein Plasmalogen-Defizit im Serum von AD-Patienten mit der Schwere der Demenz-Erkrankung korreliert (Goodenowe et al. 2007) und dass Plasmalogene einen klinischen Prädiktor für die kognitiven Einschränkungen von AD-Patienten darstellen können (Wood et al. 2010). Weiterhin zeichnen mehrere Studien das Bild einer AD assoziierten Verringerung der Plasmalogen-Konzentration (Han 2005, Han et al. 2001). Dieser Effekt ist besonders bei der Lipid-Spezies der Phosphatidylethanolamin Plasmalogene akzentuiert: Mehrere Studien beobachteten einen selektiven Abfall der PE ae in Gehirnautopsien von AD Patienten (Gershfeld and Ginsberg 1995, Guan et al. 1999, Han et al. 2001, Wells et al. 1995). Han et al. berichtete 2001 in einer Studie von einer dramatischen Verringerung der Plasmalogen-Konzentration von bis zu 40 mol% der Gesamtplasmalogen-Konzentration in der Substantia alba zu einem frühen Zeitpunkt der Alzheimer Erkrankung sowie einer Korrelation der Plasmalogen Defizienz mit der sogenannten CDR (engl „Clinical dementia ranking“) (Han et al. 2001).

Weiterhin haben verschiedene Studien eine Reduktion der Plasmalogene in AD *post mortem* Gehirnen beobachtet (Grimm M. O. et al. 2011a, Marin et al. 2017, Wood et al. 2015).

Oxidativer Stress ist mit der AD-Pathogenese assoziiert und führt zu einer vermehrten Oxidation von Plasmalogenen und vermindert so ihre Verfügbarkeit (Butterfield and Boyd-Kimball 2004, Markesbery 1999, Nunomura et al. 2006, Pappolla et al. 1996).

Ebenso konnte eine Reduktion der Plasmalogene in Erythrozyten von Kindern, die an Trisomie 21 leiden, beobachtet werden, was eine Assoziation von APP und seiner Prozessierung mit den Plasmalogen nahelegt (Bueno et al. 2015, Cheng et al. 1988).

Es konnte demonstriert werden, dass Plasmalogene und insbesondere ein erhöhtes Phosphatidylethanolamin-Plasmalogen zu Phosphatidylethanolamin Verhältnis zu einer reduzierten γ -Sekretase Aktivität führen (Onodera et al. 2015, Rothhaar et al. 2012). Mechanistisch ist dies in einer AICD-abhängigen Inhibition der Genexpression der Alkyldihydroxyacetonephosphate-Synthase (AGPS), die maßgeblich an der Plasmalogen Synthese beteiligt ist, begründet (Rothhaar et al. 2012).

Zahlreiche epidemiologische und *Post mortem* Studien konstatieren eine besondere Bedeutung der Phosphatidylethanolamine für die Pathologie von AD (Ginsberg et al. 1995, Guan et al. 1999, Prasad et al. 1998, Soderberg et al. 1991, Wells et al. 1995).

5.2.4. APP und die Lipid-Homöostase

Es ist anzunehmen, dass nicht nur Lipide die APP-Prozessierung modifizieren, sondern auch APP und seine Spaltprodukte die Lipid-Homöostase beeinflussen.

Erste Hinweise auf einen Einfluss der APP-Spaltprodukte auf die Lipid-Komposition wurden durch die Beobachtung, dass es in PS-defizienten Zellen zu einer Veränderung der Membran-Fluidität und der Lipid-Raft-Komposition kommt, gegeben (Grimm M. O. et al. 2006). Dies ist insofern interessant, als das Cholesterin ein wichtiger Regulator der Membranfluidität ist und so auf eine Beziehung zwischen Cholesterin und der Aktivität der γ -Sekretase hindeutet (Taylor and Smith 1980). Grimm et al. hat 2007 einen negativen Feedback-Zirkel postuliert: Cholesterin stimuliert die Aktivität der γ -Sekretase und führt zu einer vermehrten Produktion von A β , während A β , insbesondere A β 40, einen inhibitorischen Effekt auf die HMGCoA-Reduktase ausübt und so die Cholesterin-Synthese reguliert (Grimm M. O. et al. 2005, Zinser et al. 2007).

A β beeinflusst außerdem den Metabolismus von Sphingolipiden und von Gangliosiden. Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 einen direkten, aktivierenden Effekt auf die Sphingomyelinase hat, was zu einer verringerten Sphingomyelin-Konzentration führt (Grimm M. O. et al. 2005). Die Sphingomyelinase katalysiert die Spaltung der Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin, wodurch Ceramide und Phosphorylcholin entstehen (Ago et al. 2006, Tomiuk et al. 2000).

Ceramide werden als Mediator der AD-induzierten Apoptose diskutiert und eine erhöhte Aktivität der Sphingomyelinase führt zu einer erhöhte Konzentration der Ceramide (Jana and Pahan 2004, Jazvinscak Jembrek et al. 2015, Satoi et al. 2005). Interessanterweise sind Ceramide in der Lage die β -Sekretase zu stabilisieren, wodurch mehr A β 42 synthetisiert wird, was wiederum die Sphingomyelinase induziert und so – in Form einer positiven Rückkoppelung – die Ceramid-Konzentration erhöht (Lee J. T. et al. 2004b, Puglielli et al. 2003, Takasugi et al. 2015).

Die Lipid-Spezies der Ceramide zeigt ebenfalls markante Veränderungen im Kontext von AD. Bereits 2002 wurde in (Han et al. 2002) von einer mehr als dreifachen Erhöhung der Ceramid-Konzentration in der Substantia alba von AD Patienten berichtet. 2004 beobachteten Cutler et al. eine Akkumulation von lang-kettigen Ceramiden und Cholesterin in AD Gehirnen und postulierten in diesem Zusammenhang, dass Ceramide als Mediatoren von Apoptose und Neurodegeneration an der Pathogenese von AD beteiligt seien (Cutler et al. 2004).

Spätere Studien konnten die signifikante Zunahme der Ceramid-Konzentration bestätigen – insbesondere in der Frühform der Alzheimer Erkrankung (Han 2005).

Neben A β ist die transkriptionelle Aktivität von AICD von Bedeutung für die Lipidhomöostase. Liu et al. konnten zeigen, dass die Abwesenheit von APP/APLP2 oder PS1/PS2 zu einer signifikanten Steigerung der Expression und Funktion von LRP1 (engl. „*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*“) führt (Liu Q. et al. 2007). Die Expression von LRP1 reguliert maßgeblich die ApoE- und Cholesterin-Konzentration (Liu Q. et al. 2007). Weiterhin konnte der beobachtete Effekt durch die Expression von AICD neutralisiert werden, was darauf hinweist, dass AICD für die Regulation von LRP1 verantwortlich ist, was durch die Identifikation einer Interaktion zwischen AICD und dem Promoter von LRP1 akzentuiert wird (Liu Q. et al. 2007). AICD reguliert somit – über die Suppression der Transkription von LRP1 – Cholesterin und ApoE (Liu Q. et al. 2007).

AICD beeinflusst weiterhin die Plasmalogen-Synthese über die transkriptionelle Regulation der Alky-Dihydroxyaceton-Phosphatase (AGPS) (Grimm M. O. et al. 2011d) und den Sphingolipid-Metabolismus über die Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) (Grimm M. O. et al. 2011b). Der Effekt von AICD auf die AGPS konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (vgl. 4.1.1.5). In Lipidextrakten AICD-defizienter Zellen war die Plasmalogen-Konzentration signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Zellen verringert. Ebenso wurde der Einfluss von AICD auf die SPT reproduziert: Die Ceramid-Konzentration war in den Lipidextrakten der AICD-defizienten Zellmodelle signifikant erhöht.

5.3. Einfluss von AICD auf die Lipidkomposition

5.3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrie

Die Ergebnisse dieses Teils implizieren ein Modell in dem AICD über die Regulation der FADS die Synthese der PUFAs beeinflusst. Der PUFA/MUFA-Quotient der Lipidextrakte von MEF APP Δ CT15- war im Vergleich zu den Lipidextrakten der MEF AWT-Zellen signifikant um 24% ($p^{***} < 0,001$) erhöht. Der PUFA/SFA-Quotient war ebenfalls um 28% ($p^{***} < 0,001$) erhöht. Dieser Effekt wurde ebenfalls in den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen beobachtet. Die Veränderung des PUFA/MUFA- und PUFA/SFA-Quotienten betrug dabei 15% ($p^{**} < 0,01$) und 12% ($p^{**} < 0,01$) respektiv. Der PUFA/MUFA Quotient wurde für die PE ae der Lipidextrakte der MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu den MEF AWT-Zellen bestimmt und war um 8% ($p^* < 0,05$) erhöht. Im Einklang mit dem Modell war der PUFA/SFA-Quotient in der Lipidspezies der PC aa auch um 15% ($p^* < 0,05$) erhöht. Zusätzlich zeigten die Lipidextrakt der MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen einen signifikant erhöhte PUFA/SFA und PUFA/MUFA Quotient von 33% ($p^{***} < 0,001$) und 26% ($p < 0,001$) respektiv im Vergleich zu den Lipidextrakten von MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen. Um den Einfluss von AICD entsprechend des vorgeschlagenen Modells zu prüfen wurde der C22:6/18:1 Quotient in Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu MEF AWT bestimmt. Da die Phosphatidylethanolamine den stärksten Effekt zeigten wurde in dieser Lipidspezies der Omega-3/Omega-6 Index bestimmt. Der Omega-3/Omega-6 Index war um 7% ($p^{***} > 0,001$) in den Lipidextrakten der MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu den Lipidextrakten der MEF AWT-Zellen erhöht. Ebenso war DHA in den Lipidextrakten der MEF APP Δ CT15-Zellen um 63% ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Lipidextrakten der MEF AWT-Zellen erhöht. Die Ergebnisse stehen im Einklang einer AICD-abhängigen Regulation der PUFA Synthese.

Es wurde bereits publiziert, dass AICD den Ceramid-Level verändern kann. Um dies zu bestätigen wurden die Gesamt Ceramide in den Lipidextrakten von MEF APP Δ CT15-Zellen massenspektrometrisch analysiert und mit den Lipidextrakten von MEF AWT-Zellen verglichen. Die Ceramid-Konzentration war um 265% ($p^{***} < 0,001$) in dem AICD-defizienten Zellmodell erhöht. Neu ist, dass dieser Effekt auch in den Lipidextrakten der retransfizierten MEF $\Delta\Delta$ mock- im Vergleich zu den MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellen reproduzierbar ist. Die Effektstärke beträgt hierbei 136% ($p^{***} < 0,001$).

Außerdem wurde gezeigt, dass in dem verwendeten AICD-defizienten Zell-Modell der MEF APP Δ CT15-Zellen die Summe der PC ae um 24% ($p^* < 0,05$) im Vergleich zu

Wildtyp-Zellen reduziert ist. Dieser Effekt von AICD auf die Plasmalogene wurde bereits publiziert und konnte bestätigt werden.

Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Lipidspezies	Lipidextrakt von MEF APPACT15-Zellen im Vergleich zu MEF AWT-Zellen
PE aa	PUFA/MUFA +24% *** PUFA/SFA +28% *** (PUFA/MUFA +15% ** PUFA/SFA +12% ** in MEF ΔΔ mock gegen MEF ΔΔ C50)
PE ae	PUFA/MUFA +8% *
PC aa	PUFA/SFA +15% *
PC ae	PUFA/SFA +33% ** (PUFA/MUFA +26% * in MEF ΔΔ mock gegen MEF ΔΔ C50)
Lysierte PE	C22:6/18:1 +42%**
PE aa DHA	PE aa DHA +63% **
PE aa Omega-3/Omega-6 Index	PE aa Omega-3/Omega-6 Index +7% ***
Ceramide	Ceramide +265% *** (Ceramide +136% *** in MEF ΔΔ mock gegen MEF ΔΔ C50)
Summe PC ae	Summe PC ae -24% *

5.3.2. Die Lipidkomposition im Kontext der AD

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein erhöhter PUFA/MUFA und PUFA/SFA Quotient in AICD-defizienten Zellen beobachtet. Die Lipidspezies der PEaa zeigte den robustesten Effekt.

Die Effekte zeigen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. MEF $\Delta\Delta$ C50 überexprimieren AICD. Die Verwendung eines Vektors erlaubt zum einen ein Zellmodell mit einer erhöhten AICD-Expression zu studieren, zum anderen kann eine dahingehend veränderte Expression aber auch den Transport und die Sortierung von AICD stören. Das Zellmodell der MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zeigte stärkere Effekte als die retransfizierten Zellen. Die Funktionalität von AICD im MEF $\Delta\Delta$ C50-Zellmodell sollte durch weitere Experimente überprüft werden.

Verschiedene Arbeiten beobachteten eine Verschiebung der Lipidkomposition zu den gesättigten Fettsäuren, bzw. eine Abnahme der PUFAs im Kontext von AD (Guan et al. 1999, Nakada et al. 1990, Soderberg et al. 1991).

Es wurden verschiedene Erklärungen für diesen Effekt diskutiert, unter anderem eine verstärkte Oxydierung der Fettsäuren sowie eine Dysregulation der Desaturasen (Moreira et al. 2007, Nakada et al. 1990, Nunomura et al. 2006, Perry et al. 2002).

Die Bedeutung von AICD für die Lipidhomöostase wurde in *in vivo* noch nicht erforscht. Die beschriebenen Effekte deuten dennoch auf eine Bedeutung von AICD für die zelluläre Lipidkomposition als auch für die Pathogenese der AD hin und fordern zu weiterer Forschung auf. Es ist ebenfalls bemerkenswert, dass insbesondere die Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine markante Veränderungen zeigt.

Zahlreiche epidemiologische und *Post mortem* Studien konnten ebenfalls Veränderungen dieser Lipidspezies im Kontext von AD beobachten und betonen die Bedeutung der Phosphatidylethanolamine für die AD Pathologie (Ginsberg et al. 1995, Guan et al. 1999, Prasad et al. 1998, Soderberg et al. 1991, Wells et al. 1995). Die Veränderung des PUFA/SFA-Quotienten war in dieser Arbeit besonders bei den Phosphatidylethanolaminen akzentuiert, während die Phosphatidylethanolamin Plasmalogenen nur in einer Zellreihe einen Effekt zeigten. Guan et al. beobachtete ein verändertes PUFA-Profil hingegen vorrangig in der Lipid-Spezies der Phosphatidylethanolamin Plasmalogenene (Guan et al. 1999). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich dem Fakt geschuldet, dass es sich bei derartigen Autopsiestudien um *in vivo* Studien handelt, deren Ergebnisse grundsätzlich nicht auf die hier dargestellten *in vitro* Ergebnisse übertragbar sind. Zum anderen kann dieser Effekt dadurch erklärt werden, dass A β 42 durch direkte Interaktion die AGPS und somit die Plasmalogen *de novo* Synthese stimuliert (Grimm M. O. et al. 2011d). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellmodelle untersuchen den Effekt von AICD, nicht aber von A β . Im Rahmen der Pathogenese von AD ist die Plasmalogen Synthese unter anderem durch eine dysregulierte A β -Homöostase aber auch durch andere Mechanismen wie oxidativen

Stress gestört (Braverman and Moser 2012). Diese Effekte werden im gewählten Zellmodell nicht abgebildet.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der folgende Mechanismus diskutiert werden.

Im Kontext der AD-Pathogenese kommt es regelmäßig zu einer Dysregulation der APP-Prozessierung und gegebenenfalls zu einer Potenzierung der amyloidogenen Prozessierung (Haass et al. 2012, Selkoe et al. 1996), wodurch verstärkt genwirksames AICD anfällt (Turner et al. 2010).

AICD übt einen inhibitorischen Effekt auf die Desaturasen, insbesondere FADS1 und FADS2 aus. Als Konsequenz der verminderten Desaturasen-Aktivität kommt es zu einer Veränderung der Lipidkomposition und einer Abnahme des PUFA/MUFA- bzw. PUFA/SFA-Quotienten vor Allem in der Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine.

Es ist aber auch zu bemerken, dass die Ätiologie der AD multifaktoriell ist und nicht jede AD Erkrankung mit einer potenzierten amyloidogenen Prozessierung einhergeht. Familiäre Formen, insbesondere die Presenilin-Mutationen, gehen oftmals mit einer verringerten Aktivität der γ -Sekretase und einer Verschiebung des A β 42/40 Quotienten einher (Scheuner et al. 1996, Zhang C. et al. 2010).

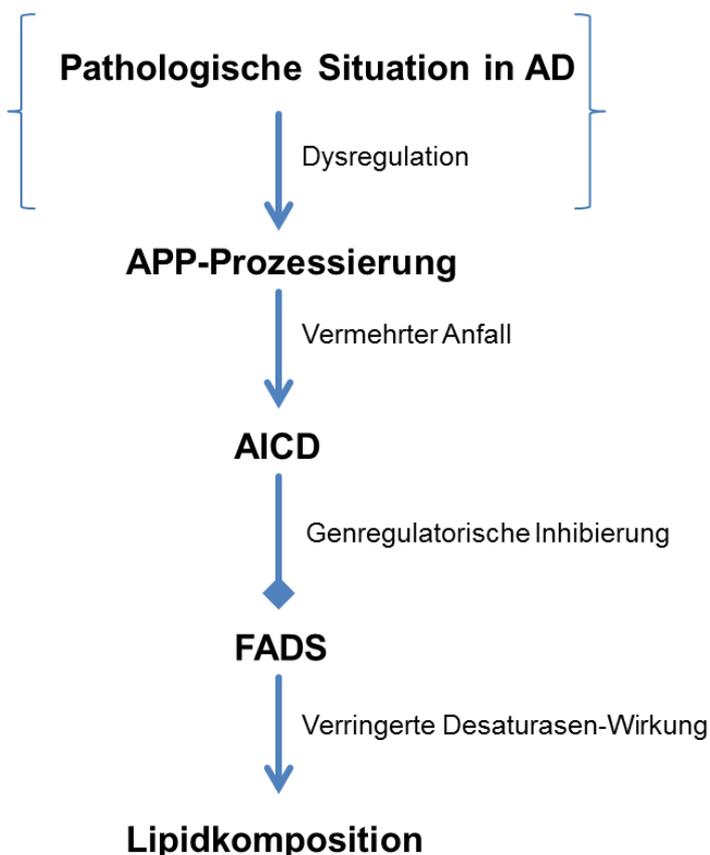


Abbildung 47:
Vorgeschlagener Mechanismus der AICD-abhängigen Modifizierung der Lipidkomposition:
 AD ist durch eine dysregulierte APP-Prozessierung und eine A β Akkumulation gekennzeichnet. Durch die amyloidogene Prozessierung fällt vermehrt genwirksames AICD an. Dieses genwirksame AICD inhibiert die Genexpression der FADS. Hierdurch kommt es zu einer veränderten, bzw. gesättigteren Lipidkomposition. Die Lipidspezies der Phosphatidylethanolamine ist hiervon besonders betroffen.

Neben einer Veränderung der Fettsäuren wurde eine signifikante Steigerung der Ceramid-Konzentration in AICD-defizienten Zellen beobachtet.

Ceramide werden im Kontext von AD als Mediatoren von Apoptose und Neurodegeneration diskutiert (Cutler et al. 2004, Puglielli et al. 2003, Sato et al. 2005) und es wurde eine Zunahme der Ceramid-Konzentration in AD-Gehirnen beobachtet (Filippov et al. 2012, Han 2005).

Die in dieser Arbeit deutlich erhöhten Ceramid-Spiegel AICD-defizienter Zellen können mechanistisch durch ein Wegfallen der inhibitorischen Wirkung von AICD auf die Expression von SPTLC2, einer Untereinheit der Serin-Palmitoyl-CoA Transferase, erklärt werden (Grimm M. O. et al. 2011b). Die Serin-Palmitoyl-CoA Transferase (SPT) spielt eine entscheidende Rolle in der *de novo* Synthese von Sphingolipiden, wie auch Ceramiden (Grimm M. O. et al. 2011b, Hojjati et al. 2005).

Der Annahme folgend, dass AICD die Ceramid-Synthese inhibiert und es bei AICD-Defizienz zu einer erhöhten Konzentration von Ceramiden kommt, wäre zu erwarten, dass im Kontext der AD-Pathologie durch eine Potenzierung der amyloidogenen Prozessierung vermehrt genwirksames AICD anfällt und es zu einer Abnahme der Ceramid-Konzentration kommt. Dies wird aber durch die Literaturlage konterkariert.

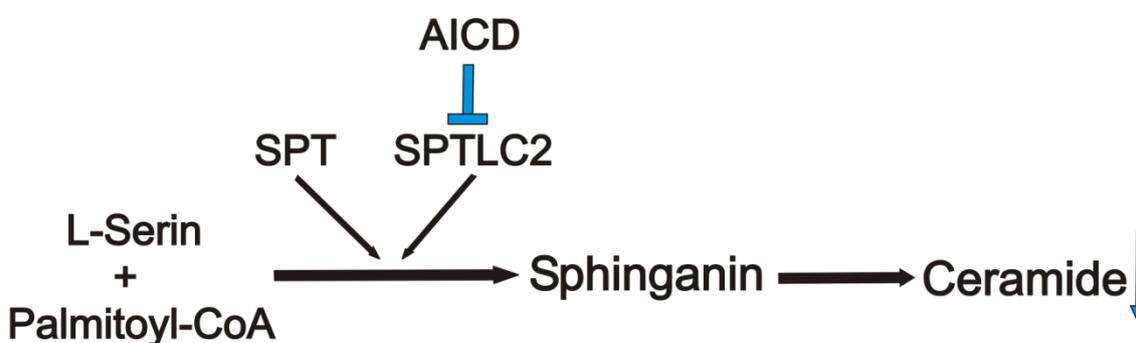


Abbildung 48: Vereinfachte Darstellung der Ceramid *de novo* Synthese.

L-Serin und Palmitoyl-CoA werden durch die SPT zu 3-Dehydrosphinganim kondensiert. 3-Dehydrosphinganim wird anschließend durch die 3-Dehydrosphinganimreduktase zu Sphinganim reduziert. Sphinganine werden anschließend durch die Wirkung der Ceramid-Synthase und verschiedenen Reduktasen zu Ceramiden transformiert. SPT limitiert die Synthese der Ceramide. SPTLC2 ist eine Untereinheit der SPT. AICD inhibiert SPTLC2 und reduziert die Menge an synthetisierten Ceramiden.

Es konnte gezeigt werden, dass Ceramide einen direkten Effekt auf die β -Sekretase haben und in der Lage sind diese zu stabilisieren (Kim M. et al. 2016, Puglielli et al. 2003, Xing et al. 2016). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Ceramid-Konzentration in AD-Gehirnen ist eine direkte Aktivierung der Sphingomyelinase durch A β -Oligomere und A β -Fibrillen (Grimm M. O. et al. 2005, Puglielli et al. 2003).

Weiterhin konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass oxidativer Stress, wie er auch in der AD-Pathologie vorkommt, zu einer Aktivierung der Sphingomyelinase führen kann (Dotson et al. 2015, Jana and Pahan 2004, Panchal et al. 2014).

Eine Inhibierung der Sphingomyelinase durch AICD in diesem Kontext könnte auf einen Homöostase-Mechanismus hinweisen: Im Rahmen der AD-Pathologie kommt es durch oxidativen Stress und eine A β -induzierten Aktivitätssteigerung zu einem vermehrten Anfall von Ceramiden.

Genwirksames AICD, das vermehrt über die amyloidogene Prozessierung entsteht, inhibiert hingegen die Sphingomyelinase und verschiebt die Ceramid-Konzentration zu einem physiologischeren Niveau.

Es ist auch abermals anzuführen, dass hier Erkenntnisse aus *in vivo* Studien mit *in vitro* Studien konfrontiert werden und dass zahlreiche Faktoren, wie beispielsweise Ernährungsgewohnheiten oder Komorbiditäten, nicht angemessen berücksichtigt und beurteilt werden können.

Die Rolle der Ceramide in der AD-Pathogenese ist unsicher (Grimm M. O. W. et al. 2017b). Es bedarf weiterer Forschungsanstrengung um eine robuste Aussage treffen zu können.

5.4. Einfluss von Lipidextrakten auf die APP-prozessierenden Sekretasen

Lipide sind von kritischer Bedeutung für die Integrität und das Überleben von Zellen und Lebewesen.

Sie erfüllen zahlreiche Funktionen. Lipide, insbesondere Triglycerid-Ester und Sterol-Ester, dienen als Energiespeicher, sie formen die Matrix zellulärer Membranen, beeinflussen die Genexpression und die Funktion von Membranproteinen oder agieren als Erst- oder Zweit-Bote (Calderon et al. 1995, van Meer et al. 2008).

Lipide können anhand ihrer Kopfgruppe, aber auch an ihrer Länge und ihrem Sättigungsgrad klassifiziert werden. Die Länge und der Sättigungsgrad einer Fettsäure beeinflusst ihre physikalischen Eigenschaften, wie die Van-der-Waals-Kräfte und den Schmelzpunkt. Lipide, die in einer Membran inkorporiert sind, beeinflussen sowohl die Membranfluidität als auch die Funktion und Stabilität nahezu aller Membranproteine (Tonelli et al. 1995, van Meer et al. 2008, Zavodnik et al. 1997).

Fettsäuren werden in gesättigte, wenn sie keine Doppelbindung aufweisen, und ungesättigte Fettsäuren, wenn sie eine oder mehr Doppelbindungen aufweisen, unterteilt.

Phospholipide sind phosphorhaltige Lipide, die den Großteil der Lipidkomposition in eukaryotischen Membranen ausmachen. Sie setzen sich aus einer hydrophilen Kopfgruppe und zwei hydrophoben Kohlenwasserschwänzen zusammen und lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen:

Phosphoglyceride sind Glycerolipide mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerin als Grundgerüst, während Sphingomyeline phosphorhaltige Sphingolipide mit Sphingosin als Grundgerüst sind.

Weiterhin existieren sogenannte Plasmalogene, die sich von Phosphoglyceriden dadurch unterscheiden, dass sie am C1-Atom des Glycerins statt einer Fettsäure einen ungesättigten Alkohol binden.

Phospholipide bilden aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Grundlage für zelluläre Lipiddoppelschichten.

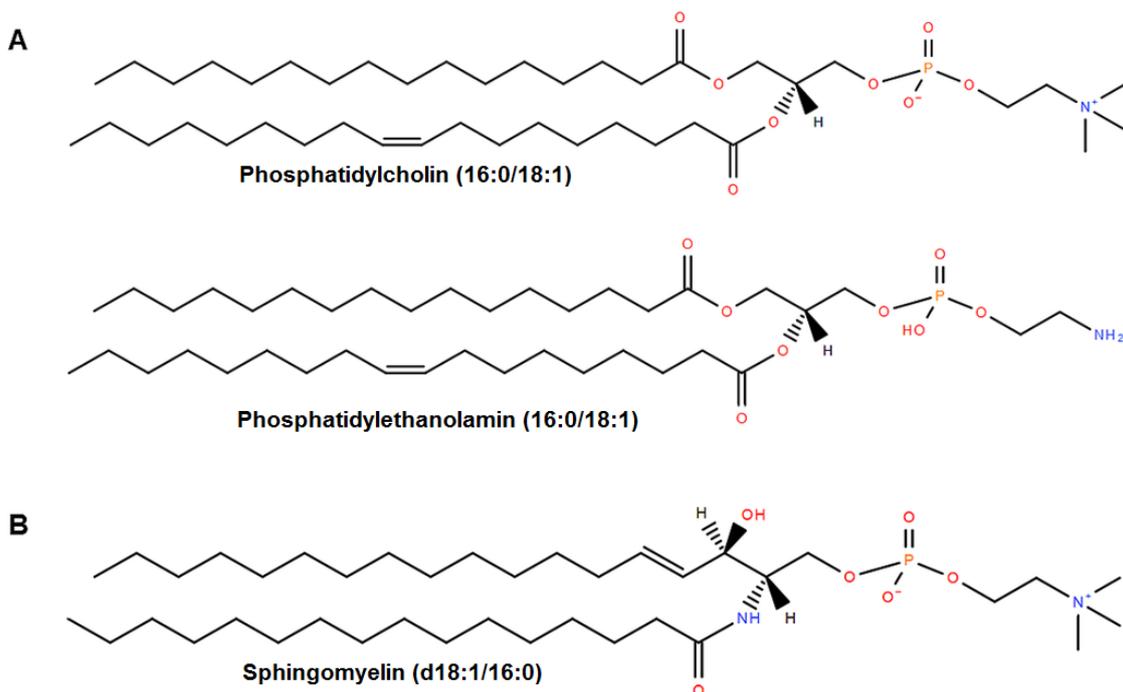


Abbildung 49: Darstellung verschiedener Phospholipide

A: Struktur der Phosphoglyceride Phosphatidylcholin (oben) und Phosphatidylethanolamin (unten).

B: Struktur von Sphingomyelin.

In Klammern ist die Länge und Sättigung der jeweiligen Fettsäure angegeben.

Verändert nach Blesso 2015 (Blesso 2015)

Phosphoglyceride sind durch ihre Kopfgruppe, die durch die Bindung eines Alkohols an die Phosphorsäure entsteht, charakterisiert. Prinzipiell werden Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Sphingocholine und Glycolipide unterschieden, wobei Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) die häufigsten Kopfgruppen repräsentieren (Kadowaki and Grant 1995, Lim S. Y. and Suzuki 2000).

PCs werden über den sogenannten Kennedy-Reaktionsweg aus Cholin und 1,2-Diacylglycerol gebildet (Kennedy and Weiss 1956).

Lipide machen 37% des Trockengewichtes von Neuronen aus, wobei sich dieses Trockengewicht auf 15.4% Cholesterin, 4.8% Galactolipide und 57.1% Phospholipide verteilt (Calderon et al. 1995).

Die Verteilung der Phospholipide wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Lipidkomposition in eukaryotischen Zellmembranen von Neuronen (Calderon et al. 1995)

Lipid	Prozent des Trockengewichtes
Phosphatidylcholin	28.9%
Phosphatidylethanolamin	16.5%
Phosphatidylinositol	5.8%
Phosphatidylserin	3.1%
Sphingomyelin	2.8%
Cholesterin	15.4%
Sulfatide	1.6%

Sowohl APP als auch die APP-prozessierenden Sekretasen sind transmembran Proteine und ein Einfluss der unmittelbaren Lipidumgebung auf die Prozessivität scheint naheliegend (Grziwa et al. 2003). Diese Prämisse konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden und die aktuelle Studienlage wird in 5.2 dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls der Effekt der Lipidumgebung auf die APP-Prozessierung untersucht.

Die Lipidextrakte von MEF AWT und MEF APP Δ CT15-Zellen als auch von MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock-Zellen zeigten einen Einfluss auf das Gesamt-A β (4.2.1), als auch auf sAPP β (4.2.2). Die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen führten hierbei zu einer signifikanten Reduktion des Gesamt-A β und von sAPP β .

Dieser Effekt konnte durch die Inkubation eines Lipidextraktes, der durch die Inkubation von APP Δ CT15-Zellen mit AICD50 gewonnen wurde, reproduziert werden (4.2.1.3).

Weiterhin führte die Inkubation von lebenden Zellen mit den AICD-defizienten Lipidextrakten zu einer signifikant verringerten Aktivität der β - und der γ -Sekretase im

Vergleich zu einer Lösungsmittel-Kontrolle, bzw. einem Lipidextrakt nicht AICD-defizienter Zellen (4.2.6).

Dieser Effekt konnte ebenfalls auf PNFs demonstriert werden (4.2.7).

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Lipidextrakte auf die Expression der Gene, die unmittelbar an der APP-Prozessierung beteiligt sind beobachtet werden (4.2.8).

Ein Einfluss der Lipidextrakte auf die A β -Degradation konnte nicht demonstriert werden (4.2.3).

Die dargestellten Ergebnisse implizieren eine direkte Modifizierung der APP-prozessierenden Sekretasen durch die eingesetzten Lipidextrakte.

Wie bereits beschrieben, weisen die Lipidextrakte AICD-defizienter Zellen ein verändertes Lipidprofil mit einem erhöhten PUFA-Anteil auf.

Die Inkorporation von PUFAs in zelluläre Membranen kann zelluläre Funktionen durch die Beeinflussung physikalischer Eigenschaften modifizieren (Grimm M. O. et al. 2013c, Hibbeln et al. 2000, Shie et al. 2002). Die Fähigkeit bestimmter Fettsäuren die Membraneigenschaften zu verändern hängt von ihrem Sättigungsgrad, ihrem *Trans/Cis*-Quotienten und ihrer Länge ab (Lapshina et al. 1995, Yang X. et al. 2011, Zavodnik et al. 1997). So konnte beispielsweise demonstriert werden, dass eine Diät reich an DHA die Membranfluidität von Neuronen und anderen Zellen erhöhen kann (Fukaya et al. 2007, Horrocks and Farooqui 2004).

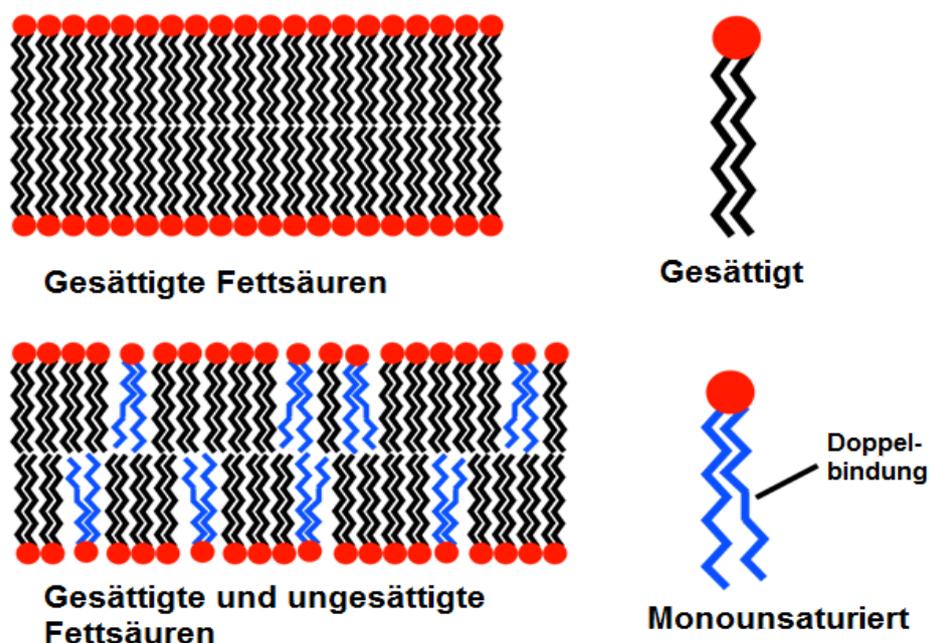


Abbildung 50: Die Doppellipidschicht: Effekt von ungesättigten Fettsäuren.

Die Inkorporation von ungesättigten Fettsäuren in eine Doppellipidschicht, wie sie in zellulären Membranen vorkommt, führt zu einer erhöhten Membranfluidität. Die Doppelbindungen führen zu einem „Knick“ in der Kohlenstoffkette; die Van der Waals Kräfte werden reduziert und die Lipidschicht wird flexibler (Rawicz et al. 2000).

Verändert nach Wikipedia: Lipid Bilayer

Die Integration von PUFAs in zelluläre Membrane bedingt eine erhöhte Membranfluidität sowie eine verringerte Membrandicke (Hashimoto et al. 1999, Yehuda et al. 2002).

Weiterhin wurde berichtet, dass PUFAs in der Lage sind membrangebundenes Cholesterin und die Cholesterin de-novo Synthese über eine Inhibierung der HMGCR zu reduzieren (Grimm M. O. et al. 2008, Yehuda et al. 2002).

In einem Mausmodell A β -induzierter kognitiver Dysfunktion zeigte eine DHA-Supplementierung eine signifikante Verbesserung der Gedächtnis- und Lernfunktion der entsprechenden Mäuse (Hashimoto et al. 2002). Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass EPA und DHA die A β -Degradation über einen Einfluss auf das Insulin-degradierende Enzym potenzieren (Grimm M. O. et al. 2016c).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass DHA über einen pleiotropen Mechanismus die A β -Synthese inhibiert (Grimm M. O. et al. 2011c, Grimm M. O. et al. 2013c, Holmes O. et al. 2012). DHA steigert die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung über eine erhöhte ADAM17 Proteininstabilität und einen direkten Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase und reduziert gleichzeitig die Enzymaktivität der β - und γ -Sekretase über einen direkten Mechanismus, während die Genexpression von BACE1 und PS1 unverändert blieb (Grimm M. O. et al. 2011c, Sahlin et al. 2007).

Sowohl für DHA als auch für EPA konnte ein aktivitätssteigernder Einfluss auf die α -Sekretase demonstriert werden (Grimm M. O. et al. 2013c).

DHA wird schnell in Zellen, insbesondere Phospholipide der Plasmamembran sowie Mitochondrien inkorporiert, wobei DHA präferenziell zu Phosphatidylethanolamin esterifiziert wird, während nur ein geringer Teil in andere Phospholipide verstoffwechselt wird (Emmelot and Van Hoeven 1975, Robinson et al. 1993, Tahin et al. 1981).

Die Forschungsgruppe um Holmes untersuchte 2012 die Effekte von verschiedenen Phospholipiden auf die γ -Sekretase. In dieser Arbeit wurde die Aktivität purifizierter γ -Sekretase auf Lösungsmittel-freien Lipid-Vesikeln untersucht und es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Fettsäurenlänge die Aktivität der γ -Sekretase erhöht und gleichzeitig den A β ₄₂/A β ₄₀-Quotienten reduziert (Holmes O. et al. 2012). In diesem Kontext konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Inkorporation von Arachidonsäure (PC 20:4) zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen A β ₄₀-Konzentration von 30% führt (Holmes O. et al. 2012). Arachidonsäure ist eine Omega-6 Fettsäure. Die Behandlung der Vesikel mit 50 μ M DHA führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der A β ₄₀-Konzentration (Holmes O. et al. 2012). Interessanterweise führte die Behandlung mit Arachidonsäure zu einer circa 40% Erhöhung des A β ₄₂/A β ₄₀-Quotienten bei einem $p \leq 0,001$, während die Behandlung mit

DHA nur zu einer dezenten Erhöhung des Quotienten führte bei einem $p \leq 0,05$ (Holmes O. et al. 2012). Es ist zu unterstreichen, dass in dieser Studie Lipidkonzentrationen von $50\mu\text{M}$ verwendet wurden, während in der hier dargestellten Arbeit $10\mu\text{M}$ eingesetzt wurden. Der beobachtete Effekt der Arachidonsäure als Omega-6 und von DHA als Omega-3 Fettsäure unterstützt das Modell, dass Omega-3 Fettsäuren in Hinblick auf AD protektiv wirken und die kognitive Leistung verbessern (Chhetri et al. 2018, Coley et al. 2018, Sakai et al. 2017).

Diese Ergebnisse sind außerdem bemerkenswert, als dass die beobachteten Effekte ungefähr dieselbe Effektstärke aufweisen, wie sie in dieser Arbeit für die eingesetzten Lipidextrakte im Kontext der γ -Sekretase beobachtet wurden. Ferner ist die Erhöhung des $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ -Quotienten durch die Behandlung mit Arachidonsäure und zu einem geringeren Maß durch DHA von Bedeutung, da dies eine negative Konsequenz in Bezug auf die AD-Pathologie darstellt. Der $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ -Quotient ist ein Biomarker für AD und korreliert mit kognitiven Einschränkungen im Rahmen der Erkrankungen (Janelidze et al. 2016, Pauwels et al. 2009, Tabira et al. 2002).

Die zelluläre Membran ist keine homogene Struktur, sondern durch den rapiden Wechsel verschiedener Membranabschnitte, sogenannter Domäne, charakterisiert (Edidin 1993, 2001).

Diese Domäne unterscheiden sich in ihrer Größe, Struktur, Lipid- und Proteinkomposition und Funktion (Edidin 2003, Nagafuku et al. 2003). So sind die Mediatoren der amyloidogenen Prozessierung, die β - und γ -Sekretase, vor allem in Lipid-Rafts lokalisiert und üben hier ihre Funktion aus, während die nicht-amyloidogene Prozessierung vor allem in non-Lipid-Raft Domänen stattfindet (Ehehalt et al. 2003).

Verschiedene Studien implizieren, dass PUFAs eine sehr geringe Affinität für Cholesterin haben und so die laterale als auch die trans-membrane Verteilung von Cholesterin beeinflussen (Knapp et al. 1994, Stillwell and Wassall 2003, Wassall et al. 2004). Wassall und Stillwell gehen weiterhin davon aus, dass die Inkorporation von PUFAs in zelluläre Membrane die Formierung PUFA-reicher und Cholesterin-armer Domäne bedingt (Wassall and Stillwell 2009). Diese desorganisierten, PUFA-reichen Domänen stellen die „Antithese der organisierten Lipid-Rafts“ da (Wassall and Stillwell 2009). Nach der Konditionierung von Zellen mit DHA konnte demonstriert werden, dass Cholesterin und PS1 von den Lipid-Raft zu den Non-Raft-Domänen verschoben werden und es zu einer reduzierten BACE1-Internalisierung kommt (Grimm M. O. et al. 2011c, Grimm M. O. et al. 2013c).

Die Inkorporation von längeren Fettsäuren in die Zellmembran erhöht sowohl die Dicke der Zellmembran als auch den Raum, der pro Molekül eingenommen wird (Cornell and Separovic 1983, Ipsen et al. 1990, Lewis B. A. and Engelman 1983). Winkler et al. konnte in diesem Kontext demonstrieren, dass die Synthese von A β 42/A β 43 durch eine erhöhte Membrandicke inhibiert wird (Winkler et al. 2012).

Neben der A β -Synthese scheinen PUFAs, wie DHA, einen positiven Effekt auf die A β -Aggregation und A β -induzierte Zelltoxizität auszuüben (Hashimoto et al. 2009, Hashimoto et al. 2008).

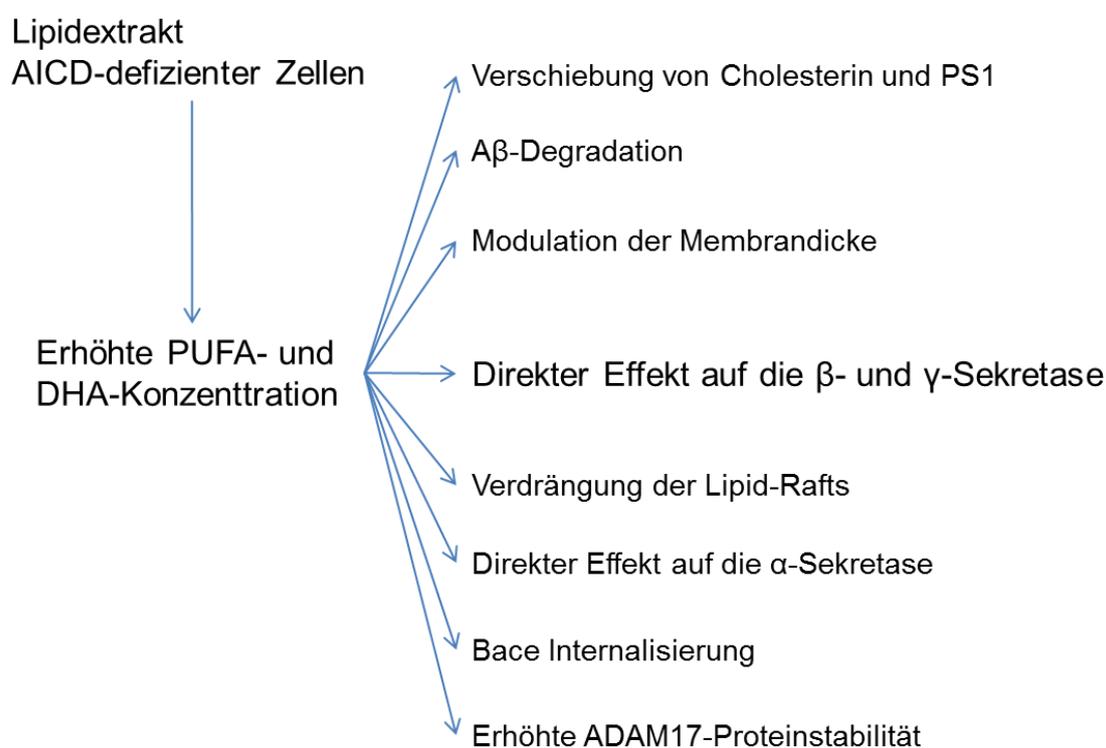


Abbildung 51: Zusammenfassung der möglichen Mechanismen.

Es ist eine Vielzahl möglicher Effekte in der Literatur beschrieben. In dieser Arbeit konnte vor allem ein direkter Effekt auf die β - und γ -Sekretase demonstriert werden.

Die beobachteten Effekte der verwendeten Lipidextrakte auf die APP-Prozessierung scheinen vor diesem Hintergrund äußerst plausibel. Die Lipidextrakte der AICD-defizienten Zellen sind durch einen erhöhten PUFA/MUFA- und PUFA/SFA-Quotienten sowie einer erhöhten DHA-Konzentration charakterisiert (4.1.3).

Abschließend soll in diesem Kontext der Mechanismus einer positiven Rückkoppelung diskutiert werden.

Genwirksames AICD fällt insbesondere durch die amyloidogene Prozessierung von APP an (Belyaev et al. 2010).

AD wird durch eine Akkumulation von amyloiden Plaques und A β charakterisiert, wobei diese Akkumulation in einer gesteigerten amyloidogenen APP-Prozessierung begründet sein kann (Selkoe et al. 1996). Der vermehrte Anfall von genwirksamen AICD führt zu einer genregulatorischen Inhibition der FADS-Gene, wodurch es zu einer verringerten Expression der Desaturasen kommt.

Die hieraus resultierende reduzierte Desaturasen-Wirkung hat eine Veränderung der Lipidkomposition zur Folge, wobei der Anteil der ungesättigten Fettsäuren abnimmt und der Anteil der gesättigten Fettsäuren zunimmt.

Dies führt durch die Inkorporation gesättigter Fettsäuren zu einer Modifizierung der physikalischen Eigenschaften der Zellmembran und über eine direkte Wirkung auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase zu einer Potenzierung der amyloidogenen Prozessierung. Hierdurch fällt vermehrt genwirksames AICD an und der Kreislauf wiederholt sich.

Diese positive Rückkoppelung scheint insbesondere im Kontext der amyloiden Kaskade plausibel. Die amyloide Kaskade geht von einer initialen Dysregulation des A β -Metabolismus aus, wobei A β akkumuliert und es als Folge zu einem komplexen Krankheitsgeschehen, inklusive der Entstehung der Tau-Pathologie und kognitiven Funktionsverlust, kommt (Tanzi and Bertram 2005). Hierbei würde es infolge der dysregulierten APP-Prozessierung zu einem vermehrten Anfall genwirksamen AICD kommen, das über eine Inhibition der FADS zu einem veränderten Lipidprofil führt und die amyloidogene Prozessierung stimuliert. Die Potenzierung der amyloidogenen Prozessierung führt in diesem Fall zu einer Akzentuierung der AD-Pathologie durch vermehrten Anfall von A β .

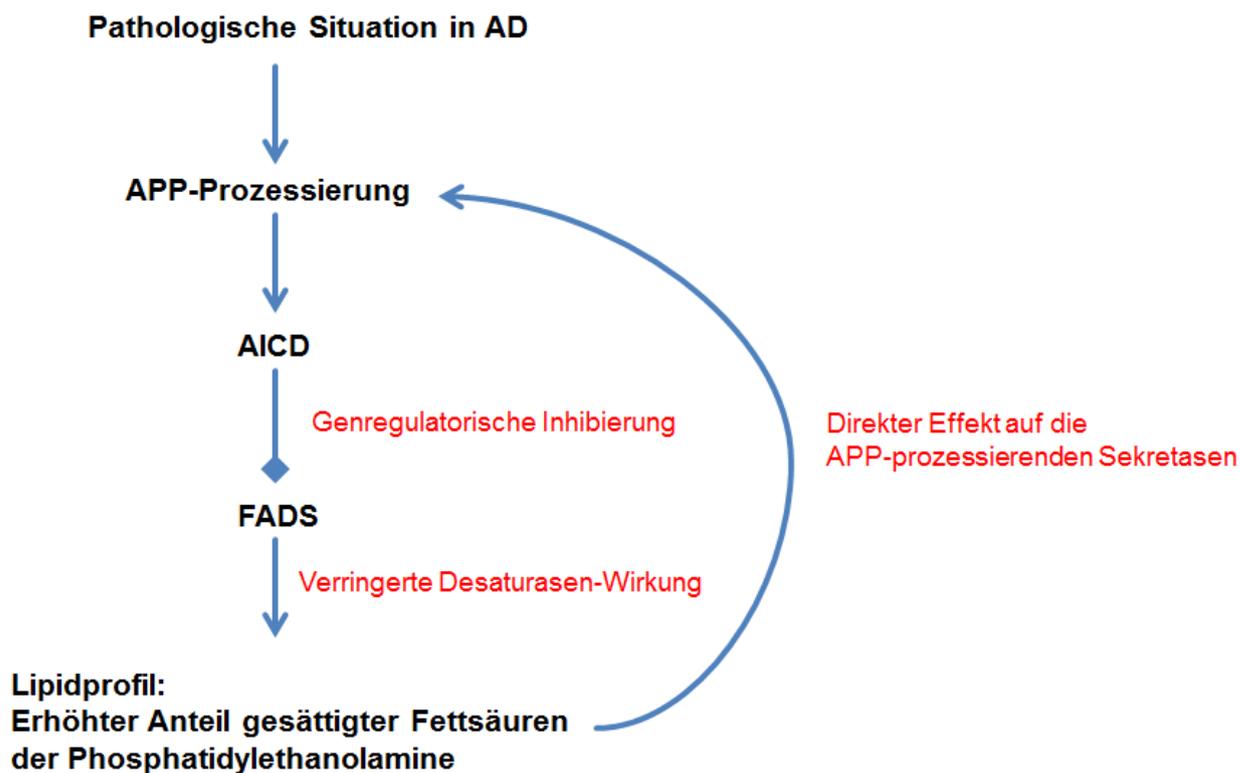


Abbildung 52: Ein sich selbst erhaltener Mechanismus

Im Kontext dieser Arbeit soll ein sich selbst erhaltender (Feed-Forward) Mechanismus postuliert werden, der sich über eine genregulatorische Inhibierung der FADS durch AICD, eine Veränderung des Lipidprofils und eine daraus folgende Potenzierung der amyloidogenen APP-Prozessierung durch einen direkten Effekt auf die APP-prozessierenden Sekretasen selbst unterhält.

Es ist aber ebenfalls denkbar, dass der hier postulierte Feed-Forward Mechanismus als Konsequenz einer unverhältnismäßigen Diät gesättigter Fettsäuren resultiert: Diätarisch aufgenommene Fettsäuren werden regelhaft in zelluläre Membranen, wie auch in Neuronen inkorporiert (Abbott et al. 2012). Tatsächlich wurde die diätarische Aufnahme von Fettsäuren als bedeutendster Einflussfaktor der Lipidkomposition der Zellmembran identifiziert (Abbott et al. 2012). Eine Veränderung des Lipidprofils durch die Integration gesättigter Fettsäuren modifiziert die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran und potenziert die Aktivität der β - und γ -Sekretase. Dies initiiert die hier beschriebene positive Rückkoppelung und resultiert in der für AD charakteristischen A β -Akkumulation. Diese Theorie wird durch die Identifikation der gesättigten Fettsäuren als Risikofaktor gestützt, so wurde im Rahmen der Rotterdam-Studie demonstriert, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren als auch die erhöhte Einnahme von Fett, gesättigten Fettsäuren und Cholesterin die Erkrankungswahrscheinlichkeit an AD signifikant erhöhen (Kalmijn et al. 1997).

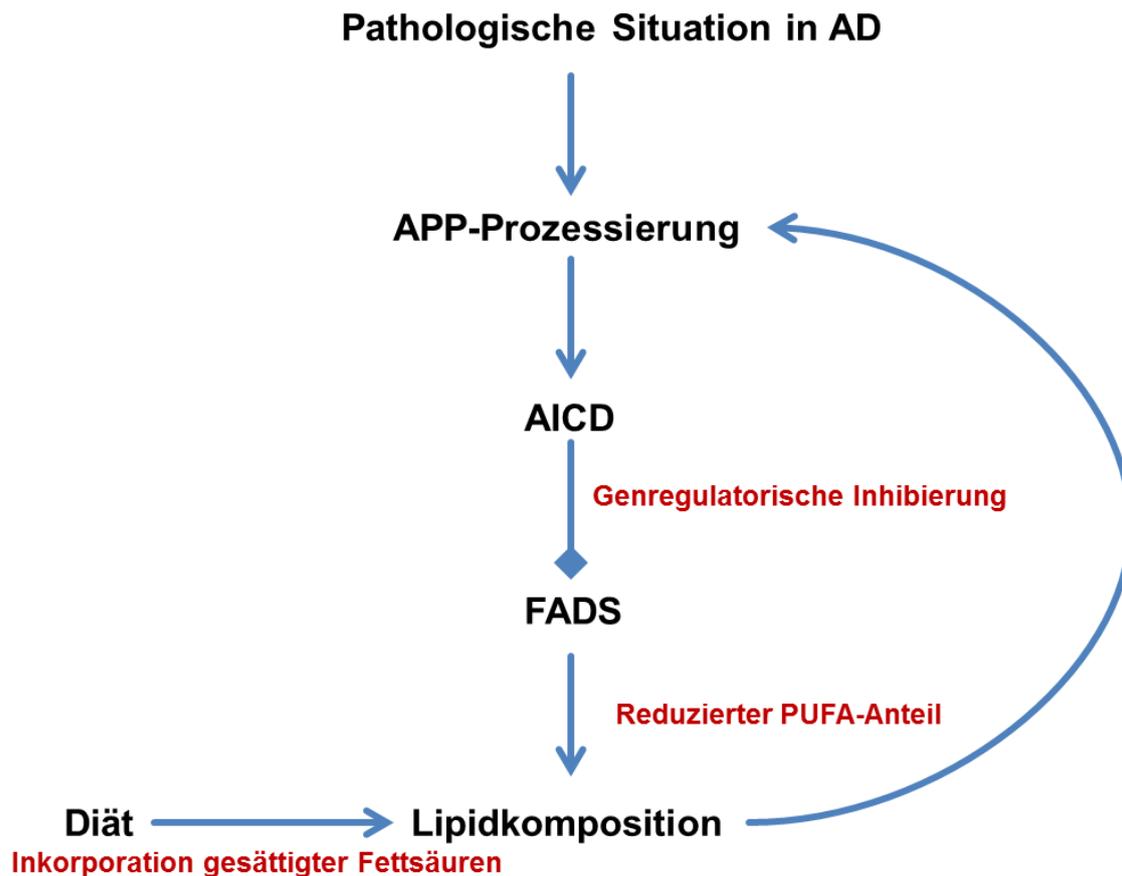


Abbildung 53: Bedeutung der Diät im Kontext eines Feed-Forward Mechanismus:

Die Aufnahme gesättigter Fettsäuren über die Diät modifiziert ebenfalls die zelluläre Lipidkomposition und ist als Initiator des beschriebenen Mechanismus der positiven Rückkoppelung.

In Bezug auf die AD-Erkrankung und ihre Inzidenz stellt dies einen weiteren Mechanismus da, durch den eine „ungesunde“ Diät einen negativen Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit AD hat. Die Inkorporation gesättigter Fettsäuren durch die Diät bedingt eine veränderte Lipidkomposition. Diese veränderte Lipidkomposition führt über eine Steigerung der amyloidogenen APP-Prozessierung zu einer reduzierten FADS-Aktivität und somit zu einer weiteren Modifizierung der Lipidkomposition. Ein sich selbst erhaltender Kreislauf entsteht.

5.5. Überlegungen und therapeutisches Potenzial

5.5.1. Die Studienlage und das therapeutischen Potential von PUFAs

Die Studienlage im Kontext der PUFA-Supplementation bei AD ist heterogen. Einige epidemiologischen Studien konnten einen positiven Effekt demonstrieren (Cole and Frautschy 2010, Morris 2009), während andere Studien, so auch die Rotterdam Studie, keinen Effekt beobachtet haben (Engelhart et al. 2002).

Der Einsatz von PUFAs in der Therapie von Patienten mit subjektiven Gedächtnisproblemen zeigte ebenfalls keine Wirkung (Andrieu et al. 2017). Sowohl eine Cochrane Meta-Analyse von 2012 (Jose Gagliardi 2012, Sydenham et al. 2012) als auch eine aktuelle Cochrane Meta-Analyse (Burckhardt et al. 2016, Phillips 2017) konnten keinen eindeutigen Nutzen einer DHA- Supplementation in Bezug auf Demenz feststellen. Dennoch zeigten DHA und verschiedene PUFAs in zahlreichen experimentellen Untersuchungen positive, bzw. protektive Eigenschaften in Bezug auf AD.

Diese Diskrepanz könnte in der Prozessivität der γ -Sekretase begründet sein: Wie (Holmes O. et al. 2012) und (Grimm M. O. et al. 2013c) bereits beschrieben, führt eine Behandlung mit DHA zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität der γ -Sekretase und folglich zu einer Reduktion von A β 40 als auch A β 42.

Interessanterweise scheint die Inkorporation von PUFAs aber auch die Prozessivität der γ -Sekretase zu verändern und es kommt zu einem veränderten A β 42/A β 40-Quotienten, wobei die Behandlung mit DHA zu einer Erhöhung dieses Quotienten führt (Holmes O. et al. 2012). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass A β 42 im Vergleich zu dem löslicheren A β 40 das prädominante Peptid in amyloiden Plaques darstellt (Roher et al. 1993). A β 42 zeichnet sich weiterhin durch eine erhöhte Neurotoxizität und einer Assoziation mit oxidativen Stress aus (Butterfield and Boyd-Kimball 2004, Casas et al. 2004, Varadarajan et al. 2001).

Eine weitere Erklärung für die heterogene Studienlage ist der zeitliche Verlauf der AD. Die pathologische Konsequenz der Alzheimer Erkrankung ist der Untergang von Synapsen und der Verlust kognitiver Funktion (Davies et al. 1987, Terry et al. 1991). Zahlreiche therapeutische Ansätze für AD haben versucht kognitive Verluste durch die Beseitigung von A β zu beheben.

Aducanumab ist ein humaner, monoklonaler, auf IgG1 basierender Antikörper, der mit hoher Affinität parenchymales A β erkennt (Ferrero et al. 2016). In Phase 3 Studien konnte Aducanumab kortikale A β -Level bis an den Rand der Nachweisgrenze durch Florbetapir PET Bildgebung reduzieren (Sevigny et al. 2016). Florbetapir ist ein Radiopharmazeutikum, das auf der zeitabhängigen Freisetzung von Positronen durch Fluorin-18 basiert (Hommet et al. 2014, Snellman et al. 2014). Florbetapir bindet zerebrales A β und gibt zeitabhängig, entsprechend der Halbwertszeit von 109,75 Minuten, Positronen ab (Chen C. J. et al. 2015, Snellman et al. 2014). Im Mai 2019 wurden die aktuellen Phase 3 Studien, die den Effekt von Aducanumab auf frühe Stadien der AD untersuchen, abgebrochen, da der primäre Endpunkt vorraussichtlich nicht erreicht wird (Pressemitteilung Biogen, März 2019).

Diese Studie ist insofern bemerkenswert und wird an dieser Stelle angeführt, da sie zeigt, dass immuntherapeutische Ansätze in der Lage sind A β -Level drastisch zu reduzieren, kognitive Verluste aber nicht effektiv kontrolliert werden können. Sekundäre Krankheitsprozesse und die unzureichende Regenerationsfähigkeit des zentralen Nervensystems verringern das Ansprechen der Therapie. Dies bedeutet aber auch, dass andere Therapieansätze, wie die Supplementation von DHA, trotz einer relevanten Reduktion von A β nur begrenzte Effekte auf die kognitive Funktion erwarten lassen können. Die meisten Interventionsstudien, die den Effekt von DHA auf Demenz oder AD untersuchten, wählten ein Patientenkollektiv im symptomatischen Stadium der Erkrankung (Burckhardt et al. 2016, Sydenham et al. 2012). Das Scheitern dieser Studien könnte in der Wahl des Patientenkollektives begründet sein und der Identifikation des optimalen Zeitpunktes der Therapie kommt eine entscheidende Bedeutung zu.

Daher nimmt ein präventiver Therapieansatz weiter an Relevanz zu. Ein Problem hierbei ist der prolongierte, asymptomatische Krankheitsverlauf der AD.

Präklinische Veränderungen können der klinischen Manifestation von AD Jahre bis Jahrzehnte vorausgehen (Caselli and Reiman 2013). Der langfristige Einsatz von immuntherapeutischen Ansätzen zur Prävention von AD ist kaum umsetzbar. Der Mangel einer effektiven Identifizierung von präklinischen AD-Patienten, unübersichtliche Nebenwirkungen und ökonomische Überlegungen machen einen derartigen Einsatz von Immuntherapeutika nur schwer vorstellbar.

Dietärische Therapieansätze hingegen sind leicht umsetzbar und weitgehend unbedenklich in Bezug auf mögliche Nebenwirkungen.

Daher könnte sich bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für AD die DHA-Supplementation in der präklinischen Phase als sinnvolle Maßnahme entwickeln. Tatsächlich zeigten einzelne Studien bereits begrenzten Erfolg. Ältere Patienten mit einem niedrigen Omega-3 Index und ohne klinische Zeichen einer Demenz-Erkrankung wurden über 3 Jahre mit DHA und EPA behandelt (Hooper C. et al. 2017). Patienten, die mit PUFAs supplementiert wurden, schnitten in der Testung der Sprachkompetenz signifikant besser ab als die Placebo-Gruppe, während die Testung anderer exekutiver Funktion zwar die PUFA-Gruppe präferierte, aber keine Signifikanz erreichte (Hooper C. et al. 2017).

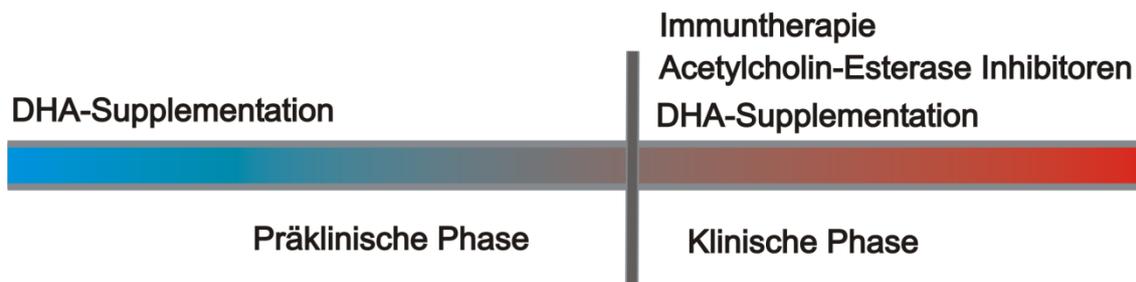


Abbildung 54: Zeitlicher Ablauf einer möglichen AD-Therapie.

Neben der Wahl des Therapiezeitpunktes ist die Evaluation des potentiellen Therapieansprechens von Bedeutung. Einzelne Studien versuchen bereits anhand des Omega-3 Indexes das optimale Patientenkollektiv für zukünftige Interventionsstudien mit PUFAs zu identifizieren (Coley et al. 2018).

5.5.2. Überlegungen zur Rolle von Lipiden im Kontext der AD-Therapie

Diese Arbeit stellt zwei Dinge fest:

- 1.) AICD modifiziert die zelluläre Lipidkomposition und verringert den PUFA-Anteil insbesondere der Phosphatidylethanolamine
- 2.) Das veränderte Lipidprofil reguliert die APP-prozessierenden Sekretasen über eine direkte Wirkung

Vor diesem Hintergrund wäre eine Inhibition der β -Sekretase vorteilhaft in Bezug auf AD. Genwirksames AICD fällt insbesondere über die amyloidogene APP-Prozessierung an (Belyaev et al. 2010, Goodger et al. 2009) und es ist zu erwarten, dass eine Inhibition von BACE1 zu einer drastischen Reduktion AICD-induzierter Genexpression führt (Goodger et al. 2009). Folglich würde die Inhibition von BACE1 zu einer gesteigerten Aktivität der FADS führen und das zelluläre Lipidprofil modifizieren. Wie im zweiten Teil der Arbeit gezeigt wurde, reduziert ein derartiges, PUFA-reiches Lipidprofil die amyloidogene Prozessierung (4.2.1).

Dennoch ist festzustellen, dass ein solcher Mechanismus für die AD-Therapie höchstens von untergeordneter Rolle ist, da nur ein geringer Teil der PUFAs endogen synthetisiert werden (Cunnane and Anderson 1997, Huang Y. S. et al. 2004).

Daher ist in diesem Kontext die Bedeutung der Diät zu diskutieren.

(Abbott et al. 2012) identifizieren die Diät als bedeutendsten Modulator der zellulären Lipidkomposition in Ratten unter normalen Bedingungen. Eine Beeinflussung der Lipidkomposition durch die Modifikation der APP-Prozessierung scheint vor diesem Hintergrund zweifelhaft; eine Beeinflussung der APP-Prozessierung durch die Diät

hingegen gewiss. Die Bedeutung der Diät, insbesondere der aufgenommenen Fettsäuren und des Cholesterins wurde in dieser Arbeit bereits diskutiert und belegt (2.4; 5.2).

Vor diesem Hintergrund soll der mögliche protektive Effekt einer Ernährung, die reich an PUFAs und DHA ist, unterstrichen werden und um die in dieser Arbeit dargestellten Mechanismen ergänzt werden. Durch die Aufnahme von PUFAs über die Diät kann die hier dargestellte positive Rückkoppelung in eine negative Rückkoppelung transformiert werden:

Die Inkorporation von diätetisch aufgenommenen, ungesättigten Fettsäuren in zelluläre Membrane führt zu einer Modifizierung des Lipidprofils und folglich zu einer Reduktion der amyloidogenen APP-Prozessierung, wodurch sowohl weniger neurotoxisches A β als auch genwirksames AICD anfallen. Hierdurch kommt es zu einer Reduktion der AICD-medierten genregulatorischen Inhibition der FADS und über eine Modifizierung der Lipidkomposition zu einer negativen Rückkoppelung.

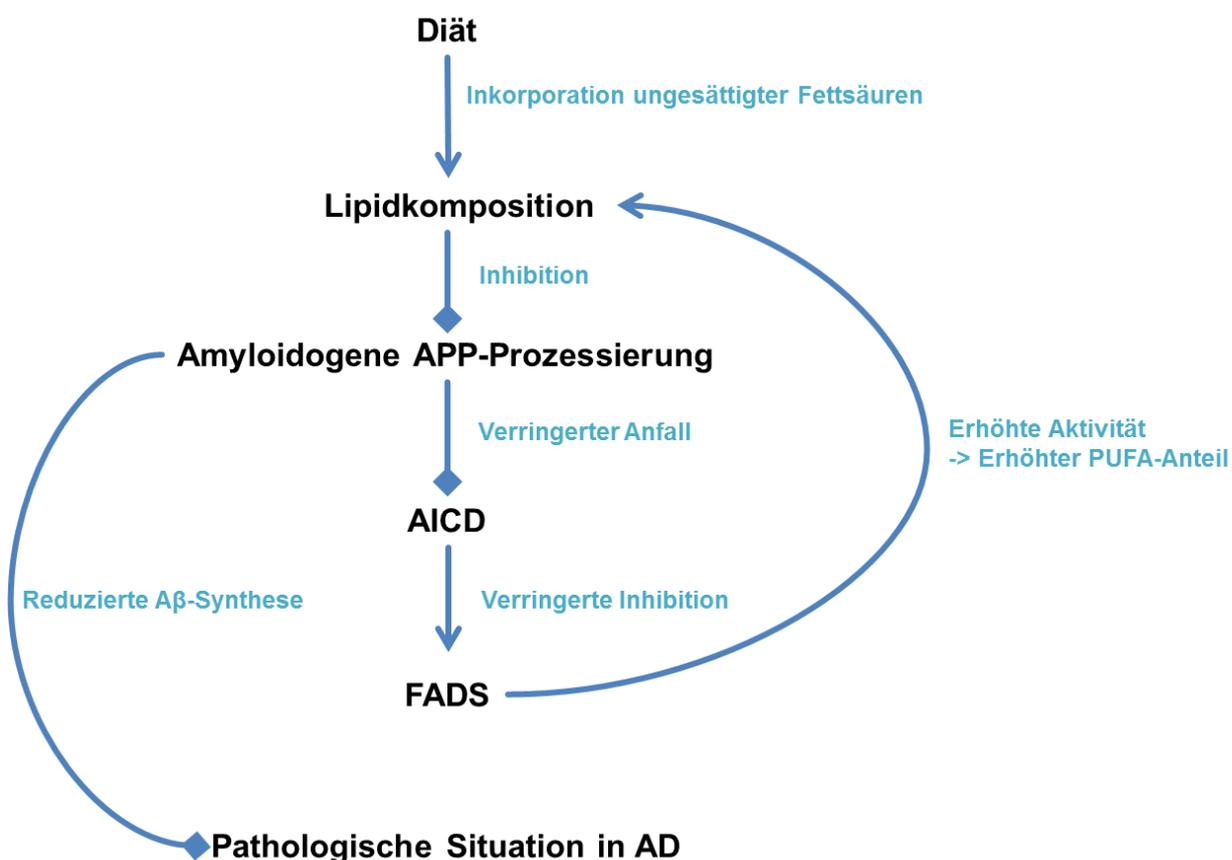


Abbildung 55: Therapeutisches Potenzial ungesättigter Fettsäuren.

Die Aufnahme ungesättigter Fettsäuren durch die Diät führt zu einer Modifizierung der Lipidkomposition und zu einer Reduktion der amyloidogenen APP-Prozessierung. Dadurch fallen sowohl weniger potentiell neurotoxisches A β als auch genwirksames AICD an. Die daraus resultierende erhöhte FADS Aktivität führt zu einem erhöhten PUFA-Anteil des Lipidprofils.

Dieser Mechanismus unterstützt einen diätarischen Therapieansatz für bestimmte AD-Patienten. Diätarische Therapieansätze zeigten bisher begrenzte Effekte in klinischen Studien (Grimm M. O. et al. 2017a). Aktuelle Studien konnten aber auch ermutigende Ergebnisse erzielen (Soininen et al. 2017). Die Inkorporation diätarischer Aspekte in einen multifaktoriellen Therapieansatz der AD ist vielversprechend und erfordert weitere Forschung.

5.6. Einfluss von Coffein und Propentofyllin auf die APP-prozessierenden Sekretasen

Trotz des vermuteten Einflusses von PPF und Coffein auf die Entwicklung einer AD, bleibt der zugrunde liegende Mechanismus unklar, insbesondere für die letztere Substanz. Eine von Chauhan et al. durchgeführte Studie untersuchte den Effekt von 40mg/kg KG PPF pro Tag auf transgene Mäuse, welche die schwedische APP Mutation Tg2576 tragen (Chauhan and Siegel 2003, Chauhan et al. 2005). Die Studie beobachtete eine Verschiebung der APP-Prozessierung von der amyloidogenen zur nicht-amyloidogenen Prozessierung, was eine verringerte Akkumulation von A β zur Folge hatte (Chauhan and Siegel 2003, Chauhan et al. 2005).

In Analogie hierzu führte Coffein durch einen Einfluss auf die Genexpression von BACE1 zu einer verringerten A β de novo Synthese (Arendash et al. 2009, Arendash et al. 2006). Zudem reguliert Coffein die BACE1-Degradation über eine Erhöhung der proteosomalen Aktivität (Fukuyama et al. 2018). Fukuyama et al. konnten außerdem zeigen, dass der vermutete Effekt von Coffein auf die AD durch den Röstvorgang der Bohnen reguliert werden kann (Fukuyama et al. 2018).

Vor diesem Hintergrund soll im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von PPF und Coffein auf die APP-prozessierenden Sekretasen mechanistisch untersucht werden. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur und bekannten Wirkung auf die APP-Prozessierung scheint ein gemeinsamer Mechanismus wahrscheinlich. Die Kenntnis eines solchen Mechanismus könnte helfen, eine therapeutische Option auf der Grundlage der Xanthine zu entwickeln.

Tatsächlich unterstützen die bisher gewonnen Ergebnisse diese Vermutung. Zusammenfassend kann zum jetzigen Zeitpunkt festgestellt werden, dass Coffein und PPF die APP-prozessierenden Sekretasen beeinflussen. PPF und Coffein zeigten dabei eine direkte, modifizierende Wirkung auf die α - und die β -Sekretase. Die Derivate konnten die APP-Prozessierung von der amyloidogenen hin zur nicht-amyloidogenen Prozessierung verschieben. Der durch Wester-Blot Analyse bestimmte sAPP α -Gehalt in

mit Coffein oder PPF inkubierten SH-SH5Y APP-Zellen stieg auf 135% und 138% respektiv. Gleichzeitig konnte ein Effekt auf zellulären Fragmenten durch die Inkubation der Derivate nachgewiesen werden. Die Inkubation mit Coffein und PPF führte jeweils zu einer Aktivitätssteigerung der α -Sekretase auf PNF auf 128% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte (4.3.1). Da die Funktion des Nukleus in PNF ausgeschaltet ist, sind die beobachteten Effekte auf einen direkten Effekt der Derivate auf die α -Sekretase zurückzuführen. Diametral hierzu war der durch Wester-Blot Analyse bestimmte A β -Gehalt der mit Coffein und PPF inkubierten SH-SY5Y Zellen auf 80% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert (4.3.2). Der beobachtete Effekt der Xanthin-Derivate auf die amyloidogene APP-Prozessierung kann auf ebenfalls auf einen direkten Effekt auf die β -Sekretase zurückgeführt werden. Die Aktivität der β -Sekretase auf mit Coffein und PPF inkubierten PNF war auf 83% und 84% respektiv im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Die γ -Sekretase und der A β -Katabolismus hingegen sind nicht verändert.

Die bisherigen Ergebnisse sind ermutigend. Dennoch bestehen weiterhin offene Fragen, wie der Einfluss der Xanthin Derivate auf die Protein-Stabilität und die Genexpression. Diese Fragen sollen durch weitere Forschungsanstrengungen beantwortet werden.

6. Ausblick

Um die Bedeutung der FADS für die Lipidhomöostase und folglich der AD Pathogenese zu untersuchen, sollten zukünftige experimentelle Arbeiten die Untersuchungen in ein Maus-Modell übertragen. Derartige FADS-knock out Maus-Modelle existieren bereits und wurden für verschiedene Fragestellungen eingesetzt (Monk et al. 2016).

Literaturverzeichnis

- Abbott SK, Else PL, Atkins TA, Hulbert AJ. 2012. Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim Biophys Acta* 1818:1309-1317.
- Abramov AY, Ionov M, Pavlov E, Duchon MR. 2011. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 10:595-603.
- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. 2009. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12:1567-1576.
- Aghajafari F, Pond D, Catzikiris N, Cameron I. 2018. Quality assessment of systematic reviews of vitamin D, cognition and dementia. *BJPsych Open* 4:238-249.
- Ago H, Oda M, Takahashi M, Tsuge H, Ochi S, Katunuma N, Miyano M, Sakurai J. 2006. Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem* 281:16157-16167.
- Aguzzi A, Haass C. 2003. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* 302:814-818.
- Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N, Kawarai T, Girardot N, St George-Hyslop P, Checler F. 2006. Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 26:6377-6385.
- Alzheimer A, Forstl H, Levy R. 1991. On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry* 2:71-101.
- Andine P, Rudolphi KA, Fredholm BB, Hagberg H. 1990. Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia. *Br J Pharmacol* 100:814-818.
- Andrieu S, et al. 2017. Effect of long-term omega 3 polyunsaturated fatty acid supplementation with or without multidomain intervention on cognitive function in elderly adults with memory complaints (MAPT): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 16:377-389.
- Annweiler C, Souberbielle JC, Schott AM, de Decker L, Berrut G, Beauchet O. 2011. [Vitamin D in the elderly: 5 points to remember]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 9:259-267.
- Arendash GW, et al. 2009. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis* 17:661-680.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. 2006. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142:941-952.
- Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231-235.
- Azizi G, Mirshafiey A. 2012. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34:881-895.
- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110:55-67.
- Balion C, Griffith LE, Striffler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, Llewellyn DJ, Raina P. 2012. Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 79:1397-1405.
- Banner KH, Page CP. 1996. Anti-inflammatory effects of theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors. *Clin Exp Allergy* 26 Suppl 2:2-9.
- Barage SH, Sonawane KD. 2015. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 52:1-18.

- Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Peres K, Dartigues JF, Renaud S. 2002. Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 325:932-933.
- Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR. 2012. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* 336:1168-1171.
- Bayer TA, Paliga K, Weggen S, Wiestler OD, Beyreuther K, Multhaup G. 1997. Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 94:519-524.
- Beel AJ, Sakakura M, Barrett PJ, Sanders CR. 2010. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim Biophys Acta* 1801:975-982.
- Belyaev ND, Kellett KA, 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 {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285:41443-41454.
- Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ. 2009. Nprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10:94-100.
- Benes FM, Farol PA, Majocha RE, Marotta CA, Bird ED. 1991. Evidence for axonal loss in regions occupied by senile plaques in Alzheimer cortex. *Neuroscience* 42:651-660.
- Benjannet S, et al. 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* 276:10879-10887.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. 2003. Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:330-335.
- Blesso CN. 2015. Egg phospholipids and cardiovascular health. *Nutrients* 7:2731-2747.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
- Borg J-P, Ooi J, Levy E, Margolis B. 1996a. The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Molecular and cellular biology* 16:6229-6241.
- Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B. 1996b. The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 16:6229-6241.
- Boudrault C, Bazinet RP, Ma DW. 2009. Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 20:1-10.
- Braverman NE, Moser AB. 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:1442-1452.
- Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD. 2006. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol* 63:1307-1311.
- Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. 1998. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 88:1337-1342.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3:186-191.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398.
- Bueno AA, Brand A, Neville MM, Lehane C, Brierley N, Crawford MA. 2015. Erythrocyte phospholipid molecular species and fatty acids of Down syndrome children compared with non-affected siblings. *Br J Nutr* 113:72-81.

- Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castano EM, Morelli L. 2010. Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis* 19:79-95.
- Bungener C, Jouvent R. 2004. Depression as an emotional response in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18:176; author reply 176-177.
- Bunnell WL, Pham HV, Glabe CG. 1998. gamma-secretase cleavage is distinct from endoplasmic reticulum degradation of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273:31947-31955.
- Burckhardt M, Herke M, Wustmann T, Watzke S, Langer G, Fink A. 2016. Omega-3 fatty acids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD009002.
- Burg VK, et al. 2013. Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33:16072-16087.
- Butterfield DA, Boyd-Kimball D. 2004. Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol* 14:426-432.
- Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM, Mucke L. 2002. Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* 22:10539-10548.
- Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, Sisodia SS. 1998. Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* 18:9629-9637.
- Calderon RO, Attema B, DeVries GH. 1995. Lipid composition of neuronal cell bodies and neurites from cultured dorsal root ganglia. *J Neurochem* 64:424-429.
- Cao C, et al. 2012. High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J Alzheimers Dis* 30:559-572.
- Cao X, Sudhof TC. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Carmona S, Hardy J, Guerreiro R. 2018. The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol* 148:395-408.
- Casas C, et al. 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165:1289-1300.
- Caselli RJ, Reiman EM. 2013. Characterizing the preclinical stages of Alzheimer's disease and the prospect of presymptomatic intervention. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1:S405-416.
- Chang CC, Althaus JC, Carruthers CJ, Sutton MA, Steel DG, Gafni A. 2013. Synergistic interactions between Alzheimer's Abeta40 and Abeta42 on the surface of primary neurons revealed by single molecule microscopy. *PLoS One* 8:e82139.
- Chang KA, Suh YH. 2010. Possible roles of amyloid intracellular domain of amyloid precursor protein. *BMB Rep* 43:656-663.
- Chartier-Harlin MC, et al. 1991. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846.
- Chauhan NB, Siegel GJ. 2003. Effect of PPF and ALCAR on the induction of NGF- and p75-mRNA and on APP processing in Tg2576 brain. *Neurochem Int* 43:225-233.
- Chauhan NB, Siegel GJ, Feinstein DL. 2005. Propentofylline attenuates tau hyperphosphorylation in Alzheimer's Swedish mutant model Tg2576. *Neuropharmacology* 48:93-104.
- Chavez-Gutierrez L, et al. 2012. The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* 31:2261-2274.
- Chen CJ, et al. 2015. In vivo SPECT imaging of amyloid-beta deposition with radioiodinated imidazo[1,2-a]pyridine derivative DRM106 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 56:120-126.

- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265:3116-3123.
- Cheng SV, Nadeau JH, Tanzi RE, Watkins PC, Jagadesh J, Taylor BA, Haines JL, Sacchi N, Gusella JF. 1988. Comparative mapping of DNA markers from the familial Alzheimer disease and Down syndrome regions of human chromosome 21 to mouse chromosomes 16 and 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6032-6036.
- Chhetri JK, de Souto Barreto P, Cantet C, Pothier K, Cesari M, Andrieu S, Coley N, Vellas B. 2018. Effects of a 3-Year Multi-Domain Intervention with or without Omega-3 Supplementation on Cognitive Functions in Older Subjects with Increased CAIDE Dementia Scores. *J Alzheimers Dis* 64:71-78.
- Cho HH, Cahill CM, Vanderburg CR, Scherzer CR, Wang B, Huang X, Rogers JT. 2010. Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. *J Biol Chem* 285:31217-31232.
- Choi OH, Shamim MT, Padgett WL, Daly JW. 1988. Caffeine and theophylline analogues: correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* 43:387-398.
- Christensen S, Kodoyianni V, Bosenberg M, Friedman L, Kimble J. 1996. lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development* 122:1373-1383.
- Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ. 2005. Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280:4383-4392.
- Cibickova L, Hyspler R, Micuda S, Cibicek N, Zivna H, Jun D, Ticha A, Brackova E, Palicka V. 2009. The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids* 74:13-19.
- Clegg RM. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 6:103-110.
- Colaiana M, Tucci P, Zotti M, Morgese MG, Schiavone S, Govoni S, Cuomo V, Trabace L. 2010. Soluble beta amyloid(1-42): a critical player in producing behavioural and biochemical changes evoking depressive-related state? *Br J Pharmacol* 159:1704-1715.
- Cole GM, Frautschy SA. 2010. DHA may prevent age-related dementia. *J Nutr* 140:869-874.
- Cole GM, Ma QL, Frautschy SA. 2009. Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81:213-221.
- . 2010. Dietary fatty acids and the aging brain. *Nutr Rev* 68 Suppl 2:S102-111.
- Coley N, Raman R, Donohue MC, Aisen PS, Vellas B, Andrieu S. 2018. Defining the Optimal Target Population for Trials of Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Using the Erythrocyte Omega-3 Index: A Step Towards Personalized Prevention of Cognitive Decline? *J Nutr Health Aging* 22:982-998.
- Cook RH. 1979. Memory loss in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 5:105-106.
- Corder EH, et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180-184.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Corder EH, Woodbury MA, Volkman I, Madsen DK, Bogdanovic N, Winblad B. 2000. Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak staging. *Exp Gerontol* 35:851-864.
- Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ. 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11735-11740.
- Cornell BA, Separovic F. 1983. Membrane thickness and acyl chain length. *Biochim Biophys Acta* 733:189-193.

- Cunnane SC, Anderson MJ. 1997. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr* 127:146-152.
- Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, Morris MC. 2012. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 29:691-697.
- 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.
- Dagai L, Peri-Naor R, Birk RZ. 2009. Docosahexaenoic acid significantly stimulates immediate early response genes and neurite outgrowth. *Neurochem Res* 34:867-875.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151-164.
- Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. 2003. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R399-404.
- Dawson GR, et al. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90:1-13.
- De Strooper B. 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- De Strooper B, et al. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.
- DeLeo J, Schubert P, Kreutzberg GW. 1988. Propentofylline (HWA 285) protects hippocampal neurons of Mongolian gerbils against ischemic damage in the presence of an adenosine antagonist. *Neurosci Lett* 84:307-311.
- DeLeo J, Toth L, Schubert P, Rudolphi K, Kreutzberg GW. 1987. Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the Mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* 7:745-751.
- Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 269:13057-13060.
- Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. 2008. Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics (Sao Paulo)* 63:321-328.
- Dewey TG, Hammes GG. 1980. Calculation on fluorescence resonance energy transfer on surfaces. *Biophys J* 32:1023-1035.
- Di Paolo G, Kim TW. 2011. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* 12:284-296.
- Dickens AP, Lang IA, Langa KM, Kos K, Llewellyn DJ. 2011. Vitamin D, cognitive dysfunction and dementia in older adults. *CNS Drugs* 25:629-639.
- Dickerson BC, Stoub TR, Shah RC, Sperling RA, Killiany RJ, Albert MS, Hyman BT, Blacker D, Detolledo-Morrell L. 2011. Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology* 76:1395-1402.
- Dietschy JM, Turley SD. 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45:1375-1397.
- Dotson PP, 2nd, Karakashian AA, Nikolova-Karakashian MN. 2015. Neutral sphingomyelinase-2 is a redox sensitive enzyme: role of catalytic cysteine residues in regulation of enzymatic activity through changes in oligomeric state. *Biochem J* 465:371-382.
- Driscoll I, Shumaker SA, Snively BM, Margolis KL, Manson JE, Vitolins MZ, Rossom RC, Espeland MA. 2016. Relationships Between Caffeine Intake and Risk for Probable Dementia or Global Cognitive Impairment: The Women's Health Initiative Memory Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71:1596-1602.

- Du Yan S, et al. 1997. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5296-5301.
- Dux E, Fastbom J, Ungerstedt U, Rudolphi K, Fredholm BB. 1990. Protective effect of adenosine and a novel xanthine derivative propentofylline on the cell damage after bilateral carotid occlusion in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 516:248-256.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K. 1988. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7:949-957.
- Eckman CB, et al. 1997. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6:2087-2089.
- Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C. 2002. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 277:13389-13393.
- Edidin M. 1993. Patches and fences: probing for plasma membrane domains. *J Cell Sci Suppl* 17:165-169.
- . 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* 11:492-496.
- . 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:257-283.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.
- Emmelot P, Van Hoeven RP. 1975. Phospholipid unsaturation and plasma membrane organization. *Chem Phys Lipids* 14:236-246.
- Emoto K, Umeda M. 2000. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol* 149:1215-1224.
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, Van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. 2002. Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study. *Neurology* 59:1915-1921.
- Epis R, et al. 2010. Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 133:3323-3335.
- Ercoli L, Siddarth P, Huang SC, Miller K, Bookheimer SY, Wright BC, Phelps ME, Small G. 2006. Perceived loss of memory ability and cerebral metabolic decline in persons with the apolipoprotein E-IV genetic risk for Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63:442-448.
- Ermekova KS, Chang A, Zambrano N, de Candia P, Russo T, Sudol M. 1998. Proteins implicated in Alzheimer disease. The role of FE65, a new adapter which binds to beta-amyloid precursor protein. *Adv Exp Med Biol* 446:161-180.
- Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. 2009. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* 16:85-91.
- Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS. 2002. Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2720-2725.
- Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R. 2000. Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci* 920:215-222.
- Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. 2000. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9712-9717.
- Fassbender K, et al. 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856-5861.

- Feldman HH, et al. 2010. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology* 74:956-964.
- Ferdinandusse S, Denis S, Dacremont G, Wanders RJ. 2003. Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 44:1992-1997.
- Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJ. 2001. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 42:1987-1995.
- Fernandes JL, de Oliveira RT, Mamoni RL, Coelho OR, Nicolau JC, Blotta MH, Serrano CV, Jr. 2008. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease--a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 196:434-442.
- Ferrero J, Williams L, Stella H, Leitermann K, Mikulskis A, O'Gorman J, Sevigny J. 2016. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* 2:169-176.
- Ferri CP, et al. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.
- Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ. 2012. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 29:537-547.
- Filser S, Ovsepian SV, Masana M, Blazquez-Llorca L, Brandt Elvang A, Volbracht C, Muller MB, Jung CK, Herms J. 2015. Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions. *Biol Psychiatry* 77:729-739.
- Fortini ME. 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:673-684.
- Fraering PC, Ye W, Strub JM, Dolios G, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, van Dorselaer A, Wang R, Selkoe DJ, Wolfe MS. 2004. Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 43:9774-9789.
- Frampton M, Harvey RJ, Kirchner V. 2003. Propentofylline for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD002853.
- Fraser T, Tayler H, Love S. 2010. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 35:503-513.
- Fredholm BB, Fastbom J, Kvanta A, Gerwins P, Parkinson F. 1992. Further evidence that propentofylline (HWA 285) influences both adenosine receptors and adenosine transport. *Fundam Clin Pharmacol* 6:99-111.
- Fryer JD, Taylor JW, DeMattos RB, Bales KR, Paul SM, Parsadanian M, Holtzman DM. 2003. Apolipoprotein E markedly facilitates age-dependent cerebral amyloid angiopathy and spontaneous hemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 23:7889-7896.
- Frykman S, et al. 2012. Identification of two novel synaptic gamma-secretase associated proteins that affect amyloid beta-peptide levels without altering Notch processing. *Neurochem Int* 61:108-118.
- 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.
- Fukuyama K, Kakio S, Nakazawa Y, Kobata K, Funakoshi-Tago M, Suzuki T, Tamura H. 2018. Roasted Coffee Reduces beta-Amyloid Production by Increasing Proteasomal beta-Secretase Degradation in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res* 62:e1800238.
- Funamoto S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Hirotani N, Saido TC, Ihara Y. 2004. Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42. *Biochemistry* 43:13532-13540.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-

- derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-1896.
- Games D, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Shahdat Hossain M, Hata N, Misawa Y, Masumura S. 1999. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 93:237-241.
- Garcia-Blanco A, Baquero M, Vento M, Gil E, Bataller L, Chafer-Pericas C. 2017. Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 373:295-302.
- Garcia-Herranz S, Diaz-Mardomingo MC, Peraita H. 2016. Neuropsychological predictors of conversion to probable Alzheimer disease in elderly with mild cognitive impairment. *J Neuropsychol* 10:239-255.
- Garcia-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Munoz J, Mena R. 2001. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 22:65-77.
- Gardener S, et al. 2012. Adherence to a Mediterranean diet and Alzheimer's disease risk in an Australian population. *Transl Psychiatry* 2:e164.
- Gatta LB, Albertini A, Ravid R, Finazzi D. 2002. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport* 13:2031-2033.
- George AJ, Holsinger RM, McLean CA, Laughton KM, Beyreuther K, Evin G, Masters CL, Li QX. 2004. APP intracellular domain is increased and soluble Abeta is reduced with diet-induced hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 16:124-132.
- Gershfeld NL, Ginsberg L. 1995. Membrane bilayer instability as a pathogenetic mechanism for neurological disease. *Rev Neurosci* 6:1-13.
- Gertz HJ, et al. 1996. The relationship between clinical dementia and neuropathological staging (Braak) in a very elderly community sample. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 246:132-136.
- Ghosal K, Fan Q, Dawson HN, Pimplikar SW. 2016. Tau Protein Mediates APP Intracellular Domain (AICD)-Induced Alzheimer's-Like Pathological Features in Mice. *PLoS One* 11:e0159435.
- Ghribi O, Larsen B, Schrag M, Herman MM. 2006. High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp Neurol* 200:460-467.
- Gibellini F, Smith TK. 2010. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62:414-428.
- Gibson RA, Muhlhausler B, Makrides M. 2011. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr* 7 Suppl 2:17-26.
- Ginsberg L, Atack JR, Rapoport SI, Gershfeld NL. 1993. Evidence for a membrane lipid defect in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 19:37-46.
- 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.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4051-4055.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987a. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235:877-880.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride WO, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987b. Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for

- the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl* 24:23-28.
- Goldshtein A, Berger M. 2014. Friend or foe: can activating mutations in NOTCH1 contribute to a favorable treatment outcome in patients with T-ALL? *Crit Rev Oncog* 19:399-404.
- Goldstein FC, Ashley AV, Endeshaw YW, Hanfelt J, Lah JJ, Levey AI. 2008. Effects of hypertension and hypercholesterolemia on cognitive functioning in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22:336-342.
- Goldstein JL, Brown MS. 2015. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* 161:161-172.
- Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 397:139-148.
- Goodenowe DB, et al. 2007. Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *J Lipid Res* 48:2485-2498.
- Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U. 2009. Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci* 122:3703-3714.
- Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M, Newman AB. 2006. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:1059-1064.
- Goto M, Demura N, Sakaguchi T. 1987. Effects of propentofylline on disorder of learning and memory in rodents. *Jpn J Pharmacol* 45:373-378.
- Green KN, Martinez-Coria H, Khashwji H, Hall EB, Yurko-Mauro KA, Ellis L, LaFerla FM. 2007. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci* 27:4385-4395.
- Grimm MO, Grimm HS, Hartmann T. 2007. Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med* 13:337-344.
- Grimm MO, et al. 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7:1118-1123.
- Grimm MO, 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.
- Grimm MO, Grosgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T. 2011a. 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.
- Grimm MO, et al. 2011b. Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:695413.
- Grimm MO, Hauptenthal VJ, Mett J, Stahlmann CP, Blumel T, Mylonas NT, Endres K, Grimm HS, Hartmann T. 2016a. Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegener Dis* 16:44-54.
- Grimm MO, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grosgen S, Hundsdorfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T. 2013a. Effect of Different Phospholipids on alpha-Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 14:5879-5898.
- Grimm MO, et al. 2011c. Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286:14028-14039.
- Grimm MO, et al. 2011d. 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.

- Grimm MO, et al. 2014. Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 13:75-81.
- Grimm MO, Mett J, Hartmann T. 2016b. The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 17.
- Grimm MO, et al. 2015. APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77.
- Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Blumel T, Stotzel H, Grimm HS, Hartmann T. 2016c. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid-beta by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochem Cell Biol* 94:534-542.
- Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T. 2013b. Neprilysin and Aβ Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5:98.
- Grimm MO, Michaelson D, Hartmann T. 2017a. Omega-3 fatty acids, lipids and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J Lipid Res*.
- Grimm MO, et al. 2016d. Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 17.
- Grimm MO, Rothhaar TL, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Kins S, Grimm HS, Hartmann T. 2012a. Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem* 23:1214-1223.
- Grimm MO, Rothhaar TL, Hartmann T. 2012b. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Exp Brain Res* 217:365-375.
- Grimm MO, Tomic I, Hartmann T. 2002. Potential external source of Aβ in biological samples. *Nat Cell Biol* 4:E164-165; author reply E165-166.
- Grimm MO, Tschape JA, Grimm HS, Zinser EG, Hartmann T. 2006. Altered membrane fluidity and lipid raft composition in presenilin-deficient cells. *Acta Neurol Scand Suppl* 185:27-32.
- Grimm MO, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T. 2013c. The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013:814390.
- Grimm MO, et al. 2012c. Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 7:e34095.
- Grimm MO, Michaelson DM, Hartmann T. 2017b. Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J Lipid Res* 58:2083-2101.
- Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ, Buschke H, Katz M, Crystal H, Lipton RB. 1999. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* 20:573-579.
- Grome JJ, Hofmann W, Gojowczyk G, Stefanovich V. 1996. Effects of a xanthine derivative, propentofylline, on local cerebral blood flow and glucose utilization in the rat. *Brain Res* 740:41-46.
- Grosgen S, Grimm MO, Friess P, Hartmann T. 2010. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1801:966-974.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Grziwa B, Grimm MO, Masters CL, Beyreuther K, Hartmann T, Lichtenthaler SF. 2003. The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *J Biol Chem* 278:6803-6808.
- Gu M, Kerwin JL, Watts JD, Aebersold R. 1997. Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 244:347-356.

- Gu Y, Luchsinger JA, Stern Y, Scarmeas N. 2010. Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:483-492.
- Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K, Ihara Y. 2001. Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* 276:35235-35238.
- 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* 58:740-747.
- Guenette S, Chang Y, Hiesberger T, Richardson JA, Eckman CB, Eckman EA, Hammer RE, Herz J. 2006. Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development. *EMBO J* 25:420-431.
- Guillou H, Rioux V, Catheline D, Thibault JN, Bouriel M, Jan S, D'Andrea S, Legrand P. 2003. Conversion of hexadecanoic acid to hexadecenoic acid by rat Delta 6-desaturase. *J Lipid Res* 44:450-454.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270.
- Haass C, et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.
- Haass C, Selkoe DJ. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75:1039-1042.
- Hamlett ED, et al. 2016. Cognitive Impairment, Neuroimaging, and Alzheimer Neuropathology in Mouse Models of Down Syndrome. *Curr Alzheimer Res* 13:35-52.
- Han X. 2005. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2:65-77.
- Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC. 2002. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818.
- Han X, Holtzman DM, McKeel DW, Jr. 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.
- Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, Welsh-Bohmer KA, Doraiswamy PM, Kaddurah-Daouk R. 2011. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One* 6:e21643.
- Hannun YA, Obeid LM. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150.
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Hartmann T, Kuchenbecker J, Grimm MO. 2007. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem* 103 Suppl 1:159-170.
- Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Shido O. 2006. Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:934-939.
- Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibashi Y, Oka J, Shido O. 2002. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 81:1084-1091.
- Hashimoto M, Hossain S, Tanabe Y, Kawashima A, Harada T, Yano T, Mizuguchi K, Shido O. 2009. The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta(1-40). *J Nutr Biochem* 20:965-973.
- Hashimoto M, et al. 2008. Docosahexaenoic acid disrupts in vitro amyloid beta(1-40) fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex of Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 107:1634-1646.

- Hashimoto M, Shinozuka K, Gamoh S, Tanabe Y, Hossain MS, Kwon YM, Hata N, Misawa Y, Kunitomo M, Masumura S. 1999. The hypotensive effect of docosahexaenoic acid is associated with the enhanced release of ATP from the caudal artery of aged rats. *J Nutr* 129:70-76.
- Heber S, et al. 2000. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951-7963.
- Henriques AG, Vieira SI, Rebelo S, Domingues SC, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA. 2007. Isoform specific amyloid-beta protein precursor metabolism. *J Alzheimers Dis* 11:85-95.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Muller U. 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106-4115.
- Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, Nyabi O, Craessaerts K, Mueller U, Annaert W, De Strooper B. 2003. gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* 116:1127-1136.
- Hibbeln JR, Umhau JC, George DT, Shoaf SE, Linnoila M, Salem N, Jr. 2000. Plasma total cholesterol concentrations do not predict cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites: implications for the biophysical role of highly unsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 71:331S-338S.
- Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. 1991. Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218:149-163.
- Hirst C, Yee IM, Sadovnick AD. 1994. Familial risks for Alzheimer disease from a population-based series. *Genet Epidemiol* 11:365-374.
- Hofman A, et al. 1991. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int J Epidemiol* 20:736-748.
- Hojjati MR, Li Z, Jiang XC. 2005. Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* 1737:44-51.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. 2011. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* 77:212-218.
- Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. 2012. Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry* 51:3565-3575.
- Hommet C, et al. 2014. Neuroinflammation and beta amyloid deposition in Alzheimer's disease: in vivo quantification with molecular imaging. *Dement Geriatr Cogn Disord* 37:1-18.
- Hooijmans CR, Kiliaan AJ. 2008. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. *Eur J Pharmacol* 585:176-196.
- Hooijmans CR, Van der Zee CE, Dederen PJ, Brouwer KM, Reijmer YD, van Groen T, Broersen LM, Lutjohann D, Heerschap A, Kiliaan AJ. 2009. DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Dis* 33:482-498.
- Hooper C, De Souto Barreto P, Coley N, Cantet C, Cesari M, Andrieu S, Vellas B. 2017. Cognitive Changes with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Demented Older Adults with Low Omega-3 Index. *J Nutr Health Aging* 21:988-993.
- Hooper NM, Turner AJ. 1995. Specificity of the Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase. *Trends Biochem Sci* 20:15-16.
- . 2002. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 9:1107-1119.
- Horrocks LA, Farooqui AA. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:361-372.
- Huang YA, Zhou B, Wernig M, Sudhof TC. 2017. ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and Abeta Secretion. *Cell* 168:427-441 e421.

- Huang YS, Pereira SL, Leonard AE. 2004. Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 86:793-798.
- Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. 2005. Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* 8:858-859.
- Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ. 1992. Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9439-9443.
- Hussain I, et al. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419-427.
- Hyman BT, Holtzman DM. 2015. Apolipoprotein E levels and Alzheimer risk. *Ann Neurol* 77:204-205.
- Iacono D, Resnick SM, O'Brien R, Zonderman AB, An Y, Pletnikova O, Rudow G, Crain B, Troncoso JC. 2014. Mild cognitive impairment and asymptomatic Alzheimer disease subjects: equivalent beta-amyloid and tau loads with divergent cognitive outcomes. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:295-304.
- Infante JP, Tschanz CL, Shaw N, Michaud AL, Lawrence P, Brenna JT. 2002. Straight-chain acyl-CoA oxidase knockout mouse accumulates extremely long chain fatty acids from alpha-linolenic acid: evidence for runaway carousel-type enzyme kinetics in peroxisomal beta-oxidation diseases. *Mol Genet Metab* 75:108-119.
- Ipsen JH, Mouritsen OG, Bloom M. 1990. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys J* 57:405-412.
- Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K. 2003. Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Res* 985:98-107.
- Iwatsubo T. 2004. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol* 14:379-383.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45-53.
- Jana A, Pahan K. 2004. Fibrillar amyloid-beta peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:51451-51459.
- Janelidze S, et al. 2016. CSF A beta₄₂/A beta₄₀ and A beta₄₂/A beta₃₈ ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol* 3:154-165.
- Jankowiak J, Knopman D, American Academy of N. 2006. Neurology patient page. Facing reality: the cost of Alzheimer dementia--who will pay? *Neurology* 67:E11-12.
- Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058.
- Jazvinscak Jembrek M, Hof PR, Simic G. 2015. Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and A beta Accumulation. *Oxid Med Cell Longev* 2015:346783.
- Jellinger K. 2000. Inverse relation between Braak stage and cerebrovascular pathology in Alzheimer predominant dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:799-800.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.
- John S, Thangapandian S, Sakkiah S, Lee KW. 2011. Potent BACE-1 inhibitor design using pharmacophore modeling, in silico screening and molecular docking studies. *BMC Bioinformatics* 12 Suppl 1:S28.
- John V, Beck JP, Bienkowski MJ, Sinha S, Henrikson RL. 2003. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J Med Chem* 46:4625-4630.
- Jose Gagliardi R. 2012. Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. *Sao Paulo Med J* 130:419.
- Kadowaki H, Grant MA. 1995. Relationship of membrane phospholipid composition, lactosylceramide molecular species, and the specificity of CMP-N-

- acetylneuraminic:lactosylceramide alpha 2,3-sialyltransferase to the molecular species composition of GM3 ganglioside. *J Lipid Res* 36:1274-1282.
- Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. 1997. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42:776-782.
- Kam TI, Gwon Y, Jung YK. 2014. Amyloid beta receptors responsible for neurotoxicity and cellular defects in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 71:4803-4813.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
- Kano T, Katayama Y, Kawamata T, Hirota H, Tsubokawa T. 1994. Propentofylline administered by microdialysis attenuates ischemia-induced hippocampal damage but not excitatory amino acid release in gerbils. *Brain Res* 641:149-154.
- Keelan M, Clandinin MT, Thomson AB. 1997. Dietary lipids influence the activity of delta 5-desaturase and phospholipid fatty acids in rat enterocyte microsomal membranes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1009-1014.
- Kehoe P, et al. 1999. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8:237-245.
- Kennedy EP, Weiss SB. 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 222:193-214.
- Kim HS, et al. 2003. C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *FASEB J* 17:1951-1953.
- Kim J, Eltorai AE, Jiang H, Liao F, Verghese PB, Kim J, Stewart FR, Basak JM, Holtzman DM. 2012. Anti-apoE immunotherapy inhibits amyloid accumulation in a transgenic mouse model of Abeta amyloidosis. *J Exp Med* 209:2149-2156.
- Kim M, et al. 2016. Association between Plasma Ceramides and Phosphatidylcholines and Hippocampal Brain Volume in Late Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Kim SY, Kim MY, Mo JS, Park HS. 2007. Notch1 intracellular domain suppresses APP intracellular domain-Tip60-Fe65 complex mediated signaling through physical interaction. *Biochim Biophys Acta* 1773:736-746.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288-40292.
- King GD, Perez RG, Steinhilb ML, Gaut JR, Turner RS. 2003. X11alpha modulates secretory and endocytic trafficking and metabolism of amyloid precursor protein: mutational analysis of the YENPTY sequence. *Neuroscience* 120:143-154.
- Kino R, Araya T, Arai T, Sohma Y, Kanai M. 2015. Covalent modifier-type aggregation inhibitor of amyloid-beta based on a cyclo-KLVFF motif. *Bioorg Med Chem Lett* 25:2972-2975.
- Kittner B, Rossner M, Rother M. 1997. Clinical trials in dementia with propentofylline. *Ann N Y Acad Sci* 826:307-316.
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. 2005. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 62:1556-1560.
- Knapp HR, Hullin F, Salem N, Jr. 1994. Asymmetric incorporation of dietary n-3 fatty acids into membrane aminophospholipids of human erythrocytes. *J Lipid Res* 35:1283-1291.
- Konietzko U. 2012. AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9:200-216.
- Kopan R, Ilagan MX. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-233.
- Kornberg RD. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30:235-239.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044-4048.

- Koudinov AR, Koudinova NV. 2005. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J Neurol Sci* 229-230:233-240.
- Kowalska A. 2004. Genetic aspects of amyloid beta-protein fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 42:235-237.
- Ksiezak-Reding H, Dickson DW, Davies P, Yen SH. 1987. Recognition of tau epitopes by anti-neurofilament antibodies that bind to Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3410-3414.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020-3032.
- Kukull WA, Brenner DE, Speck CE, Nochlin D, Bowen J, McCormick W, Teri L, Pfanschmidt ML, Larson EB. 1994. Causes of death associated with Alzheimer disease: variation by level of cognitive impairment before death. *J Am Geriatr Soc* 42:723-726.
- Kyle DJ, Schaefer E, Patton G, Beiser A. 1999. Low serum docosahexaenoic acid is a significant risk factor for Alzheimer's dementia. *Lipids* 34 Suppl:S245.
- Kyratzi E, Liakos A, Papadogiannaki G, Efthimiopoulos S. 2015. Structural and regulatory elements of the interaction between amyloid-beta protein precursor and Homer3. *J Alzheimers Dis* 45:147-157.
- La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. 2014. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. *Nutrients* 6:5453-5472.
- Laird FM, et al. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.
- Landau M, Sawaya MR, Faull KF, Laganowsky A, Jiang L, Sievers SA, Liu J, Barrio JR, Eisenberg D. 2011. Towards a pharmacophore for amyloid. *PLoS Biol* 9:e1001080.
- Lapshina EA, Zavodnik IB, Bryszewska M. 1995. Effect of free fatty acids on the structure and properties of erythrocyte membrane. *Scand J Clin Lab Invest* 55:391-397.
- Lee JH, Flaquer A, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. 2004a. Genetic influences on memory performance in familial Alzheimer disease. *Neurology* 62:414-421.
- Lee JT, Xu J, Lee JM, Ku G, Han X, Yang DI, Chen S, Hsu CY. 2004b. Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol* 164:123-131.
- Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Adlard PA, Masters CL, Bush AI. 2010. Tau protein: relevance to Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1775-1778.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Leszek J, Trypka E, Koutsourak E, Michmizos D, Ashraf GM, Aliev G. 2016. Late-life depression and Alzheimer disease: a potential synergy of the underlying mechanisms. *Curr Med Chem*.
- Lewis BA, Engelman DM. 1983. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J Mol Biol* 166:211-217.
- Lewis FI, Torgerson PR. 2016. The current and future burden of late-onset dementia in the United Kingdom: Estimates and interventions. *Alzheimers Dement*.
- Li DY, Chen HJ, Mehta JL. 2001. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 52:130-135.
- Li M, Pehar M, Liu Y, Bhattacharyya A, Zhang SC, O'Riordan KJ, Burger C, D'Adamio L, Puglielli L. 2015. The amyloid precursor protein (APP) intracellular domain regulates translation of p44, a short isoform of p53, through an IRES-dependent mechanism. *Neurobiol Aging* 36:2725-2736.

- Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G. 2000. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 275:17187-17194.
- Lichtenthaler SF, Haass C. 2004. Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1384-1387.
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N, Jr., Frautschy SA, Cole GM. 2005. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 25:3032-3040.
- Lim SY, Suzuki H. 2000. Effect of dietary docosahexaenoic acid and phosphatidylcholine on maze behavior and fatty acid composition of plasma and brain lipids in mice. *Int J Vitam Nutr Res* 70:251-259.
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1456-1460.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. 2002. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 156:445-453.
- Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46-50.
- Lippa CF, Nee LE, Mori H, St George-Hyslop P. 1998. Abeta-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352:1117-1118.
- Liu Q, Zerbiniatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G. 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56:66-78.
- Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Murphy MP, Klein RL, Hersh LB. 2010. Circulating neprilysin clears brain amyloid. *Mol Cell Neurosci* 45:101-107.
- Liu Y, Yang L, Conde-Knape K, Behr D, Shearman MS, Shachter NS. 2004. Fatty acids increase presenilin-1 levels and [gamma]-secretase activity in PSwt-1 cells. *J Lipid Res* 45:2368-2376.
- Lopes da Silva S, Vellas B, Elemans S, Luchsinger J, Kamphuis P, Yaffe K, Sijben J, Groenendijk M, Stijnen T. 2014. Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* 10:485-502.
- Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H. 1995. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65:1009-1025.
- Lovestone S, et al. 1994. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4:1077-1086.
- Lowe TL, Strzelec A, Kiessling LL, Murphy RM. 2001. Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry* 40:7882-7889.
- Luo LQ, Martin-Morris LE, White K. 1990. Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849-3861.
- MA E. 2013. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*.
- Mahoney R, Regan C, Katona C, Livingston G. 2005. Anxiety and depression in family caregivers of people with Alzheimer disease: the LASER-AD study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:795-801.
- Maia L, de Mendonca A. 2002. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* 9:377-382.

- Mallat Z, Lambeau G, Tedgui A. 2010. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers. *Circulation* 122:2183-2200.
- Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. 2009. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev* 8:285-305.
- Mangialasche F, et al. 2012. Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 33:2282-2290.
- Mapstone M, et al. 2014. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat Med* 20:415-418.
- Marcusson J, Rother M, Kittner B, Rossner M, Smith RJ, Babic T, Folnegovic-Smalc V, Moller HJ, Labs KH. 1997. A 12-month, randomized, placebo-controlled trial of propentofylline (HWA 285) in patients with dementia according to DSM III-R. The European Propentofylline Study Group. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8:320-328.
- Marin R, Fabelo N, Martin V, Garcia-Esparcia P, Ferrer I, Quinto-Aleman D, Diaz M. 2017. Anomalies occurring in lipid profiles and protein distribution in frontal cortex lipid rafts in dementia with Lewy bodies disclose neurochemical traits partially shared by Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurobiol Aging* 49:52-59.
- Markesbery WR. 1999. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 56:1449-1452.
- Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD. 2005. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 58:730-735.
- Marlow L, Cain M, Pappolla MA, Sambamurti K. 2003. Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J Mol Neurosci* 20:233-239.
- Marz W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Gross W, Ohm TG. 1996. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann N Y Acad Sci* 777:276-280.
- Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. 2006. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem* 97:1700-1725.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. 1985a. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4:2757-2763.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. 1985b. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
- Matos MF, Xu Y, Dulubova I, Otwinowski Z, Richardson JM, Tomchick DR, Rizo J, Ho A. 2012. Autoinhibition of Mint1 adaptor protein regulates amyloid precursor protein binding and processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3802-3807.
- Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD. 1999. 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. *J Neurochem* 73:532-537.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H. 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.
- Mawuenyega KG, Kasten T, Sigurdson W, Bateman RJ. 2013. Amyloid-beta isoform metabolism quantitation by stable isotope-labeled kinetics. *Anal Biochem* 440:56-62.
- McGeer PL, McGeer EG. 2013. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol* 126:479-497.
- McLoughlin DM, Miller CC. 1996. The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett* 397:197-200.
- . 2008. The FE65 proteins and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 86:744-754.
- McNamara RK, et al. 2016. Polyunsaturated fatty acid status, phospholipase A2 activity and brain white matter microstructure in late childhood and adolescence. *Neuroscience*.

- Medrano G, Guan P, Barlow-Anacker AJ, Gosain A. 2017. Comprehensive selection of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of murine extramedullary hematopoiesis during development. *PLoS One* 12:e0181881.
- Mehta PD, Pirttila T. 2005. Increased cerebrospinal fluid A beta38/A beta42 ratio in Alzheimer disease. *Neurodegener Dis* 2:242-245.
- Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, Kingwell BA. 2014. Lipidomics: potential role in risk prediction and therapeutic monitoring for diabetes and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 143:12-23.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683-12688.
- Micchelli CA, Esler WP, Kimberly WT, Jack C, Berezovska O, Kornilova A, Hyman BT, Perrimon N, Wolfe MS. 2003. Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*. *FASEB J* 17:79-81.
- Mielke R, Ghaemi M, Kessler J, Kittner B, Szelies B, Herholz K, Heiss WD. 1998a. Propentofylline enhances cerebral metabolic response to auditory memory stimulation in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 154:76-82.
- Mielke R, Moller HJ, Erkinjuntti T, Rosenkranz B, Rother M, Kittner B. 1998b. Propentofylline in the treatment of vascular dementia and Alzheimer-type dementia: overview of phase I and phase II clinical trials. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 Suppl 2:S29-35.
- Minopoli G, Gargiulo A, Parisi S, Russo T. 2012. Fe65 matters: new light on an old molecule. *IUBMB Life* 64:936-942.
- Mizutani T, Amano N, Sasaki H, Morimatsu Y, Mori H, Yoshimura M, Yamanouchi H, Hayakawa K, Shimada H. 1990. Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex. *Acta Neuropathol* 80:575-580.
- Mohajeri MH, Troesch B, Weber P. 2015. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition* 31:261-275.
- Moller HJ, Maurer I, Saletu B. 1994. Placebo-controlled trial of the xanthine derivative propentofylline in dementia. *Pharmacopsychiatry* 27:159-165.
- Monk JM, Liddle DM, Cohen DJ, Tsang DH, Hillyer LM, Abdelmagid SA, Nakamura MT, Power KA, Ma DW, Robinson LE. 2016. The delta 6 desaturase knock out mouse reveals that immunomodulatory effects of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids are both independent of and dependent upon conversion. *J Nutr Biochem* 32:29-38.
- Montine TJ, Morrow JD. 2005. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 166:1283-1289.
- Moreira PI, Harris PL, Zhu X, Santos MS, Oliveira CR, Smith MA, Perry G. 2007. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis* 12:195-206.
- Morris MC. 2009. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. *Eur J Neurol* 16 Suppl 1:1-7.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J. 2003. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:940-946.
- Moss MA, Nichols MR, Reed DK, Hoh JH, Rosenberry TL. 2003. The peptide KLVFF-K(6) promotes beta-amyloid(1-40) protofibril growth by association but does not alter protofibril effects on cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). *Mol Pharmacol* 64:1160-1168.
- Mueller HT, Borg JP, Margolis B, Turner RS. 2000. Modulation of amyloid precursor protein metabolism by X11alpha/Mint-1. A deletion analysis of protein-protein interaction domains. *J Biol Chem* 275:39302-39306.
- Muller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, Tribl F, Kogel D, Prehn JH, Egensperger R. 2007. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell* 18:201-210.

- Muller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K. 2008. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393-406.
- Muller T, Schrotter 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* 1834:387-394.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. 1991. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254:97-99.
- Nabeshima T, Nitta A, Hasegawa T. 1993. Impairment of learning and memory and the accessory symptom in aged rat as senile dementia model (3): Oral administration of propentofylline produces recovery of reduced NGF content in the brain of aged rats. *Yakubutsu Seishin Kodo* 13:89-95.
- Nagafuku M, et al. 2003. Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. *J Biol Chem* 278:51920-51927.
- Nagan N, Zoeller RA. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40:199-229.
- Nagase H, Nakayama K. 2014. The Intracellular Domain of Amyloid Precursor Protein is a Potential Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Curr Drug Discov Technol* 11:243-258.
- Nagata K, Ogawa T, Omosu M, Fujimoto K, Hayashi S. 1985. In vitro and in vivo inhibitory effects of propentofylline on cyclic AMP phosphodiesterase activity. *Arzneimittelforschung* 35:1034-1036.
- Nakada T, Kwee IL, Ellis WG. 1990. Membrane fatty acid composition shows delta-6-desaturase abnormalities in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1:153-155.
- Nakamura MT, Nara TY. 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 24:345-376.
- Nalivaeva NN, Turner AJ. 2013. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 587:2046-2054.
- Nasaruddin ML, Holscher C, Kehoe P, Graham SF, Green BD. 2016. Wide-ranging alterations in the brain fatty acid complement of subjects with late Alzheimer's disease as detected by GC-MS. *Am J Transl Res* 8:154-165.
- Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 17:139-170.
- Niederwolfgruber E, Schmitt TL, Blasko I, Trieb K, Steger MM, Maczek C, Hager J, Bobak K, Steiner E, Grubeck-Loebenstein B. 1998. The production of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP) in extraneuronal tissue does not increase in old age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53:B186-190.
- Nishiwaki Y, et al. 1996. Mutational screening of APP gene in patients with early-onset Alzheimer disease utilizing mismatched PCR-RFLP. *Clin Genet* 49:119-123.
- Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ. 1992. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1671-1675.
- Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS. 1999. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11235-11240.
- Novak M. 1994. Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta Virol* 38:173-189.

- Numagami Y, Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. 1998. Effect of propentofylline on free radical generation during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *Neuroscience* 84:1127-1133.
- Nunan J, Williamson NA, Hill AF, Sernee MF, Masters CL, Small DH. 2003. Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein. *J Neurosci Res* 74:378-385.
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:631-641.
- O'Brien JS, Sampson EL. 1965. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 6:537-544.
- O'Neil J, Calvo J, McKenna K, Krishnamoorthy V, Aster JC, Bassing CH, Alt FW, Kelliher M, Look AT. 2006. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood* 107:781-785.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. 2004. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 41:27-33.
- Oksman M, Iivonen H, Högges E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, Broersen L, Lutjohann D, Hartmann T, Tanila H. 2006. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23:563-572.
- Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C. 2013. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Onco Targets Ther* 6:943-955.
- Onodera T, Futai E, Kan E, Abe N, Uchida T, Kamio Y, Kaneko J. 2015. Phosphatidylethanolamine plasmalogen enhances the inhibiting effect of phosphatidylethanolamine on gamma-secretase activity. *J Biochem* 157:301-309.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A. 1995. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 310:970-973.
- Owusu JE, et al. 2018. Cognition and Vitamin D in Older African-American Women-Physical performance and Osteoporosis prevention with vitamin D in older African Americans Trial and Dementia. *J Am Geriatr Soc*.
- Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. 2006. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:57-63.
- Ozkan A, Parlak H, Tanriover G, Dilmac S, Ulker SN, Birsen L, Agar A. 2016. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of hemeoxygenase. *Neurochem Int*.
- Paliga K, Peraus G, Kreger S, Durrwang U, Hesse L, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K, Weidemann A. 1997. Human amyloid precursor-like protein 1--cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid. *Eur J Biochem* 250:354-363.
- Panchal M, et al. 2014. Ceramides and sphingomyelinases in senile plaques. *Neurobiol Dis* 65:193-201.
- Papasozomenos SC. 1989a. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type. I. Morphology, evolution, distribution, and pathogenetic implications. *Lab Invest* 60:123-137.
- . 1989b. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type: II. Electron microscopy and pathogenetic implications. Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer's abnormal filaments. *Lab Invest* 60:375-389.
- Pappolla MA, et al. 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61:199-205.
- Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Sambamurti K. 1996. The heat shock/oxidative stress connection. Relevance to Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 28:21-34.
- Pardossi-Piquard R, Checler F. 2012. The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1:109-124.

- Pardridge WM, Moeller TL, Mietus LJ, Oldendorf WH. 1980. Blood-brain barrier transport and brain sequestration of steroid hormones. *Am J Physiol* 239:E96-102.
- Paris D, Townsend KP, Humphrey J, Obregon DF, Yokota K, Mullan M. 2002. Statins inhibit A beta-neurotoxicity in vitro and A beta-induced vasoconstriction and inflammation in rat aortae. *Atherosclerosis* 161:293-299.
- Park HG, Park WJ, Kothapalli KS, Brenna JT. 2015. The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes Delta4 desaturation to yield n-3 docosaehaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells. *FASEB J* 29:3911-3919.
- Park IH, Hwang EM, Hong HS, Boo JH, Oh SS, Lee J, Jung MW, Bang OY, Kim SU, Mook-Jung I. 2003. Lovastatin enhances A beta production and senile plaque deposition in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 24:637-643.
- Park WJ, Kothapalli KS, Lawrence P, Tyburczy C, Brenna JT. 2009. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *J Lipid Res* 50:1195-1202.
- Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L. 2000. Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis* 2:289-301.
- Pauwels EK, Volterrani D, Mariani G. 2009. Biomarkers for Alzheimer's disease. *Drug News Perspect* 22:151-160.
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N, Jr. 2001. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42:1257-1265.
- Pearson HA, Peers C. 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* 575:5-10.
- Perchellet JP, Perchellet EM, Crow KR, Buszek KR, Brown N, Ellappan S, Gao G, Luo D, Minatoya M, Lushington GH. 2009. Novel synthetic inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity that inhibit tumor cell proliferation and are structurally unrelated to existing statins. *Int J Mol Med* 24:633-643.
- Perry G, Cash AD, Smith MA. 2002. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J Biomed Biotechnol* 2:120-123.
- Pfriegeer FW. 2003. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60:1158-1171.
- Philibert RA, Madan A. 2007. Role of MED12 in transcription and human behavior. *Pharmacogenomics* 8:909-916.
- Phillips P. 2017. Omega 3 fatty acids for the treatment of dementia: a Cochrane review summary. *Int J Nurs Stud* 67:83-84.
- Pijet B, Pijet M, Litwiniuk A, Gajewska M, Gorzata, Paj, K B, Orzechowski A. 2013. TNF- α ; and IFN- γ -Dependent Muscle Decay Is Linked to NF- κ B- and STAT-1-Stimulated Atrogin1 and MuRF1 Genes in C2C12 Myotubes. *Mediators of Inflammation* 2013 (art. 171437):18.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. 1991. Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur J Pharmacol* 207:367-368.
- Pirttila T, et al. 1996. Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res* 722:71-77.
- Plassman BL, et al. 2007. Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology* 29:125-132.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. 1997. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265-1268.
- Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkmann I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K. 2010a. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120:185-193.
- Portelius E, Dean RA, Gustavsson MK, Andreasson U, Zetterberg H, Siemers E, Blennow K. 2010b. A novel A beta isoform pattern in CSF reflects gamma-secretase inhibition in Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther* 2:7.

- Prabhakar YS, Saxena AK, Doss MJ. 1989. QSAR study of the role of hydrophobicity in the activity of HMGCoA reductase inhibitors. *Drug Des Deliv* 4:97-108.
- Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. 1998. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 23:81-88.
- Prince M, Ali GC, Guerchet M, Prina AM, Albanese E, Wu YT. 2016. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimers Res Ther* 8:23.
- Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM. 2003. Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* 278:19777-19783.
- Qi-Takahara Y, et al. 2005. Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25:436-445.
- Qi Y, Morishima-Kawashima M, Sato T, Mitsumori R, Ihara Y. 2003. Distinct mechanisms by mutant presenilin 1 and 2 leading to increased intracellular levels of amyloid beta-protein 42 in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 42:1042-1052.
- Quinn JF, et al. 2010. Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 304:1903-1911.
- Rapoport SI. 2008. Arachidonic acid and the brain. *J Nutr* 138:2515-2520.
- Rasmussen DE, Sobsey D. 1994. Age, adaptive behavior, and Alzheimer disease in Down syndrome: cross-sectional and longitudinal analyses. *Am J Ment Retard* 99:151-165.
- Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J* 79:328-339.
- Rebeck GW, Hoe HS, Moussa CE. 2010. Beta-amyloid1-42 gene transfer model exhibits intraneuronal amyloid, gliosis, tau phosphorylation, and neuronal loss. *J Biol Chem* 285:7440-7446.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331.
- Reiman EM, et al. 2016. CAP--advancing the evaluation of preclinical Alzheimer disease treatments. *Nat Rev Neurol* 12:56-61.
- Reitz C, Mayeux R. 2014. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88:640-651.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM. 2010. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1:S3-15.
- Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C. 2007. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 28:591-606.
- Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11:1288-1293.
- Ritchie K, Carriere I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML. 2007. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69:536-545.
- Roberts RO, et al. 2010. Vegetables, unsaturated fats, moderate alcohol intake, and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 29:413-423.
- Robinson DR, Xu LL, Knoell CT, Tateno S, Olesiak W. 1993. Modification of spleen phospholipid fatty acid composition by dietary fish oil and by n-3 fatty acid ethyl esters. *J Lipid Res* 34:1423-1434.
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. 2002. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 59:223-227.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. 1993. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10836-10840.

- Rother M, Erkinjuntti T, Roessner M, Kittner B, Marcusson J, Karlsson I. 1998. Propentofylline in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: a review of phase III trials. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9 Suppl 1:36-43.
- Rother M, Kittner B, Rudolphi K, Rossner M, Labs KH. 1996. HWA 285 (propentofylline)-a new compound for the treatment of both vascular dementia and dementia of the Alzheimer type. *Ann N Y Acad Sci* 777:404-409.
- Rothhaar TL, Grosgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdorfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO. 2012. Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012:141240.
- Ryan KA, Pimplikar SW. 2005. Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol* 171:327-335.
- Rydbirk R, Folke J, Winge K, Aznar S, Pakkenberg B, Brudek T. 2016. Assessment of brain reference genes for RT-qPCR studies in neurodegenerative diseases. *Sci Rep* 6:37116.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. 2001. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153:1403-1414.
- . 2003. The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23:5407-5415.
- Sahlin C, Pettersson FE, Nilsson LN, Lannfelt L, Johansson AS. 2007. Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced Abeta levels in cellular models of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 26:882-889.
- Saito Y, Sano Y, Vassar R, Gandy S, Nakaya T, Yamamoto T, Suzuki T. 2008. X11 proteins regulate the translocation of amyloid beta-protein precursor (APP) into detergent-resistant membrane and suppress the amyloidogenic cleavage of APP by beta-site-cleaving enzyme in brain. *J Biol Chem* 283:35763-35771.
- Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, Ishida T. 2017. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One* 12:e0187934.
- Saletu B, Moller HJ, Grunberger J, Deutsch H, Rossner M. 1990. Propentofylline in adult-onset cognitive disorders: double-blind, placebo-controlled, clinical, psychometric and brain mapping studies. *Neuropsychobiology* 24:173-184.
- Sanchez-Mejia RO, Mucke L. 2010. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:784-790.
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. 1994. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem* 269:1510-1517.
- Sannerud R, et al. 2016. Restricted Location of PSEN2/gamma-Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular Abeta Pool. *Cell* 166:193-208.
- Santos C, Costa J, Santos J, Vaz-Carneiro A, Lunet N. 2010. Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1:S187-204.
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835-841.
- Sato T, et al. 2003. Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 278:24294-24301.
- Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y. 2012. Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res* 53:567-576.
- Satoi H, et al. 2005. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 130:657-666.
- Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Manly JJ, Schupf N, Luchsinger JA. 2009. Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 66:216-225.

- Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. 2006. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 59:912-921.
- Scheinfeld MH, Matsuda S, D'Adamio L. 2003. JNK-interacting protein-1 promotes transcription of A beta protein precursor but not A beta precursor-like proteins, mechanistically different than Fe65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1729-1734.
- Scheuner D, et al. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:864-870.
- Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M. 2006. Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 23:573-577.
- Schroeder A, Fahrenholz F, Schmitt U. 2009. Effect of a dominant-negative form of ADAM10 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16:309-314.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393:382-386.
- Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.
- Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB, Haass C. 1996. The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 777:57-64.
- Sevigny J, et al. 2016. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537:50-56.
- Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC. 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13:455-459.
- Shimizu H, et al. 2011. Clinical profiles of late-onset semantic dementia, compared with early-onset semantic dementia and late-onset Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 11:46-53.
- Shin CH, Chung WS, Hong SK, Ober EA, Verkade H, Field HA, Huisken J, Stainier DY. 2008. Multiple roles for Med12 in vertebrate endoderm development. *Dev Biol* 317:467-479.
- Shin RW, Ogino K, Kondo A, Saido TC, Trojanowski JQ, Kitamoto T, Tateishi J. 1997. Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. *J Neurosci* 17:8187-8193.
- Shin RW, Saido TC, Maeda M, Kitamoto T. 2005. Novel alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta precursor protein in the endoplasmic reticulum of COS7 cells. *Neurosci Lett* 376:14-19.
- Shinoda I, Furukawa Y, Furukawa S. 1990. Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by propentofylline in cultured mouse astroglial cells. *Biochem Pharmacol* 39:1813-1816.
- Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. 2005. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4:841-852.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460-6464.
- Sinha S, et al. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH. 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3:281-290.
- Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, Sisodia SS. 1994. Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269:2637-2644.
- Smith IF, Hitt B, Green KN, Oddo S, LaFerla FM. 2005. Enhanced caffeine-induced Ca²⁺ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 94:1711-1718.

- Snellman A, Rokka J, Lopez-Picon FR, Eskola O, Salmona M, Forloni G, Scheinin M, Solin O, Rinne JO, Haaparanta-Solin M. 2014. In vivo PET imaging of beta-amyloid deposition in mouse models of Alzheimer's disease with a high specific activity PET imaging agent [(18)F]flutemetamol. *EJNMMI Res* 4:37.
- Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, Troncoso J, Legido-Quigley C, Thambisetty M. 2017. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med* 14:e1002266.
- Soba P, et al. 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24:3624-3634.
- Soderberg 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.
- Soininen H, Solomon A, Visser PJ, Hendrix SB, Blennow K, Kivipelto M, Hartmann T, LipiDiDiet clinical study g. 2017. 24-month intervention with a specific multinutrient in people with prodromal Alzheimer's disease (LipiDiDiet): a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Neurol* 16:965-975.
- Solfrizzi V, et al. 2017. Relationships of Dietary Patterns, Foods, and Micro- and Macronutrients with Alzheimer's Disease and Late-Life Cognitive Disorders: A Systematic Review. *J Alzheimers Dis* 59:815-849.
- Spiegel S, Kolesnick R. 2002. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* 16:1596-1602.
- Sprecher H. 1981. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res* 20:13-22.
- Sprecher H, Chen Q, Yin FQ. 1999. Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n-3: a complex intracellular process. *Lipids* 34 Suppl:S153-156.
- Stahlmann C. 2017. Dissertation.
- Standen CL, Perkinton MS, Byers HL, Kesavapany S, Lau KF, Ward M, McLoughlin D, Miller CC. 2003. The neuronal adaptor protein Fe65 is phosphorylated by mitogen-activated protein kinase (ERK1/2). *Mol Cell Neurosci* 24:851-857.
- Steiner H, Capell A, Pesold B, Citron M, Kloetzel PM, Selkoe DJ, Romig H, Mendla K, Haass C. 1998. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem* 273:32322-32331.
- Steiner H, Fluhrer R, Haass C. 2008. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* 283:29627-29631.
- Stern Y, et al. 1997. Predicting time to nursing home care and death in individuals with Alzheimer disease. *JAMA* 277:806-812.
- Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S. 1992. Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 2:119-127.
- Stillwell W, Wassall SR. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126:1-27.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981.
- Strittmatter WJ, et al. 1994. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 125:163-171; discussion 172-164.
- Strooper BD, Annaert W. 2001. Presenilins and the intramembrane proteolysis of proteins: facts and fiction. *Nat Cell Biol* 3:E221-225.
- Stuart G, Snowden AAE, Abdul Hye, Yang An, Olga Pletnikova, Richard O'Brien, John Troncoso, Cristina Legido-Quigley, Madhav Thambisetty 2017. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Biol*.
- Suh J, Lyckman A, Wang L, Eckman EA, Guenette SY. 2011. FE65 proteins regulate NMDA receptor activation-induced amyloid precursor protein processing. *J Neurochem* 119:377-388.

- Sullivan GW, Carper HT, Novick WJ, Jr., Mandell GL. 1988. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun* 56:1722-1729.
- Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T. 2005. Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem* 280:42364-42374.
- Sun GY, Simonyi A, Fritsche KL, Chuang DY, Hannink M, Gu Z, Greenleaf CM, Yao JK, Lee JC, Beversdorf DQ. 2018. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 136:3-13.
- Sydenham E, Dangour AD, Lim WS. 2012. Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005379.
- Tabira T, Chui DH, Kuroda S. 2002. Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front Biosci* 7:a44-49.
- Taflin DC, Ward TL, Davis EJ. 1989. Electrified droplet fission and the Rayleigh limit. *Langmuir* 5:376-384.
- Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T, Takeda M. 2014. Relative ratio and level of amyloid-beta 42 surrogate in cerebrospinal fluid of familial Alzheimer disease patients with presenilin 1 mutations. *Neurodegener Dis* 13:166-170.
- Tahin QS, Blum M, Carafoli E. 1981. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. *Eur J Biochem* 121:5-13.
- Takahashi K, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. 2009. Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway. *J Neurochem* 109:1324-1337.
- Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T, Tomita T. 2015. Synthetic ceramide analogues increase amyloid-beta 42 production by modulating gamma-secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 457:194-199.
- Tanzi RE, Bertram L. 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120:545-555.
- Tanzi RE, et al. 2010. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5:e9505.
- Taylor MG, Smith IC. 1980. The fidelity of response by nitroxide spin probes to changes in membrane organization: the condensing effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 599:140-149.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J. 1997. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* 36:14845-14852.
- Thinakaran G, Koo EH. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.
- Tocher DR, Dick JR. 2001. Effects of essential fatty acid deficiency and supplementation with docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on cellular fatty acid compositions and fatty acyl desaturation in a cell culture model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:11-22.
- Tomiuk S, Zumbansen M, Stoffel W. 2000. Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 275:5710-5717.
- Tonelli F, Dolara P, Batignani G, Monaci I, Caderni G, Spagnesi MT, Luceri C, Amorosi A. 1995. Effects of short chain fatty acids on mucosal proliferation and inflammation of ileal pouches in patients with ulcerative colitis and familial polyposis. *Dis Colon Rectum* 38:974-978.

- Tousseyn T, et al. 2009. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284:11738-11747.
- Trabace L. 2014. Soluble beta amyloid in a continuum from physiology to pathology: searching the determinants of its effects and designing new pharmacological treatments. *Curr Pharm Des* 20:2457.
- Trazzi S, Mitrugno VM, Valli E, Fuchs C, Rizzi S, Guidi S, Perini G, Bartesaghi R, Ciani E. 2011. APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome. *Hum Mol Genet* 20:1560-1573.
- Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schaid DJ, Kokmen E, Ivnik RJ, Thibodeau SN. 1994. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 54:643-649.
- Tsay HJ, Huang YC, Huang FL, Chen CP, Tsai YC, Wang YH, Wu MF, Chiang FY, Shiao YJ. 2013. Amyloid beta peptide-mediated neurotoxicity is attenuated by the proliferating microglia more potently than by the quiescent phenotype. *J Biomed Sci* 20:78.
- Tully AM, Roche HM, Doyle R, Fallon C, Bruce I, Lawlor B, Coakley D, Gibney MJ. 2003. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* 89:483-489.
- Tun H, Marlow L, Pinnix I, Kinsey R, Sambamurti K. 2002. Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci* 19:31-35.
- Turner AJ, Belyaev ND, Kellett KA, 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 {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285:41443-41454.
- Twamley EW, Ropacki SA, Bondi MW. 2006. Neuropsychological and neuroimaging changes in preclinical Alzheimer's disease. *J Int Neuropsychol Soc* 12:707-735.
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B. 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999-1005.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.
- van Tetering G, Vooijs M. 2011. Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN". *Curr Mol Med* 11:255-269.
- Vance JE, Tasseva G. 2013. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1831:543-554.
- Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. 2001. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc* 123:5625-5631.
- Vassar R, et al. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Veszelka S, et al. 2013. Docosahexaenoic acid reduces amyloid-beta induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J Alzheimers Dis* 36:487-501.
- Vlassenko AG, McCue L, Jasielc MS, Su Y, Gordon BA, Xiong C, Holtzman DM, Benzinger TL, Morris JC, Fagan AM. 2016. Imaging and cerebrospinal fluid biomarkers in early preclinical alzheimer disease. *Ann Neurol* 80:379-387.
- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U. 2004. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448.
- von Strauss E, Viitanen M, De Ronchi D, Winblad B, Fratiglioni L. 1999. Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. *Arch Neurol* 56:587-592.
- Wang DC, Sun CH, Liu LY, Sun XH, Jin XW, Song WL, Liu XQ, Wan XL. 2012. Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:1057-1066.

- Wang H, Sang N, Zhang C, Raghupathi R, Tanzi RE, Saunders A. 2015. Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments. *Biochemistry* 54:2806-2816.
- Wang J, Yan K, Wu ZQ, Zheng CY, Xu RX, Chen LH, Wen ZM, Zhao HQ, Ma QH. 2014. TDP-43 interaction with the intracellular domain of amyloid precursor protein induces p53-associated apoptosis. *Neurosci Lett* 569:131-136.
- Wang P, et al. 2005. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25:1219-1225.
- Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. 2006. Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95:1491-1498.
- Wang Z, Wang B, Yang L, Guo Q, Aithmitti N, Songyang Z, Zheng H. 2009. Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci* 29:10788-10801.
- Wassall SR, Brzustowicz MR, Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W. 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids* 132:79-88.
- Wassall SR, Stillwell W. 2009. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788:24-32.
- Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. 2002. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41:2825-2835.
- Weiss B, Stoffel W. 1997. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem* 249:239-247.
- Wells K, Farooqui AA, Liss L, Horrocks LA. 1995. Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem Res* 20:1329-1333.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306:269-271.
- Whalley LJ, Staff RT, Murray AD, Deary IJ, Starr JM. 2013. Genetic and environmental factors in late onset dementia: possible role for early parental death. *Int J Geriatr Psychiatry* 28:75-81.
- Wild Ma. 2013. Structure and Function of the APP Intracellular Domain in Health and Disease. INTECH.
- Wilson A, Radtke F. 2006. Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett* 580:2860-2868.
- Winkler E, Kamp F, Scheuring J, Ebke A, Fukumori A, Steiner H. 2012. Generation of Alzheimer disease-associated amyloid beta42/43 peptide by gamma-secretase can be inhibited directly by modulation of membrane thickness. *J Biol Chem* 287:21326-21334.
- Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. 1985. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17:278-282.
- Wolfe MS. 2012. Processive proteolysis by gamma-secretase and the mechanism of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 393:899-905.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.
- Wood PL, Barnette BL, Kaye JA, Quinn JF, Woltjer RL. 2015. Non-targeted lipidomics of CSF and frontal cortex grey and white matter in control, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Acta Neuropsychiatr* 27:270-278.
- Wood PL, Mankidy R, Ritchie S, Heath D, Wood JA, Flax J, Goodenowe DB. 2010. Circulating plasmalogen levels and Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive scores in Alzheimer patients. *J Psychiatry Neurosci* 35:59-62.

- Xia W, Mo H. 2016. Potential of tocotrienols in the prevention and therapy of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 31:1-9.
- Xing Y, Tang Y, Zhao L, Wang Q, Qin W, Zhang JL, Jia J. 2016. Plasma Ceramides and Neuropsychiatric Symptoms of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 52:1029-1035.
- Xu X, Zhou H, Boyer TG. 2011. Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling. *EMBO Rep* 12:216-222.
- Yan R, et al. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537.
- Yang LB, et al. 2003. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3-4.
- Yang T, Goldstein JL, Brown MS. 2000. Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP.SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275:29881-29886.
- Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC. 2011. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58:321-329.
- Yassine HN, Rawat V, Mack WJ, Quinn JF, Yurko-Mauro K, Bailey-Hall E, Aisen PS, Chui HC, Schneider LS. 2016. The effect of APOE genotype on the delivery of DHA to cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 8:25.
- Yates CM, Simpson J, Maloney AF, Gordon A, Reid AH. 1980. Alzheimer-like cholinergic deficiency in Down syndrome. *Lancet* 2:979.
- Ye C, Walsh DM, Selkoe DJ, Hartley DM. 2004. Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neurosci Lett* 366:320-325.
- Ye J, DeBose-Boyd RA. 2011. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Yeaman PA, Ford JL, Kim KY. 2013. Providing quality palliative care in end-stage Alzheimer disease. *Am J Hosp Palliat Care* 30:499-502.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 23:843-853.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. 1990. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87:257-263.
- Yu C, Kim SH, Ikeuchi T, Xu H, Gasparini L, Wang R, Sisodia SS. 2001. Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J Biol Chem* 276:43756-43760.
- Zambrano N, Minopoli G, de Candia P, Russo T. 1998. The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 273:20128-20133.
- Zavodnik IB, Zaborowski A, Niekurzak A, Bryszewska M. 1997. Effect of free fatty acids on erythrocyte morphology and membrane fluidity. *Biochem Mol Biol Int* 42:123-133.
- Zhang B, Matsunaga A, Saku K, Nakano S, Yamada T. 2004. Associations among plasma lipoprotein subfractions as characterized by analytical capillary isotachopheresis, apolipoprotein E phenotype, Alzheimer disease, and mild cognitive impairment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e144-146.
- Zhang C, Browne A, Kim DY, Tanzi RE. 2010. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin 1 do not alter levels of the secreted amyloid-beta protein precursor generated by beta-secretase cleavage. *Curr Alzheimer Res* 7:21-26.
- Zhang Y-w, Thompson R, Zhang H, Xu H. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain* 4:3.
- Zhang YW, Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao FF, Xu H. 2007. Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10613-10618.
- Zheng H, Koo EH. 2006. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:5.

- Zhou X, Xu J. 2012. Free cholesterol induces higher beta-sheet content in Abeta peptide oligomers by aromatic interaction with Phe19. *PLoS One* 7:e46245.
- Zinser EG, Hartmann T, Grimm MO. 2007. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768:1991-2001.

7. Appendix

Einfluss von Vitamin D auf Lyso PC

LysoPC	Kontrolle			Vitamin D			p
	Intensität t	%	SEM %	Intensität	%	SEM %	
LysoPC total	1,6	100,0	16,5	1,4	85,5	37,7	
LysoPC saturiert	0,962	100,000	15,167	0,854	88,736	38,599	0,922
LysoPC unsaturiert	0,626	100,000	19,594	0,504	80,473	36,211	0,882
LysoPC CX:1	0,533	100,000	19,504	0,432	81,081	37,596	0,903
LysoPC CX:2	0,032	100,000	18,558	0,026	80,483	31,663	0,818
LysoPC CX:3	0,040	100,000	21,797	0,033	82,354	33,431	0,983
LysoPC CX:4	0,010	100,000	28,230	0,006	59,674	7,571	0,170
LysoPC CX:5	0,003	100,000	12,896	0,003	97,528	51,256	0,965
LysoPC CX:6	0,008	100,000	36,170	0,004	46,649	17,559	0,218
Lyso PC 06:0	0,272	100,000	24,097	0,313	114,86 5	66,928	0,691
Lyso PC 10:0	0,025	100,000	44,834	0,027	106,44 1	102,73 1	0,972
Lyso PC 12:0	0,013	100,000	17,385	0,019	142,86 1	143,17 6	0,457
Lyso PC 14:0	0,039	100,000	13,454	0,040	102,17 5	72,426	0,721
Lyso PC 16:0	0,262	100,000	16,734	0,220	84,246	41,490	0,956
Lyso PC 16:1	0,117	100,000	23,791	0,094	80,766	50,894	0,982
Lyso PC 17:0	0,010	100,000	25,872	0,011	110,61 8	29,339	0,664
Lyso PC 18:0	0,090	100,000	18,127	0,074	82,255	18,932	0,532
Lyso PC 18:1	0,314	100,000	19,098	0,275	87,590	43,314	0,878
Lyso PC 18:2	0,032	100,000	18,558	0,026	80,483	31,663	0,818
Lyso PC 18:3	0,007	100,000	22,673	0,005	71,553	42,052	0,630
Lyso PC 20:0	0,018	100,000	11,867	0,015	80,553	10,919	0,178
Lyso PC 20:3	0,033	100,000	22,232	0,028	84,695	31,682	0,876
Lyso PC 20:4	0,010	100,000	28,230	0,006	59,674	7,571	0,170
Lyso PC 20:5	0,003	100,000	12,896	0,003	97,528	51,256	0,965

Lyso PC 22:0	0,022	100,000	27,962	0,014	61,188	7,709	0,095
Lyso PC 22:6	0,008	100,000	36,170	0,004	46,649	17,559	0,218
Lyso PC 24:0	0,069	100,000	24,697	0,039	56,137	6,833	0,046
Lyso PC 26:0	0,085	100,000	30,245	0,049	58,221	7,919	0,181
Lyso PC 26:1	0,056	100,000	20,284	0,037	67,138	15,298	0,123
Lyso PC 28:0	0,057	100,000	21,465	0,035	60,123	10,635	0,088
Lyso PC 28:1	0,047	100,000	30,236	0,026	54,754	8,988	0,099

Einfluss von Vitamin D auf Carnitine

Carnitine	Kontrolle			Vitamin D			T-Test
	Intensität	%	SEM %	Intensität	%	SEM %	
Carnitine total	101,9	100,0	13,2	110,3	108,3	6,0	0,48
C00	3,98	100,00	22,73	3,93	98,75	22,91	0,94
C02	14,29	100,00	12,78	18,28	127,97	44,70	0,27
C03	8,46	100,00	17,82	7,83	92,54	14,61	0,54
C03 OH	0,73	100,00	5,34	0,75	103,22	7,40	0,51
C03:1	1,22	100,00	12,90	1,31	107,88	13,95	0,44
C04	7,15	100,00	11,67	8,63	120,73	48,02	0,43
C04 OH	1,25	100,00	20,22	1,39	111,89	9,69	0,33
C04:1	1,44	100,00	15,07	1,38	95,86	9,19	0,66
C05	2,59	100,00	20,31	2,46	95,00	18,63	0,73
C05 M DC	0,65	100,00	22,55	0,56	86,67	23,94	0,45
C05 OH	1,13	100,00	18,86	1,02	89,80	21,49	0,50
C05:1	1,66	100,00	25,88	1,88	113,32	23,58	0,48
C05:1 DC	0,72	100,00	23,33	0,82	113,53	17,66	0,39
C06	1,17	100,00	12,48	1,19	101,49	2,87	0,82
C06 OH	0,68	100,00	23,64	0,77	113,72	19,76	0,41
C06:1	1,67	100,00	17,80	1,79	106,78	17,63	0,61
C07 DC	1,44	100,00	7,71	1,48	102,72	18,98	0,80
C08	1,12	100,00	17,72	1,07	95,92	13,37	0,73
C08:1	1,45	100,00	24,24	1,44	99,70	19,18	0,99
C09	0,98	100,00	27,24	1,04	105,46	22,35	0,77
C10	2,33	100,00	5,15	2,46	105,66	26,14	0,69
C10:1	12,11	100,00	20,96	11,53	95,21	42,16	0,85
C10:2	0,92	100,00	22,71	0,96	104,06	12,03	0,76
C12	1,27	100,00	15,28	1,82	143,83	63,47	0,23
C12 DC	0,85	100,00	21,34	0,75	87,55	17,16	0,40

C12:1	8,03	100,00	18,53	8,15	101,47	37,37	0,95
C14	1,36	100,00	40,96	1,52	112,31	32,39	0,65
C14:1	1,15	100,00	9,62	1,25	108,49	23,60	0,53
C14:1 OH	0,73	100,00	17,30	0,81	110,61	21,50	0,47
C14:2	0,49	100,00	19,51	0,54	110,47	18,79	0,47
C14:2 OH	0,65	100,00	17,48	0,73	112,21	15,39	0,33
C16	4,05	100,00	18,52	4,73	116,87	53,29	0,57
C16 OH	0,82	100,00	7,44	0,81	98,65	22,01	0,91
C16:1	2,58	100,00	25,53	2,91	112,59	46,95	0,65
C16:1 OH	0,73	100,00	26,74	0,87	119,74	15,10	0,25
C16:2	0,58	100,00	17,70	0,65	111,92	33,26	0,55
C16:2 OH	0,65	100,00	14,67	0,66	100,71	26,69	0,96
C18:0	0,94	100,00	12,68	1,23	130,24	45,89	0,25
C18:1	5,07	100,00	37,18	5,96	117,63	51,66	0,60
C18:1 OH	0,82	100,00	10,73	1,14	140,05	40,22	0,10
C18:2	1,99	100,00	6,99	1,82	91,33	30,06	0,59

Einfluss von Vitamin D auf die Sphingomyeline

SM	Kontrolle			Vitamin D			
	Intensität	%	SEM %	Intensität	%	SEM %	
SM total	3,5	100,0		2,8	80,7		0,1
SM saturiert	2,1	100,0	14,5	1,7	80,0	9,9	0,1
SM unsaturiert	1,4	100,0	15,5	1,1	81,7	14,9	0,2
SM CX:1	1,1	100,0	15,4	0,9	83,1	15,8	0,2
SM CX:2	0,1	100,0	20,1	0,0	71,2	12,3	0,2
SM CX:3	0,1	100,0	22,3	0,0	69,9	10,0	0,1
SM C14:1 OH	0,0	100,0	21,8	0,0	68,1	10,1	0,0
SM C16:0	0,9	100,0	19,2	0,7	82,1	12,4	0,1
SM C16:1	0,1	100,0	15,8	0,1	78,9	11,3	0,1
SM C16:1 OH	0,1	100,0	8,3	0,1	83,3	15,0	0,2
SM C18:0	1,0	100,0	5,7	0,8	77,8	6,7	0,1
SM C18:1	0,2	100,0	3,7	0,2	78,5	11,2	0,1
SM C20:2	0,1	100,0	28,1	0,0	71,2	6,3	0,1
SM C22:1 OH	0,1	100,0	0,8	0,1	92,9	22,4	0,7
SM C22:2 OH	0,2	100,0	7,6	0,1	81,6	14,7	0,3
SM C22:3	0,1	100,0	14,3	0,0	69,9	10,0	0,1

SM C24:0	0,2	100,0	12,0	0,1	82,6	15,8	0,2
SM C24:1	0,5	100,0	10,4	0,4	84,6	18,4	0,3
SM C24:1 OH	0,0	100,0	3,5	0,0	85,6	14,1	0,2
SM C26:0	0,0	100,0	22,1	0,0	84,8	19,4	0,3
SM C26:1	0,1	100,0	8,1	0,0	83,8	17,6	0,2

Auswertung der Carnitine

MEF AWT und MEF APPACT15

Metabolit	AWT (Pijet et al.)	AWT (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	Metabolit	d/d (Pijet et al.)	d/d (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	ttes
C00	76,23	54,84	65,53	10,69	100,00	16,31	C00	61,38	48,81	55,09	6,29	84,07	9,60	0,4886
C02	140,13	131,57	135,85	4,28	100,00	3,15	C02	135,09	115,47	125,28	9,81	92,22	7,22	0,4276
C03	107,17	100,13	103,65	3,52	100,00	3,40	C03	99,62	97,86	98,74	0,88	95,27	0,85	0,3092
C03 OH	53,33	66,67	60,00	6,67	100,00	11,11	C03 OH	47,80	93,33	70,57	22,77	117,61	37,95	0,6996
C03:1	118,74	128,81	123,77	5,03	100,00	4,07	C03:1	134,34	116,23	125,28	9,06	101,22	7,32	0,8975
C04	126,04	113,71	119,87	6,16	100,00	5,14	C04	125,79	89,81	107,80	17,99	89,93	15,01	0,5903
C04 OH	60,63	50,57	55,60	5,03	100,00	9,05	C04 OH	51,07	47,80	49,43	1,64	88,91	2,94	0,3642
C04:1	104,65	115,22	109,94	5,28	100,00	4,81	C04:1	115,72	93,58	104,65	11,07	95,19	10,07	0,7086
C05	102,14	109,43	105,79	3,65	100,00	3,45	C05	103,40	98,62	101,01	2,39	95,48	2,26	0,3874
C05 MDC	44,78	43,02	43,90	0,88	100,00	2,01	C05 MDC	43,77	38,24	41,01	2,77	93,41	6,30	0,4241
C05 OH	56,10	56,10	56,10	0,00	100,00	0,00	C05 OH	58,36	45,79	52,08	6,29	92,83	11,21	0,5877
C05:1	175,35	177,36	176,35	1,01	100,00	0,57	C05:1	170,57	148,93	159,75	10,82	90,58	6,13	0,2660
C05:1 DC	65,41	111,95	88,68	23,27	100,00	26,24	C05:1 DC	60,38	67,92	64,15	3,77	72,34	4,26	0,4074
C06	61,89	63,40	62,64	0,75	100,00	1,20	C06	57,11	55,60	56,35	0,75	89,96	1,20	0,0276
C06 OH	44,53	45,53	45,03	0,50	100,00	1,12	C06 OH	36,98	41,76	39,37	2,39	87,43	5,31	0,1464
C06:1	154,21	189,94	172,08	17,86	100,00	10,38	C06:1	160,25	131,07	145,66	14,59	84,65	8,48	0,3706
C07 DC	84,28	84,53	84,40	0,13	100,00	0,15	C07 DC	78,99	71,70	75,35	3,65	89,27	4,32	0,1312
C08	104,40	103,90	104,15	0,25	100,00	0,24	C08	100,38	81,76	91,07	9,31	87,44	8,94	0,2952
C08:1	138,62	327,80	233,21	94,59	100,00	40,56	C08:1	148,43	169,56	158,99	10,57	68,18	4,53	0,5172
C09	126,54	492,83	309,69	183,14	100,00	59,14	C09	148,93	175,60	162,26	13,33	52,40	4,31	0,5063
C10	370,31	474,21	422,26	51,95	100,00	12,30	C10	389,94	384,40	387,17	2,77	91,69	0,66	0,5695

C10:1	178,36	441,51	309,94	131,57	100,00	42,45	C10:1	179,62	177,61	178,62	1,01	57,63	0,32	0,4234
C10:2	2144,65	2102,39	2123,52	21,13	100,00	1,00	C10:2	1662,14	1486,04	1574,09	88,05	74,13	4,15	0,0261
C12	54,84	71,45	63,14	8,30	100,00	13,15	C12	64,65	54,09	59,37	5,28	94,02	8,37	0,7383
C12 DC	34,21	32,20	33,21	1,01	100,00	3,03	C12 DC	28,43	28,43	28,43	0,00	85,61	0,00	0,0416
C12:1	156,48	159,75	158,11	1,64	100,00	1,03	C12:1	162,52	143,40	152,96	9,56	96,74	6,05	0,6481
C14	61,64	56,60	59,12	2,52	100,00	4,26	C14	49,31	57,36	53,33	4,03	90,21	6,81	0,3471
C14:1	657,86	558,99	608,43	49,43	100,00	8,12	C14:1	565,28	492,83	529,06	36,23	86,95	5,95	0,3246
C14:1 OH	140,63	125,53	133,08	7,55	100,00	5,67	C14:1 OH	134,34	122,26	128,30	6,04	96,41	4,54	0,6699
C14:2	371,07	304,40	337,74	33,33	100,00	9,87	C14:2	284,28	285,53	284,91	0,63	84,36	0,19	0,2539
C14:2 OH	148,93	120,50	134,72	14,21	100,00	10,55	C14:2 OH	130,06	124,53	127,30	2,77	94,49	2,05	0,6593
C16	122,26	105,16	113,71	8,55	100,00	7,52	C16	238,74	347,17	292,96	54,21	257,63	47,68	0,0823
C16 OH	101,64	83,77	92,70	8,93	100,00	9,63	C16 OH	87,30	86,04	86,67	0,63	93,49	0,68	0,5696
C16:1	144,91	102,39	123,65	21,26	100,00	17,19	C16:1	104,15	122,26	113,21	9,06	91,56	7,32	0,6957
C16:1 OH	338,11	298,62	318,36	19,75	100,00	6,20	C16:1 OH	276,98	239,75	258,36	18,62	81,15	5,85	0,1576
C16:2	57,11	47,04	52,08	5,03	100,00	9,66	C16:2	54,34	43,77	49,06	5,28	94,20	10,14	0,7192
C16:2 OH	44,28	37,99	41,13	3,14	100,00	7,65	C16:2 OH	38,74	32,45	35,60	3,14	86,54	7,65	0,3394
C18:0	49,56	46,54	48,05	1,51	100,00	3,14	C18:0	69,43	105,91	87,67	18,24	182,46	37,96	0,1628
C18:1	77,74	59,62	68,68	9,06	100,00	13,19	C18:1	121,76	220,88	171,32	49,56	249,45	72,16	0,1785
C18:1 OH	92,58	67,42	80,00	12,58	100,00	15,72	C18:1 OH	85,79	80,50	83,14	2,64	103,93	3,30	0,8295
C18:2	61,13	46,04	53,58	7,55	100,00	14,08	C18:2	49,81	42,01	45,91	3,90	85,68	7,28	0,4617
Sum me	7353,46	7909,43	7631,45	277,99	100,00	3,64	Sum me	6715,97	6506,67	6611,32	104,65	86,63	1,37	0,0753

Auswertung der Carnitine

MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock

Metabolit	d/d mock (Pijet et al.)	d/d mock (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	Metabolit	d/d C50 (Pijet et al.)	d/d C50 (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	ttest
C00	45,03	53,84	49,43	4,40	100,00	8,91	C00	39,50	40,50	40,00	0,50	80,92	1,02	0,1670
C02	96,10	116,23	106,16	10,06	100,00	9,48	C02	99,12	106,16	102,64	3,52	96,68	3,32	0,7725

C03	84,0 3	74,7 2	79,3 7	4,65	100, 00	5,86	C03	74,2 1	81,7 6	77,9 9	3,77	98,2 6	4,75	0,83 88
C03 OH	60,6 3	34,4 7	47,5 5	13,08	100, 00	27,51	C03 OH	37,7 4	37,4 8	37,6 1	0,13	79,1 0	0,26	0,52 68
C03:1	91,8 2	108, 93	100, 38	8,55	100, 00	8,52	C03:1	77,7 4	98,6 2	88,1 8	10,44	87,8 4	10,40	0,46 14
C04	91,8 2	92,3 3	92,0 8	0,25	100, 00	0,27	C04	85,2 8	75,9 7	80,6 3	4,65	87,5 7	5,05	0,13 34
C04 OH	41,0 1	36,9 8	38,9 9	2,01	100, 00	5,16	C04 OH	41,7 6	34,4 7	38,1 1	3,65	97,7 4	9,35	0,85 22
C04:1	86,7 9	87,8 0	87,3 0	0,50	100, 00	0,58	C04:1	81,0 1	78,2 4	79,6 2	1,38	91,2 1	1,59	0,03 49
C05	82,5 2	74,9 7	78,7 4	3,77	100, 00	4,79	C05	86,0 4	76,7 3	81,3 8	4,65	103, 35	5,91	0,70 24
C05 M DC	32,7 0	28,1 8	30,4 4	2,26	100, 00	7,44	C05 M DC	35,4 7	35,7 2	35,6 0	0,13	116, 94	0,41	0,15 08
C05 OH	42,5 2	37,7 4	40,1 3	2,39	100, 00	5,96	C05 OH	40,7 5	50,3 1	45,5 3	4,78	113, 48	11,91	0,41 80
C05:1	141, 64	150, 69	146, 16	4,53	100, 00	3,10	C05:1	149, 43	147, 42	148, 43	1,01	101, 55	0,69	0,67 38
C05:1 DC	55,3 5	56,8 6	56,1 0	0,75	100, 00	1,35	C05:1 DC	50,3 1	46,7 9	48,5 5	1,76	86,5 5	3,14	0,05 88
C06	38,4 9	42,5 2	40,5 0	2,01	100, 00	4,97	C06	39,5 0	42,7 7	41,1 3	1,64	101, 55	4,04	0,83 10
C06 OH	29,9 4	38,4 9	34,2 1	4,28	100, 00	12,50	C06 OH	40,2 5	37,7 4	38,9 9	1,26	113, 97	3,68	0,39 58
C06:1	126, 29	133, 84	130, 06	3,77	100, 00	2,90	C06:1	138, 62	125, 28	131, 95	6,67	101, 45	5,13	0,82 84
C07 DC	58,6 2	44,5 3	51,5 7	7,04	100, 00	13,66	C07 DC	82,7 7	52,5 8	67,6 7	15,09	131, 22	29,27	0,43 57
C08	77,7 4	69,6 9	73,7 1	4,03	100, 00	5,46	C08	84,2 8	71,7 0	77,9 9	6,29	105, 80	8,53	0,62 46
C08:1	119, 25	113, 96	116, 60	2,64	100, 00	2,27	C08:1	122, 01	103, 65	112, 83	9,18	96,7 6	7,87	0,73 10
C09	125, 03	121, 26	123, 14	1,89	100, 00	1,53	C09	99,1 2	91,8 2	95,4 7	3,65	77,5 3	2,96	0,02 13
C10	291, 32	326, 29	308, 81	17,48	100, 00	5,66	C10	317, 23	302, 14	309, 69	7,55	100, 29	2,44	0,96 73
C10:1	145, 41	123, 77	134, 59	10,82	100, 00	8,04	C10:1	121, 76	122, 01	121, 89	0,13	90,5 6	0,09	0,36 12
C10:2	1324 ,53	678, 99	1001 ,76	322,7 7	100, 00	32,22	C10:2	1389 ,69	1354 ,97	1372 ,33	17,36	136, 99	1,73	0,37 03
C12	45,2 8	43,2 7	44,2 8	1,01	100, 00	2,27	C12	36,9 8	41,2 6	39,1 2	2,14	88,3 5	4,83	0,16 08
C12 DC	24,9 1	18,3 6	21,6 4	3,27	100, 00	15,12	C12 DC	26,9 2	23,9 0	25,4 1	1,51	117, 44	6,98	0,40 47
C12:1	136, 60	101, 64	119, 12	17,48	100, 00	14,68	C12:1	146, 67	126, 29	136, 48	10,19	114, 57	8,55	0,48 14
C14	46,7 9	32,7 0	39,7 5	7,04	100, 00	17,72	C14	55,3 5	48,0 5	51,7 0	3,65	130, 06	9,18	0,27 09
C14:1	454, 34	221, 89	338, 11	116,2 3	100, 00	34,37	C14:1	433, 46	438, 24	435, 85	2,39	128, 91	0,71	0,48 90
C14:1 OH	105, 66	61,3 8	83,5 2	22,14	100, 00	26,51	C14:1 OH	104, 65	122, 26	113, 46	8,81	135, 84	10,54	0,33 58
C14:2	236, 98	120, 00	178, 49	58,49	100, 00	32,77	C14:2	195, 72	247, 55	221, 64	25,91	124, 17	14,52	0,56 96

C14:2	94,8	57,3	76,1	18,74	100,	24,63	C14:2	96,6	104,	100,	4,03	132,	5,29	0,32
OH	4	6	0		00		OH	0	65	63		23		91
C16	131,	52,5	91,8	39,25	100,	42,74	C16	139,	108,	123,	15,47	134,	16,85	0,52
	07	8	2		00			37	43	90		93		65
C16	74,4	67,9	71,1	3,27	100,	4,59	C16	74,9	71,4	73,2	1,76	102,	2,47	0,64
OH	7	2	9		00		OH	7	5	1		83		22
C16:1	82,5	47,5	65,0	17,48	100,	26,89	C16:1	69,9	79,5	74,7	4,78	114,	7,35	0,64
	2	5	3		00			4	0	2		89		65
C16:1	245,	119,	182,	62,89	100,	34,48	C16:1	231,	241,	236,	5,03	129,	2,76	0,48
OH	28	50	39		00		OH	19	26	23		52		34
C16:2	42,0	24,1	33,0	8,93	100,	27,00	C16:2	36,9	41,0	38,9	2,01	117,	6,08	0,58
	1	5	8		00			8	1	9		87		46
C16:2	23,6	21,1	22,3	1,26	100,	5,62	C16:2	37,7	28,4	33,0	4,65	147,	20,79	0,15
OH	5	3	9		00		OH	4	3	8		75		68
C18:0	54,3	26,9	40,6	13,71	100,	33,75	C18:0	64,6	49,5	57,1	7,55	140,	18,58	0,40
	4	2	3		00			5	6	1		56		28
C18:1	64,1	36,9	50,5	13,58	100,	26,87	C18:1	64,6	51,3	57,9	6,67	114,	13,18	0,67
	5	8	7		00			5	2	9		68		24
C18:1	82,2	59,1	70,6	11,57	100,	16,37	C18:1	48,3	69,4	58,8	10,57	83,2	14,95	0,52
OH	6	2	9		00		OH	0	3	7		7		93
C18:2	39,7	30,4	35,0	4,65	100,	13,26	C18:2	36,2	33,2	34,7	1,51	98,9	4,30	0,94
	5	4	9		00			3	1	2		2		55
Sum	5273	3789	4531	741,7	100,	16,37	Sum	5233	5140	5187	46,67	114,	1,03	0,47
me	,46	,94	,70	6	00		me	,96	,63	,30		47		08

Auswertung der Sphingomyeline

MEF AWT und MEF APPΔCT15

Metabolit	AWT (Pij et al.)	AWT (2)	MW	StabwM	%MW	%StabwM	Metabolit	d/d (Pij et al.)	d/d (2)	MW	StabwM	%MW	%StabwM	ttest
SM	0,0	0,0	0,0	0,003	100,0	10,915	SM	0,0	0,0	0,0	0,001	134,6	5,123	0,10
C14:1	29	23	26		00		C14:1	34	36	35		88		26
OH							OH							
SM	0,9	0,6	0,8	0,115	100,0	14,270	SM	0,7	0,8	0,8	0,011	100,1	1,338	0,99
C16:0	21	91	06		00		C16:0	96	18	07		68		17
SM	0,1	0,0	0,0	0,013	100,0	13,959	SM	0,0	0,0	0,0	0,000	93,44	0,214	0,68
C16:1	09	82	95		00		C16:1	89	89	89		8		50
SM	0,0	0,0	0,0	0,003	100,0	14,814	SM	0,0	0,0	0,0	0,000	114,1	1,827	0,44
C16:1	22	16	19		00		C16:1	21	22	21		65		28
OH							OH							
SM	0,0	0,0	0,0	0,006	100,0	6,611	SM	0,1	0,1	0,1	0,005	208,6	5,263	0,00
C18:0	94	82	88		00		C18:0	88	78	83		19		60
SM	0,0	0,0	0,0	0,001	100,0	8,730	SM	0,0	0,0	0,0	0,000	131,1	2,940	0,07
C18:1	16	14	15		00		C18:1	19	20	20		74		73
SM	0,0	0,0	0,0	0,001	100,0	16,975	SM	0,0	0,0	0,0	0,000	169,1	1,852	0,05
C20:2	07	05	06		00		C20:2	10	09	10		04		60
SM	0,0	0,0	0,0	0,004	100,0	11,711	SM	0,0	0,0	0,0	0,000	175,4	1,582	0,02
C22:1	33	26	30		00		C22:1	52	53	53		98		36
OH							OH							

SM C22:2 OH	0,0 34	0,0 25	0,0 30	0,004	100,0 00	14,898	SM C22:2 OH	0,0 50	0,0 51	0,0 50	0,001	168,5 19	3,069	0,04 59
SM C22:3 OH	0,0 18	0,0 12	0,0 15	0,003	100,0 00	18,925	SM C22:3 OH	0,0 24	0,0 23	0,0 24	0,001	158,1 46	3,843	0,09 49
SM C24:0 OH	0,1 49	0,1 20	0,1 34	0,014	100,0 00	10,613	SM C24:0 OH	0,2 12	0,2 16	0,2 14	0,002	159,2 67	1,568	0,03 12
SM C24:1 OH	0,2 91	0,2 45	0,2 68	0,023	100,0 00	8,608	SM C24:1 OH	0,3 52	0,3 61	0,3 57	0,004	133,1 19	1,655	0,06 35
SM C24:1 OH	0,0 10	0,0 09	0,0 10	0,001	100,0 00	6,772	SM C24:1 OH	0,0 16	0,0 16	0,0 16	0,000	167,5 69	0,966	0,01 01
SM C26:0 OH	0,0 12	0,0 09	0,0 10	0,001	100,0 00	12,068	SM C26:0 OH	0,0 25	0,0 26	0,0 25	0,000	246,1 16	1,435	0,00 68
SM C26:1 OH	0,0 12	0,0 10	0,0 11	0,001	100,0 00	7,750	SM C26:1 OH	0,0 24	0,0 25	0,0 25	0,001	226,3 03	4,734	0,00 51
Summ e	1,7 56	1,3 70	1,5 63	0,193	100,0 00	12,343	Summ e	1,9 12	1,9 46	1,9 29	0,017	123,4 45	1,057	0,19 89

Auswertung der Sphingomyeline

MEF $\Delta\Delta$ C50 und MEF $\Delta\Delta$ mock

Metabolit	d/d mock (Pij et al.)	d/d mock (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	Metabolit	d/d C50 (Pij et al.)	d/d C50 (2)	MW	Stab wM	%M W	%Stab wM	ttest
SM C14:1 OH	0,0 25	0,0 11	0,0 18	0,007	100,0 00	38,044	SM C14:1 OH	0,0 40	0,0 27	0,0 33	0,006	181,9 94	34,305	0,25 06
SM C16:0 OH	0,7 29	0,3 51	0,5 40	0,189	100,0 00	34,933	SM C16:0 OH	1,0 23	0,6 46	0,8 35	0,189	154,5 75	34,964	0,38 46
SM C16:1 OH	0,0 59	0,0 25	0,0 42	0,017	100,0 00	41,026	SM C16:1 OH	0,1 16	0,0 68	0,0 92	0,024	221,0 08	57,999	0,23 06
SM C16:1 OH	0,0 18	0,0 08	0,0 13	0,005	100,0 00	39,215	SM C16:1 OH	0,0 24	0,0 14	0,0 19	0,005	144,5 44	35,870	0,49 02
SM C18:0 OH	0,1 84	0,1 37	0,1 61	0,023	100,0 00	14,599	SM C18:0 OH	0,2 91	0,1 34	0,2 13	0,079	132,1 00	48,944	0,59 39
SM C18:1 OH	0,0 19	0,0 15	0,0 17	0,002	100,0 00	12,123	SM C18:1 OH	0,0 27	0,0 14	0,0 21	0,007	124,6 98	39,571	0,61 12
SM C20:2 OH	0,0 09	0,0 03	0,0 06	0,003	100,0 00	47,313	SM C20:2 OH	0,0 11	0,0 06	0,0 09	0,002	146,3 54	38,019	0,52 48
SM C22:1 OH	0,0 45	0,0 23	0,0 34	0,011	100,0 00	32,981	SM C22:1 OH	0,0 56	0,0 28	0,0 42	0,014	123,7 90	40,222	0,69 23
SM C22:2 OH	0,0 44	0,0 21	0,0 33	0,011	100,0 00	34,656	SM C22:2 OH	0,0 41	0,0 24	0,0 32	0,009	97,60 7	25,888	0,96 09
SM C22:3 OH	0,0 22	0,0 08	0,0 15	0,007	100,0 00	47,541	SM C22:3 OH	0,0 30	0,0 17	0,0 24	0,007	159,9 37	45,544	0,45 87

SM	0,2	0,1	0,1	0,046	100,0	29,087	SM	0,2	0,1	0,1	0,052	110,1	32,564	0,83
C24:0	06	13	60		00		C24:0	28	24	76		69		75
SM	0,3	0,2	0,3	0,073	100,0	23,731	SM	0,3	0,1	0,2	0,079	82,54	25,638	0,66
C24:1	79	34	07		00		C24:1	32	74	53		0		68
SM	0,0	0,0	0,0	0,001	100,0	12,812	SM	0,0	0,0	0,0	0,004	107,6	35,974	0,86
C24:1	13	10	11		00		C24:1	16	08	12		33		00
OH							OH							
SM	0,0	0,0	0,0	0,005	100,0	29,313	SM	0,0	0,0	0,0	0,007	125,0	43,706	0,68
C26:0	21	11	16		00		C26:0	27	13	20		06		15
SM	0,0	0,0	0,0	0,004	100,0	15,752	SM	0,0	0,0	0,0	0,006	74,63	26,542	0,49
C26:1	26	19	23		00		C26:1	23	11	17		9		76
Summ	1,7	0,9	1,3	0,405	100,0	29,021	Summ	2,2	1,3	1,7	0,488	128,8	35,004	0,59
e	99	90	94		00		e	85	09	97		53		06