

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

**Lipide bei der Alzheimer Krankheit –
Der Einfluss von *trans*-Fettsäuren, Plasmalogenen und
Sphingomyelinase-Inhibitoren auf die Prozessierung des
Amyloiden Vorläufer Proteins**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von

Tatjana Rothhaar

geboren am 19. August 1982 in Zweibrücken

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhalt

A Abkürzungsverzeichnis	I
B Abbildungsverzeichnis	IV
C Tabellenverzeichnis	IX
D Kooperationen	XI
1 Zusammenfassung	1
1.1 Lipide bei der Alzheimer Krankheit – Der Einfluss von <i>trans</i> -Fettsäuren, Plasmalogenen und Sphingomyelinase-Inhibitoren auf die Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins	1
1.2 Lipids and Alzheimer’s disease – The effect of <i>trans</i> -fatty acids, plasmalogens and functional sphingomyelinase inhibitors on amyloid precursor protein’s proteolytic processing	2
2 Einleitung	4
2.1 Die Alzheimer Krankheit.....	4
2.2 Die molekularen Ursachen der Alzheimer Krankheit.....	5
2.2.1 Die APP-Prozessierung	6
2.2.2 Die β -Sekretase	8
2.2.3 Die γ -Sekretase	10
2.3 Die Rolle von Lipiden bei der Alzheimer Krankheit	12
2.3.1 Die Bedeutung von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit	13
2.3.2 Die Rolle von Plasmalogenen bei der Alzheimer Krankheit.....	15
2.3.4 Die Bedeutung des Sphingolipidstoffwechsels bei der Alzheimer Krankheit	16
2.4 Fragestellung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	20
3.2 Geräte	23
3.3 Verwendetes <i>in vivo</i> Material.....	25
3.4 Verwendete Zelllinien	29
3.5 Zellkultur	29
3.5.1 Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen	29

3.5.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	30
3.5.3	Inkubation von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Fettsäuren	31
3.5.4	Inkubation von Plasmalogenen und Phospholipiden.....	32
3.5.5	Inkubation von Sphingomyelinase-Inhibitoren.....	33
3.5.6	Inkubation von rekombinantem aSMase-Enzym	33
3.5.7	Inkubation von Sphingomyelin und Ceramid.....	34
3.5.8	Bestimmung der Zytotoxizität	34
3.5.9	Transienter aSMase Knockdown.....	35
3.6	RNS-analytische Arbeiten	35
3.6.1	Isolierung der Gesamt-RNS	35
3.6.2	Synthese von cDNS	36
3.6.3	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	36
3.7	Proteinanalytische Arbeiten.....	38
3.7.1	Chemischer Zellaufschluss.....	38
3.7.2	Mechanischer Zellaufschluss	38
3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Methode.....	39
3.7.4	Immunopräzipitation	40
3.7.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	41
3.7.6	Proteintransfer mittels Western Blotting	41
3.7.7	Proteindetektion mit der „enhanced chemoluminescence“ (ECL)-Methode	42
3.7.8	Bestimmung der A β -Degradation	44
3.7.9	Bestimmung der APP-Lokalisation an der Zelloberfläche mittels FACS.....	45
3.7.10	Die Bestimmung des Oberflächenanteils von Proteinen mittels Biotinylierung.....	45
3.8	Analyse von Enzymaktivitäten.....	46
3.8.1	Bestimmung der Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase.....	46
3.8.2	Bestimmung der aSMase-Aktivität	51
3.8.3	Bestimmung der nSMase-Aktivität	52
3.9	Isolation von Lipid Rafts	53
3.10	Isolation von Endosomen	54
3.11	Lipidanalytische Arbeiten	55

3.11.1	Analyse der Sphingomyeline, PC- und PE-Plasmalogene.....	55
3.11.2	Analyse der Ceramide	57
3.12	Methoden zur Bestimmung der A β -Aggregation.....	58
3.12.1	Aufarbeitung der A β -Peptide	58
3.12.2	Thioflavin T-Assay.....	58
3.12.3	Dot-Blot-Analyse von A β -Aggregaten	59
3.12.4	Rasterkraft-Mikroskopie.....	59
3.12.5	Transmissionselektronenmikroskopie	60
3.13	Bestimmung des oxidativen Stresses	60
3.13.1	Bestimmung mittels Aminophenylfluorescein (APF)	60
3.13.2	Bestimmung mittels Amplex Red.....	60
4	Ergebnisse	62
4.1	Weiterentwicklung und Validierung von Methoden zur Messung der Sekretase-Aktivitäten	62
4.1.1	Messung der Sekretase-Aktivität aus isolierten Plasmamembranen	62
4.1.2	Messung der Sekretase-Aktivität aus lebenden Zellen	67
4.2	Der Einfluss von <i>trans</i> -Fettsäuren auf die APP-Prozessierung	70
4.2.1	Der Einfluss von TFA auf die Spaltprodukte des APPs.....	70
4.2.2	Der Einfluss von TFA auf die Aktivität der β -Sekretase	73
4.2.3	Der Einfluss von TFA auf die Aktivität der γ -Sekretase.....	77
4.2.4	Der Einfluss von TFA auf die Gen-Expression der Sekretasen	80
4.2.5	Der Einfluss von TFA auf die Proteine ADAM10, BACE1 und Nicastrin.....	83
4.2.6	Der Einfluss von TFA auf den subzellulären Transport des APPs.....	85
4.2.7	Der Einfluss von TFA auf A β -Aggregation	88
4.3	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die APP-Prozessierung	90
4.3.1	Bestimmung von Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Plasmalogenen in humanen <i>post mortem</i> Gehirnen.....	90
4.3.2	Der Effekt von Plasmalogenen auf die Expression der Sekretasen.....	92
4.3.3	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase	94
4.3.4	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase	97
4.3.5	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase	100

4.3.6	Der Einfluss von PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 auf die γ -Sekretase in humanen <i>post mortem</i> Gehirnen.....	103
4.3.7	Bestimmung der AGPS-Proteinlevel in humanen Alzheimer-Gehirnen	105
4.4	Der Einfluss von funktionellen aSMase Inhibitoren auf die APP-Proteolyse	108
4.4.1	Der Einfluss von Amitriptylin auf die Produktion der APP Spaltprodukte.....	108
4.4.2	Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität und die Proteinlevel der α -, β - und γ -Sekretase.....	110
4.4.3	Der Einfluss von Amitriptylin auf die γ -Sekretase Verteilung in den Lipid Rafts	114
4.4.4	Der Einfluss von Amitriptylin auf die Degradation der A β -Peptide	116
4.4.5	Der Effekt von Amitriptylin auf die aSMase, Sphingomyelin und Ceramid	117
4.4.6	Der Effekt von Amitriptylin auf die APP-Prozessierung über Sphingomyelin und Ceramid	119
4.4.7	Die Effekte von Sphingomyelin und Ceramid auf die Aktivität der α -Sekretase	126
4.4.8	Der Einfluss von Sphingomyelin und Ceramid auf die Aggregation von A β -Peptiden	127
4.4.9	Die Effekte anderer Antidepressiva auf die Bildung von A β	130
4.4.10	Die Gen-Expression der Sphingomyelinasen in humanen <i>post mortem</i> Gehirnen von Alzheimer-Patienten	135
4.5	Weitere Lipide und ihr Einfluss auf die Aktivitäten der Sekretasen	138
4.5.1	Der Effekt von Phospholipiden auf die Aktivität der α -Sekretase.....	138
4.5.2	Der Einfluss von Phytosterolen auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase	140
4.5.3	Der Einfluss von DHA auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase	147
4.5.4	Der Einfluss von Gangliosiden auf die Aktivität der γ -Sekretase	148
5	Diskussion	150
5.1	Der Einfluss von TFA auf die APP-Prozessierung	150
5.1.1	TFA und das Alzheimer-Risiko – Die epidemiologische Datenlage	150
5.1.2	TFA beeinflussen die APP-Prozessierung	151
5.1.3	TFA reduzieren die nicht amyloidogene APP-Prozessierung	152
5.1.4	TFA erhöhen die amyloidogene APP-Prozessierung über einen multifaktoriellen Mechanismus.....	154
5.1.5	TFA erhöhen die Aggregation von A β -Peptiden	157
5.1.6	TFA und die Alzheimer Krankheit – Ein Fazit.....	158
5.1.7	Ausblick	161
5.2	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die APP-Prozessierung	162

5.2.1	Plasmalogene bei der Alzheimer Krankheit	162
5.2.2	Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Sekretasen der APP-Prozessierung	163
5.2.3	Plasmalogene und die APP-Prozessierung – Physiologische und pathologische Aspekte.....	165
5.2.4	Ausblick	167
5.3	Der Einfluss funktioneller aSMase Inhibitoren auf die APP-Prozessierung	169
5.3.1	Amitriptylin reduziert die A β -Produktion durch Inhibierung der amyloidogenen APP-Prozessierung.....	170
5.3.2	Amitriptylin beeinflusst die amyloidogene APP-Prozessierung über das SM/Cer-Verhältnis.....	172
5.3.3	Amitriptylin erhöht die nicht amyloidogene APP-Prozessierung über ADAM17	174
5.3.4	Amitriptylin reduziert A β über eine verstärkte Degradation und inhibiert dessen Aggregation	175
5.3.5	Andere FIASMA als therapeutische Targets für die Alzheimer Krankheit.....	176
5.3.6	Antidepressiva als möglicher Therapie-Ansatz bei der Alzheimer Krankheit – Ein Fazit	177
5.3.7	Ausblick	181
6	Literatur	182
7	Publikationen	206
8	Danksagung	209

A Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Aβ	Amyloid-β-Peptid
AA	Arachidonsäure (engl. arachidonic acid)
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimer's disease)
AK	Antikörper
AICD	Intrazelluläre Domäne des APP (engl. APP intracellular domain)
ADAM	Ein Disintegrin und Metalloproteinasen (engl. A Disintegrin And Metalloproteinase)
AGPS	Alkyl-dihydroxyacetone-Phosphate-Synthase
Aph1	Anterior pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloides Vorläuferprotein (engl. Amyloid Precursor Protein)
AS	Aminosäure
BACE	Sekretase, die an der β-Schnittstelle des APPs schneidet (engl. β-site APP cleaving enzyme)
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cer	Ceramid
CHCl ₃	Chloroform
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CTF	C-terminales Fragment
CuSO ₄	Kupfersulfat
dd	bidestilliert
DHA	Docosahexaensäure (engl. Docosahexaenoic acid)
DMEM	„Dulbecco's modified Eagels Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	engl. „enhanced-chemo-luminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	Markerprotein früher Endosomen (engl. early endosomal antigen 1)
Engl.	englisch

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung
FAD	familiär vererbte Form der Alzheimer Krankheit
FCS	fetales Kälber-Serum (engl. fetal calf serum)
FIASMA	Funktionelle Inhibitoren der azidischen Sphingomyelinase
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase)
I-CLIP	Protease, die innerhalb der Membran schneidet (engl. intramembrane-Cleaving protease)
IDE	Insulin-degradierendes Enzym
IP	Immunpräzipitation
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
m	milli
M	mol/l
mA	Milliampère
MEM	„Minimum Essential Medium“
MeOH	Methanol
min	Minute
mm	Millimeter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano; normal; neutral
n.s.	nicht signifikant
N ₂	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonidet P40 Substitute
OH	Hydroxy
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEN2	Presenilin enhancer 2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PL	Plasmalogen
PS	Presenilin
RIP	regulierte Proteolyse innerhalb der Membran (engl. regulated intramembrane proteolysis)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. real-time-PCR)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
sn	Stereospezifische Nummerierung (engl. stereospecific numbering)
StabwM	Standardabweichung des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TACE	Tumor-Negrose-Faktor- α converting enzyme
TFA	<i>trans</i> -Fettsäure (engl. <i>trans</i> fatty acid)
TNF- α	Tumor-Negrose-Faktor- α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Enzymeinheit; Menge des Enzyms, die 1 μ M Substrat/min umsetzt (engl. Units)
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

B Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der APP-Prozessierung	8
Abb. 2 Schematische Darstellung des intrazellulären Transports des BACE1-Proteins	9
Abb. 3 Die Zusammensetzung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes	11
Abb. 4 Strukturformeln der <i>trans</i> -9-Octadecensäure (Elaidinsäure) und ihrem <i>cis</i> -Isomer Ölsäure	14
Abb. 5 Strukturelle Darstellung der Plasmalogene und Phospholipide.....	15
Abb. 6 Schematische Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels.....	17
Abb. 7 Extinktionsscan der Substrate	63
Abb. 8 Emissionsscan der Substrate	64
Abb. 9 Linearität des β -Sekretase- (A) und γ -Sekretase-Assays (B).....	65
Abb. 10 Aktivität der γ -Sekretase in Abhängigkeit der verwendeten Methode zur Solubilisierung der Membranpellets	66
Abb. 11 Spezifität des (A) β - und (B) γ -Sekretase-Assays aus isolierten Membranen	66
Abb. 12 Spezifität des (A) β - und (B) γ -Sekretase-Assay in lebenden SH-SY5Y wt Zellen ...	68
Abb. 13 Der Effekt von Elaidinsäure auf die APP-Prozessierungsprodukte	71
Abb. 14 Der Effekt von CLA auf die APP-Prozessierungsprodukte.....	72
Abb. 15 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen	74
Abb. 16 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen.....	74
Abb. 17 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen	75
Abb. 18 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen	76
Abb. 19 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen	77
Abb. 20 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen.....	78
Abb. 21 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen.....	78
Abb. 22 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen.	79
Abb. 23 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Gen-Expression der Sekretasen.....	81

Abb. 24 Der Einfluss von CLA auf die Gen-Expression der Sekretasen	82
Abb. 25 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Proteinlevel der Sekretasen.....	84
Abb. 26 Der Einfluss von CLA auf die Proteinlevel der Sekretasen	84
Abb. 27 Der Einfluss von TFA auf die Menge des intrazellulären APP	86
Abb. 28 Der Einfluss von TFA auf die Gen-Expression des APP.....	87
Abb. 29 Der Einfluss von TFA auf die APP-Lokalisation an der Zelloberfläche.....	87
Abb. 30 TEM-Aufnahmen der A β -Aggregate in Abhängigkeit von TFA.....	88
Abb. 31 ThT Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von TFA.....	89
Abb. 32 Der Einfluss von PC-PL 18:1 auf die Proteinlevel der Sekretasen.....	93
Abb. 33 Der Einfluss von PC-PL 20:4 auf die Proteinlevel der Sekretasen.....	94
Abb. 34 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen	95
Abb. 35 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen	96
Abb. 36 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen	97
Abb. 37 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen	98
Abb. 38 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen	99
Abb. 39 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen	101
Abb. 40 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen	102
Abb. 41 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen	102
Abb. 42 Der Einfluss von PC-PL 18:1 auf die Aktivität der γ -Sekretase in humanen <i>post mortem</i> Gehirnproben	104
Abb. 43 Der Einfluss von PC-PL 20:4 auf die Aktivität der γ -Sekretase in humanen <i>post mortem</i> Gehirnproben	105
Abb. 44 Bestimmung des AGPS-Proteinlevels in humanen <i>post mortem</i> Gehirnen von Alzheimer-Patienten	106
Abb. 45 Bestimmung der Lipidperoxidation und der ROS-Level in <i>post mortem</i> Alzheimer- Gehirnen	106

Abb. 46 Der Effekt von Amitriptylin auf die Produkte der amyloidogenen APP-Prozessierung	109
Abb. 47 Der Effekt von Amitriptylin auf die Produkte der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung	110
Abb. 48 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität der Sekretasen	111
Abb. 49 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von ADAM10 und ADAM17	112
Abb. 50 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität von ADAM17 <i>in vitro</i>	112
Abb. 51 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von BACE1 und PS1	113
Abb. 52 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von APP	114
Abb. 53 Lokalisation der Lipid Raft- und Non-Raft-Fraktionen	115
Abb. 54 Die Verteilung der γ -Sekretase in den Lipid Rafts und Non-Rafts in Abhängigkeit von Amitriptylin	116
Abb. 55 Die Degradation von A β durch IDE in Abhängigkeit von Amitriptylin	117
Abb. 56 Die Inhibition der aSMase durch Amitriptylin	118
Abb. 57 Die Veränderung des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels durch Amitriptylin	118
Abb. 58 Analyse des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels in den Lipid Rafts und Non-Rafts	119
Abb. 59 Analyse der aSMase-Aktivität und -Expression in aSMase-Knockdown Zellen	120
Abb. 60 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase und der A β -Degradation in aSMase-KD Zellen	121
Abb. 61 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Amitriptylin in aSMase-KD Zellen	122
Abb. 62 Analyse der nSMase-Aktivität und der Sphingomyelin- und Ceramidspiegel nach Inkubation mit GW4869	123
Abb. 63 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inhibierung der nSMase	123
Abb. 64 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Sphingomyelin	124
Abb. 65 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Ceramid	125
Abb. 66 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit aSMase-Enzym	126
Abb. 67 Analyse der Aktivität der α -Sekretase in Abhängigkeit des Sphingomyelin- bzw. Ceramidspiegels	127
Abb. 68 ThT-Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Sphingomyelin und Ceramid	128

Abb. 69 ThT-Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Amitriptylin	129
Abb. 70 Dot Blot Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Sphingomyelin und Ceramid	129
Abb. 71 AFM-Aufnahmen der A β -Aggregate in Anwesenheit von Sphingomyelin und Ceramid	130
Abb. 72 Analyse der aSMase-Aktivität nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin	131
Abb. 73 Analyse des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin	132
Abb. 74 Analyse der A β -Sekretion nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin	132
Abb. 75 Analyse der Aktivität der β -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin.....	133
Abb. 76 Analyse der Aktivität der γ -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin.....	134
Abb. 77 Analyse der Aktivität der α -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin.....	134
Abb. 78 Analyse der SMase-Gen-Expression in humanen <i>post mortem</i> Alzheimer-Gehirnen	135
Abb. 79 Der Einfluss PC 12:0 auf die Aktivität von ADAM10	139
Abb. 80 Der Einfluss von PC 18:3 und PC 22:6 auf die Aktivität von ADAM10	139
Abb. 81 Der Effekt von Phytosterolen und Cholesterin auf die Aktivität der γ -Sekretase	140
Abb. 82 Der Effekt von Phytosterolen und Cholesterin auf die Aktivität der β -Sekretase	141
Abb. 83 Identifikation der endosomalen Fraktionen des Iodixanol-Gradienten.....	142
Abb. 84 Die endosomale Aktivität der β -Sekretase und das BACE1-Proteinlevel in Abhängigkeit von Stigmasterol	143
Abb. 85 Analyse der Lokalisation von BACE1 und APP an der Zelloberfläche	144
Abb. 86 Der Einfluss einer Stigmasterolreichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen im Gehirn	145
Abb. 87 Der Einfluss einer Stigmasterolreichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen in den Blutzellen.....	146
Abb. 88 Der Einfluss einer DHA-reichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen im Gehirn ...	147
Abb. 89 Die Aktivität der γ -Sekretase in den Gehirnen von GD3S-KO Mäusen	149
Abb. 90 Übersicht der Effekte von TFA auf die APP-Prozessierung	159

Abb. 91 Modell der pathologischen Vorgänge im Alzheimer-Gehirn167

Abb. 92 Übersicht der Effekte von Amitriptylin auf die APP-Prozessierung.....179

C Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	20
Tab. 2 Geräte	23
Tab. 3 <i>In vivo</i> Material	26
Tab. 4 Zelllinien	29
Tab. 5 Zellkulturmedien	29
Tab. 6 Fettsäuren	31
Tab. 7 Plasmalogen und Phospholipide	32
Tab. 8 SMase-Inhibitoren	33
Tab. 9 Sequenzen aller verwendeten Primer	36
Tab. 10 Einstellungen des PCR-Geräts	37
Tab. 11 Homogenisierungsbedingungen in Abhängigkeit der nachfolgenden	39
Tab. 12 AK für die Immunopräzipitation	40
Tab. 13 Primär- und Sekundär-AK zum Proteinnachweis	43
Tab. 14 Verwendete Sekretase-Substrate zur Messung aus isolierten Membranen	48
Tab. 15 Messparameter der Sekretase-Assays aus isolierten Membranen	49
Tab. 16 Sekretase-Substrate für die Messung in lebenden Zellen	50
Tab. 17 Herstellung der Lösungen für die Bestimmung der nSMase-Aktivität	52
Tab. 18 MRM Paarungen zur massenspektrometrischen Detektion der SM-Spezies	56
Tab. 19 MRM Paarungen zur massenspektrometrischen Detektion der PC-PL	56
Tab. 20 Molekulargewichte zur massenspektrometrischen Detektion der PE-PL	57
Tab. 21 Molekulargewichte zur massenspektrometrischen Detektion der Ceramide	58
Tab. 22 Herstellung der Lösungen für die Bestimmung von H ₂ O ₂	61
Tab. 23 Vergleich der Effektstärken der APP-Prozessierungsprodukte nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA	73
Tab. 24 Vergleich der Effektstärken der β -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA	76
Tab. 25 Vergleich der Effektstärken der γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA	79

Tab. 26 Vergleich der Effektstärken der Sekretasen durch die Inkubation von TFA auf isolierten Membranen und auf lebenden Zellen	80
Tab. 27 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA.....	82
Tab. 28 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression mit den Aktivitäten der Sekretasen	83
Tab. 29 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression mit den Proteinleveln der Sekretasen	85
Tab. 30 PC-PL und PE-PL Spezies in humanen <i>post mortem</i> Gehirnen	91
Tab. 31 Gen-Expression der Sekretasen in Abhängigkeit von PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4.....	92
Tab. 32 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die β -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y Membranen.....	96
Tab. 33 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die α -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y-Membranen.....	99
Tab. 34 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die α -Sekretase-Aktivität in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen.....	100
Tab. 35 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die γ -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y-Membranen.....	101
Tab. 36 Vergleich der Effektstärken der PL auf die γ -Sekretase-Aktivität in isolierten Membranen und lebenden SH-SY5Y wt Zellen	103
Tab. 37 Gen-Expression der SMasen in humanen <i>post mortem</i> Alzheimer-Gehirnen	136

D Kooperationen

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung verschiedener Personen nicht möglich gewesen. Im Folgenden sind alle Abbildungen und Tabellen, die in Kooperation entstanden, sowie die beteiligten Personen oder Arbeitsgruppen und die jeweils durchgeführten Versuchsteile aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben sind alle beteiligten Personen Mitarbeiter der Experimentellen Neurologie der Universität des Saarlandes. Versuchsplanung und -auswertung fanden in Kooperation mit Herrn Dr. Marcus Grimm statt.

Kapitel	Abb./ Tab.	Tätigkeit	Durchführende Person
4.2.1	Abb. 13	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		A β -WB aus SH-SY5Y C99, intrazelluläres A β , β -CTF-WB	Verena Burg
		A β -WB aus SH-SY5Y APP, α -CTF-WB, sAPP α -WB	Viola Haupenthal
	Abb. 14	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		A β -WB aus SH-SY5Y C99, intrazelluläres A β , β -CTF-WB	Verena Burg
		A β -WB aus SH-SY5Y APP, α -CTF-WB, sAPP α -WB	Viola Haupenthal
4.2.2	Abb. 16/18	Präparation kortikaler Neurone	Inge Tomic
		FS-Inkubation, Probenaufarbeitung, Messung Sekretase-Aktivität	Tatjana Rothhaar
4.2.3	Abb. 20/22	Präparation kortikaler Neurone	Inge Tomic
		FS-Inkubation, Probenaufarbeitung, Messung Sekretase-Aktivität	Tatjana Rothhaar
4.2.4	Abb. 23/24	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		RT-PCR	Sven Grösgen
4.2.5	Abb. 25/26	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		WB Nicastrin & BACE1	Verena Burg
		WB ADAM10	Viola Haupenthal
4.2.6	Abb. 27	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		WB APP	Benjamin Hundsdörfer
	Abb. 28	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		RT-PCR	Sven Grösgen
	Abb. 29	Zellkultur & FS-Inkubation, Probenaufarbeitung	Tatjana Rothhaar
		FACS-Analyse	Benjamin Hundsdörfer
4.2.7	Abb. 30/31	TEM, ThT-Assay	Benjamin Hundsdörfer
4.3.1	Tab. 30	Probenaufarbeitung	Tatjana Rothhaar
		Massenspektrometrische Lipid-Analyse	Sven Grösgen
4.3.2	Tab. 31	Zellkultur & FS-Inkubation	Tatjana Rothhaar
		RT-PCR	Sven Grösgen
4.3.2	Abb. 32/33	Zellkultur & FS-Inkubation, Probenaufarbeitung	Tatjana Rothhaar
		WB ADAM17, PS1, BACE1	Verena Burg
4.3.4	Abb. 37/38	Herstellung PNFs aus SH-SY5Y und Mäusegehirnen	Tatjana Rothhaar
		Messung α -Sekretase-Aktivität	Viola Haupenthal
4.4.1	Abb. 46/47	Zellkultur, Inkubation, A β -WB	Tatjana Rothhaar
		WB β -CTF & α -CTF	Janine Mett
		WB sAPP β	Verena Burg
		WB sAPP α	Viola Haupenthal

4.4.2	Abb. 48	Zellkultur, Inkubation, Messung β - & γ -Sekretase	Tatjana Rothhaar
		Messung α -Sekretase	Viola Haupenthal
	Abb. 49	Zellkultur, Inkubation, WB ADAM10 & ADAM17	Tatjana Rothhaar
		RT-PCR	Sven Grösgen
	Abb. 50	Inkubation	Tatjana Rothhaar
		Messung α -Sekretase-Aktivität	Viola Haupenthal
Abb. 51	Zellkultur, Inkubation, WB PS1 & BACE1	Tatjana Rothhaar	
	RT-PCR	Sven Grösgen	
Abb. 52	Zellkultur & Inkubation	Tatjana Rothhaar	
	APP-WB	Janine Mett	
4.4.3	Abb. 53	Zellkultur & Inkubation	Tatjana Rothhaar
		Raft-Präparation & WB	Viola Haupenthal
Abb. 54	Messung γ -Sekretase-Aktivität	Tatjana Rothhaar	
	Raft-Präparation & PS1-WB	Viola Haupenthal	
4.4.4	Abb. 55	Zellkultur & Inkubation	Tatjana Rothhaar
		Bestimmung A β -Degradation	Janine Mett
4.4.5	Abb. 56	Zellkultur & Inkubation	Tatjana Rothhaar
		Bestimmung aSMase-Aktivität	Janine Mett
	Abb. 57	Zellkultur & Inkubation	Tatjana Rothhaar
		Massenspektrometrische Lipid-Analyse	Sven Grösgen
Abb. 58	Zellkultur & Inkubation, Probenvorbereitung	Tatjana Rothhaar	
	Raft-Präparation	Viola Haupenthal	
	Massenspektrometrische Lipid-Analyse	Sven Grösgen	
4.4.6	Abb. 59	Zellkultur & Herstellung aSMase-KD	Tatjana Rothhaar
		Bestimmung aSMase-Aktivität	Janine Mett
		RT-PCR	Sven Grösgen
	Abb. 60	Zellkultur & Herstellung aSMase-KD, Messung β - und γ -Sekretase-Aktivität	Tatjana Rothhaar
Bestimmung A β -Degradation		Janine Mett	
4.4.7	Abb. 67	Zellkultur, Herstellung aSMase-KD, Inkubation nSMase-Inhibitor, Ceramid & Sphingomyelin	Tatjana Rothhaar
		Messung α -Sekretase-Aktivität	Viola Haupenthal
4.4.8	Abb. 68/69	Ansetzen & Vorbereitung der Lipide bzw. Amitriptylin	Tatjana Rothhaar
		ThT-Analyse	Benjamin Hundsdörfer & Lukas Schwarz
	Abb. 70	Ansetzen & Vorbereitung der Lipide	Tatjana Rothhaar
		Dot-Blot-Analyse	Lukas Schwarz
	Abb. 71	Ansetzen & Vorbereitung der Lipide	Tatjana Rothhaar
Inkubation & AFM-Aufnahme Geräte-Einweisung & Anleitung		Benjamin Hundsdörfer Ralf Friedrich, AG Erich Wanker, Max Dellbrück Centre, Berlin	
4.4.9	Abb. 72	Zellkultur & Inkubation Antidepressiva	Tatjana Rothhaar
		Bestimmung aSMase-Aktivität	Janine Mett
	Abb. 73	Zellkultur & Inkubation Antidepressiva	Tatjana Rothhaar
		Massenspektrometrische Lipid-Analyse	Sven Grösgen
Abb. 77	Zellkultur & Inkubation Antidepressiva	Tatjana Rothhaar	
	Messung α -Sekretase-Aktivität	Viola Haupenthal & Lisa Hentschel	
4.4.10	Abb. 78/ Tab. 37	Probenvorbereitung	Tatjana Rothhaar
		RT-PCR	Sven Grösgen
4.5.1	Abb. 79/80	Herstellung des Lipidextrakts aus humanen <i>post mortem</i> Hirnen	Benjamin Hundsdörfer
		Inkubation & Messung α -Sekretase-Aktivität	Tatjana Rothhaar

4.5.2	Abb. 86/87	Fütterung der Versuchstiere, Präparation der Gehirne & Isolation der Blutzellen	Martijn C. de Wilde, Laus M. Broersen, Nutricia Advanced Medical Nutrition, Danone Research, Centre of Specialised Nutrition, Wageningen, Niederlande
		Messung der Sekretase-Aktivitäten	Tatjana Rothhaar
4.5.3	Abb. 88	Fütterung der Versuchstiere & Präparation der Gehirne	Martijn C. de Wilde, Laus M. Broersen, Nutricia Advanced Medical Nutrition, Danone Research, Centre of Specialised Nutrition, Wageningen, Niederlande
		Messung der Sekretase-Aktivitäten	Tatjana Rothhaar

1 Zusammenfassung

1.1 Lipide bei der Alzheimer Krankheit – Der Einfluss von *trans*-Fettsäuren, Plasmalogenen und Sphingomyelinase-Inhibitoren auf die Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins

Die Alzheimer Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es unter anderem zu einer extrazellulären Ablagerung von Amyloid- β Peptiden ($A\beta$) in Form seniler Plaques in den Gehirnen der Betroffenen kommt. Diese Peptide entstehen durch die sequentielle proteolytische Spaltung des Amyloiden Vorläufer Proteins (APP) durch die beiden Aspartatproteasen β -Sekretase und γ -Sekretase. Alternativ kann APP durch eine Metalloprotease mit α -sekretorischer Aktivität auf einem Weg prozessiert werden, bei dem die Entstehung von $A\beta$ verhindert wird. Sowohl die Prozessierung auf dem amyloidogenen als auch auf dem nicht amyloidogenen Weg ist eng verknüpft mit der Lipidzusammensetzung der Membranen, an denen die APP-Proteolyse stattfindet.

Trans-Fettsäuren, die in der Vergangenheit schon mit einem erhöhten Risiko koronarer Herzerkrankungen und Arteriosklerose assoziiert wurden, entstehen unter anderem durch die industrielle Härtung von Pflanzenölen und kommen somit in großen Mengen in unserer Nahrung vor. In Zellkultur-basierten Untersuchungen erhöhen diese Fettsäuren die Produktion der $A\beta$ -Peptide verglichen mit Fettsäuren, bei denen die Wasserstoffatome der Doppelbindung in *cis*-Konformation vorliegen über einen multifaktoriellen Mechanismus. *Trans*-Fettsäuren verstärken die amyloidogene APP-Prozessierung durch eine Erhöhung der Gen-Expression der β -Sekretase BACE1 sowie der Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes und darüber hinaus durch eine direkte Beeinflussung der Aktivität der beiden Sekretasen. Zeitgleich wird die nicht amyloidogene Proteolyse über die α -Sekretase durch eine Reduktion der ADAM10 Gen-Expression verringert, unterstützt durch eine intrazelluläre Akkumulation des APPs, wodurch die α -sekretorische Prozessierung an der Plasmamembran verhindert wird. Eine Erhöhung der Neigung zur Aggregation der $A\beta$ -Peptide und zu ihrer Umwandlung in β -Faltblattstrukturen durch *trans*-Fettsäuren verstärkt den pathogenen Charakter dieser Lipide.

Plasmalogene, Lipide die in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten reduziert vorliegen, verringern hingegen die amyloidogene Proteolyse des APPs durch eine direkte Inhibierung der γ -Sekretase-Aktivität ohne eine Veränderung der α - oder β -Sekretase. Diese Reduktion erfolgt unabhängig von einer Beeinflussung der Expression der Komponenten des γ -

Sekretase-Komplexes und kann auch in *post mortem* Gehirnproben von Alzheimer-Patienten nach der Inkubation von Plasmalogenen beobachtet werden.

Funktionelle Inhibitoren der azidischen Sphingomyelinase (aSMase), wie das Antidepressivum Amitriptylin, inhibieren den Abbau von Sphingomyelin und die Freisetzung von Ceramid und verändern somit das zelluläre Verhältnis der beiden Lipide zueinander. Dies führt zu einer Reduktion der A β -Produktion durch die Inhibierung des β - und γ -Sekretase-Schnitts, während die Degradation der A β -Peptide über das Insulin-degradierende Enzym (IDE) erhöht wird. Zusätzlich wird die Aggregation der A β -Peptide reduziert. Auch andere Antidepressiva, die als aSMase Inhibitoren wirken, zeigen eine reduzierende Wirkung auf die amyloidogene APP-Proteolyse. Amitriptylin erhöht darüber hinaus über einen Sphingomyelin/Ceramid-unabhängigen Mechanismus die nicht amyloidogene Prozessierung über ADAM17.

Zusammenfassend scheint die Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membranen durch eine Veränderung der Zusammensetzung unserer Nahrung zum einen, oder durch pharmakologische Beeinflussung des Lipidmetabolismus zum anderen, einen potentiellen Ansatzpunkt für die Prävention und die Therapie der Alzheimer Erkrankung darzustellen.

1.2 Lipids and Alzheimer's disease – The effect of *trans*-fatty acids, plasmalogens and functional sphingomyelinase inhibitors on amyloid precursor protein's proteolytic processing

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by extracellular deposition of amyloid- β peptides (A β) as senile plaques in the brains of persons affected by AD. These peptides result from proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) by the two aspartat proteases β - and γ -secretase. Alternatively, APP can be processed by a metalloproteinase with α -secretory activity on the non-amyloidogenic way which prevents A β production. The balance between the two possible ways of APP processing is closely linked with lipid composition of membranes where the proteolysis takes place.

Trans-fatty acids (TFA), which have been associated with the risk for coronary heart diseases and arteriosclerosis, are produced by industrial hydrogenation of plant oil and therefore occur in large quantities in human diet. Cell culture based experiments revealed an enhancing effect of this FAs on A β production compared with FAs carrying the double bond's hydrogen atoms in *cis* conformation via a pleiotropic mechanism. *Trans*-FAs enhance amyloidogenic APP processing by increasing gene expression of β -secretase BACE1 and the

components of γ -secretase complex. Additionally, TFA directly influence secretase's activities. Furthermore, non-amyloidogenic processing is decreased because of reduced gene expression of α -secretase ADAM10, supported by an intracellular accumulation of APP which further prevents α -secretase processing on plasmamembrane. Furthermore, *trans*-FAs increase A β 's addiction to aggregate, emphasizing pathogenic character of these lipids.

Plasmalogens, the major brain phospholipids, have been reported to be reduced in brains of AD patients. All tested plasmalogen species decrease amyloidogenic processing by reducing γ -secretase activity without affecting α - or β -secretases. Plasmalogens directly reduce γ -secretase activity while gene expression and protein of γ -secretase components are unaffected. The decreasing effect of plasmalogens on γ -secretase activity could also be simulated in AD brain samples by external addition of plasmalogens.

Functional acidic sphingomyelinase inhibitors like the antidepressant amitriptyline reduce sphingomyelin degradation and ceramide release and therefore change cellular sphingomyelin/ceramide ratio. Increased sphingomyelin/ceramide ratios reduce A β production by inhibition of β - and γ -secretases. Additionally A β degradation is increased via insulin degrading enzyme (IDE), while aggregation of A β peptides is reduced. Furthermore, amitriptyline enhances non-amyloidogenic processing by α -secretase ADAM17 independently from changing sphingomyelin/ceramide ratio.

In summary, changing membrane's lipid composition by modification of human diet content or through pharmacological approaches seems to be a promising target for AD prevention and therapy.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Form der Demenz (Barker *et al.*, 2002), die meist ältere Menschen über dem 65. Lebensjahr betrifft. Im Jahr 2010 waren weltweit 36 Millionen Menschen an der Alzheimer Krankheit erkrankt. Schätzungen gehen davon aus, dass diese Zahl auf 66 Millionen im Jahr 2030 ansteigen wird und bis zum Jahr 2050 etwa 115 Millionen Menschen mit der Alzheimer Krankheit leben werde (Price *et al.*, 2009). Nach einem Bericht der Weltgesundheitsorganisation WHO betrug die Anzahl der Neuerkrankungen alleine im Jahr 2010 7,7 Millionen und durch die immer noch steigende Lebenserwartung ist bis 2050 von einer Inzidenz von 24,6 Millionen Neuerkrankungen jährlich auszugehen (Batsch *et al.*, 2012).

Patienten, die an der Alzheimer Krankheit leiden, zeigen im Frühstadium vor allem eine Abnahme der Gedächtnisleistung, überwiegend betroffen ist hiervon das Kurzzeitgedächtnis (Becker and Overman, 2002; Carlesimo and Oscar-Berman, 1992). Auch bei der Kommunikation ist in diesem Stadium schon ein vermindertes Vokabular und ein veränderter Sprachfluss zu bemerken (Becker and Overman, 2002; Frank, 1994). Im weiteren Verlauf der Erkrankung vergessen Alzheimer-Patienten erlernte Fähigkeiten und erkennen Gegenstände oder Personen nicht wieder (Price *et al.*, 2009). Es kommt häufig zu Persönlichkeitsveränderungen, Aggression und Depressionen, die Betroffenen sind nicht mehr in der Lage den Alltag ohne Hilfe zu meistern. Durch einen Abbau der Muskulatur sind die Patienten in fortgeschrittenen Stadien oft bettlägerig, es kommt vermehrt zu Stuhl- und Harninkontinenz, und der völligen Unfähigkeit sich mitzuteilen. Sie sind schließlich auf Vollzeit-Pflege angewiesen. Die Alzheimer Krankheit führt in der Regel ca. vier bis acht Jahre nach der Diagnose zum Tod, wobei die Todesursache in der Regel Sekundärerkrankungen wie beispielsweise Herzinfarkte oder Lungenentzündungen sind (Batsch *et al.*, 2012).

Trotz intensiver Forschung gibt es bisher keine kausale Therapie dieser Krankheit. Im frühen und mittleren Stadium wurde eine Behandlung mit Folsäure und B-Vitaminen (Smith *et al.*, 2010), mit Acetylcholinesterase-Hemmern (Kaduszkiewicz *et al.*, 2005), mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern (NSAIDs, engl.: nonsteroidal anti-inflammatory drugs) (Wyss-Coray and Mucke, 2000) oder mit dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor-Antagonisten Memantin (McShane *et al.*, 2006) diskutiert, die kognitiven Leistungen der Patienten zu verbessern oder das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen. Der Verzicht auf Nikotin, vermehrte sportliche und geistige Betätigung und gesunde Ernährung scheinen das Risiko an Alzheimer zu erkranken, zu senken. Hohe Cholesterinwerte (Kivipelto *et al.*, 2002),

Bluthochdruck (Kehoe and Wilcock, 2007), Diabetes (Whitmer, 2007) und ein vorangegangenes Schädel-Hirn-Trauma (Mayeux *et al.*, 1993) werden hingegen als risikoerhöhende Faktoren diskutiert.

Weniger als 5% aller Alzheimer-Erkrankungen sind auf eine vererbare Mutation in den Genen für Presenilin oder APP zurückzuführen (Filley *et al.*, 2007; Sandbrink *et al.*, 1996). Diese Form der Demenz wird als familiäre Alzheimer Krankheit oder FAD (engl.: Familial Alzheimer Disease) bezeichnet und unterscheidet sich von der häufigeren sporadischen Form (SAD) durch das Alter der Patienten beim Krankheitsausbruch. Während von der SAD hauptsächlich ältere Menschen über 65 Jahre betroffen sind, tritt die FAD meist deutlich vor dem 65. Lebensjahr, gelegentlich sogar im Jugendalter auf (Campion *et al.*, 1999; Terry, 1995).

2.2 Die molekularen Ursachen der Alzheimer Krankheit

Neuropathologisch ist die Alzheimer Krankheit gekennzeichnet durch die extrazelluläre Ablagerung seniler Plaques (Beyreuther and Masters, 1997) und den intrazellulär in Neuronen gelegenen Neurofibrillen-Bündeln, die aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen bestehen (Goedert *et al.*, 1991; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b). Die Ablagerung von Neurofibrillen ist auch in Patienten anderer neurodegenerativer Erkrankungen zu beobachten und es ist fraglich, ob diese als krankheitsursächlich anzusehen ist, oder eher eine Sekundärscheinung darstellt (Love *et al.*, 1988; Rankin and Gamblin, 2008; Spillantini and Goedert, 1998). In der Umgebung der senilen Plaques finden sich gehäuft aktivierte Gliazellen, die durch diese räumliche Nähe zur Ausschüttung neurotoxischer Substanzen stimuliert werden. Dies führt in der Folge zu einem degenerativen Prozess, bei dem es zum Verlust von Hirnmasse, auch Atrophie genannt, kommt (McGeer and McGeer, 2001; Tuppo and Arias, 2005). Dieser betrifft vor allem die Hirnrinde im fronto-temporalen und parieto-okzipitalen Bereich und den Hippocampus (Hoogenraad and Jansen, 1994; Schott *et al.*, 2005; Soininen, 2012).

Die senilen Plaques bestehen hauptsächlich aus Aggregaten des Amyloid- β ($A\beta$) Peptids (Fraser *et al.*, 1993). Es erhielt seinen Namen aufgrund seiner Eigenschaft ebenso wie Stärke durch Iod-Kaliumlösungen rot angefärbt zu werden (amyloid = stärkeähnlich) (Cooper, 1974) und seiner β -Faltblattstruktur. Das 40 Aminosäuren (AS) große $A\beta_{40}$ ist die häufigste Form der $A\beta$ -Peptide, während $A\beta$ -Peptide anderer Größen deutlich seltener auftreten. In den amyloiden Plaques findet sich hauptsächlich $A\beta_{42}$ (Iwatsubo, 1998; Iwatsubo *et al.*, 1994; Tamaoka *et al.*, 1994), das aufgrund seiner zwei zusätzlichen AS eine erhöhte Hydrophobizität aufweist und somit deutlich schneller aggregiert als andere $A\beta$ -Spezies

(Jarrett *et al.*, 1993). Alle A β -Peptide entstehen durch die sequenzielle proteolytische Spaltung des Amyloiden Vorläuferproteins (Amyloid Precursor Protein, APP), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

2.2.1 Die APP-Prozessierung

APP ist ein Typ-I Transmembranprotein, bestehend aus einer großen, extrazellulären N-terminalen Ektodomäne, einem kurzen C-terminalen Bereich und einer Transmembrandomäne (Kang *et al.*, 1987). Das auf Chromosom 21 lokalisierte APP-Gen (Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987) kodiert für mindestens 10 verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen (Sandbrink *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2003). Die drei häufigsten Isoformen sind APP695, das überwiegend in Neuronen exprimiert wird, und APP751 und APP770, die in Gliazellen und peripherem Gewebe exprimiert werden (Sandbrink *et al.*, 1994). Die Existenz von Homologen in zahlreichen verschiedenen Spezies (Daigle and Li, 1993; Kang *et al.*, 1987; Luo *et al.*, 1990) lässt auf eine physiologische Bedeutung des APP innerhalb der Zelle schließen. So wurden in der Vergangenheit zahlreiche physiologische Funktionen des APP, wie eine Beteiligung bei der Ausbildung und Funktion von Synapsen (Dawson *et al.*, 1999; Priller *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005), bei der neuronalen Differenzierung (Hung *et al.*, 1992), der Zelladhäsion (Coulson *et al.*, 1997; Soba *et al.*, 2005), der Protektion von Neuronen (Masliah *et al.*, 1997) und dem axonalen Transport verschiedener Proteine beschrieben (Lazarov *et al.*, 2005). Eine weitere physiologische Funktion des APP bzw. seiner Spaltprodukte ist die regulatorische Wirkung auf die Lipidhomöostase. So werden beispielsweise die Cholesterinbiosynthese sowie die Homöostase einiger Sphingolipide durch APP-Prozessierungsprodukte beeinflusst (Bryleva *et al.*, 2010; Grimm *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2011b; Grimm *et al.*, 2011d; Jana and Pahan, 2004; Liu *et al.*, 2007). Die größte wissenschaftliche Bedeutung erlangte das APP als Vorläuferprotein des A β -Peptids, das sich in den senilen Plaques von Alzheimer-Patienten nachweisen lässt.

Die sequenzielle proteolytische Spaltung des APP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen stattfinden. Bei der nicht amyloidogenen Prozessierung wird der erste Schnitt im Bereich der Ektodomäne von einer α -Sekretase katalysiert. Dabei entstehen das sekretorische APP α (sAPP α) und das in der Plasmamembran verbleibende α -carboxy-terminale Fragment (α -CTF), das seiner Größe entsprechend auch als C83 bezeichnet wird (Lammich *et al.*, 1999). Als Enzyme mit α -Sekretase-Aktivität wurden Mitglieder der ADAM-Familie (engl.: a disintegrin and metalloproteinase), eine Gruppe von Enzymen, die zu den Metalloproteinase gehören, identifiziert. Bei der proteolytischen Prozessierung des APP sind hauptsächlich die

Enzyme ADAM10 und ADAM17 beteiligt (Buxbaum *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 2006; Lopez-Perez *et al.*, 2001). Das membrangebundene α -CTF unterliegt nun der nachfolgenden Proteolyse durch die γ -Sekretase und wird dabei in das p3-Peptid und die intrazelluläre APP Domäne (AICD, engl.: APP intracellular domain) gespalten.

Alternativ kann APP im ersten Schritt von der β -Sekretase gespalten werden. Dieser Schnitt leitet die amyloidogene Prozessierung ein. Als Enzym, das diesen amyloidogenen Schnitt in der Ektodomäne des APP katalysiert, wurde BACE1 (β -site APP cleaving enzyme) identifiziert. Das neben dem löslichen APP β (sAPP β) freigesetzte membrangebundene β -CTF, auch als C99 bezeichnet, wird in Analogie zur nicht amyloidogenen Prozessierung durch die γ -Sekretase in der Mitte der Membrandomäne geschnitten (Grziwa *et al.*, 2003), wobei neben dem ins Zytosol entlassene AICD das A β -Peptid entsteht, das extrazellulär freigesetzt wird (Haass *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1992). Diese A β -Peptide variieren in ihrer Länge und werden entsprechend der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt. Am häufigsten kommen dabei A β 38, A β 40 und das pathogene A β 42 vor, das aufgrund seiner Hydrophobizität zur Aggregation neigt und somit als neurotoxische Form der A β -Peptide gilt. Längere A β -Peptide entstehen durch die sogenannten ϵ - und ζ -Schnitte, die sich um jeweils 3 AS versetzt der γ -Schnittstelle befinden. Einem derzeit gängigen Modell zufolge entstehen zunächst die längeren A β -Spezies durch Spaltung an der ϵ - und ζ -Schnittstelle, woraufhin diese schrittweise zu kürzeren A β -Peptide prozessiert werden (Funamoto *et al.*, 2004; Qitakahara *et al.*, 2005; Sastre *et al.*, 2001; Weidemann *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004).

Die Abbildung 1 fasst die Vorgänge der amyloidogenen und nicht amyloidogenen APP-Prozessierung schematisch zusammen.

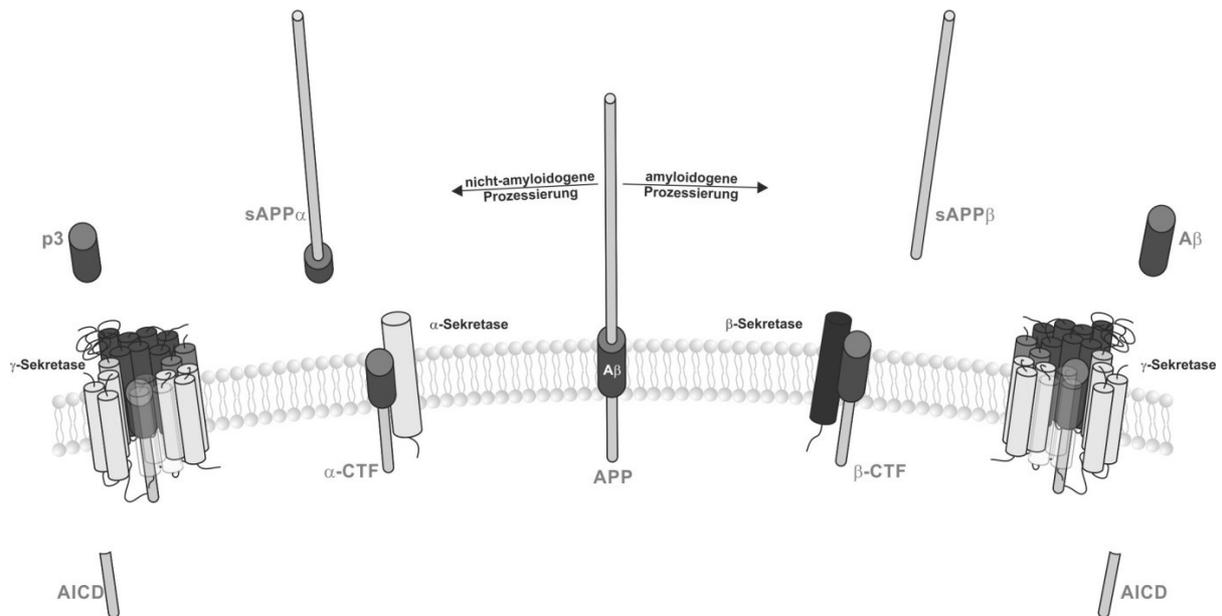


Abb. 1 Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

Bei der amyloidogenen Prozessierung wird APP zunächst durch die β -Sekretase gespalten, wobei neben dem sAPP β das membranständige β -CTF entsteht. Dieses wird in der Folge durch die γ -Sekretase unter der Entstehung von A β und AICD geschnitten. Wird APP im ersten Schritt von einer α -Sekretase gespalten, wird die Freisetzung von A β verhindert. Das membranständige α -CTF wird analog zur amyloidogenen Prozessierung im zweiten Schritt von der γ -Sekretase gespalten, wobei das Peptid p3 und wiederum AICD entstehen.

Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich damit beschäftigt, inwieweit sich verschiedene Lipide auf die amyloidogene APP-Prozessierung und damit auf die Produktion der A β -Peptide auswirken, werden im Folgenden die beiden an der amyloidogenen Prozessierung beteiligten Sekretasen näher charakterisiert.

2.2.2 Die β -Sekretase

Die β -Sekretase BACE1 ist eine 501 AS große, membrangebundene Aspartatprotease und katalysiert den ersten Schritt der amyloidogenen APP-Prozessierung, die letztlich zur Freisetzung von A β -Peptiden führt. Als Typ-1 Transmembranprotein besteht BACE1 aus einer langen extrazellulären N-terminalen und einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne, verbunden von einer Transmembrandomäne (Vassar *et al.*, 1999). Die beiden Aspartatreste D92 und D289 befinden sich in der Ektodomäne und bilden das aktive Zentrum des Enzyms (Benjannet *et al.*, 2001).

Neben APP wurden diverse alternative Substrate identifiziert, die ebenfalls einer Spaltung durch BACE1 unterliegen (zusammengefasst in Dislich and Lichtenthaler, 2012). Als Substrate, deren Spaltung durch BACE1 nachweislich eine *in vivo*-Relevanz hat, wurden

neben APP bisher unter anderen das Typ III Neuregulin 1 (Hu *et al.*, 2006; Willem *et al.*, 2006), die β -Untereinheiten 2 und 4 der spannungsabhängigen Natriumkanäle (VGSCs) (Kim *et al.*, 2007a; Kovacs *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2005) und die β -Galaktosid α -2,6-Sialyltransferase (Kaplan *et al.*, 1983; Sugimoto *et al.*, 2007) beschrieben. Eine Inhibierung von BACE1 als therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer Krankheit, wie er in der Vergangenheit verfolgt wurde, ist deshalb heute als kritisch anzusehen (zusammengefasst in Dislich and Lichtenthaler, 2012). Neuere Ansätze zielen auf eine Teilinhibition der bei der Alzheimer Krankheit erhöhten BACE1 Aktivität ab (Fukumoto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004 Vassar *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2003).

BACE1 wird als Zymogen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und unterliegt während seiner Maturierung verschiedenen Modifikationen, wie N-Glykosylierung, Palmitoylierung und Acetylierung (Benjannet *et al.*, 2001; Costantini *et al.*, 2007; Haniu *et al.*, 2000; Vetrivel *et al.*, 2009), bevor es schließlich im Golgi-Apparat durch die Abspaltung seiner Prodomäne zur aktiven Form reift (Bennett *et al.*, 2000; Capell *et al.*, 2000) (Abb. 2).

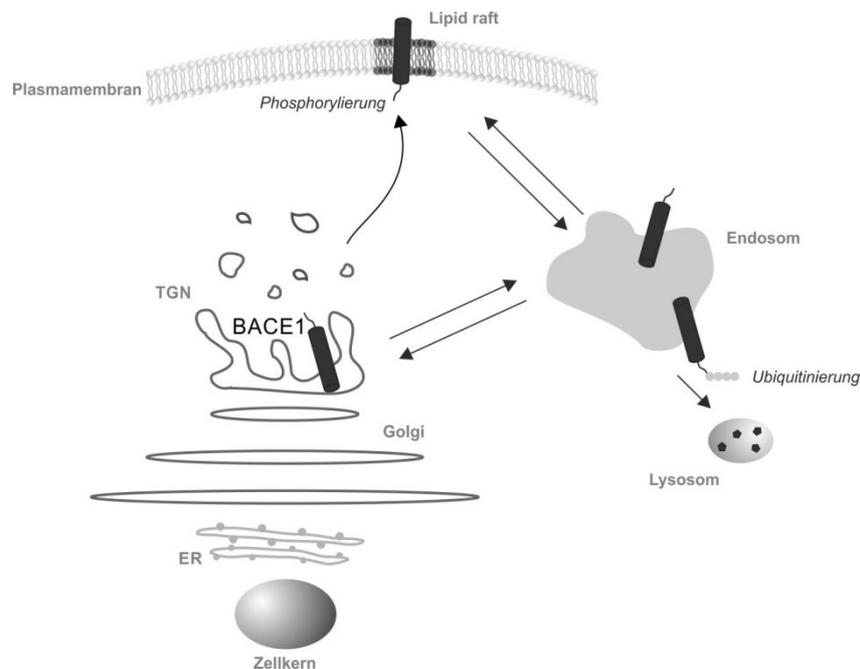


Abb. 2 Schematische Darstellung des intrazellulären Transports des BACE1-Proteins

Bace1 wird zunächst als Zymogen im ER synthetisiert und unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, bevor es im Golgi-Apparat durch Abspaltung der Prodomäne in seine aktive Form übergeht. Nach dem Transport zur Plasmamembran wird es internalisiert und findet sich in der Folge in den frühen endosomalen Strukturen, von wo aus zum einen ein Recycling zur Plasmamembran und zum anderen ein Rücktransport zum TGN stattfinden kann. Die Lokalisation in den Lipid Rafts wurde mehrfach postuliert, gilt aber als umstritten. Durch Ubiquitinierung am C-Terminus unterliegt es dem Abbau in den Lysosomen (He *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005; He *et al.*, 2003; Huse *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2010; Wahle *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2001).

BACE1 hat ein saures pH Optimum (Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2008; Vassar *et al.*, 1999) und schneidet seine Substrate deshalb hauptsächlich in den frühen

endosomalen Strukturen oder dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wo auch die Initiierung der amyloidogenen APP-Prozessierung bevorzugt stattfindet (Capell *et al.*, 2000; Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Haass *et al.*, 1993; Koo and Squazzo, 1994; Vassar *et al.*, 1999). Obwohl Studien in der Vergangenheit zeigten, dass auch die sekretierte Form von BACE1 bestimmte Substrate *in vitro* schneiden kann, scheint die membrangebundene Form für die Proteolyse des APP essentiell zu sein (Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001). Umstritten ist nach wie vor die Bedeutung der Lokalisation von BACE1 in den sogenannten Lipid Rafts, Membranmikrodomänen, reich an Cholesterin und Sphingomyelin, für die APP-Prozessierung. *In vivo* konnte sowohl für APP als auch für BACE1 gezeigt werden, dass beide zum Teil in diesen Mikrodomänen lokalisiert sind, und eine Anreicherung von BACE1 in den Lipid Rafts durch das Anhängen von GPI (Glycosylphosphatidylinositol) -Ankern verstärkte die Produktion von A β (Cordy *et al.*, 2003; Eehalt *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2006; Kawarabayashi *et al.*, 2004; Riddell *et al.*, 2001; Tun *et al.*, 2002). Andere Studien konnten jedoch keine Notwendigkeit der BACE1 Lokalisation an oder in den Lipid Rafts für dessen Fähigkeit APP zu schneiden, nachweisen (Motoki *et al.*, 2012) (zusammengefasst in Dislich and Lichtenthaler, 2012).

Mehrere Lipide, wie Sphingosin-1-Phosphat (Takasugi *et al.*, 2011) oder Ceramid (Puglielli *et al.*, 2003), für die eine Wirkung auf die BACE1-Aktivität postuliert wurde, zusammen mit der Tatsache, dass APP ausschließlich durch membranassoziertes BACE1 prozessiert wird (Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2001), sprechen in jedem Fall für eine Abhängigkeit der amyloidogenen APP-Prozessierung von der Lipidzusammensetzung der umgebenden Membranen.

2.2.3 Die γ -Sekretase

Der letzte Schritt bei beiden APP-Prozessierungswegen wird von der γ -Sekretase vollzogen. Die γ -Sekretase ist ein Multienzymkomplex, der sich aus vier verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Zusammen mit den Signalpeptid Peptidasen (SPP), den Site-2-Proteasen (S2P) und den Rhomboid-Proteasen bildet sie eine Enzymfamilie, die entsprechend ihrer Fähigkeit ihre Substrate innerhalb der Membran zu schneiden I-CLiPs (engl.: intramembrane cleaving proteases) genannt werden (Weihofen and Martoglio, 2003). Sie katalysieren einen als RIP (engl.: regulated intramembrane proteolysis) bezeichneten Prozess (Brown *et al.*, 2000; Strisovsky *et al.*, 2009), bei dem typischerweise Transmembranproteine gespalten werden (zusammengefasst in Haapasalo and Kovacs, 2011).

Die γ -Sekretase besteht aus den Komponenten Presenilin 1 oder 2 (PS1, PS2), Nicastrin, APH1a oder APH1b (anterior pharynx defective-1) und PEN2 (Presenilin enhancer-2)

(Selkoe and Wolfe, 2007). PS bildet das aktive Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes mit den beiden Aspartatresten an den Positionen D257 und D385, die in der 6. und 7. Transmembrandomäne des Proteins lokalisiert sind (Kimberly *et al.*, 2000; Wolfe *et al.*, 1999). Für Nicastrin wurden mehrere Funktionen wie die Substraterkennung und Rekrutierung (Shah *et al.*, 2005), die Maturierung (Chavez-Gutierrez *et al.*, 2008) oder die Stabilisierung des γ -Sekretase-Komplexes (Zhao *et al.*, 2010) beschrieben (zusammengefasst in Haapasalo and Kovacs, 2011). APH1 und PEN2 scheinen sowohl für die Zusammensetzung des γ -Sekretase-Komplexes als auch für dessen Transport und Aktivität essentiell zu sein (Serneels *et al.*, 2009; Spasic and Annaert, 2008) (zusammengefasst in Haapasalo and Kovacs, 2011).

Die Zusammensetzung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes scheint in einer chronologischen Abfolge stattzufinden (St George-Hyslop and Fraser, 2012) und wird vermutlich im ER initiiert (Capell *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007b) (Abb. 3). Zunächst bilden APH1 und Nicastrin einen Zwischenkomplex, der dann über die Transmembrandomäne von Nicastrin an den C-Terminus des PS bindet (Arawaka *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002). Durch die Bindung von PEN2 an die Transmembrandomäne des PS1 wird dessen Endoproteolyse initiiert, wodurch der aktive γ -Sekretase-Komplex entsteht (Prokop *et al.*, 2005; Prokop *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2002). Alternativ wurde ein Weg beschrieben, nach dem PEN2 zunächst an PS1 bindet, wodurch erst die Bindung des APH1/Nicastrin-Komplexes an PS1 ermöglicht wird (Capell *et al.*, 2005; Fraering *et al.*, 2004; Shirotani *et al.*, 2004).

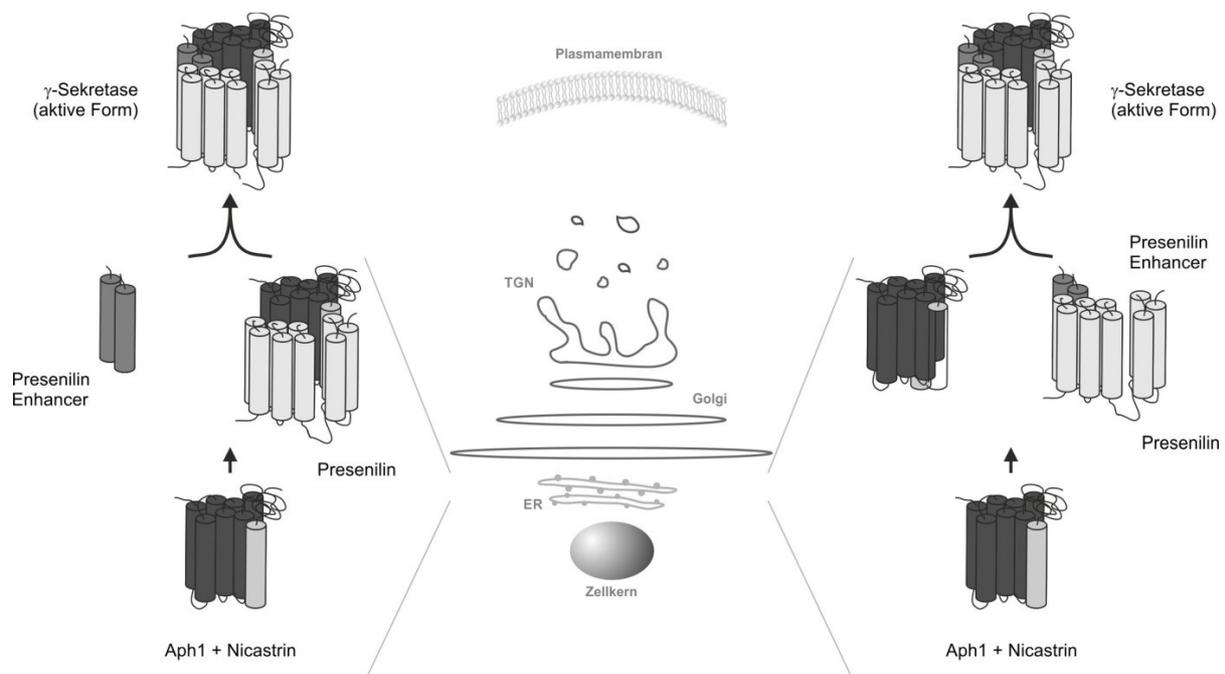


Abb. 3 Die Zusammensetzung des aktiven γ -Sekretase-Komplexes

Die Zusammensetzung des γ -Sekretase-Komplexes wird durch die Bildung eines Zwischenkomplexes aus APH1 und Nicastrin im ER initiiert. Für den weiteren Ablauf existieren zwei unterschiedliche

Hypothesen: 1) APH1/Nicastrin bindet an PS1, woraufhin PEN2 an die Transmembrandomäne des PS1 bindet und dessen Endoproteolyse auslöst. 2) PEN2 bindet an PS1, wodurch die Bindung des APH1/Nicastrin-Komplexes ermöglicht wird (Arawaka *et al.*, 2002; Fraering *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2003; Prokop *et al.*, 2005; Prokop *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Bis heute wurden über 90 Substrate identifiziert, die durch die γ -Sekretase prozessiert werden (Hemming *et al.*, 2008), von denen bis auf wenige Ausnahmen alle Typ-I Transmembranproteine sind (zusammengefasst in: Haapasalo and Kovacs, 2011). Wie bei der Prozessierung des APP scheint auch bei der Proteolyse der anderen Substrate ein Schnitt in der Ektodomäne und damit die Abspaltung des N-Terminus dem γ -Sekretase Schnitt voranzugehen, was charakteristisch für RIP-Prozesse ist (zusammengefasst in Haapasalo and Kovacs, 2011).

Da sowohl die γ -Sekretase selbst als auch ihre Substrate an der Membran lokalisiert sind, kann deren Proteolyse durch die γ -Sekretase von der Lipidzusammensetzung der sie umgebenden Membran beeinflusst werden (Osenkowski *et al.*, 2008). Da die γ -Sekretase ihre Substrate nicht nach einer spezifischen Aminosäuresequenz schneidet, sondern der γ -Sekretase Schnitt in der Mitte der Membran stattzufinden scheint (Grziwa *et al.*, 2003), könnte eine Veränderung der Lipidkomposition, die mit einer Veränderung der Membraneigenschaften, wie beispielsweise der Membrandicke einhergeht, die Länge der freigesetzten A β -Spezies beeinflussen.

2.3 Die Rolle von Lipiden bei der Alzheimer Krankheit

Neben der Tatsache, dass alle an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen sowie das APP selbst Transmembranproteine sind, lieferte die Entdeckung des Apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4 Allels als Risikofaktor der Alzheimer-Erkrankung (Corder *et al.*, 1993) einen Hinweis auf die Bedeutung von Lipiden bei der Alzheimer-Pathologie. Bei ApoE handelt es sich um ein Lipidbindeprotein, das an der Aufnahme von Cholesterin aus den Astrozyten in Neurone beteiligt ist (Mauch *et al.*, 2001; Pitas *et al.*, 1987). ApoE tritt beim Menschen hauptsächlich in drei verschiedenen Isoformen auf, von denen nur das ApoE ϵ 4 Allel bei seinen Trägern zu einem erhöhten Risiko führt, an der Alzheimer Krankheit zu erkranken (Corder *et al.*, 1993; Saunders and Roses, 1993; Saunders *et al.*, 1993). Liegt eine Homozygotie bezüglich des ApoE ϵ 4 Allels vor, so leiden die Betroffenen an Hypercholesterinämie (Boer *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2005) und neigen zu einer früheren Manifestation der Alzheimer-Pathologie (Corder *et al.*, 1993). Generell wird ein erhöhter Cholesterinspiegel im mittleren Lebensalter mit einem erhöhten Alzheimer-Risiko assoziiert (Kivipelto *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Cholesterin die

Produktion von A β erhöht (Fassbender *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 1998; Wahrle *et al.*, 2002). So wurde die Cholesterin *de novo* Synthese zum Ansatzpunkt möglicher Therapien der Alzheimer Krankheit. Diese zielten zumeist auf eine Inhibierung des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGCR) ab (Fassbender *et al.*, 2001). Studien, bei denen Alzheimer-Patienten mit Cholesterin senkenden Statinen behandelt wurden, zeigten allerdings keine einheitlichen Ergebnisse (Jick *et al.*, 2000; Simons *et al.*, 2002; Sparks *et al.*, 2005a; Sparks *et al.*, 2005b; Wolozin *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2007). Panchal *et al.* fanden erhöhte Level an Cholesterin in den senilen Plaques in Gehirnen von Alzheimer-Patienten und lieferten somit einen weiteren Hinweis auf die enge Verknüpfung von Cholesterin mit der Alzheimer-Pathologie (Panchal *et al.*, 2010).

Neben der Cholesterinhomöostase wurden Veränderungen weiterer Lipidklassen, zum Beispiel Ganglioside oder Phospholipide bei Alzheimer-Patienten beschrieben. Wegen ihrer besonderen Relevanz für die vorliegende Arbeit soll auf drei weitere Lipidklassen, die *trans*-Fettsäuren, die Plasmalogene und schließlich auf zwei Vertreter der Sphingolipide, Sphingomyelin und Ceramid, näher eingegangen werden.

2.3.1 Die Bedeutung von *cis*- und *trans*-Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit

Bei *trans*-Fettsäuren (TFA, engl.: *trans* fatty acid) handelt es sich um ungesättigte Fettsäuren, bei denen mindestens eine Kohlenstoff-Doppelbindung in *trans*-Konfiguration vorliegt. Die *trans*-Konformation zeichnet sich durch das Gegenüberliegen der beiden H-Atome der Doppelbindung aus, während die H-Atome in *cis*-Konformation auf einer Seite der Doppelbindung liegen (Abb. 4). Wegen der geänderten Molekülform kommt es zu veränderten chemischen und physikalischen Eigenschaften der TFA, zum Beispiel weisen sie verglichen mit ihren *cis*-Isomeren einen höheren Schmelzpunkt auf.

Natürlicherweise finden sich TFA in Milchprodukten wie Käse, Joghurt oder Butter, wo man davon ausgeht, dass es sich bei 3-6% der Fettsäuren um TFA handelt (Aro *et al.*, 1998b; Aro *et al.*, 1998c). Weiterhin kommen sie im Fleisch von wiederkäuenden Säugetieren vor. Dort entstehen sie durch anaerobe Stoffwechselprozesse des Bakteriums *Butyrivibrio fibrisolvens* (Lawson *et al.*, 2001). Erhitzt man pflanzliche Öle, in denen natürlicherweise keine TFA vorliegen beim Braten oder Backen, so werden ab einer Temperatur von etwa 150°C die in *cis*-Konfiguration vorliegenden Fettsäureester in ihre *trans*-Form umgewandelt (Suliman, 2013). Bei der industriellen Härtung von Pflanzenölen entstehen TFA als Nebenprodukte durch unvollständige Hydrierung von *cis*-Doppelbindungen oder durch unerwünschte Isomerisierung der *cis*-Doppelbindung in ihre *trans*-Form (Lichtenstein *et al.*, 1999). So

liegen beispielsweise in Margarine, je nach Herstellungsverfahren zwischen 1 und 17% aller Fettsäuren als TFA-Ester vor (Aro *et al.*, 1998c).

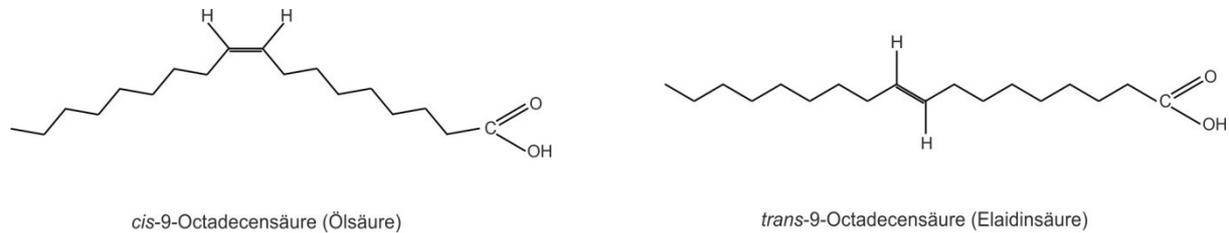


Abb. 4 Strukturformeln der *trans*-9-Octadecensäure (Elaidinsäure) und ihrem *cis*-Isomer Ölsäure

Während bei der *cis*-Form beide Wasserstoffatome auf einer Seite der Doppelbindung liegen, stehen sie sich bei der *trans*-Form gegenüber, wodurch sich eine gestreckte Molekülform ergibt.

Zusammen mit der Menge an industriell hochverarbeiteten Nahrungsmitteln stieg auch der Anteil an TFA in unserer Nahrung (Emken, 1984). Die TRANSFAIR-Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Aufnahme von TFA in europäischen Ländern bei 1,2 - 6,7g pro Tag für Männer und bei 1,7 - 4,1g pro Tag für Frauen liegt (Hulshof *et al.*, 1999). In den USA soll die Zahl mit 13,3g pro Tag, was etwa 4-20% der insgesamt täglich aufgenommenen Menge an Fett entspricht, sogar noch höher liegen (Allison *et al.*, 1995; Enig *et al.*, 1990). Die Nahrungsmittel, über die die größten Mengen an TFA aufgenommen werden, stellen Backwaren, Frühstückscerealien, Pommes Frites, Trockenpulver-Suppen und Süßigkeiten dar. Hier liegen die Konzentrationen an TFA bei bis zu 40% der Gesamt-Fettmenge (Aro *et al.*, 1998a; Becker *et al.*, 2004; Van Erp-Baart *et al.*, 1998).

Immer wieder wurde über eine mögliche Gefährdung der Gesundheit durch den hohen Konsum von TFA berichtet. So wurde ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen (Hu *et al.*, 1997; Mozaffarian *et al.*, 2006) und Arteriosklerose (Stender *et al.*, 1995) und der Aufnahme von TFA hergestellt. Dagegen waren nach Angaben der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA die Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Krebs, Typ-2-Diabetes und Allergien nicht haltbar (Becker *et al.*, 2004). Als Konsequenz des befürchteten gesundheitlichen Risikos senkten während der letzten Jahre bereits viele Hersteller die Anteile an TFA in ihren Produkten (Kuhnt *et al.*, 2011). In einer aktuellen Studie wird die durchschnittliche tägliche Aufnahme von industriellen erzeugten TFA in der US-amerikanischen Bevölkerung mit 1,3g pro Person angegeben (Doell *et al.*, 2012).

Epidemiologische Studien, die den Einfluss der Einnahme von TFA auf das Risiko untersuchten, an Alzheimer zu erkranken, kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während die Studien von Morris *et al.* aus den Jahren 2003 und 2004 von einem erhöhten Alzheimer-Risiko durch den Konsum von TFA ausgehen (Morris *et al.*, 2003; Morris *et al.*,

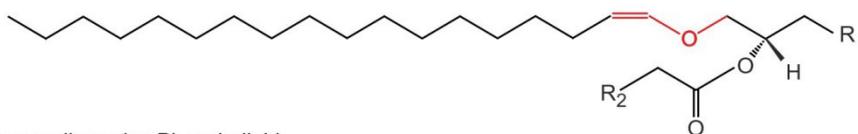
2004), konnten die Gruppen um Engelhart und Naqvi keinen Zusammenhang finden (Engelhart *et al.*, 2002; Naqvi *et al.*, 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden TFA auf ihren Einfluss auf die APP-Prozessierung und damit ihr Potential das Alzheimer-Risiko zu erhöhen, untersucht.

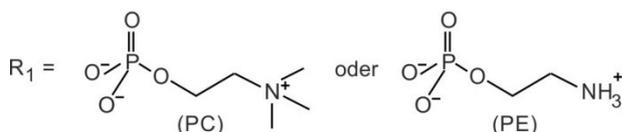
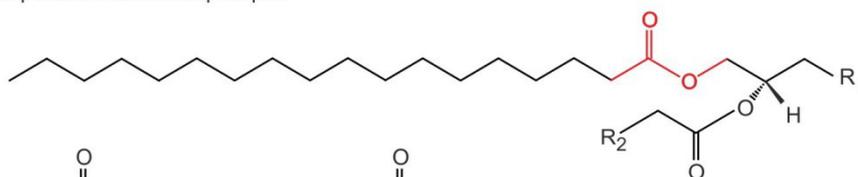
2.3.2 Die Rolle von Plasmalogenen bei der Alzheimer Krankheit

Plasmalogene gehören zur Gruppe der Glycerophospholipide und sind durch eine Vinyletherbindung an der *sn*-1 Position gekennzeichnet, die mit einer Alkenylkette von meist 16 oder 18 C-Atomen verknüpft ist. Die *sn*-2 Position trägt meist eine ungesättigte Omega-3 oder Omega-6 Fettsäure, verknüpft über eine Esterbindung. Weiterhin unterscheiden sich Plasmalogene in ihrer polaren Kopfgruppe, auf die sich die Einteilung in Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PC-PL) und Phosphatidyletanolamin-Plasmalogene (PE-PL) bezieht (Abb. 5).

Plasmalogen (PL)



korrespondierendes Phospholipid:



R₂ = verschiedene Acylketten

Abb. 5 Strukturelle Darstellung der Plasmalogene und Phospholipide

Charakteristisch für die Plasmalogene ist die Vinyletherbindung an der *sn*-1 Position, während bei Phospholipiden die *sn*-1 Position eine veresterte Fettsäure trägt. (Abbildung modifiziert nach Rothhaar *et al.*, 2012)

Plasmalogene werden bei Säugetieren in allen Geweben gefunden und gelten als Hauptbestandteil neuronaler Membranen. Neben dem Herzmuskel kommen sie außerdem in hohen Konzentrationen im menschlichen Gehirn vor, wo sie ca. 20% des Glycerophospholipid-Gehaltes stellen (Farooqui and Horrocks, 2001b; Gross, 1985; Horrocks and Sharma, 1982). Die Vinyletherbindung ist anfällig gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies, weshalb Plasmalogene als Antioxidantien fungieren, die die Zelle vor

oxidativem Stress schützen (Engelmann, 2004; Kuczynski and Reo, 2006; Zoeller *et al.*, 1999; Zoeller *et al.*, 1988). Zudem sind sie an Prozessen der Membranfusion und Vesikelbildung (Favrelere *et al.*, 2000; Glaser and Gross, 1994), Ionentransportvorgängen (Duhm *et al.*, 1993; Ford and Hale, 1996) und dem Cholesterin-Efflux (Mandel *et al.*, 1998) beteiligt. Werden Plasmalogene durch die Phospholipase A2, die selektiv Plasmalogene hydrolysiert (Farooqui and Horrocks, 2001a), gespalten, fungieren die freigesetzten Fettsäuren wie beispielsweise die Arachidonsäure und deren Metaboliten als „second messenger“ und regulieren verschiedene Enzyme wie die Proteinkinase A, die Proteinkinase C, die NADPH-Oxidase oder die Na⁺K⁺-ATPase in ihrer Aktivität (Farooqui *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1996).

Änderungen im Plasmalogengehalt sind für mehrere neurologische Erkrankungen beschrieben worden, darunter Multiple Sklerose (Yanagihara and Cumings, 1969), Down-Syndrom (Murphy *et al.*, 2000), Nieman-Pick (Schedin *et al.*, 1997) und das Zellweger-Syndrom (Datta *et al.*, 1984; Heymans *et al.*, 1983). In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden mehrfach reduzierte Plasmalogenspiegel beschrieben (Farooqui *et al.*, 1995; Ginsberg *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 2011a; Grimm *et al.*, 2011d; Guan *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 1995). Weitgehend unklar ist jedoch, ob die Veränderung der Plasmalogene als Ursache oder Folge der Alzheimer-Pathologie anzusehen ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob die reduzierten Plasmalogenspiegel einen Einfluss auf die Prozessierung des APP haben und als eine mögliche Ursache der Alzheimer Krankheit in Betracht kommen.

2.3.4 Die Bedeutung des Sphingolipidstoffwechsels bei der Alzheimer Krankheit

Sphingolipide, vor allem Sphingomyelin, sind neben anderen Phospholipiden und Cholesterin die am häufigsten in eukaryontischen Zellmembranen vertretenen Lipide. Die Synthese der Sphingolipide beginnt, katalysiert von der Serinpalmitoyl-CoA-Transferase (SPT), mit der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Dehydrosphingonin, welches weiter zu Dihydroceramid und schließlich zu Ceramid umgewandelt wird (Geeraert *et al.*, 1997; Hanada, 2003; Rother *et al.*, 1992; Weiss and Stoffel, 1997). Ausgehend von Ceramid, welches als wichtigster Vorläufer im Sphingolipidmetabolismus angesehen wird, werden Sphingosine, Sulfatide und Ganglioside synthetisiert (Spiegel and Merrill, 1996). Die Synthese von Sphingomyelin findet, ebenfalls ausgehend von Ceramid, durch die Aktivität der Sphingomyelin-Synthase (SMS) statt (Spiegel and Merrill, 1996). Die rückläufige Reaktion, also der Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid, wird durch Sphingomyelinasen (SMasen) katalysiert (Marchesini and Hannun, 2004; Marchesini *et al.*, 2003) (Abb. 6).

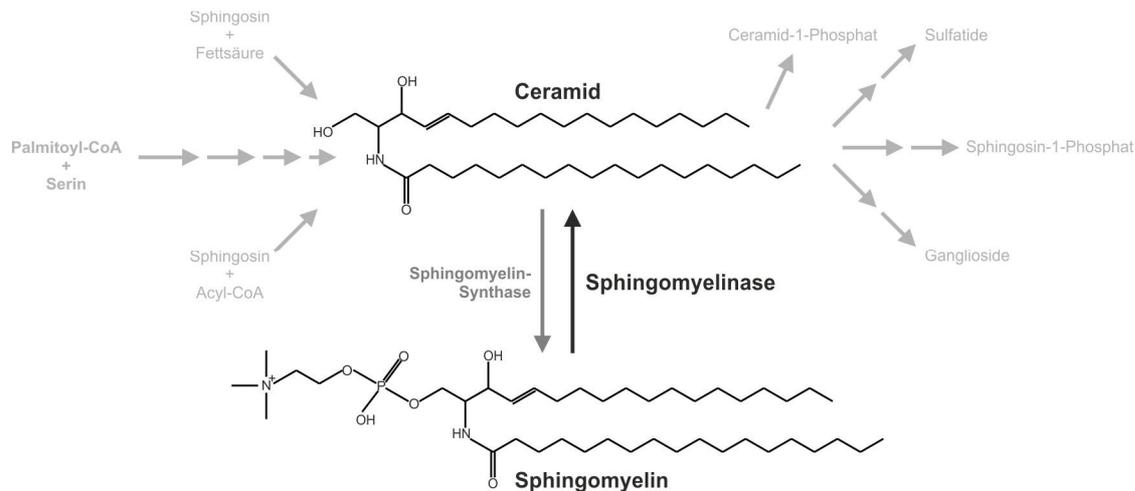


Abb. 6 Schematische Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels

Bei der Synthese von Ceramid kondensieren im ersten Schritt Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Dehydrosphingonin, woraus schließlich über mehrere Zwischenschritte Ceramid entsteht. Neben Sphingosinen, Sulfatiden und Gangliosiden wird aus Ceramid durch die Aktivität der SMS auch Sphingomyelin synthetisiert. Bei der rückläufigen Reaktion wird Sphingomyelin katalysiert durch SMasen zu Ceramid abgebaut.

Diese Enzymgruppe, auch als Sphingomyelin-Phosphodiesterasen (SMPD) bezeichnet, wird entsprechend des pH-Optimums der Enzyme in die saure SMase (aSMase, engl.: acidic aSMase), mindestens drei neutrale SMasen (nSMasen) und die alkalische SMase untergliedert. Eine hohe medizinische Relevanz kommt dabei der aSMase zu. Durch eine Mutation in ihrem kodierenden Gen SMPD1 kommt es zur Anreicherung von Sphingomyelin in den Lysosomen, was zur Manifestation der Niemann-Pick-Krankheit führt (Ferlinz *et al.*, 1991; Horinouchi *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1992a; Takahashi *et al.*, 1992b). Weiterhin wurde eine erhöhte aSMase-Aktivität in Zusammenhang mit Depressionen gebracht (Kornhuber *et al.*, 2005). Zahlreiche Antidepressiva inhibieren dieses Enzym (Albouz *et al.*, 1986; Kolzer *et al.*, 2004; Kornhuber *et al.*, 2010) und eine kürzlich veröffentlichte Studie von Gulbins *et al.* sieht in der Inhibierung der aSMase den hauptsächlichen Wirkmechanismus dieser Antidepressiva (Gulbins *et al.*, 2013).

Auch bezüglich der Alzheimer Krankheit wurden verschiedene Veränderungen des Sphingolipidmetabolismus beschrieben. So sind in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten Sulfatide und Phospholipide reduziert (Grimm *et al.*, 2011a; Han *et al.*, 2002; Pettegrew *et al.*, 2001). Ceramide und Galactoceramide liegen hingegen vermehrt vor (Han *et al.*, 2002). Zudem wurde auch in der cerebrospinalen Flüssigkeit von an Alzheimer erkrankten Personen ein erhöhter Ceramidspiegel festgestellt (Satoi *et al.*, 2005). In Zellen, die eine FAD-Mutation im PS1-Gen tragen, konnten erhöhte SMase-Aktivitäten gemessen werden (Grimm *et al.*, 2005). Diese führen über den verstärkten Abbau von Sphingomyelin zu einer

Akkumulation von Ceramid, das als Vermittler der A β -induzierten Apoptose diskutiert wird (Jana and Pahan, 2004; Malaplate-Armand *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Antidepressiva, die zur Gruppe der funktionellen aSMase Inhibitoren (FIASMA) gehören, auf ihre Wirkung bezüglich der APP-Prozessierung und damit auf einen potentiellen Einsatz bei der Therapie der Alzheimer Krankheit getestet.

2.4 Fragestellung der Arbeit

Die Alzheimer Krankheit ist neuropathologisch unter anderem durch die Ablagerung extrazellulärer Plaques in den Gehirnen der betroffenen Patienten gekennzeichnet. Den Hauptbestandteil dieser senilen Plaques stellen A β -Peptide in aggregierter Form dar. Diese entstehen durch die amyloidogene proteolytische Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase. Diese Enzyme, ebenso wie ihr Substrat APP sind membranassoziiert, weshalb sie einer Beeinflussung durch die Zusammensetzung und somit durch die physikalischen Eigenschaften der Membran unterliegen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Lipide auf die APP-Prozessierung analysiert werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte auf die an der amyloidogenen Prozessierung beteiligten β - und γ -Sekretasen gerichtet werden, wozu zunächst die Etablierung und Weiterentwicklung verschiedener Methoden zur Bestimmung ihrer Aktivitäten notwendig war. Im Folgenden wurden Veränderungen der Lipidkomposition in Zellkultur- sowie in *ex vivo*-Modellen herbeigeführt und deren Auswirkung auf die Aktivitäten der Sekretasen analysiert.

Im ersten Teil wurde eine mögliche Beeinflussung der APP-Prozessierung durch TFA, die in industriell verarbeiteten Lebensmitteln vorkommen, untersucht. Diese wurden bereits in der Vergangenheit als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen erkannt. Hier sollte eine Beeinflussung der APP-Prozessierung und damit ein potentielles Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung durch den Konsum von TFA verglichen mit der Aufnahme der natürlich vorliegenden *cis*-Form analysiert werden. Während die *cis*- und die *trans*-Fettsäuren sich lediglich in ihrer sterischen Konformation unterscheiden, wurden im zweiten Teil der Arbeit zwei Lipidklassen bezüglich ihrer Wirkung auf die APP-Prozessierung miteinander verglichen, die sich in der Bindung ihrer Fettsäureketten unterscheiden. Charakteristisch für Plasmalogene ist die Vinyetherbindung an der *sn*-1 Position, wodurch diese Lipide reaktiver sind als ihre korrespondierenden Phospholipide, die stattdessen eine Esterbindung tragen. In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden reduzierte Plasmalogenspiegel festgestellt, was in der Vergangenheit als Konsequenz des oxidativen Stresses in den Gehirnen der Betroffenen angesehen wurde. Hier sollte untersucht werden, ob eine Veränderung der

Plasmalogene eine Auswirkung auf die Sekretasen und damit auf die Progression der Alzheimer Krankheit hat. Im dritten Teil dieser Arbeit sollte das Verhältnis zweier Lipide, Sphingomyelin und Ceramid, zueinander durch den Einsatz funktioneller Inhibitoren der aSMase verändert und der Effekt dieser Verschiebung auf die APP-Prozessierung untersucht werden. Hohe Ceramidspiegel wurden in der Vergangenheit in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten nachgewiesen, während Sphingomyelin eher als protektiv angesehen wird. Hier sollte festgestellt werden ob eine Modulierung der aSMase und die damit verbundene Änderung des Ceramid- sowie Sphingomyelingehtes einen Effekt auf die Sekretasen bewirkt. Somit wurde in drei Stufen zunächst die Veränderung der sterischen Konformation von Fettsäuren, dann die Veränderung einer chemischen Bindung innerhalb der Lipide und schließlich die Verschiebung des Verhältnisses zweier Lipide zueinander hinsichtlich der Beeinflussung der Sekretasen untersucht.

Ein Teil der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse ist Bestandteil acht verschiedener Manuskripte, von denen sechs bereits publiziert wurden. Die Darstellung der Ergebnisse orientiert sich in diesen Fällen an den Abbildungen der Publikationen, die im Original von Dr. Marcus Grimm erstellt wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tab. 1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Material	Hersteller
α -Sekretase Substrat	Calbiochem
β -Mercaptoethanol	Sigma
β -Sekretase Inhibitor II	Calbiochem
β -Sekretase Substrat	Calbiochem
γ -Sekretase InhibitorX (L-658,458)	Calbiochem
γ -Sekretase Substrat	Calbiochem
96-Loch-Platte transparent für OD-Messungen	Falcon
96-Loch-Platten schwarz für Fluoreszenz-Messungen	Costar
96-Loch-Zellkulturschalen	Nunc
Agarose	Difco
BCA-Lösung	Sigma
Bromphenolblau Na-Salz	Serva
BSA (fatty acid free)	Sigma
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Chloroform	Merck
Complete Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics
Complete Proteaseinhibitor-Tabletten, EDTA-free	Roche Diagnostics
Cryo Tube Vials	Nunc
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	J.T.Baker

Deckgläschen	Marienfeld
DMEM	Sigma
DMSO	Roth
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösung 1/2	Amersham
EDTA (Titriplex III)	Merck
Entwickler	Kodak
Essigsäure	Fluka
Ethanol	J.T.Baker
Falconröhrchen, 15ml und 50ml	Sarstedt
FCS	PAN
Filterpapier	Whatman
Fixierer	Kodak
Fotokopierfolien TypeC A4	XEROX
Glaskügelchen für Minilys-Homogenisator, Durchmesser 0,1mm	Peqlab
Glycerin	J.T.Baker
Glycin	AppliChem
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Hygromycin B	PAN
Insulinspritzen	Terumo
Isopropanol	J.T.Baker
Kaliumacetat	Roth
Kanülen Nr.14: 23G 1¼; 0,6mmx30mm Nr.17: 24G 1; 0,55mmx25mm Nr.20: 27G ¾; 0,4mmx19mm	Becton Dickinson

U-100 Insulinspritze; 0,33mmx12,7mm	Becton Dickinson
KCl	Merck
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	Merck
L-Glutamin	Sigma
MEM non essential Aminosäure Lösung	Sigma
Methanol p.A.	J.T.Baker
Milchpulver blotting grade	Merck
Multitip Aufsätze für Multistep-Pipette, verschiedene Größen	Eppendorf
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	J.T.Baker
NaCl	AppliChem
NaOH	Roth
Nitrozellulose PROTRAN 0,45µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Nonidet P40 Substitute	Fluka
Novex Pre-Cast gels 10-20% Tricine 1,0mm x 10 well, 12 well & 15 well	Invitrogen
Pasteurpipetten	VWR
Penicillin-Streptomycin	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Polyvinylalkohol	Merck
Protein-A-Sepharose	Sigma
Protein-G-Sepharose	Sigma
Protein Rainbow-Marker full-range	Amersham
Protein Rainbow-Marker low-range	Amersham
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf

RNaseA	New England-Biolabs
SDS	Sigma
Saccharose	Sigma
TACE Substrat	Calbiochem
Tricine	Biomol
Tris/HCl	Sigma
Triton X-100	Merck
Trizma Base	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypsin-EDTA-solution (1x)	Sigma
Wheaton-Röhrchen	Wheaton
Zellkultur 6-Loch-Platte	Falcon
Zellkulturplatte 245 x 245 x 25mm	Nunc
Zellkulturschale 100 x 20mm	Sarstedt

3.2 Geräte

Tab. 2 Geräte

Gerät	Hersteller
-80°C Gefrierschrank	Thermo Electron
80°C Wärmeschrank	Memmert
8-Kanal-Multipette	Eppendorf
Analysenwaage	Sartorius
Autosampler und Kühlmodul 1200er Serie	Agilent
Blotkammer Trans-Blot Cell	BioRad

Brutschrank 37°C	Heraeus
Capillary Pump 1200er Serie	Agilent
Degasser 1200er Serie	Agilent
ESI-MS 4000QTrap	Absciex
Fluorometer M1000Pro	Tecan
Fluorometer Safire ²	Tecan
Gelkammer Xcell SureLock Novex Mini-Cell	Invitrogen
Hamilton Pipette	Hamilton
Harvard Syringe Pump	Harvard Apparatus
Lichtmikroskop	Leica
Magnetheizrührer	Heidolph
Mikrowelle Micromat	AEG
Minilys Homogenisator	Peqlab
Multipette plus	Eppendorf
Multi-Reax	Heidolph
N ₂ -Abdampfvorrichtung	VLH
N ₂ -Tank GT 140	Air Liquide
OD Lesegerät für 96-Loch-Platten	Thermo Fischer
PCR cycler	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
Pipetten-Set Research	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra
Potter-Röhrchen	B. Braun
PotterS	B. Braun

Power-Supply für Tank-Blot	LKB Bromma
Power-Supply Model 200 / 2.0 für Gelelektrophorese	Biorad
Rotor SW-41 für Ultrazentrifuge	Beckman
Rotor TLA-100 für Ultrazentrifuge	Beckman
RT-PCR cycler 7500 Fast	Life Technologies
Speedvac Savant DNA110	Thermo
Sterilbank	Heraeus
Teflonhomogenisator	B. Braun
Teflonschaber	neolab
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferkammer	Biorad
Überkopftaumler Reax2	Heidolph
Ultrazentrifuge	Beckman
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Wheatonschüttler Multi-Reax	Heidolph
Zentrifuge 5415D	Eppendorf

3.3 Verwendetes *in vivo* Material

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen *post mortem* Gehirne wurden von BrainNet in München bezogen. Es wurden 58 verschiedene Proben von 37 Alzheimer-Patienten und von 21 nicht an Alzheimer erkrankter Personen verwendet. Zur Bestimmung der Plasmalogenspiegel wurden Proben des frontalen Cortex aller in Tabelle 3 aufgeführten Gehirne verwendet, zur Bestimmung der SMPD-Genexpression wurden Proben des frontalen und temporalen Cortex sowie des Cerebellums der Gehirne verwendet, die mit * gekennzeichnet sind.

Tab. 3 *In vivo* Material

#	Alter	Geschlecht	Diagnose	Braak & Braak	CERAD
Con #01	69	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #02 *	77	W	Kontrolle	II	A
Con #03 *	61	M	Kontrolle	0	0
Con #04 *	85	W	Kontrolle	I	0
Con #05 *	80	W	Kontrolle	III-IV	0
Con #06 *	75	M	Kontrolle	II	0
Con #07 *	71	M	Kontrolle	0-I	0
Con #08	79	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #09	62	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #10 *	88	W	Kontrolle	I-II	B
Con #11	64	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #12	69	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #13 *	83	W	Kontrolle	II	0
Con #14	74	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #15 *	85	M	Kontrolle	III-IV	B
Con #16 *	76	W	Kontrolle	III-IV	C
Con #17 *	87	M	Kontrolle	I-II	0
Con #18 *	71	n.d.	Kontrolle	n.d.	n.d.
Con #19 *	75	W	Kontrolle	III-IV	B
Con #20 *	77	W	Kontrolle	II	C
Con #21 *	63	M	Kontrolle	I	0
AD #01 *	83	M	Alzheimer	VI	C

AD #02 *	78	W	Alzheimer	VI	C
AD #03 *	76	M	Alzheimer	V	B
AD #04 *	88	W	Alzheimer	VI	C
AD #05 *	67	W	Alzheimer	V-VI	C
AD #06 *	82	W	Alzheimer	V	C
AD #07 *	80	M	Alzheimer	V	C
AD #08 *	75	M	Alzheimer	VI	C
AD #09 *	74	M	Alzheimer	V-VI	C
AD #10 *	83	M	Alzheimer	VI	C
AD #11 *	80	M	Alzheimer	V	C
AD #12 *	88	W	Alzheimer	V	C
AD #13 *	73	M	Alzheimer	V-VI	C
AD #14 *	62	M	Alzheimer	VI	C
AD #15 *	70	M	Alzheimer	VI	C
AD #16	81	n.d.	Alzheimer	n.d.	n.d.
AD #17 *	75	W	Alzheimer	VI	C
AD #18	73	n.d.	Alzheimer	n.d.	n.d.
AD #19 *	78	W	Alzheimer	V-VI	C
AD #20	79	n.d.	Alzheimer	>V	C
AD #21	86	n.d.	Alzheimer	>V	C
AD #22 *	85	W	Alzheimer	IV	C
AD #23	75	n.d.	Alzheimer	VI	C
AD #24 *	80	W	Alzheimer	V	C
AD #25 *	73	W	Alzheimer	V-VI	C

AD #26 *	85	W	Alzheimer	III	C
AD #27	80	n.d.	Alzheimer	>V	C
AD #28 *	78	W	Alzheimer	VI	C
AD #29 *	87	M	Alzheimer	V	C
AD #30 *	65	W	Alzheimer	V-VI	C
AD #31 *	82	W	Alzheimer	V-VI	C
AD #32 *	76	W	Alzheimer	V-VI	C
AD #33 *	79	W	Alzheimer	V	C
AD #34 *	87	M	Alzheimer	V	C
AD #35 *	68	W	Alzheimer	VI	C
AD #36	85	n.d.	Alzheimer	n.d.	n.d.
AD #37 *	83	M	Alzheimer	V	C

Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten humanen *post mortem* Gehirnproben. Verwendete Abkürzungen: AD: Alzheimer, Con: Kontrolle, M: männlich, W: weiblich, CERAD: engl.: Consortium to establish a registry for AD, *: verwendet zur Analyse der SMPD-Expression.

Die AD-Stadien laut CERAD A, B, C, 0 sind unter <http://cerad.mc.duke.edu> nachzulesen), die Einteilung in Stadien nach Braak & Braak erfolgte nach Braak and Braak, 1991.

Die Mäusegehirne zur Herstellung postnuklearer Fraktionen wurden aus C57Bl6/N Wildtyp-Mäusen präpariert. Zur Gewinnung kortikaler Neurone wurden E14 Embryos von C57Bl6/N Wildtyp-Mäusen verwendet, die vom Tierstall von Frau Dr. Petra Weißgerber (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes) bezogen wurden.

Für die Fütterung mit Stigmasterol und DHA wurden männliche Mäuse des Stamms C57Bl6/J verwendet. Die Fütterung wurde unter der Leitung von Dr. Laus Broersen von Danone Research (Nutricia Advanced Medical Nutrition, Danone Research, Centre of Specialised Nutrition, Wageningen, Niederlande) durchgeführt.

3.4 Verwendete Zelllinien

Tab. 4 Zelllinien

Zelltyp	Beschreibung
SH-SY5Y-Wildtyp	Humane Wildtyp-Neuroblastoma-Zelllinie
SH-SY5Y-SPA4CT-DA (C99)	Wildtypzellen, stabil transfiziert mit pCEP4/SPA4CT-DA von Dr. Heike Grimm; Hygromycin resistent
SH-SY5Y-APP695	Wildtypzellen, stabil transfiziert mit humanem pCEP4/APP695 von Dr. Heike Grimm; Hygromycin resistent
Kortikale Neurone	Kortikale Neurone aus Hirnen von E14 Mausembryonen, präpariert von Inge Tomic

3.5 Zellkultur

3.5.1 Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen

Verwendete Puffer:

1x PBS: 137mM NaCl
 2,7mM KCl
 8,1mM Na₂PO₄ x 2H₂O
 1,5mM KH₂PO₄

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt, die Lösung anschließend autoklaviert und bei RT gelagert.

Verwendete Zellkulturmedien:

Tab. 5 Zellkulturmedien

Zelltyp	Medienzusammensetzung
SH-SY5Y-Wildtyp (wt)	DMEM, AS-Mix (1:100), 10% FCS
SH-SY5Y-SPA4CT-DA	DMEM, AS-Mix (1:100), 10% FCS, 400µg/ml Hygromycin B
SH-SY5Y-APP695	DMEM, AS-Mix (1:100), 10% FCS, 400µg/ml Hygromycin B
Kortikale Neurone	MEM 500ml, 20ml NaHCO ₃ (5,5%), 15ml Glukose (20%), 5ml Natriumpyruvat, 5ml Glutamin, 5ml N2-Supplement, 10ml B27-Supplement, 0,1% Ovalbumin

Alle verwendeten Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen waren steril und wurden vor der Benutzung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Alle SH-SY5Y-Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in beschichteten 10cm² Zellkulturschalen kultiviert und das Wachstum regelmäßig kontrolliert. Ein Mediumwechsel wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Um einen Befall mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde regelmäßig ein Mykoplasmentest der Firma Roche Diagnostik (Mannheim) von Inge Tomic durchgeführt. Bei Erreichen 95 bis 100%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit je 2ml Trypsin/EDTA pro Schale abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Es wurden 8ml frisches Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nun wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen überführt und das Medium wurde auf 10ml aufgefüllt. Sollten die Zellen anschließend inkubiert werden, wurde immer im Verhältnis 1:5 passagiert, d.h. die Zellen von einer 10cm² Zellkulturschale wurden auf 5 neue 10cm² Schalen aufgeteilt.

Die kortikalen Neurone wurden von Inge Tomic aus den Gehirnen von E14 Mausembryonen präpariert und bei 37°C und 7% CO₂ auf Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Im Gegensatz zu den SH-SY5Y-Zellen konnten diese Zellen nicht passagiert werden. Sie wurden daher frisch präpariert und 7 Tage kultiviert, bevor sie für Inkubationen zur Verfügung standen.

3.5.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

(nach einem Protokoll aus der Dissertation von Dr. Marcus Grimm)

Verwendete Lösungen

Lösung A: DMEM mit 30% FCS

Lösung B: DMEM mit 30% FCS und 20% DMSO

Zur langfristigen Lagerung der SH-SY5Y-Zelllinien, sowie um eine einheitliche Passagenzahl zu gewährleisten, wurden Gefrierkulturen angelegt und diese im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert, danach wie oben beschrieben, gewaschen und abgelöst. Nach Zugabe von 5ml Zellkulturmedium und Vereinzeln durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension in ein 15ml Falconröhrchen überführt und für 5min mit 1500g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in 1,5ml Lösung A resuspendiert. Nach Zufügen von 1,5ml Lösung B wurde die Zellsuspension auf 2 Kryoröhrchen aufgeteilt.

Diese wurden in einem Einfrierbehälter, der mit Isopropanol gefüllt war im -80°C Schrank gelagert, wobei die Gefrierkulturen langsam um je 1°C pro min bis auf -80°C heruntergekühlt wurden. Anschließend wurden die Gefrierkulturen in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs gelagert.

Zum Auftauen kryokonservierter Zelllinien wurden die Gefrierkulturen im 37°C Wasserbad aufgetaut und mit 5ml Zellkulturmedium gemischt. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und für 5min mit 1500g bei RT zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 5ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Zellkulturschale mit 5ml vorgelegtem Medium gegeben. Die Zellen wurden dann, wie oben beschrieben, kultiviert. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens zweimal passagiert bevor sie für Inkubationen benutzt wurden.

3.5.3 Inkubation von *cis*- und *trans*-Fettsäuren

Die hier verwendeten Fettsäuren wurden von Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) bezogen.

Tab. 6 Fettsäuren

Fettsäure	Formaler Name	Konformation
Ölsäure	9Z-Octadecensäure	<i>cis</i>
Elaidinsäure	9E-Octadecensäure	<i>trans</i>
Linolsäure	9Z,12Z-Octadecadiensäure	<i>cis, cis</i>
Konjugierte Linolsäure (CLA)	9E,11E-Octadecadiensäure	<i>trans, trans</i>

Alle verwendeten Fettsäuren wurden in einer Konzentration von 100mM in Ethanol gelöst. Um ein Oxidieren der Fettsäuren zu vermeiden, wurde das Ethanol zuvor für 20min im Ultraschallbad entgast und dann bei -20°C gekühlt, bevor es zum Ansetzen der Fettsäuren verwendet wurde. Die angesetzten Fettsäuren wurden in Glasgefäße aufgeteilt und bis zu ihrer Verwendung im flüssigen Stickstoff gelagert.

Für die Inkubation wurde Zellkulturmedium mit einem reduzierten FCS-Gehalt von 1% verwendet. Dieses wurde bereits 12Std. vor Beginn der Inkubation zum Kultivieren der Zellen verwendet. Die Fettsäuren wurden dem Inkubationsmedium in einer finalen Konzentration von $50\mu\text{M}$ zugegeben, das Kontrollmedium enthielt die entsprechende Menge des Lösungsmittels Ethanol (0,5% (v/v)). Das Medium wurde für 5min sonifiziert, bevor es auf die Zellen gegeben wurde. Die Inkubationsdauer betrug 5 Tage, wobei alle 12Std. das Medium von den Zellen abgenommen und frisches Medium mit den Fettsäuren zugegeben wurde.

3.5.4 Inkubation von Plasmalogenen und Phospholipiden

Die hier verwendeten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen.

Tab. 7 Plasmalogen und Phospholipide

Plasmalogen/ Phospholipid	Formaler Name
PC-PL 18:0/18:1	1-(1Z-octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PC-PL 18:0/20:4	1-(1Z-octadecenyl)-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PC-PL 18:0/22:6	1-(1Z-octadecenyl)-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PE-PL 18:0/22:6	1-(1Z-octadecenyl)-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
PC 18:0/18:1	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PC 18:0/20:4	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PC 18:0/22:6	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PE 18:0/22:6	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin

Alle verwendeten Phospholipide und Plasmalogene wurden in einer Konzentration von 50mM in entgastem Ethanol gelöst. Die angesetzten Phospholipide und Plasmalogene wurden in Glasgefäße aufgeteilt und im flüssigen Stickstoff gelagert.

12Std. vor der Inkubation wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit einem reduzierten FCS-Gehalt von 0,1% kultiviert. Die Plasmalogene wurden dem Inkubationsmedium mit 0,1% FCS in einer finalen Konzentration von 100µM zugegeben, wobei die Konzentration des Lösungsmittels Ethanol bei 2‰ (v/v) lag. Als Kontrolle wurden Zellen mit den korrespondierenden Phospholipiden in der gleichen Weise inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 24Std. wobei nach 12Std. das Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium mit den zugesetzten Lipiden ersetzt wurde.

3.5.5 Inkubation von Sphingomyelinase-Inhibitoren

Die hier verwendeten Inhibitoren wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Tab. 8 SMase-Inhibitoren

Inhibitor	Target	Inkubierte Konzentration	Lösungsmittel
Amitriptylin	aSMase	30 μ M	ddH ₂ O
Desipramin	aSMase	10 μ M	ddH ₂ O
Maprotilin	aSMase	10 μ M	ddH ₂ O
Fluoxetin	aSMase	10 μ M	ddH ₂ O
GW4869	nSMase	2 μ M	DMSO

Die Inkubation von Inhibitoren der aSMase und nSMase erfolgte in Inkubationsmedium mit einem reduzierten FCS-Gehalt von 1% FCS. Die zu inkubierenden Zellen wurden bereits 12Std. vor Beginn der Inkubation in Medium mit 1% FCS kultiviert. Die Inhibitoren wurden dem Inkubationsmedium in den in Tab. 8 angegebenen Konzentrationen zugegeben. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit den entsprechenden Mengen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Inkubationsdauer betrug 24Std., wobei nach 12Std. das Inkubationsmedium erneuert wurde.

3.5.6 Inkubation von rekombinantem aSMase-Enzym

Die Inkubation von rekombinantem aSMase-Enzym erfolgte auf konfluenten SH-SY5Y wt Zellen in 96-Loch Zellkulturschalen. Das Enzym, das als Standard (K-3201) im aSMase-Aktivitäts-Assay Kit der Firma Echelon (K-3200) enthalten war, wurde mit 150 μ l OptiMEM pro Aliquot (Stockkonzentration: 10U/ml) frisch angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem OptiMEM gewaschen und das rekombinante Enzym wurde in sterilen Gefäßen in einer finalen Konzentration von 1U/ml in OptiMEM verdünnt. Pro Vertiefung der 96-Loch Zellkulturplatte wurden 50 μ l dieser Verdünnung mit einer Multistep-Pipette mit sterilem 1ml-Aufsatz zu den Zellen gegeben. Dies entsprach einer Menge von 0,05U aSMase-Enzym pro Vertiefung. Die Inkubation erfolgte für 5Std., danach wurden die Zellen für die Messung der Sekretase-Aktivitäten wie unter Kapitel 3.8 beschrieben, verwendet.

3.5.7 Inkubation von Sphingomyelin und Ceramid

Sphingomyelin und Ceramid wurden über Avanti Polar Lipids bezogen und in einer Stockkonzentration von 50mM für Sphingomyelin und 10mM für Ceramid in eiskaltem, entgastem Ethanol gelöst. Die Lipide wurden in Glasgefäße aufgeteilt und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die zu inkubierenden Zellen wurden vor der Inkubation für 12Std. in Medium mit 1% FCS kultiviert. Vor dem Zugeben der Lipide wurden diese in finalen Konzentrationen von 50µM für Sphingomyelin und 10µM für Ceramid in Medium mit 1% FCS verdünnt, wobei die Konzentration des Lösungsmittels EtOH 1‰ (v/v) betrug. Hierzu musste das Medium auf 40°C im Wasserbad erwärmt werden. Die Lipide wurden für 5min im 37°C Heizschrank unter Schütteln aufgetaut und dem Medium unter Rühren zugegeben. Das Medium mit den Lipiden wurde auf etwa 37°C abgekühlt und zu den Zellen gegeben. Die Inkubationsdauer betrug 24Std., wobei ein Mediumwechsel nach 12Std. stattfand.

3.5.8 Bestimmung der Zytotoxizität

Nach Inkubationen in der Zellkultur musste eine Zytotoxizität der inkubierten Substanz auf die inkubierte Zelllinie ausgeschlossen werden. Dafür wurde das „Cytotoxicity Detection Kit Plus“ der Firma Roche verwendet. Diese Methode beruht auf der Messung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), die bei Störungen der Zellintegrität ins Zellkulturmedium sezerniert wird, während sie bei intakten Zellen zytosolisch vorliegt. Die ins Medium abgegebene Menge der LDH ist also proportional zur Zytotoxizität, die eine inkubierte Substanz auf eine Zelllinie hat.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde ein photometrischer Nachweis verwendet: Durch die LDH vermittelte Oxidation von Laktat zu Pyruvat wird NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert. Dieses dient in der Folge der Diaphorase zur Reduktion des Tetrazoliumsalzes (INT) zu Formazan, dessen Entstehung photometrisch verfolgt werden kann.

Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers wie in der Dissertation von Frau Dr. Johanna Kuchenbecker beschrieben. Für jede inkubierte Substanz wurde die LDH-Bestimmung von mindestens drei unabhängigen Inkubationen durchgeführt.

3.5.9 Transienter aSMase Knockdown

Zur Herstellung von aSMase Knockdown Zellen wurden SH-SY5Y wt Zellen mit aSMase siRNS (h) (Santa Cruz Biotechnology) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. In zwei sterilen Eppendorfgefäßen wurden Transfektionsansatz A, der 1µg siRNA in 100µl OptiMEM GlutaMAX (Gibco) enthielt, und Transfektionsansatz B, bestehend aus 8µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamine™2000 (Invitrogen) in 100µl OptiMEM GlutaMAX für 5min bei RT inkubiert. Beide Transfektionsansätze wurden vereinigt, erneut 20min bei RT inkubiert und dann auf 1ml mit auf 37°C vorgewärmtem OptiMEM aufgefüllt. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit OptiMEM gewaschen und der Transfektionsansatz zugegeben. Dabei wurde 1ml für je eine Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturschale oder 50µl für eine Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturschale verwendet. Nach 5Std. wurde das Medium mit der siRNS von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden für weitere 24Std. in Kultivierungsmedium mit 10% FCS inkubiert, bevor sie analysiert wurden.

3.6 RNS-analytische Arbeiten

3.6.1 Isolierung der Gesamt-RNS

(in Zusammenarbeit mit Sven Grösgen)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNS aus inkubierten Zellen mit Trizol isoliert. Hierzu wurden die Zellen in 1ml Trizol pro 10cm²-Zellkulturschale mit einem Gummischaber abgeschabt und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer 5minütigen Inkubation bei RT wurden den Proben 200µl Chloroform zugegeben und für 15sek gevortext. Nach weiteren 3min bei RT wurden die Proben bei 12000rpm für 15min zentrifugiert, wobei sich 3 Phasen ausbilden: Die obere Phase enthält die RNS, die mittlere enthält Proteine und die untere Phase enthält die DNS. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben erneut für 10min bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert, wobei die isolierte RNS pelletiert wird. Diese wurde mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen, erneut bei 7500rpm für 5min abzentrifugiert und für etwa 5min getrocknet. Die RNS wurde in 100µl RNase freiem H₂O aufgenommen und im Wasserbad bei 55°C für 10min inkubiert.

Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten RNS wurde diese in RNase-freiem H₂O verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Da eine Extinktion

von 1 bei reiner RNS der Konzentration 40µg/ml entspricht, lässt sich die Konzentration mit der Formel

$$c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40\mu\text{g/ml}$$

bestimmen. Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen, bei der das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. So konnte über das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ die Reinheit der RNS ermittelt werden. Bei reiner RNS liegt der Wert bei 2,2. Für weitere Analysen wurden nur RNA-Präparationen verwendet, bei denen der Wert zwischen 2,0 und 2,2 lag. Die isolierte RNS konnte nun bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert werden.

3.6.2 Synthese von cDNS

(in Zusammenarbeit mit Sven Grösgen)

Zur reversen Transkription der isolierten RNS in cDNS wurde das „High Capacity cDNA RT Kit“ (Life Technologies) verwendet. Die isolierte RNS wurde nach den Angaben des Herstellers, wie in der Dissertation von Frau Dr. Johanna Kuchenbecker beschrieben, in cDNS umgeschrieben.

Die gewonnene cDNS wurde 1:10 in Nuklease-freiem H₂O verdünnt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

(in Zusammenarbeit mit Sven Grösgen)

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRTPCR: engl.: „quantitative Real Time Polymerase chain reaction“) wurde die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegende Menge an mRNS verschiedener Gene und damit ihr Expressionsniveau bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die SYBR-Green Methode verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9 Sequenzen aller verwendeten Primer

Gen	forward	reverse
β-Actin	5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3'	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
ADAM10	5'-GCA AAC TGA AAC CTG GGA AA-3'	5'-TTC CTT CCC TTG CAC AGT CT-3'

ADAM17	5'-CTG TGT GCC CTA TGT CGA TG-3'	5'-CAG CTG GTC AAT GAA ATC CC-3'
APH1a	5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3'	5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3'
APH1b	5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3'	5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3'
BACE1	5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3'	5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3'
NCSTN	5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3'	5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3'
PS1	5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3'	5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3'
PS2	5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3'	5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3'
PEN2	5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3'	5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3'
SMPD1	5'-CCG AAT TGT AGC CAG GTA TGA-3'	5'-GCC GGC TCA GAG TCT CTT C-3'
SMPD2	5'-CTG CTG GTG CTC CAT CTA AGT-3'	5'-GCC ACA CGA TGT GCT AGG TA-3'
SMPD3	5'-CCT CTG ACG ACA AGC TGG A-3'	5'-CGT TCG TGT CCA GCA GAG TA-3'
SMPD3a	5'-CCT GCG CTG GGT AAT CAT-3'	5'-CTA GCC ATG GTT TCC AGA GGT-3'
SMPD3b	5'-CCC TCA TCA ACT CCT CCA TC-3'	5'-CAG TTT CTC ATC GGG CAC A-3'
SMPD4	5'-CTC ATG CCA AGG AGT CGT TC-3'	5'-CTC TGG CTT CAG GCT GTT G-3'

Die Bestimmung der Gen-Expression erfolgte in 96-Loch-Platten, wobei für jede Vertiefung folgender Ansatz pipettiert wurde:

0,5µl Primer forward
 0,5µl Primer reverse
 4µl Nuklease-freies H₂O
 10µl SYBR Green Master Mix
 5µl cDNS

Die Messung der Expression erfolgte in einem 7500 Fast Real Time PCR System Gerät (Life Technologies) mit der Software SDS unter Verwendung der folgenden Einstellungen:

Tab. 10 Einstellungen des PCR-Geräts

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	95°C	20sek	1
2	95°C	3sek	40
3	60°C	30sek	
4	Schmelzkurvenanalyse		1

Die Analyse der Schmelzkurven diente zur Überprüfung der spezifischen Primerbindung. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta/\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) ausgewertet, wobei β -Aktin als nicht reguliertes „Housekeeping-Gen“ genutzt und die Expression der zu analysierenden Gene als relative Veränderung zur Aktin-Expression berechnet wurde.

3.7 Proteinanalytische Arbeiten

3.7.1 Chemischer Zellaufschluss

Verwendete Puffer:

Lysepuffer

150mM NaCl
50mM Tris/HCl, pH7,4
2mM EDTA
0,1% NP-40
0,1% Triton X-100

10x Protease-Inhibitor

1 Tablette Complete Protease-Inhibitor
- gelöst in 5ml ddH₂O
- bei -20°C gelagert

Vor der Verwendung wird 1:10 Protease-Inhibitor frisch dazugegeben.

Zur Durchführung proteinanalytischer Nachweise wurden die zuvor inkubierten Zellen chemisch aufgeschlossen. Der komplette Zellaufschluss wurde auf Eis durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und die Reste durch zweimaliges Waschen mit 4°C kaltem 1xPBS entfernt. Pro 10cm²-Zellkulturschale wurden 400µl Lysepuffer zu den Zellen gegeben. Diese wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 30min auf Eis inkubiert. Für den Nachweis der Proteine ADAM17, BACE1 und PS1 wurden die Proben zusätzlich dreimal durch eine 27Gx3/4 Nr.20 0,4mmx19mm-Kanüle gezogen. Die lysierten Zellen wurden zur Entfernung des Zelldebris bei 13000rpm für 5min zentrifugiert und der Überstand je nach Verwendungszweck sofort zur weiteren Analyse eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.7.2 Mechanischer Zellaufschluss

Diese Aufschlussmethode wurde zum Homogenisieren von Gehirnen oder Zellen verwendet. Zellen wurden vor dem Homogenisieren dreimal mit 4°C kaltem 1xPBS gewaschen und je

nach Anwendung im entsprechenden Puffer mit einem Gummischaber abgeschabt. Die Zellen wurden in spezielle Glasröhrchen überführt und durch Auf- und Abbewegen des Teflonstößels des Potters homogenisiert. Dabei waren die Umdrehungszahl des Potters sowie die Anzahl der ausgeführten Auf- und Abbewegungen variabel und wurden je nach nachfolgender Analysemethode gewählt. Gehirne wurden ebenfalls mit kaltem 1xPBS gespült und in der gleichen Weise homogenisiert. Tab. 11 fasst die verschiedenen Homogenisierungsbedingungen zusammen.

Tab. 11 Homogenisierungsbedingungen in Abhängigkeit der nachfolgenden Anwendung

Anwendung	Umdrehungszahl [rpm]	Anzahl Stöße
Membranpräparation aus Zellen	1000	25
Membranpräparation aus Gehirnen	1000	50
Massenspektrometrische Analyse	1500	50
Isolation von Lipid Rafts	1500	10
Isolation von Endosomen	1000	20

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Methode

(nach einem Protokoll von Smith *et al.*, 1985)

Zur Ermittlung des Proteingehaltes eines Zellhomogenats oder -lysates wurde die Bicinchoninsäure-Methode (BCA) verwendet. Dazu wurde eine BCA-Arbeitslösung angesetzt, die 4% Kupfersulfatlösung und Bicinchoninsäure im Verhältnis 1:39 enthielt. Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu(II) zu Cu(I), welches mit der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bildet, dessen Entstehung photometrisch bei einer Absorption von 560nm bestimmt werden kann. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Proteinmenge.

Für den BCA-Test wurden die Proben als Dreifachbestimmung in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben. Dabei wurde die eingesetzte Menge entsprechend der zu erwartenden Proteinkonzentration gewählt und die Proben gegebenenfalls verdünnt. Zusätzlich wurde eine Standardreihe aus Verdünnungen des Proteins Rinderserumalbumin in 12 verschiedenen Konzentrationen von 0-1,1mg/ml benötigt, die später als Referenz zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der zu analysierenden Proben dient. Von jeder Verdünnung der Standardreihe wurden 20µl auf die 96-Loch-Platte pipettiert. Zu den Proben und den Standards wurden 200µl der BCA-Arbeitslösung gegeben und die Platte für 15min bei 37°C und darauf folgend für weitere 15min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Absorption bei 560nm wurde in einem Platten-Photometer ausgelesen und mit Hilfe der

Geradengleichung der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben berechnet werden.

3.7.4 Immunopräzipitation

(nach Celis, 1998)

Verwendete Puffer:

Waschpuffer A	Waschpuffer B	Waschpuffer C
10mM Tris/HCl pH 7,5	10mM Tris/HCl pH 7,5	10mM Tris/HCl pH7,5
150mM NaCl	500mM NaCl	
0,1% (v/v) NP-40	0,1% (v/v) NP-40	
0,1% (v/v) Triton X-100	0,1% (v/v) Triton X-100	
2mM EDTA	2mM EDTA	

Die Immunopräzipitation dient zur Anreicherung der zu untersuchenden Proteine aus Zelllysaten oder Zellkulturmedium. Hierzu wurden zu je 1ml Zelllysate bzw. Medium 20µl Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und je nach Protein der entsprechende Antikörper (AK) gegeben. Tab. 12 fasst die in dieser Arbeit zur Immunopräzipitation verwendeten AK zusammen.

Tab. 12 AK für die Immunopräzipitation

Antigen	Lokalisation	AK	Konzentration	Sepharose
Aβ	Medium	W02	10µg/ml	Protein-G-Sepharose
α-CTF	Zelllysate	2214	5µg/ml	Protein-A-Sepharose
β-CTF	Zelllysate	W02	10µg/ml	Protein-G-Sepharose

Vor jeder Immunopräzipitation wurde der Proteingehalt der Proben mittels BCA-Methode bestimmt, und die Proben wurden auf die maximal mögliche Proteinkonzentration eingestellt. Nach Zugabe des entsprechenden AKs und der Sepharose wurden die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Überkopftaumler inkubiert. Danach wurde das Präzipitat für 1min bei 13000rpm abzentrifugiert und nacheinander mit je 1ml Waschpuffer A, B und C gewaschen. Die Präzipitate wurden mit 3x Protein-Probenpuffer versetzt und wie unten beschrieben weiter verarbeitet.

3.7.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

(nach Schagger and von Jagow, 1987)

Verwendete Puffer:

3x Protein-Probenpuffer

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

Kathodenpuffer

100mM Tris

100mM Tricine

0,1% (w/v) SDS

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte entweder direkt aus dem Zelllysate oder nach vorheriger Anreicherung des gewünschten Proteins mittels Immunopräzipitation. Wurden Lysate benutzt, wurden die Proben zunächst auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und mit 3x Protein-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5min bei 98°C aufgeköcht, mit Ausnahme der Proben aus denen die Proteine PS1, BACE1 und ADAM17 detektiert werden sollten. Nach vorheriger Immunopräzipitation wurde das komplette Präzipitat eingesetzt und mit 20 μ l Proteinprobenpuffer ebenfalls für 5min bei 98°C aufgeköcht. Kondensierte Probe an den Wänden und den Deckeln der Reaktionsgefäße wurde kurz abzentrifugiert und die Proben durch Vortexen gemischt. Die Proben wurden dann in die Taschen von kommerziell erhältlichen Tris/Tricin-Gelen mit einem Gradienten von 10-20% pipettiert. Je nachdem welches Protein detektiert werden sollte, wurden 10-50 μ g Protein pro Tasche aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in mit Kathodenpuffer gefüllten Gelkammern bei 120V für ca. 1,5Std.

3.7.6 Proteintransfer mittels Western Blotting

(nach Celis, 1998)

Verwendete Puffer:

Transferpuffer

25mM Trizma Base

157mM Glycin

Transferpuffer mit Methanol und SDS

Transferpuffer (siehe links)

+ 20% (v/v) Methanol

+ 0,025% SDS

Das Tris/Tricin-Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurde auf eine Nitrozellulose-Membran (PROTRAN, 0,45 μ m Porengröße) gelegt, die zuvor mit

Transferpuffer befeuchtet wurde. Die Membran mit dem Gel wurde zwischen je 3 Lagen ebenfalls mit Transferpuffer befeuchteten Whatman-Papier gelegt und zusammen mit in Transferpuffer eingeweichten Schwämmen auf beiden Seiten in einem Transfer-Sandwich fixiert. Dieses wurde in eine Transferkammer gefüllt mit Transferpuffer mit Methanol und SDS eingehängt. Die im Gel nach Größe aufgetrennten Proteine wurden bei einer Spannung von 380mA bei 4°C auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins betrug die Transferdauer zwischen 1 und 3Std.

3.7.7 Proteindetektion mit der „enhanced chemoluminescence“ (ECL)-Methode

(nach einem Protokoll des Amersham ECL-Detection Kits)

Verwendete Puffer:

1x PBS

137mM NaCl

2,7mM KCl

8,1mM Na₂PO₄ x 2H₂O

1,5mM KH₂PO₄

1x TBST

10 mM Tris/HCl pH8

150 mM NaCl

0,05 % (w/v) Tween-20

Bei allen Nachweisen, die mit dem AK W02 erfolgten, wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Transfer für 10min in PBS aufgekocht, für alle anderen AK entfiel dieser Schritt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst mit 10% (w/v) Magermilchpulver (MP) in PBS oder TBST für 1Std. bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 Waschschritten, bei denen die Membran für je 5min in PBS oder TBST geschwenkt wurde, erfolgte die Inkubation des Primär-AKs. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS oder TBST wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundär-AK, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war, für 1Std. bei RT inkubiert. Die Inkubationszeiten, Konzentrationen, sowie die verwendeten Puffer der einzelnen AK sind in Tab. 13 zusammengefasst. Nach abgeschlossener Inkubation des Sekundär-AKs wurde die Membran dreimal für je 10min in PBS oder TBST gewaschen, um ungebundenen AK zu entfernen.

Tab. 13 Primär- und Sekundär-AK zum Proteinnachweis

Antigen	Primär-AK	Konzentration/ Puffer	Inkubationsdauer	Sekundär-AK	Konzentration/ Puffer
A β APP sAPP α β -CTF	W02	1 μ g/ml/ 1% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-mouse (Dako)	1:5000/ PBS
sAPP β	Anti-sAPP β MyBio Source	1:200/ 5% MP (w/v) in PBS	Über Nacht/ 4°C	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v)/ in PBS
α -CTF	2214	1:5000 in PBS	Über Nacht/ 4°C	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v)/ in PBS
Adam10	422751 Merck	1:2000/ 5% MP (w/v) in PBS	Über Nacht/ 4°C	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
Adam17	Ab39162 abcam	1:5000/ 5% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
AGPS	Ab90642 Abcam	1:500/ 5% BSA, 1% MP (w/v) in TBST	1,5Std./ RT	Anti-rabbit (Promega)	1:5000/ 5% BSA, 1% MP (w/v) in TBST
Bace1	B0806 Sigma	1:1000/ 5% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
Cadherin	Ab6528 Abcam	1:1000/ 5% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
EEA1	Ab2900 Abcam	1:1000/ 5% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
Flotillin	610821 BD	1:250/ 5% MP (w/v) in PBS	1,5Std./ RT	Anti-mouse (Dako)	1:5000/ PBS

PS1	sc-7860 Santa Cruz	1:500/ 5% MP (w/v) in PBS	Über Nacht/ 4°C	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
Nicastrin	N1660 Sigma	1:500/ 5% MP (w/v) in TBST	Über Nacht/ 4°C	Anti-rabbit (Promega)	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS

Der entstandene Komplex aus dem nachzuweisenden Protein, dem Primär- und dem Sekundär-AK wurde mit der ECL-Methode nachgewiesen. Die Membran wurde mit Whatman-Papier getrocknet und für 1min mit ECL-Lösung, bestehend aus ECL1 und ECL2 im Verhältnis 1:1 inkubiert. Die Membran wurde zwischen 2 Folien gelegt und das überschüssige ECL ausgestrichen. Durch die Meerrettichperoxidase-katalysierte Reduktion des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols entstand eine Chemolumineszenz, die durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert wurde.

3.7.8 Bestimmung der A β -Degradation

(in Zusammenarbeit mit Janine Mett)

Zur Bestimmung der Degradation von A β -Peptiden wurde nach der Inkubation das Zellkulturmedium abgenommen und zur Entfernung toter Zellen für 5min bei 13000rpm zentrifugiert. In 1ml des Mediums wurden 0,25 μ g synthetisches A β 40 gegeben und dieser Ansatz für 24Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die spezifische Degradation über das Enzym IDE (engl.: insulin degrading enzyme) zu ermitteln, wurde von jeder Probe ein zweiter Ansatz angefertigt, der zusätzlich mit 1mM des IDE-Inhibitors NEM (N-Ethylmaleimid) versetzt wurde. Nach der Inkubation wurden 12 μ l jeder Probe mit 3x Protein-Probenpuffer versetzt und die Proteine wie oben beschrieben über ein 10-20% Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. Die Detektion des verbliebenen A β s erfolgte wie beschrieben mit dem AK W02.

3.7.9 Bestimmung der APP-Lokalisation an der Zelloberfläche mittels FACS

(in Zusammenarbeit mit Benjamin Hundsdörfer)

Verwendete Puffer:

PBS-EDTA	FACS-Puffer	FACS-Fix
5mM EDTA	2% BSA (w/v)	8,5g/l NaCl
in 1xPBS	in 1xPBS	10g/l PFA
		in 1xPBS

Die selektive Detektion von APP an der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der FACS-Analyse (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) durchgeführt. Hierfür wurden SH-SY5Y wt Zellen nach Beendigung der Inkubation mit 1xPBS gewaschen und für 10min in PBS-EDTA inkubiert, wobei sich die Zellen von der Zellkulturschale ablösen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FACS-Puffer gestoppt, und die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt. Durch Auf- und Abziehen mit der Pipette wurden die Zellen vereinzelt und danach für 4min bei 1400rpm und 4°C abzentrifugiert. Auf das Zellpellet wurde der Primär-AK anti-APP (A8967, Sigma Aldrich) 1:200 verdünnt in FACS-Puffer gegeben und für 1Std. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und einmal gewaschen, bevor der Sekundär-AK anti-rabbit-FITC (ab6717, Abcam) in einer Verdünnung von 1:200 in FACS-Puffer für eine weitere Std. inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und in einer Mischung aus 150µl FACS-Fix und 250µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden in einem FACSCantoll Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) unter Verwendung der FACSDiva 6.1 Software analysiert.

3.7.10 Die Bestimmung des Oberflächenanteils von Proteinen mittels Biotinylierung

Zur Bestimmung des Anteils von BACE1 und APP an der Zelloberfläche wurden selektiv die Oberflächenproteine durch die kovalente Bindung von Biotin markiert. Hierzu wurden die Zellen dreimal mit kaltem 1xPBS/ 1mM MgCl₂/ 0,1mM CaCl₂ (PBS-Mg-Ca) gewaschen, in 1ml PBS-Mg-Ca abgeschabt und in Eppendorfgefäße überführt. Pro Ansatz wurden 0,5mg EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) zugegeben und die Proben wurden für 30min bei 4°C auf dem Überkopftaumler inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS-Mg-Ca gewaschen und die Biotinylierungsreaktion wurde durch die Zugabe von 100mM Glyzin/PBS gestoppt. Nicht gebundenes Biotin wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Mg-Ca entfernt und die Zellen wurden lysiert (siehe Kapitel 3.7.1). Nach Zentrifugation der Proben bei 14.500rpm für 15min bei 4°C wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode

bestimmt und die Proben wurden auf die größtmögliche einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Die biotinylierten Proteine wurden mittels Immunopräzipitation mit je 100µl 50%iger Streptavidin-Agarose (Pierce) über Nacht bei 4°C auf dem Überkopftaumler angereichert. Die Präzipitate wurden dreimal mit Lysepuffer gewaschen, bevor sie in 3x Protein-Probenpuffer für 5min bei 98°C aufgekocht wurden. Der Nachweis von BACE1 und APP erfolgte im Western Blot Verfahren mittels spezifischer AK wie oben beschrieben.

3.8 Analyse von Enzymaktivitäten

3.8.1 Bestimmung der Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase

(Protokoll verändert und erweitert nach der Dissertation von Frau Dr. Eva Zinser; die Messung der α -Sekretase-Aktivität erfolgte in Kooperation mit Viola Hauptenthal)

Die Messung der Enzymaktivität der α -, β - bzw. γ -Sekretase erfolgte mittels Fluoreszenz-basierter Nachweise. Dabei wurden intern gequenchte fluorogene Substrate verwendet, die spezifische Schnittstellen der jeweiligen Sekretasen tragen. Die nach der Spaltung emittierte Fluoreszenz ist dabei proportional zur Aktivität der Sekretasen. Das Originalprotokoll aus der Dissertation von Frau Dr. Eva Zinser zur Bestimmung der Sekretase-Aktivität aus isolierten Plasmamembranen inkubierter Zellen wurde bezüglich der Resuspension der Membranen weiterentwickelt und basierend auf diesem Protokoll die Methode zusätzlich für die Messung der Sekretase-Aktivität aus isolierten Plasmamembranen humaner oder muriner Gehirne etabliert, wofür eine Anpassung des Gewebeaufschlusses und der einzusetzenden Proteinmenge nötig war. Darüberhinaus wurde ein Verfahren zur Messung der Sekretase-Aktivitäten direkt aus lebenden SH-SY5Y wt Zellen entwickelt.

3.8.1.1 Bestimmung der Sekretase-Aktivität aus isolierten Plasmamembranen

Herstellung postnuklearer Fraktionen

Verwendete Puffer:

α -Saccharose-Puffer

200mM Saccharose

10mM Tris/HCl pH 7,4

β - / γ -Saccharose-Puffer

200mM Saccharose

10mM Tris/HCl pH 7,4

1mM EDTA

Die Herstellung postnuklearer Fraktionen (PNFs) erfolgte zum einen aus bereits inkubierten SH-SY5Y-Zellen, zum anderen wurden PNFs aus unbehandelten Zellen, Gehirnen von WT-Mäusen und aus *post mortem* Gehirnmateriale von AD-Patienten gewonnen. Diese standen dann für *in vitro* Inkubationen zur Verfügung. Zur Herstellung von PNFs aus SH-SY5Y wt Zellen wurden diese zweimal mit 4°C kaltem 1xPBS gewaschen, in Saccharose-Puffer abgeschabt und mechanisch mit einem Potter homogenisiert. Wurden PNFs aus Gehirnen hergestellt, so wurden die Gehirne mehrmals mit 4°C kaltem 1xPBS gespült und ebenfalls in Saccharose-Puffer homogenisiert. Der Proteingehalt wurde mittels Bicinchoninsäure-Methode bestimmt. Die Proben für die Messung der α -Sekretase wurden auf 1mg Protein pro ml, die für die Messung der β - oder γ -Sekretase auf 2mg/ml für SH-SY5Y wt Zellen bzw. 4mg/ml für PNFs aus Gehirnen eingestellt. Zellkerne und Debris wurden mit 900g für 10min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand, der der postnuklearen Fraktion entspricht, bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

In vitro-Inkubation von PNFs

Zur Bestimmung des direkten Effektes einer Substanz auf die Aktivität der α -, β - bzw. γ -Sekretase wurden PNFs *in vitro* mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Hierzu wurden PNFs wie oben beschrieben aus SH-SY5Y wt Zellen gewonnen, die zuvor für 24Std. mit reduziertem FCS-Gehalt von 0,1% kultiviert wurden. Die PNFs wurden zu je 1ml in Glasgefäße aliquotiert. Um ein Ausfallen der zu inkubierenden Lipide zu vermeiden, wurden die PNFs für 5min bei 37°C im Wasserbad erwärmt und die Lipide unter Vortexen zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15min unter leichtem Schütteln bei 37°C.

Membranpräparation

Verwendete Puffer:

α -Assay-Puffer

α -Saccharose-Puffer

+ 5 μ M CaCl₂

+ 5 μ M ZnCl₂

β - / γ -Assay-Puffer

Entspricht β - / γ -Saccharose-Puffer

Frisch vor Gebrauch zugesetzt:

1,46 μ M Pepstatin A

1 μ M β -Sekretase Inhibitor II

Proteaseinhibitor Complete EDTA-frei

Zur Isolation von Plasmamembranen wurden die PNFs für 75min mit 55000rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierten Membranen wurden dann im Assay-Puffer für die jeweilige Sekretase aufgenommen. Durch wiederholtes Aufziehen (10x) in Kanülen mit kleiner werdendem Durchmesser wurden die Membranen solubilisiert. Folgende Kanülen wurden verwendet:

23Gx1¼, 0,6mm x 30mm

27Gx¾, 0,4mm x 19mm

U-100 Insulinspritze, 0,33mm x 12,7mm

Später wurde dieses Verfahren zur Resuspendierung der Membranpellets durch die Aufarbeitung mit dem Minilys-Gerät der Firma Peqlab (Erlangen) ersetzt. Hierzu wurden die Membranpellets nach der Ultrazentrifugation in Saccharose-Puffer mit der Pipette von der Gefäßwand abgespült, dann wurden ca. 2mg Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,2mm zugegeben, und die Membranen wurden durch 10-sekündiges Schütteln mit mittlerer Geschwindigkeit im Minilys-Gerät solubilisiert.

Messung der Sekretase-Aktivitäten

Für die Bestimmung der Aktivitäten der α -, β - bzw. γ -Sekretase wurden die solubilisierten Membranpräparationen als Dreifachbestimmung auf schwarze 96-Loch-Platten pipettiert. Pro Vertiefung wurden dabei 100 μ l eingesetzt, was den in Tab. 14 angegebenen Proteinmengen entsprach. Bei der Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität wurden die Proben 1:1 mit 1x PBS mit einem pH-Wert von 4,5 verdünnt. Folgende Substrat- und Proteinmengen wurden verwendet:

Tab. 14 Verwendete Sekretase-Substrate zur Messung aus isolierten Membranen

Substrat	Konzentration	Proteinmenge
α -Sekretase Substrat II (Calbiochem No. 565767)	3 μ M	<ul style="list-style-type: none"> • 100μg für SH-SY5Y Membranen • 50μg für Membranen aus Gehirnen
β -Sekretase Substrat IV (Calbiochem No. 565758)	20 μ M	<ul style="list-style-type: none"> • 125μg für SH-SY5Y Membranen • 250μg für Membranen aus Gehirnen
γ -Sekretase Substrat (Calbiochem No. 565764)	6,25 μ M	<ul style="list-style-type: none"> • 250μg für SH-SY5Y Membranen • 500μg für Membranen aus Gehirnen
TACE Substrat (Calbiochem No. 616403)	4 μ M	<ul style="list-style-type: none"> • 100μg

Nach Zugabe des jeweiligen Substrates wurde die Umsetzung kontinuierlich in einem Fluorometer unter Lichtausschluss aufgezeichnet. Die Emissions- und Extinktionswellenlängen sowie die aufgezeichnete Anzahl an Zyklen sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Emissionsspektren des β - und γ -Sekretase Substrats, anhand derer die Wellenlängen und die Bandbreite für die Messungen festgelegt wurden, sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tab. 15 Messparameter der Sekretase-Assays aus isolierten Membranen

Sekretase	Extinktionswellenlänge	Emissionswellenlänge	Zyklusanzahl & Intervall
α -Sekretase	340 \pm 10nm	490 \pm 10nm	120, 120sec
β -Sekretase	345 \pm 5nm	500 \pm 2,5nm	180, 60sec
γ -Sekretase	355 \pm 10nm	440 \pm 10nm	50, 180sec
TACE	340 \pm 10nm	490 \pm 10nm	120, 120sec

Um die Spezifität der Aktivitätsmessungen zu überprüfen, wurden die Aktivitäten in Anwesenheit von Inhibitoren der jeweiligen Sekretasen gemessen. Für die Inhibierung der α -Sekretase wurde 10mM EDTA/EGTA verwendet, für die β -Sekretase 2 μ M des β -Sekretase Inhibitors und für die γ -Sekretase 50 μ M des γ -Sekretase Inhibitors. Als Kontrolle dienten Ansätze, die statt der Inhibitoren das entsprechende Lösungsmittel enthielten. Die Inhibitoren wurden 15min bei 37°C unter Lichtausschluss vorinkubiert, danach erfolgte die Zugabe des jeweiligen Substrates. Die Messung der Aktivität erfolgte wie oben beschrieben. Die Umsetzung der Substrate in Anwesenheit der Inhibitoren wurde mit der der Kontrollansätze ohne Inhibitor verglichen.

3.8.1.2 Bestimmung der α -, β - und γ -Sekretase-Aktivität aus lebenden Zellen

Verwendete Puffer:

„Cell Imaging Solution“

140mM NaCl

2,5mM KCl

1,8mM CaCl₂

1mM MgCl₂

20mM Hepes, pH 7,4

Neben der Messung der Enzymaktivitäten der α -, β - und γ -Sekretase aus isolierten Plasmamembranen wurde eine Methode entwickelt, bei der die Umsetzung der spezifischen Substrate direkt von lebenden Zellen gemessen wurde. Damit war es möglich auch

Aktivitätseffekte zu erfassen, die durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Sekretasen, sowie durch Expressions- oder Proteinstabilitätseffekte zustande kommen. Hierfür wurden SH-SY5Ywt-Zellen auf 96-Loch-Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Inkubation erfolgte wie bereits beschrieben. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit bei 37°C vorgewärmter „Cell-Imaging-Solution“ gewaschen. Für die Messung wurden die gleichen Substrate wie in Tab. 14 beschrieben, mit den gleichen Extinktions- und Emissionswellenlängen wie in Tab. 15 aufgeführt, verwendet. Diese wurden in „Cell-Imaging-Solution“ angesetzt und pro Vertiefung wurden 50µl verdünntes Substrat gegeben. Die Spaltung der Substrate durch die Sekretasen wurde in einem Infinite M1000 Fluorometer (Tecan) aufgezeichnet. Dabei wurde die Z-Position, die die Ebene angibt, in der die emittierte Fluoreszenz abgelesen wird, analog zur zellulären Lokalisation der jeweiligen Sekretase gewählt. Tab. 16 fasst die eingesetzte Substratkonzentration sowie die gewählten Einstellungen am Fluorometer zusammen.

Tab. 16 Sekretase-Substrate für die Messung in lebenden Zellen

Sekretase	Substrat-konzentration	Zyklenanzahl & Intervall	Z-Position
β-Sekretase	30µM	140, 60sec	18600µm
γ-Sekretase	12,5µM	140, 60sec	18000µm
TACE	10µM	180, 60sec	18000µm

Zur Überprüfung der Spezifität der β-Sekretase-Aktivitätsbestimmung wurden die Zellen vor der Messung für 3Std. mit 1µM β-Sekretase-Inhibitor II inkubiert und danach wie oben beschrieben gewaschen. Zeitgleich mit der Zugabe des Substrats erfolgte eine erneute Zugabe von 1µM β-Sekretase-Inhibitor, so dass die eigentliche Messung in Anwesenheit des Inhibitors stattfand. Die Umsetzung des β-Sekretase Substrats der inkubierten Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt und mit der von Zellen verglichen, die statt des Inhibitors die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle enthielten. Die Spezifität der γ-Sekretase-Aktivitätsbestimmung wurde analog dazu mittels Inkubation des spezifischen γ-Sekretase-Inhibitor X (2µM) ermittelt.

3.8.1.3 Bestimmung der TACE-Aktivität des aufgereinigten Enzyms (in Kooperation mit Viola Hauptenthal)

Um den Einfluss von Amitriptylin auf die TACE-Aktivität zu analysieren, wurde 100ng aufgereinigtes TACE-Enzym (R&D Systems) mit 30µM Amitriptylin in 100µl α-Assay-Puffer inkubiert. Um die natürliche Lipidumgebung des TACE-Enzyms zu simulieren, wurden

zusätzlich 5µg eines Lipidextraktes, das mittels Lipidextraktion nach Bligh & Dyer (beschrieben in (Grimm *et al.*, 2013)) aus humanen *post mortem* Gehirnen gewonnen wurde (hergestellt von Benjamin Hundsdörfer), zugegeben. Der Inkubationsansatz wurde zunächst für 1Std. bei 4°C unter Schütteln inkubiert und danach 15min im Ultraschallbad gefüllt mit Eiswasser sonifiziert. Die Proben wurden als Dreifachbestimmung auf eine schwarze 96-Loch Platte pipettiert und nach Zugabe von 4µM TACE-Substrat wurde die Umsetzung im Tecan Fluorometer wie oben beschrieben gemessen.

3.8.1.4 Bestimmung der ADAM10-Aktivität des aufgereinigten Enzyms

Um den Einfluss verschiedener Phospholipide auf die α -Sekretase-Aktivität zu analysieren, wurde analog zur in Kapitel 3.8.1.3 für TACE beschriebenen Methode mit aufgereinigtem ADAM10-Enzym (Sigma) durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität wurde das α -Sekretase-Substrat II in der in Tab. 14 angegebenen Konzentration benutzt.

3.8.2 Bestimmung der aSMase-Aktivität

(nach einem modifizierten Protokoll des aSMase-Aktivitäts-Kits von Echelon; in Kooperation mit Janine Mett)

Zur Bestimmung der aSMase-Aktivität wurde das aSMase-Aktivitäts-Assay Kit K-3200 der Firma Echelon verwendet. Im Vergleich zum Originalprotokoll wurde das Verfahren zum Zellaufschluss an die von uns verwendete Ultraschallsonde angepasst und die einzusetzende Proteinmenge ermittelt, die im Originalprotokoll nicht angegeben wird. Die zu analysierenden Zellen wurden mit kaltem 1xPBS gewaschen, in ddH₂O abgeschabt und für 30sek bei schwächster Stufe mit der Ultraschallsonde sonifiziert. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Test bestimmt und die Proben auf 1,25mg Protein pro ml H₂O eingestellt. 20µl der eingestellten Proben wurden in weiße 96-Loch-Platten pipettiert, was einer Proteinmenge von 25µg pro Vertiefung entsprach. Zusätzlich wurden eine aSMase Standard-Reihe von 0-10 Units aSMase-Enzym pro ml durch Verdünnung des im Kit enthaltenen rekombinanten aSMase-Enzyms mit H₂O angesetzt. Je 20µl jedes Standards wurden ebenfalls auf die weiße 96-Loch-Platte gegeben. Nun wurden pro Vertiefung 30µl des mitgelieferten Substrat-Puffers zugegeben und die Platte für 5min bei RT auf dem Plattenschüttler inkubiert. Das aSMase-Substrat wurde währenddessen aufgetaut und im Verhältnis 1:40 (v/v) in Substrat-Puffer unter Vortexen verdünnt. Pro Vertiefung wurden 50µl dieser Substrat-Lösung zugegeben, die Platte mit einer Folie verschlossen und für 3Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 50µl der Stopp-Lösung pro Vertiefung zugegeben und nach einer

weiteren 10minütigen Inkubation bei RT wurde die Aktivität der aSMase im Safire-Fluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 360nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm aufgezeichnet.

3.8.3 Bestimmung der nSMase-Aktivität

(nach einem modifizierten Protokoll des Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kits, beschrieben in der Dissertation von Herrn Dr. Marcus Grimm)

Für die Bestimmung der nSMase-Aktivität wurde das Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die benötigten Lösungen wurden wie folgt angesetzt:

Tab. 17 Herstellung der Lösungen für die Bestimmung der nSMase-Aktivität

Gebrauchslösung	Anzusetzen aus
1x Reaktionspuffer	5x Stock 1:5 (v/v) in H ₂ O, bei RT gelagert
10mM Amplex Red	1 Amplex Red-Aliquot in 100µl DMSO, unter Lichtausschluss bei -20°C gelagert
HRP-Lösung	200 Units HRP in 1ml 1xReaktionspuffer, bei -20°C gelagert
Choline-Oxidase-Lösung	12 Units Choline-Oxidase in 600µl 1xReaktionspuffer, bei -20°C gelagert
Alkalische Phosphatase-Lösung	500 Units Alkalische Phosphatase in 1,25ml 1xReaktionspuffer, bei -20°C gelagert
2% Triton X-100 (v/v)	130µl 20% Triton X-100 in 1,17ml 1xReaktionspuffer, frisch angesetzt
0,5mM Sphingomyelin	60µl Sphingomyelin-Stocklösung in 1,14ml 2% Triton X-100, frisch angesetzt
Startpuffer	8,5ml 1x Reaktionspuffer 100µl HRP STOCK 100µl Cholin-Oxidase STOCK 200µl Alkalische Phosphatase STOCK 1ml Sphingomyelin STOCK 100µl Amplex Red® STOCK

Die Startlösung wurde vor jeder Messung frisch angesetzt und bis zu ihrer Verwendung dunkel gelagert.

Das Protokoll des Herstellers wurde um die Methode des Zellaufschlusses und der einzusetzenden Proteinmenge weiterentwickelt, über die dort keine Angaben gemacht werden. Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst mit kaltem 1xPBS gewaschen und in 1xReaktionspuffer mittels Teflonhomogenisator mechanisch aufgeschlossen. Der Proteingehalt wurde über den BCA-Test bestimmt und die Proben wurden auf 300µg Protein pro ml in 1xReaktionspuffer eingestellt. 100µl der eingestellten Proben wurden in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Loch-Platte als Dreifachbestimmung pipettiert, was einer Proteinmenge von 30µg pro Vertiefung entsprach. Nach der Zugabe von 100µl Startpuffer pro Vertiefung wurde die Platte für 30min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Aktivität der nSMase wurde im Safire-Fluorometer mit einer Extinktionswellenlänge von 530nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm kontinuierlich aufgezeichnet.

3.9 Isolation von Lipid Rafts

(nach einer Methode aus der Dissertation von Herrn Dr. Marcus Grimm; in Kooperation mit Viola Hauptenthal)

Verwendete Puffer:

MBST

25mM MES, pH 6,5

150mM NaCl

0,1% Triton X-100

90%, 35% und 5% (w/v) Saccharose-Lösungen wurden durch Lösen der entsprechenden Menge Saccharose in MBST hergestellt.

Für die Isolation der Lipid Rafts wurden pro Ansatz drei inkubierte 10cm² Zellkulturschalen benötigt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem MBST gewaschen, in MBST abgeschabt und mit Hilfe des Teflonhomogenisators mechanisch homogenisiert. Zusätzlich wurden die Proben je fünfmal durch eine 24G-Kanüle gezogen. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Test bestimmt und die Proben auf 5mg Protein pro ml eingestellt. In einem Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 1,2ml der eingestellten Probe mit 1,2ml der 90%igen Saccharose-Lösung gemischt. Darüber wurden vorsichtig 4ml der 35%igen Saccharose-Lösung und dann 4,5ml der 5%igen Saccharose-Lösung geschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte für 18Std. bei 35000rpm und 4°C in einer Beckman

Ultrazentrifuge unter Verwendung des SW 41 Rotors. Danach wurden von oben 16 einzelne Fraktionen von je 680µl von jedem Gradienten abgenommen, diese wurden dann mittels Western Blot Analyse auf die Markerproteine Flotillin und Cadherin untersucht. Dafür wurden je 10µl jeder Fraktion mit 5µl 3xProtein-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und die Proteine wurden wie unter 3.7.5 – 3.7.7 beschrieben aufgetrennt und detektiert. Die Fraktionen, in denen der Lipid Raft-Marker Flotillin detektiert wurde (in der Regel Fraktion 7-9), wurden vereinigt und zur weiteren Analyse verwendet. Als Non-Raft Fraktionen wurden die Cadherin-positiven Fraktionen (11-16) vereinigt.

Zur Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität wurden je 100µl der vereinigten Lipid Raft und Non-Raft Fraktionen als Dreifachbestimmung auf eine schwarze 96-Loch Safire-Platte pipettiert und die Sekretase-Aktivität wie unter 3.8.1 beschrieben fluorometrisch bestimmt. Alternativ wurden die isolierten Lipid Raft Fraktionen zur Analyse der Sphingomyelin- und Ceramidspiegel wie unter 3.10 beschrieben eingesetzt. Zur Bestimmung von Proteinspiegeln wurden die vereinigten Lipid Raft Fraktionen wie unter 3.7.5 – 3.7.7 beschrieben per Western Blot Verfahren analysiert.

3.10 Isolation von Endosomen

(Protokoll entwickelt in Anlehnung an die Optiprep-Anwendungshinweise von Axis-Shield)

Benötigte Lösungen:

Homogenierungspuffer	Verdünnungspuffer	Optiprep-Gradientenmedium
250mM Saccharose	250mM Saccharose	60% Iodixanol
140mM NaCl	140mM NaCl	
1mM EDTA	3mM EDTA	
20mM Tris/HCl, pH 8	60mM Tris/HCl, pH 8	

Die Isolation von Endosomen erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation über einen Iodixanol-Gradienten.

SH-SY5Y wt Zellen wurden nach der Inkubation dreimal mit kaltem 1xPBS gewaschen, in 400µl Homogenisierungspuffer pro Schale abgeschabt und durch 20maliges Pottern bei 1000rpm homogenisiert. Die Proben wurden auf 5mg Protein pro ml eingestellt und bei 700g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Gradientenmedien mit 40%, 30%, 20% und 10% Iodixanol durch Verdünnen des Optiprep-Gradientenmediums mit Verdünnungspuffer angesetzt. Zunächst wurden diskontinuierliche Gradienten durch

Überschichten der Gradientenmedien zu je 2,5ml in 13,2ml Ultrazentrifugenröhrchen hergestellt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und in eine waagerechte Position gebracht. Durch die waagerechte Lagerung für 1Std. bei RT bildet sich ein kontinuierlicher Gradient aus. Die Röhrchen wurden vorsichtig aufgerichtet und der Überstand der zentrifugierten Proben wird darauf geladen. Nach Ultrazentrifugation für 18Std. bei 48.000g und 4°C in einem Swing-out-Rotor (Beckman, SW41) wurden von jedem Gradienten 20 Fraktionen zu je 550µl von oben abgenommen. Mittels spezifischem AK gegen den Endosomen-Marker EEA1 („early endosomal antigen 1) wurden im Western Blot die Fraktionen identifiziert, in denen die Endosomen enthalten waren. Diese wurden vereinigt und für die Analyse der β -Sekretase-Aktivität oder für Western Blots weiterverwendet.

3.11 Lipidanalytische Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Lipidklassen aus humanen *post mortem* Gehirnen und aus inkubierten Zellen massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurde ein 4000 QTrap ESI-MS (ABSciex, Darmstadt) verwendet. Abhängig von der zu untersuchenden Lipidspezies kamen dabei verschiedene Methoden zur Aufreinigung und Anreicherung zum Einsatz.

3.11.1 Analyse der Sphingomyeline, PC- und PE-Plasmalogene

(in Kooperation mit Sven Grösgen)

Verwendete Lösungen:

PITC-Lösung

Ethanol/ H₂O/ Pyridine (1:1:1; v/v/v)
+ Phosphoisothiocyanat (PITC) 1:20

Laufpuffer A

H₂O/ Methanol (3:97; v/v)
+ 5mM Ammoniumacetat

Zur massenspektrometrischen Analyse der Sphingomyeline und der PC- und PE-Plasmalogene (PC-PL, PE-PL) wurden die inkubierten Zellen sowie die humanen Gehirnproben in ddH₂O mechanisch homogenisiert und der Proteingehalt mittels BCA-Analyse bestimmt. Die Proben wurden auf 6mg Protein pro ml für Zellen und auf 10mg/ml für Gehirnproben eingestellt. In die Vertiefungen einer 96-Loch-Sterilfilterplatte, die auf einer 96-Loch-Sammelplatte klebt, wurden kreisförmig ausgestanzte Whatman-Papiere mit einem Durchmesser von 5mm gelegt. In jede Vertiefung wurden 10µl der eingestellten Proben gegeben und diese unter Stickstoffstrom für 30min bei RT getrocknet. Auf die getrockneten

Proben wurden 20µl PITC-Lösung pipettiert und nach einer Inkubation bei RT für 20min wurden die Proben wiederum für 30min unter Stickstoffstrom getrocknet. Den Proben wurden dann 300µl 5mM Ammoniumacetat in Methanol zugegeben, und nach einer 30minütigen Inkubation bei RT unter Schütteln wurde die Platte für 2min bei 500g zentrifugiert, wobei die Proben durch die Sterilfilterplatte liefen und in der Sammelplatte aufgefangen wurden. Nach Zugabe von 600µl Laufpuffer A pro Vertiefung wurde die Platte für 2min auf dem Plattenschüttler inkubiert und mit einer Silikonmatte verschlossen. Die Platte wurde in den auf 10°C vorgekühlten Autosampler gestellt und die Messung wurde gestartet. Die Proben wurden mit folgendem Gradienten aus Laufpuffer A injiziert: 0-2,4min: 30µl; 2,4-3min: 200µl; 3min: 30µl.

Folgende MRM (multi reaction monitoring) Paarungen wurden zur Detektion verwendet:

Tab. 18 MRM Paarungen zur massenspektrometrischen Detektion der SM-Spezies

Metabolit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	Metabolit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
SM (18:1/14:1 OH)	689,6	184	SM (18:1/22:2 OH)	799,7	184
SM (18:1/16:0)	703,6	184	SM (18:1/22:3)	781,6	184
SM (18:1/16:1)	701,6	184	SM (18:1/24:0)	815,7	184
SM (18:1/16:1 OH)	717,6	184	SM (18:1/24:1)	813,7	184
SM (18:1/18:0)	731,6	184	SM (18:1/24:1 OH)	829,7	184
SM (18:1/18:1)	729,6	184	SM (18:1/26:0)	843,7	184
SM (18:1/20:2)	755,6	184	SM (18:1/26:1)	841,7	184
SM (18:1/22:1 OH)	801,7	184			

Tab. 19 MRM Paarungen zur massenspektrometrischen Detektion der PC-PL

Metabolit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	Metabolit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
PCae C34:1	746,6	184	PCae C38:6	792,6	184
PCae C36:4	768,6	184	PCae C38:5	794,6	184
PCae C36:2	772,6	184	PCae C38:4	796,6	184
PCae C36:1	774,6	184	PCae C40:6	820,6	184

Zur Detektion der PE-Plasmalogene wurde ein „Precursor Ion Scan“ mit einer Masse von 141 m/z verwendet und die PE-PL Spezies wurden anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert.

Tab. 20 Molekulargewichte zur massenspektrometrischen Detektion der PE-PL

Metabolit	[m/z]	Precursor [m/z]	Metabolit	Q1 [m/z]	Precursor [m/z]
PEae C36:4	728,8	141	PEae C38:5	754,8	141
PEae C36:2	732,8	141	PEae C38:4	756,8	141
PEae C38:6	752,8	141	PEae C40:6	780,8	141

3.11.2 Analyse der Ceramide

(nach einem modifizierten Protokoll von Gu *et al.*)

Verwendete Lösungen:

CH₃OH/ HCl-Lösung

Methanol

ddH₂O

1M HCl

im Verhältnis 95:5:0,5 (v/v/v)

CHCl₃/ CH₃OH-Lösung

Chloroform

Methanol

im Verhältnis 95:5 (v/v)

Zur Analyse der Ceramide wurde zunächst eine Lipidextraktion nach Gu *et al.* (Gu *et al.*, 1997) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in ddH₂O mechanisch aufgeschlossen und der Proteingehalt mittels BCA-Analyse bestimmt. Die auf 6mg Protein pro ml eingestellten Proben wurden 1:10 mit CH₃OH/ HCl-Lösung verdünnt und für 1min bei 4°C sonifiziert. Nach 10minütiger Inkubation bei RT unter Schütteln wurden den Proben 300µl H₂O und 500µl CHCl₃ zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 10min unter Schütteln. Durch eine Zentrifugation für 10min bei 5000rpm bildeten sich 3 Phasen aus: die obere, wässrige Phase enthält Zucker, während die Interphase die Proteine beinhaltet. Die untere Phase, die die Lipide enthält, wurde isoliert. Die obere Phase wurde ein weiteres Mal nach Zugabe von 700µl CHCl₃ unter Schütteln für 10min inkubiert und bei 5000rpm für 10min zentrifugiert. Wiederum wurde die untere Lipidphase isoliert und mit der Lipidphase aus der ersten Extraktion vereinigt. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel in einer Speedvac wurden die extrahierten Lipide in 300µl CHCl₃/ CH₃OH-Lösung aufgenommen. Nach der Zugabe von 600µl Ammoniumacetat-Lösung (5mM Ammoniumacetat in Methanol) wurden die Proben 10min bei RT unter Schütteln inkubiert, bevor sie in eine 96-Loch-Platte überführt und dann

mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Als Abweichung vom Originalprotokoll wurde hierfür ein 4000 QTrap ESI-MS (ABSciex, Darmstadt) verwendet.

Zur Detektion der Ceramide wurde ein "Precursor Ion Scan" mit der Masse von 500-700 m/z verwendet und die Ceramid Spezies wurden anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert:

Tab. 21 Molekulargewichte zur massenspektrometrischen Detektion der Ceramide

Ceramid	m/z (Da)	Ceramid	m/z (Da)
C18:1/C14:0	510,7	C18:2/C22:0	620,7
C18:1/C16:0	538,7	C18:2/C23:0	634,7
C18:1/C18:1	564,7	C18:1/C24:1	648,7
C18:1/C18:0	566,7	C18:1/C26:1	676,7
C18:1/C20:0	594,7		

3.12 Methoden zur Bestimmung der A β -Aggregation

3.12.1 Aufarbeitung der A β -Peptide

(in Kooperation mit Benjamin Hundsdörfer)

Für alle Methoden zur Bestimmung der A β -Aggregation wurden die verwendeten A β -Peptide zunächst so vorbehandelt, dass ausgeschlossen werden konnte, dass diese bereits in Aggregaten vorlagen. Dazu wurde das pulverförmige A β in 10 μ M NH₄OH gelöst und für 30min im Ultraschallbad sonifiziert. Danach wurde das gelöste A β mittels Zentrifugation bei 13000rpm für 10min bei 4°C durch einen 0,22 μ m Ultrafree Durapore PVDF-Filter (Millipore) und darauffolgend für 90min durch einen 30k- Amicon Ultra-Filter (Millipore) aufgereinigt, so dass nur noch monomere A β -Peptide in der Lösung vorlagen. Die Konzentration der A β -Peptide in der Lösung wurde mittels BCA-Test bestimmt.

3.12.2 Thioflavin T-Assay

(in Kooperation mit Benjamin Hundsdörfer bzw. Lukas Schwarz)

Bei dieser Methode zur Bestimmung des Aggregationsverhaltens von A β -Peptiden macht man sich die Eigenschaft des Benzothiazol-Farbstoffs Thioflavin T (ThT) zu Nutze, an β -Faltblattreiche Strukturen, wie sie in A β -Aggregaten vorliegen, zu binden. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des typischen ThT-Emissionsspektrums (LeVine, 1993, 1997).

Um den Einfluss von Lipiden auf die A β -Aggregation zu untersuchen, wurden diese in einer finalen Konzentration von 10 μ M mit 50 μ M A β und 20 μ M ThT in einem Endvolumen von 100 μ l in 1xPBS in den Vertiefungen einer 96-Loch-Quarzplatte inkubiert. Die Aggregation wurde als Kinetik in einem Safire-Fluorometer mit einer Extinktionswellenlänge von 450nm \pm 5nm und einer Emissionswellenlänge von 482nm \pm 10nm unter Lichtausschluss kontinuierlich aufgezeichnet. Im Verlaufe dieser Arbeit wurde das Protokoll weiterentwickelt und fortan 18 μ M synthetisches A β 42 und 19,6 μ g/ml ThT für die Messung eingesetzt.

3.12.3 Dot-Blot-Analyse von A β -Aggregaten

(in Kooperation mit Benjamin Hundsdörfer bzw. Lukas Schwarz)

Zur Analyse von A β -Aggregaten mittels Dot-Blot-Verfahren wurden 18 μ M A β 42, das zuvor wie oben beschrieben aufbereitet wurde, mit 10 μ M der zu analysierenden Lipide in 1xPBS für 24Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 10 μ l dieses Inkubationsansatzes wurden unter Verwendung eines 96-well Dot-Blotters der Firma Scie-Plas (Cambridge, UK) auf eine Nitrozellulose Membran (Whatman, Dassel) mit einer Porengröße von 0,2 μ M aufgetragen. Für die Detektion von A β -Fibrillen wurde der OC-Antikörper (AB2286, Millipore, Billerica, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 mit dem korrespondierenden Sekundär-AK Anti-rabbit (A10547) der Firma Invitrogen verwendet. A β -Oligomere wurden mit dem A11-AK (AHB0052, Invitrogen) in einer Konzentration von 1 μ g/ml und dem Sekundär-AK Anti-rabbit W401B (Promega, Mannheim) detektiert.

3.12.4 Rasterkraft-Mikroskopie

(in Zusammenarbeit mit Benjamin Hundsdörfer im Rahmen einer Kooperation mit der AG Prof. E. Wanker am Max-Dellbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch)

Für die Analyse von A β -Aggregaten mit dem Rasterkraft-Mikroskop (AFM, engl.: atomic force microscope) wurde der gleiche Inkubationsansatz, wie oben für die Dot-Blot-Analyse beschrieben, verwendet. Zunächst wurde ein ca. 5x5 mm großes Glimmer-Stück (Nanoworld, Neuchatel, Schweiz) mit 2-Komponenten-Kleber auf einem Objektträger befestigt. Die oberste Schicht dieses Glimmers wurde vor dem Auftragen der Proben mit einem Klebestreifen abgezogen, um Staub zu entfernen. Danach wurden 15 μ l der Proben auf den Glimmer aufgetragen und für 5min inkubiert, bevor die restliche Flüssigkeit mit einem Tuch entfernt wurde. Zum Entfernen von Salzen wurde der Glimmer mehrmals mit jeweils 20 μ l ddH₂O gewaschen und dann für 24Std. getrocknet. Die Aufnahmen von 10x10 μ m mit 512x512 Pixeln wurden mit dem AFM NanoWizard II (JPK Instruments, Berlin), montiert auf

einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit der Kamera HAL 100 und mit einer Messfrequenz von 1 Hz im Intermitted Contact (Air)-Mode angefertigt.

3.12.5 Transmissionselektronenmikroskopie

(in Kooperation mit Benjamin Hundsdörfer)

Für die Aufnahmen von A β -Aggregaten im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde synthetisches A β 42 in einer finalen Konzentration von 10 μ M mit 100 μ M der zu untersuchenden Fettsäuren für 24Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 7 μ l dieses Ansatzes wurden auf einen Kupfer-Grid (G220T7, Agar Scientific Limited) aufgetragen. Nach einer 5minütigen Inkubation wurde der Kupfer-Grid zweimal mit ddH₂O und einmal mit 1% Uranylacetat gewaschen. Nachdem der Grid vollständig getrocknet war, konnten die Aufnahmen mit einem Tecnai Biotwin 120 TEM angefertigt werden.

3.13 Bestimmung des oxidativen Stresses

3.13.1 Bestimmung mittels Aminophenylfluorescein (APF)

Mit APF werden verschiedene reaktive Sauerstoffspezies wie Hypochlorit (OCI⁻), Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit nachgewiesen, indem diese das Fluoreszenzspektrum des APF verändern.

Die Gehirnproben wurden zunächst mit 4°C kaltem PBS gewaschen und mittels Pottern homogenisiert. Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 75 μ g/100 μ l in PBS eingestellt und mit 1,15 μ l APF/100 μ l für 15min unter Lichtausschluß in einer schwarzen 96-Loch-Platte inkubiert. Die Fluoreszenz wird bei 37°C mit einer Extinktionswellenlänge von 490nm und einer Emissionswellenlänge von 515nm im Safire-Fluorometer aufgezeichnet.

3.13.2 Bestimmung mittels Amplex Red

(nach einem modifizierten Protokoll von Molecular Probes)

Da die APF-Methode nur begrenzt Wasserstoffperoxid detektiert, wurde als weiterer Nachweis das Amplex Red-H₂O₂-Assay Kit verwendet. In Anwesenheit von H₂O₂ reagiert HRP zu Resorufin. Verglichen mit dem Originalprotokoll des Herstellers wurde die Methode um die Art des Gewebeaufschlusses sowie die einzusetzende Proteinmenge erweitert, über die das Protokoll keine Angaben macht.

Benötigte Puffer und Lösungen:

Tab. 22 Herstellung der Lösungen für die Bestimmung von H₂O₂

Gebrauchslösung	Anzusetzen aus
1x Reaktionspuffer	5x Stock 1:5 (v/v) in H ₂ O, bei RT gelagert
10mM Amplex Red	1 Amplex Red-Aliquot in 200µl DMSO, unter Lichtausschluss bei -20°C gelagert
HRP-Lösung	200 Units HRP in 1ml 1xReaktionspuffer, bei -20°C gelagert
Waschpuffer	0,1M Tris/HCl pH 7,5
Startpuffer	8,5ml Waschpuffer 100µl HRP-Lösung 100µl Amplex Red® Lösung

Die Gehirnproben wurden analog Kapitel 3.13.1 homogenisiert und auf eine Proteinkonzentration von 150µg/100µl in Waschpuffer eingestellt. Die Proben wurden zu je 50µl in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Loch-Platte gegeben und nach Zugabe von 50µl der Startlösung wurde die Platte 15min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Entstehung des Resorufins als Nachweis für H₂O₂ wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 530nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm im Safire-Fluorometer aufgezeichnet.

4 Ergebnisse

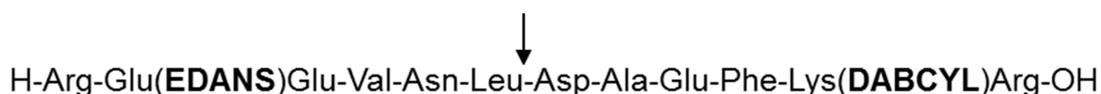
4.1 Weiterentwicklung und Validierung von Methoden zur Messung der Sekretase-Aktivitäten

4.1.1 Messung der Sekretase-Aktivität aus isolierten Plasmamembranen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Lipide auf die APP-Prozessierung untersucht. Neben der Analyse der APP-Spaltprodukte sollten auch die Aktivitäten der beteiligten Sekretasen, dabei besonders der am amyloidogenen Prozessierungsweg beteiligten β - und γ -Sekretase, untersucht werden. Dazu wurden bereits etablierte Methoden modifiziert und verschiedene Varianten zur direkten Messung der Sekretase-Aktivitäten etabliert.

Generell beruhen die Methoden zur Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten auf einem FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) basierten System. Spezifische Substrate der β - und γ -Sekretase, bestehend aus einem Fluorophor und einem Quencher, verbunden über eine Aminosäure-Sequenz, die eine Schnittstelle für die jeweilige Sekretase trägt, werden dabei durch die Sekretasen geschnitten und so der Quencher vom Fluorophor abgespalten. Dadurch wird der Energietransfer der fluoreszierenden Donorgruppe zur quenchenden Akzeptorgruppe unterbrochen, wodurch es nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Freisetzung von Fluoreszenz durch den Fluorophor kommt (Förster, 1948).

Als β -Sekretase-Substrat wurde ein Ausschnitt der APP_{swedish}-Sequenz mit der Schnittstelle für die β -Sekretase verwendet, als Fluorophor trägt das Substrat EDANS (5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonsäure), welches von Dabcyl (4-(4-Dimethylaminophenyl)-Diazenylbenzoesäure) intern gequencht wird:



Das Substrat, das für die Messung der γ -Sekretase-Aktivität verwendet wurde, trägt N-Methylantraniloylamide (NMA) als Fluorophor und 2,4-Dinitrophenyl (DNP) als Quencher. Diese sind verbunden über eine Sequenz des β -CTFs, das die γ -Sekretase-Schnittstelle trägt:



Zur Ermittlung der optimalen Messparameter wurden zunächst Extinktionsspektren der beiden Substrate aufgenommen. Hierfür wurden isolierte Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen wie unter Kapitel 3.8 beschrieben mit den Substraten für 30min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert und danach im Fluorometer die entsprechenden Scans durchgeführt (Abb. 7).

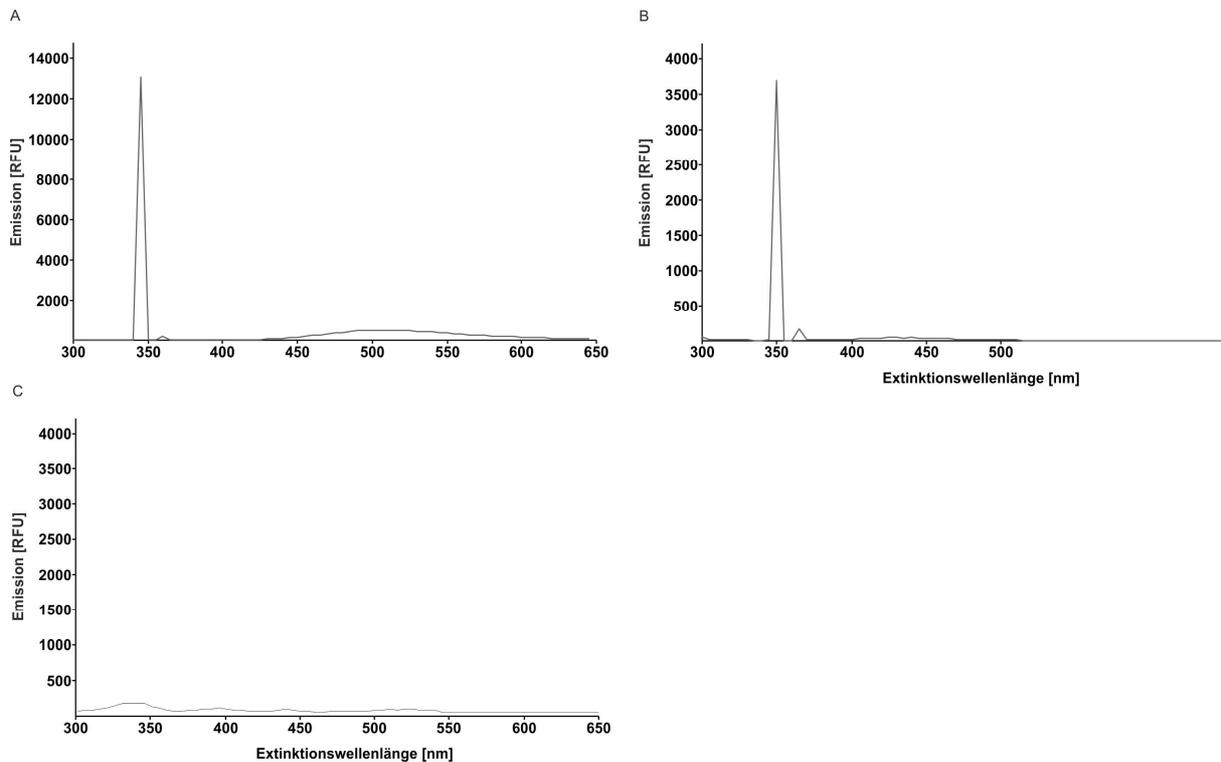


Abb. 7 Extinktionsscan der Substrate

A) β -Sekretase-Substrat, B) γ -Sekretase-Substrat, C) Hintergrundkontrolle

Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen wurden für 30min mit den Substraten inkubiert und danach im Fluorometer ein Scan durchgeführt, bei dem die Extinktionswellenlänge in 2nm Schritten verändert wurde. Als Hintergrundkontrolle dienen isolierte SH-SY5Y Membranen, die statt dem Substrat die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO enthielten.

Die Extinktionswellenlänge wurde entsprechend der Extinktionsmaxima daraufhin auf 345nm für das β -Sekretase-Substrat und auf 355nm für die Messung der γ -Sekretase festgelegt.

Mit diesen fixierten Extinktionswellenlängen wurden Emissionsspektren beider Substrate ermittelt und anhand dieser die optimalen Einstellungen für die Messung der Sekretase-Aktivitäten festgelegt (Abb. 8). Für die Messung der β -Sekretase wurde die Emissionswellenlänge auf 500nm \pm 5nm fixiert, für das γ -Sekretase-Substrat auf 440 \pm 10nm.

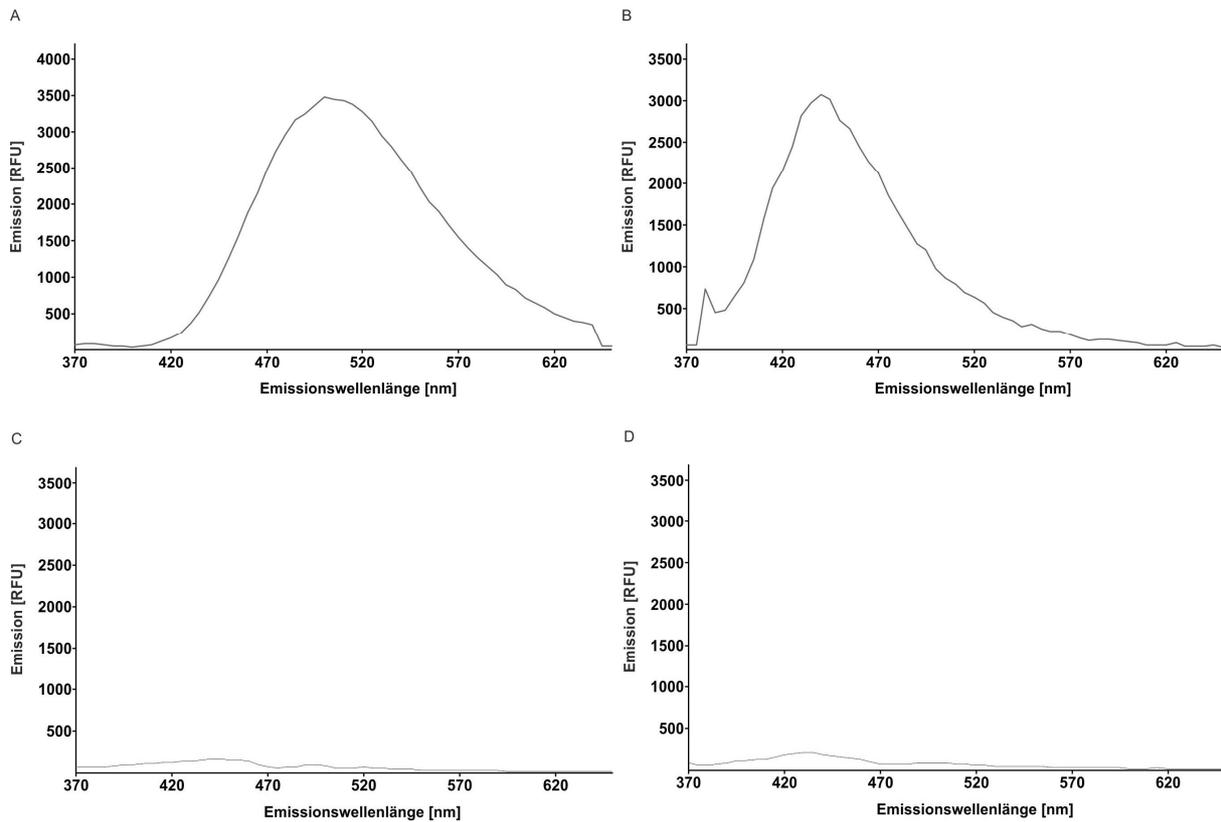


Abb. 8 Emissionsscan der Substrate

A) β -Sekretase-Substrat, B) γ -Sekretase-Substrat, C) Hintergrundkontrolle 345nm D) Hintergrundkontrolle 355nm

Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen wurden für 30min mit den Substraten inkubiert und danach im Fluorometer ein Emissionsscan durchgeführt. Es wurde bei fixierten Extinktionswellenlängen von 345nm für das β -Sekretase-Substrat und 355nm für das γ -Sekretase-Substrat die Emissionswellenlänge in 2nm Schritten verändert. Als Hintergrundkontrollen dienten SH-SY5Y Membranen, die statt der Substrate die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO enthielten.

Um zu ermitteln, ob die eingesetzte Menge an Substrat ab einer bestimmten Proteinmenge limitierend ist, wurden Messungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt, während die Konzentration des Substrates fixiert war. Die Abb. 9 zeigt verschiedene Proteinmengen, aufgetragen gegen die jeweilige Steigung der Fluoreszenz über die Zeit.

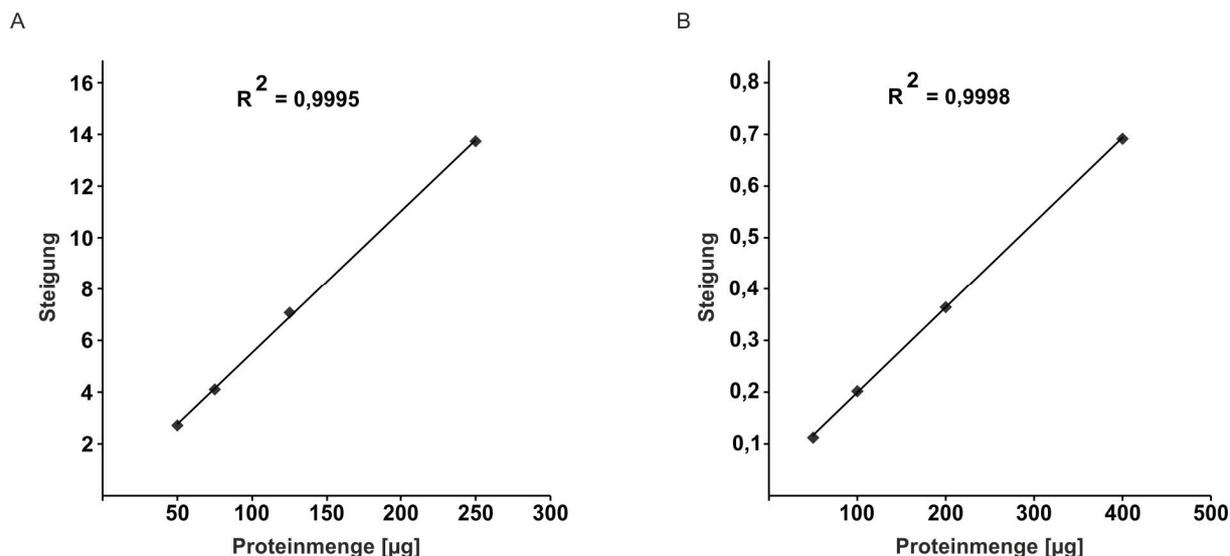


Abb. 9 Linearität des β -Sekretase- (A) und γ -Sekretase-Assays (B)

Isolierte Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen wurden mit Substraten der β - bzw. γ -Sekretase inkubiert und die emittierte Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet. Es wurde die Steigung der Fluoreszenz über die Zeit ermittelt und gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen.

Die einzusetzende Proteinmenge wurde für die Messung der β -Sekretase auf 125 μg , für die der γ -Sekretase auf 250 μg pro Ansatz festgelegt.

Um die Spezifität der Aktivitätsmessung zu erhöhen, wurden die Sekretasen zunächst durch die Isolation von Membranen aus den Zellen oder dem zu untersuchenden Gewebe, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, durch Ultrazentrifugation angereichert. Die eingesetzten Proteinmengen wurden dabei so angepasst, dass in der Folge aus einer aufgearbeiteten Probe die Messung der β - und der γ -Sekretase parallel erfolgen konnte, wodurch die Aktivitäten beider Sekretasen direkt miteinander vergleichbar waren. Um die pelletierten Membranen im Saccharose-Puffer zu solubilisieren, wurden die Proben je zehnmal durch drei verschiedene Kanülen mit immer kleiner werdendem Durchmesser gezogen. Im Verlaufe dieser Arbeit wurde das wiederholte Ziehen durch Kanülen durch eine Methode ersetzt, bei der die pelletierten Membranen mit Hilfe von Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,2mm durch starkes Schütteln in einem Minilys-Gerät der Firma Peqlab solubilisiert wurden. Dies bedeutete zum einen eine Möglichkeit mehrere Proben parallel zu bearbeiten, zum anderen reduzierte das standardisierte Lösen der Membranpellets unter festgelegten Parametern die Varianz verglichen mit dem manuellen Ziehen durch die Kanülen. Die gemessene Steigung des γ -Sekretase-Assays war nach der Aufarbeitung mittels Minilys 12% höher, verglichen mit der Aufarbeitung nach dem vorhergehenden Protokoll, was vermutlich aus der kürzeren Zeit resultiert, die die Proben bis zur Messung auf Eis stehen. Die Standardabweichung des Mittelwertes war bei drei unabhängig aufgearbeiteten Proben mit dem Minilys-Verfahren mit 1,16% nur etwa halb so hoch wie nach Aufarbeitung mit dem Standardverfahren (StabwM% = 2,26%) (Abb. 10).

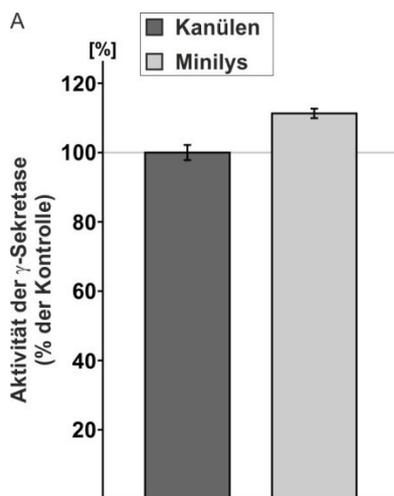


Abb. 10 Aktivität der γ -Sekretase in Abhängigkeit der verwendeten Methode zur Solubilisierung der Membranpellets

Die aus SH-SY5Y wt Zellen gewonnenen Membranpellets wurden zum einen durch wiederholtes Ziehen durch Kanülen verschiedener Durchmesser und zum anderen durch starkes Schütteln im Minilys-Gerät mit Hilfe von Glaskügelchen resuspendiert. Die Aktivität der γ -Sekretase wurde unter Verwendung eines spezifischen fluorogenen Substrats im Infinite-Fluorometer gemessen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 3 unabhängig aufgearbeiteten Proben dar.

Um die unspezifische Umsetzung der Substrate durch andere Proteasen zu minimieren wurde dem Puffer EDTA zugefügt. Entsprechend dem sauren pH-Optimum der β -Sekretase wurden die Proben vor der Messung 1:1 mit PBS pH 4,5 verdünnt, die Messung der γ -Sekretase erfolgte in Saccharose-Puffer mit einem neutralen pH-Wert von 7,4. Zur Überprüfung der Spezifität der Aktivitätsmessungen wurden die Assays in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren der Sekretasen durchgeführt (Abb. 11).

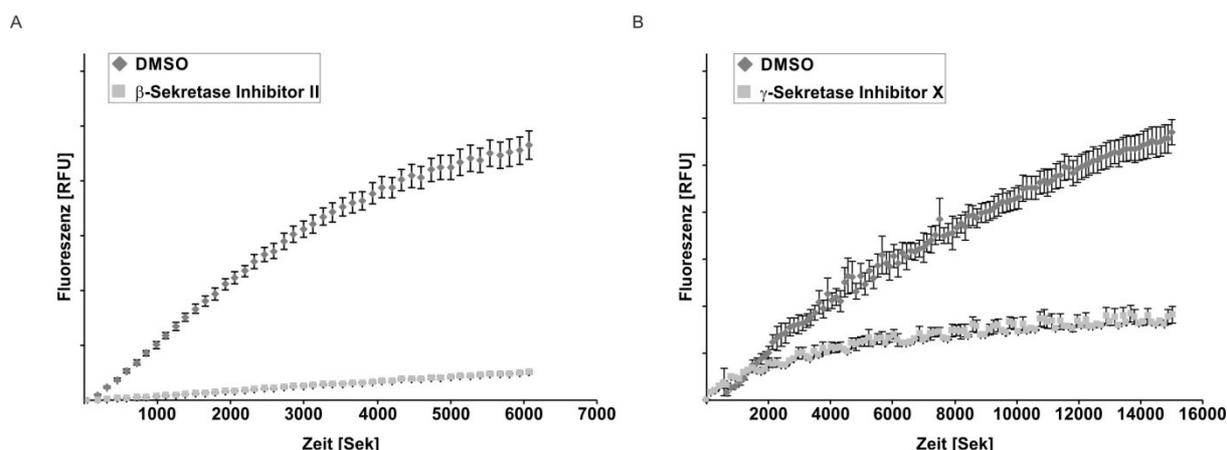


Abb. 11 Spezifität des (A) β - und (B) γ -Sekretase-Assays aus isolierten Membranen

Hierzu wurden Membranpräparationen aus SH-SY5Y wt Zellen hergestellt und diese für 15min bei 37°C mit spezifischen Inhibitoren der Sekretasen unter Lichtausschluss inkubiert, die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge DMSO. Nach Zugabe der Substrate wurde die Aktivität kontinuierlich im Infinite-Fluorometer aufgezeichnet. Die eingetragenen Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von je 3 unabhängigen Proben dar.

Wertete man die Steigung des linearen Bereichs über die Zeit aus, so ergab sich bei der Messung der β -Sekretase-Aktivität in Anwesenheit des β -Sekretase Inhibitors eine Restaktivität von 11,0% (+/- 2,1%, $p = 7,01 \times 10^{-05}$), was bedeutet, das 89,0% des Substrates unter den gewählten Konditionen spezifisch von der β -Sekretase umgesetzt werden. Bei der Messung der γ -Sekretase betrug die spezifische Umsetzung des Substrats 76,2% (+/- 5,9%, $p = 0,0005$).

4.1.2 Messung der Sekretase-Aktivität aus lebenden Zellen

Man geht davon aus, dass die Aktivität der Sekretasen neben der Expression und der Proteinstabilität auch von ihrer subzellulären Lokalisation abhängt, was beim oben beschriebenen Verfahren, bei dem die Membranen isoliert und dann solubilisiert werden, durch den Aufschluss der Organellen und Membranstrukturen nicht berücksichtigt wird. Beispielsweise hat die β -Sekretase wegen ihres sauren pH-Optimums ihre höchste Aktivität in den Zellkompartimenten mit saurem pH-Wert, wie z.B. den Endosomen (Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2008; Vassar *et al.*, 1999). Sie ist aber auch an der Plasmamembran lokalisiert, wo sie aber vermutlich eine geringere Aktivität aufweist. Ebenso wurde für die γ -Sekretase beschrieben, sie weise in den Lipid Rafts eine höhere Aktivität als außerhalb dieser Domänen auf (Hur *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2005). Werden diese Strukturen aber während des Aufschlussverfahrens der Zellen vor der Messung zerstört, werden Lokalisations-bedingte Aktivitätsunterschiede nivelliert. Aus diesem Grund wurde eine Methode etabliert, bei der die Umsetzung der Substrate von intakten lebenden Zellen gemessen werden kann. Dies bietet den Vorteil, dass alle Membranstrukturen wie zum Beispiel Lipid Rafts erhalten bleiben und die Organellen noch intakt sind. Hierfür wurden SH-SY5Y wt Zellen auf 96-Loch-Zellkulturschalen transferiert. Entscheidend dabei war, dass jede Vertiefung der Platte gleich viele Zellen enthielt. Nach Inkubation der zu untersuchenden Substanz wurden die Zellen mit einer farblosen HEPES-gepufferten Lösung gewaschen, da der rote Farbstoff des DMEMs die nachfolgende Fluoreszenzmessung störte. Die Verwendung von HEPES garantiert einen stabilen pH-Wert außerhalb des CO₂-Inkubators. Die Zugabe der Substrate erfolgte, verdünnt in der HEPES-gepufferten Lösung, direkt zu den Zellen. Um die Umsetzung auf lebenden Zellen zu messen, mussten höhere Substrat-Konzentrationen eingesetzt werden, als bei den Messungen aus isolierten Plasmamembranen. Es wurden zunächst verschiedene Konzentrationen getestet und in der Folge diejenige verwendet, bei der eine Steigung der Fluoreszenz detektiert werden konnte. Um die Ebene zu bestimmen, in der die Messung der Emission erfolgen sollte (Z-Position), musste zunächst die genaue Position der Zellen in der Platte bestimmt werden. Dazu

wurden die Zellen mit Dapi angefärbt und über die Einstellung „optimal Z-position“ am Fluorometer die Position gesucht, wo die höchste Fluoreszenz messbar war. Der ermittelte Wert wurde mit 18600µm angegeben. Dieser Wert wurde in der Folge für die Messung der β -Sekretase-Aktivität beibehalten, da die Umsetzung des β -Sekretase-Substrats intrazellulär erfolgt. Für die Messung der γ -Sekretase-Aktivität konnte dagegen in die Lösung fokussiert werden, da das von der γ -Sekretase gespaltene Substrat sezerniert wird. Hierfür wurde die Einstellung 18000µm gewählt, was laut der Positionsbestimmung per Dapi-Färbung leicht oberhalb der Zellen ist.

Für die folgenden Messungen war es essentiell, dass das Transferieren der Zellen auf die 96-Loch-Zellkulturschale, sowie das anschließende Kultivieren und Inkubieren unter streng standardisierten Bedingungen stattfand, da sonst die Konfluenz der Zellen und somit die ermittelte Z-Position nicht konstant gewesen wäre.

Analog zur Messung der Sekretase-Aktivitäten aus isolierten Membranen wurde auch hier die Spezifität der Methode mittels spezifischer Inhibitoren ermittelt (Abb. 12).

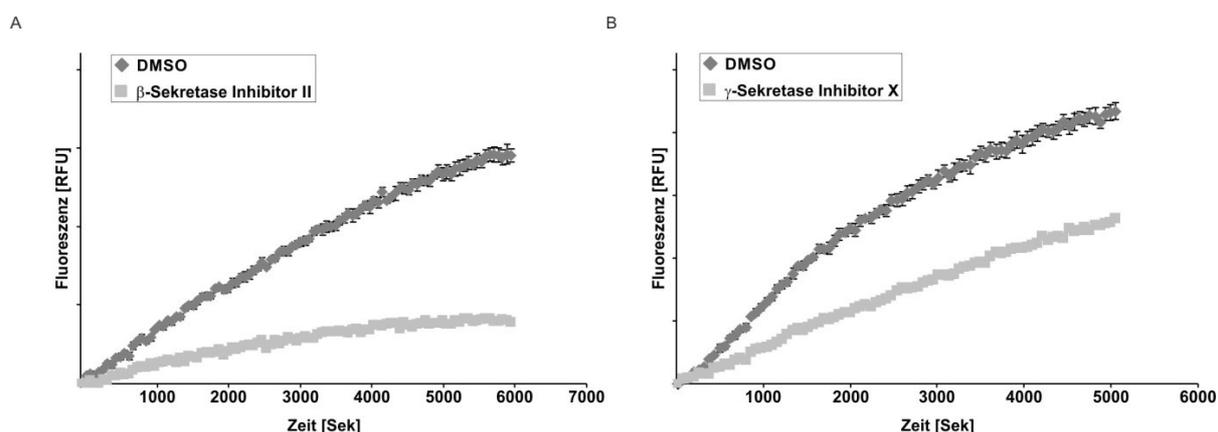


Abb. 12 Spezifität des (A) β - und (B) γ -Sekretase-Assay in lebenden SH-SY5Y wt Zellen

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 3Std. in Anwesenheit von 1µM β -Sekretase Inhibitor II bzw. 2µM γ -Sekretase Inhibitor X inkubiert. Die Zellen wurden mit HEPES-Puffer gewaschen und mit der Zugabe der Substrate wurden erneut die Inhibitoren zugesetzt. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO. Die Aktivität der Sekretasen wurde kontinuierlich in einem Infinite-Fluorometer aufgezeichnet. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 6 unabhängigen Proben dar.

Die unspezifische Umsetzung in Anwesenheit des Inhibitors betrug für die Messung der β -Sekretase 27,7% (+/- 3,0%, $p=7,67 \times 10^{-11}$), womit sie etwas höher lag als bei der Messung aus aufgereinigten Membranen. Bei der Messung der γ -Sekretase wurden 43% (+/- 0,8%, $p=1,03 \times 10^{-10}$) des Substrats in Anwesenheit des γ -Sekretase Inhibitors umgesetzt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Spezifität der Methode höher liegt, als es dieses Ergebnis vermuten lässt. Der γ -Sekretase-Inhibitor konnte in der Zellkultur mit einer maximalen Konzentration von 2µM eingesetzt werden, da sonst die Konzentration des Lösungsmittels DMSO im toxischen Bereich gewesen wäre. Bei der Messung der

Unspezifität aus isolierten Membranen, bei der wesentlich höhere Konzentrationen des Lösungsmittels toleriert werden, musste der Inhibitor 50 μ M eingesetzt werden, um eine Restumsetzung des Substrats von 24% zu erhalten.

Um eine spezifische Messung zu gewährleisten, wurden die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase nach den Inkubation zur Kontrolle unter Verwendung der jeweiligen Inhibitoren bestimmt.

4.2 Der Einfluss von *trans*-Fettsäuren auf die APP-Prozessierung

Die Ergebnisse in diesem Kapitel wurden bereits veröffentlicht in:

Grimm M.O.*, Rothhaar T.L.*, Grösgen S., Burg V.K., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Friess P., Kins S., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). *Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP)*. J Nutr Biochem, 23(10):1214-23. (*equally contributed)

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass die Lipid-Zusammensetzung zellulärer Membranen die Prozessierung des APP und damit die Produktion des in hohen Konzentrationen neurotoxischen A β -Peptids beeinflusst (Fassbender *et al.*, 2001; Frears *et al.*, 1999; Grimm *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 1996; Osenkowski *et al.*, 2008; Simons *et al.*, 1998; Wolozin, 2004).

TFA kommen heute in großen Mengen in unserer Nahrung vor (Emken, 1984). Sie machen etwa 4-12% des aufgenommenen Fettes in der amerikanischen Bevölkerung aus, was täglich etwa 13,3g TFA pro Person entspricht (Allison *et al.*, 1995; Enig *et al.*, 1990). Diese Fettsäuren können in Phospholipide eingebaut werden und so als Bestandteil zellulärer Membranen deren Eigenschaften wie z.B. die Membranfluidität verändern, was letztlich biochemische Vorgänge in der Membran beeinflusst (Alam *et al.*, 1989; Engelhard *et al.*, 1976; Ghafoorunissa, 2001; Larque *et al.*, 2003; Morgado *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb ein möglicher Einfluss der TFA im Vergleich zu den korrespondierenden *cis*-Fettsäuren auf die APP-Prozessierung und damit auf die Progression der Alzheimer Krankheit untersucht werden.

4.2.1 Der Einfluss von TFA auf die Spaltprodukte des APPs

Um einen möglichen Einfluss von TFA auf die proteolytische Spaltung des APPs zu untersuchen, wurden vier Fettsäuren ausgewählt, die typischerweise in unserer Nahrung vorkommen: die einfach ungesättigte TFA Elaidinsäure (18:1) und das korrespondierende *cis*-Isomer, die Ölsäure, sowie die zweifach ungesättigte konjugierte Linolsäure (CLA, engl.: conjugated linoleic acid) und ihr *cis*-Isomer Linolsäure. Im Unterschied zu anderen Studien, die den Einfluss von TFA untersuchten, wurden hier TFA gezielt mit ihren jeweiligen *cis*-Isomeren verglichen.

Die TFA und ihre *cis*-Isomere wurden in SH-SY5Y Zellen, die entweder mit APP695, die hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimierte APP-Isoform (Rohan de Silva *et al.*, 1997), oder dem verkürzten APP Konstrukt C99 stabil transfiziert waren, über 5 Tage inkubiert. Die ermittelte Zytotoxizität nach der Inkubation betrug für Ölsäure 0,83% (+/- 0,26%), für Elaidinsäure 0,60% (+/- 0,04%), für Linolsäure 0,98% (+/- 0,16%) und für CLA 1,29%

(+/- 0,12%). Die Mengen der APP Spaltprodukte wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Während in APP695 transfizierten Zellen die Aktivität der β - und der γ -Sekretase für die Freisetzung des A β -Peptids notwendig ist, benötigen C99 transfizierte Zellen lediglich die Aktivität der γ -Sekretase, um A β -Peptide zu sekretieren (Grimm *et al.*, 2003).

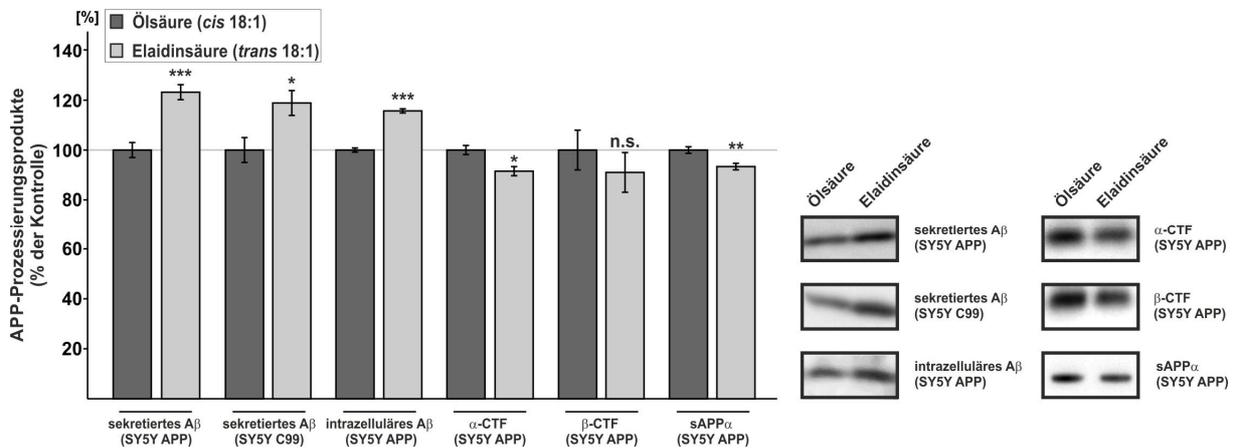


Abb. 13 Der Effekt von Elaidinsäure auf die APP-Prozessierungsprodukte

SH-SY5Y Zellen, die entweder APP695 oder das verkürzte C99 überexprimierten, wurden für 5 Tage in Anwesenheit von 50 μ M Elaidinsäure kultiviert. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des *cis*-Isomers Ölsäure. Die APP-Fragmente A β und β -CTF wurden mittels Immunopräzipitation mit dem AK W02 aus dem Inkubationsmedium (sekretiertes A β) bzw. dem Zelllysat (intrazelluläres A β und β -CTF) angereichert und per Western Blot Analyse nachgewiesen. Die Detektion des α -CTF fand nach Immunopräzipitation aus dem Zelllysat per Western Blot Analyse mit dem AK 2214 statt. sAPP α wurde direkt aus dem Inkubationsmedium per Western Blot mit dem AK W02 detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Nach der Inkubation mit Elaidinsäure war die Menge an sekretiertem A β -Peptid im Zellkulturmedium der inkubierten Zellen verglichen mit Zellen, die das *cis*-Isomer Ölsäure erhielten, sowohl bei den APP695 transfizierten, als auch bei den C99 exprimierenden Zellen signifikant erhöht (APP695: 123,2% +/- 3,01%, $p = 0,0001$; C99: 118,9% +/- 4,98%, $p = 0,023$). Die Effektstärke der APP695 transfizierten Zellen unterschied sich dabei nicht signifikant von der der C99 exprimierenden Zellen ($p = 0,719$). Auch die Menge an intrazellulären A β -Peptiden in den Zelllysaten der inkubierten Zellen war nach Inkubation der *trans*-Fettsäure erhöht auf 114,1% (+/- 0,89%, $p = 0,0007$). Die Produkte der α -Sekretase vermittelten nicht amyloidogenen Prozessierung des APPs, sAPP α und α -CTF, waren in SH-SY5Y APP695 Zellen in Anwesenheit der *trans*-Fettsäure Elaidinsäure, signifikant auf 93,9% (+/- 1,31%, $p = 0,0027$) bzw. 92,0% (+/- 1,38%, $p = 0,011$) reduziert. Das auf dem amyloidogenen Weg entstehende β -CTF war nicht signifikant auf 91,6% (+/- 7,97, $p = 0,411$) geändert (Abb. 13).

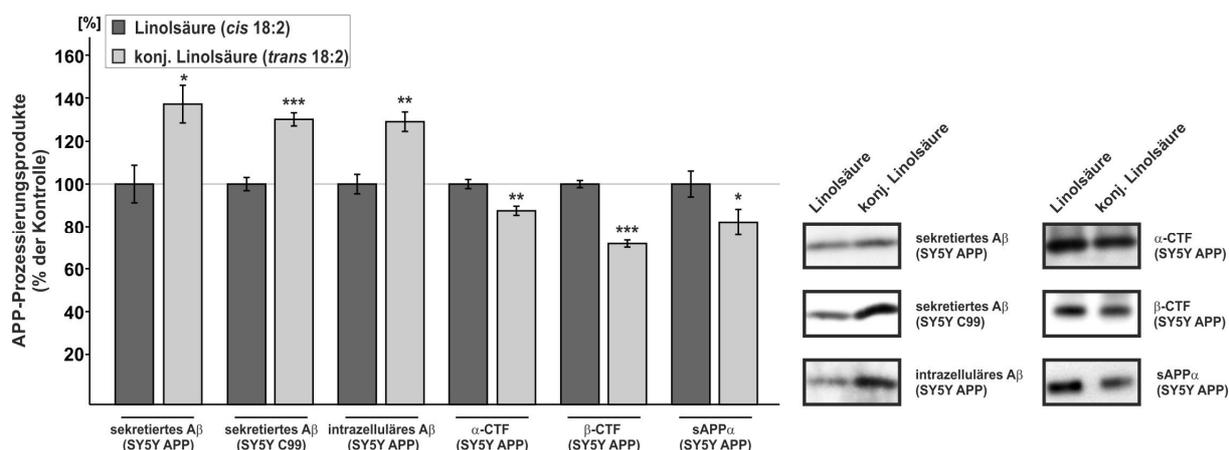


Abb. 14 Der Effekt von CLA auf die APP-Prozessierungsprodukte

SH-SY5Y Zellen, die entweder APP695 oder das verkürzte C99 überexprimierten, wurden für 5 Tage in Anwesenheit von 50 μ M CLA kultiviert. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des *cis*-Isomers Linolsäure. Die Analyse der APP-Fragmente sowie statistische Auswertung erfolgte wie für Abb. 13 beschrieben.

Inkubierte man die zweifach ungesättigte CLA auf SH-SY5Y APP695 bzw. SH-SY5Y C99, war die Menge an sekretierten A β -Peptiden ebenfalls signifikant erhöht. Der Effekt war hier mit 135,8% (+/- 8,50%, $p=0,041$) bzw. 128,9% (+/- 2,98%, $p=4,0 \times 10^{-5}$) verglichen mit dem der einfach ungesättigten Elaidinsäure stärker ausgeprägt, die Effektstärken unterscheiden sich aber nicht signifikant voneinander (siehe Tab. 23). Weiterhin ergab sich keine Signifikanz zwischen der Effektstärke der A β -Level der SH-SY5Y APP695 und der der C99 transfizierten Zellen ($p=0,732$). Die Bestimmung des intrazellulär vorliegenden A β ergab ebenfalls erhöhte Werte von 127,7% (+/- 4,39%, $p=0,003$) bei Zellen, die mit der TFA inkubiert wurden, verglichen mit denen der Zellen, die das *cis*-Isomer, die Linolsäure erhielten. Die α -Sekretase Produkte α -CTF und sAPP α waren, wie nach der Inkubation mit Elaidinsäure, auch nach einer Behandlung mit CLA signifikant auf 87,6% (+/- 2,06%, $p=0,005$) bzw. 82,4% (+/- 5,88%, $p=0,018$) reduziert. Im Gegensatz zur Inkubation mit Elaidinsäure, war nach der mit CLA verglichen mit der korrespondierenden *cis*-Fettsäure, das β -Sekretase Produkt β -CTF signifikant auf 72,5% (+/- 1,62%, $p=3,0 \times 10^{-5}$) verringert (Abb. 14).

Beide TFA führten also, inkubierte man sie über 5 Tage auf SH-SY5Y Zellen, zu einer Erhöhung der A β -Produktion, also möglicherweise zu einer Verschiebung der APP-Prozessierung vom nicht amyloidogenen hin zum amyloidogenen Weg. Die Effektstärken der zweifach ungesättigten CLA waren tendenziell größer, als die der einfach ungesättigten Elaidinsäure, jedoch ergab sich lediglich für das β -CTF ein signifikanter Unterschied von $p=0,046$ (siehe Tab. 23).

Tab. 23 Vergleich der Effektstärken der APP-Prozessierungsprodukte nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA

	Elaidinsäure	CLA	t-test
A β aus SH-SY5Y APP	122,15	135,76	0,546
A β aus SH-SY5Y C99	118,90	128,86	0,411
intrazelluläres A β	114,05	127,71	0,312
α -CTF	92,02	87,61	0,376
β -CTF	91,55	72,45	0,046
sAPP α	93,87	82,37	0,373

Die Effektstärken von Elaidinsäure und CLA wurden miteinander verglichen und die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt

4.2.2 Der Einfluss von TFA auf die Aktivität der β -Sekretase

Um zu überprüfen, ob die verstärkte Produktion von A β durch eine Aktivierung der amyloidogenen APP-Prozessierung bedingt ist, wurde zunächst die Aktivität der β -Sekretase nach der Inkubation der TFA in einem fluoreszenz-basierten Assay unter Verwendung eines spezifischen β -Sekretase-Substrats untersucht. Es wurden hierbei unterschiedliche Inkubationsansätze verfolgt. Der direkte Effekt auf die Aktivität der β -Sekretase konnte zum einen nach der *in vitro* Inkubation der Fettsäuren in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen und zum anderen nach der *ex vivo* Inkubation in Membranen, die aus den Gehirnen von Mäusen isoliert wurden, bestimmt werden. Bei diesen Inkubationsansätzen wurden Effekte auf die Sekretase-Aktivität die durch Gen-Expression, Proteinstabilität oder subzelluläre Lokalisation der Sekretase bedingt sind, nicht erfasst, da die Inkubation auf PNFs erfolgte.

Nach der Inkubation mit Elaidinsäure wurde eine signifikant erhöhte Aktivität der β -Sekretase, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, sowohl in den Membranen der SH-SY5Y wt Zellen (115,5% +/- 0,40%, p=0,0001), als auch in denen der Mäusegehirne (110,8% +/- 0,93%, p=0,049) gemessen (Abb. 15).

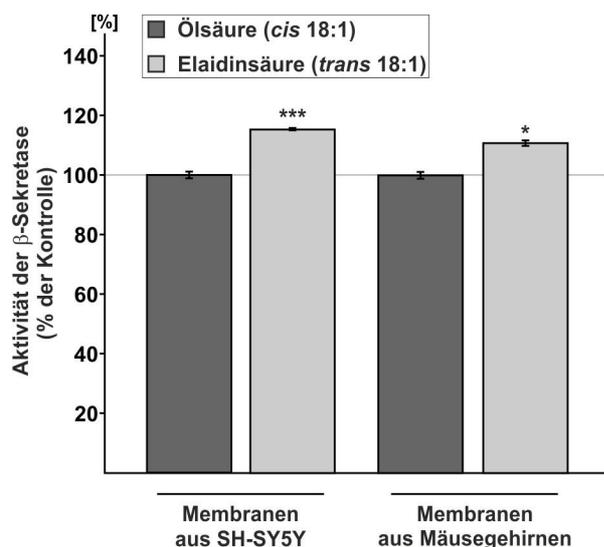


Abb. 15 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen

Postnukleäre Fraktionen aus SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit Elaidinsäure bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Ölsäure inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrates wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der β -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

In einem weiteren Ansatz wurden lebende SH-SY5Y wt Zellen über 5 Tage in Anwesenheit der Fettsäuren kultiviert und die Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität fand nach der Inkubation aus isolierten Membranen statt.

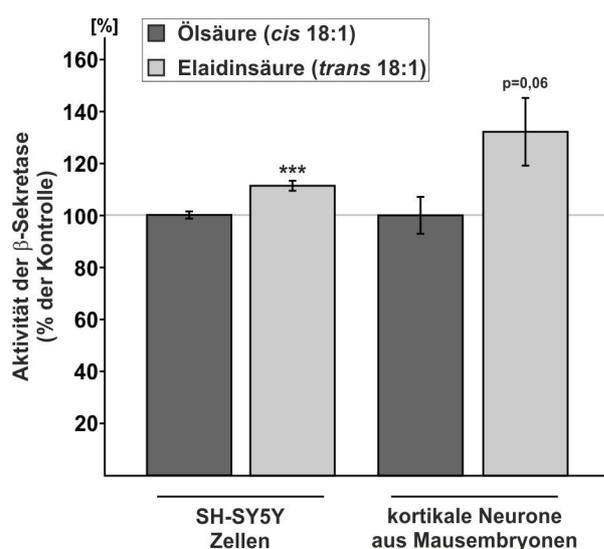


Abb. 16 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen

SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus E14 Mausembryonen gewonnene kortikale Neurone wurden in der Zellkultur mit Elaidinsäure bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Ölsäure inkubiert. Die Membranen

wurden isoliert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrates wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Auswertung und Statistik erfolgte wie für Abb. 15 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

Hierbei wurde eine Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität auf 111,5% (+/- 1,68%, $p=0,003$) nach der Inkubation mit Elaidinsäure im Vergleich zur Inkubation mit Ölsäure festgestellt. Kultivierte man kortikale Neuronen, die aus Mäuseembryonen isoliert wurden mit Elaidinsäure bzw. dem *cis*-Isomer Ölsäure, war die Aktivität der β -Sekretase in den Zellen, die mit Elaidinsäure behandelt wurden, ebenfalls um 132,2% (+/- 11,42%) erhöht, die Werte erreichten aber nicht die festgelegte statistische Signifikanzgrenze von 0,05 ($p=0,0597$) (Abb. 16).

Die zweifach ungesättigte *trans*-Fettsäure CLA führte ebenfalls in allen untersuchten Systemen zu einer signifikanten Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität. So war in den *in vitro* inkubierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen die Aktivität der β -Sekretase auf 119,1% (+/- 1,32%, $p=5,88 \times 10^{-6}$), in denen aus Mäusegehirnen auf 119,0% (+/- 1,53%, $p=0,0002$) erhöht (Abb. 17).

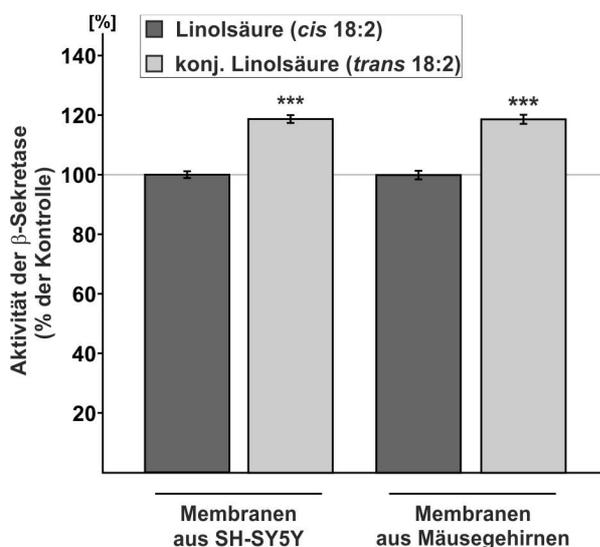


Abb. 17 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen

Postnukleäre Fraktionen aus SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit CLA bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Linolsäure inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrates wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Auswertung und Statistik erfolgte wie für Abb. 15 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

Wurde CLA in der Zellkultur auf lebenden Zellen inkubiert und die Membranen nach der Inkubation isoliert, zeigten diese sowohl bei SH-SY5Y wt Zellen als auch bei kortikalen Neuronen aus Mäuseembryonen eine erhöhte Aktivität der β -Sekretase von 110,3%

(+/- 1,52%, p=0,003) bzw. 153,8% (+/- 12,63%, p=0,026), verglichen mit Zellen, die stattdessen Linolsäure erhielten (Abb. 18).

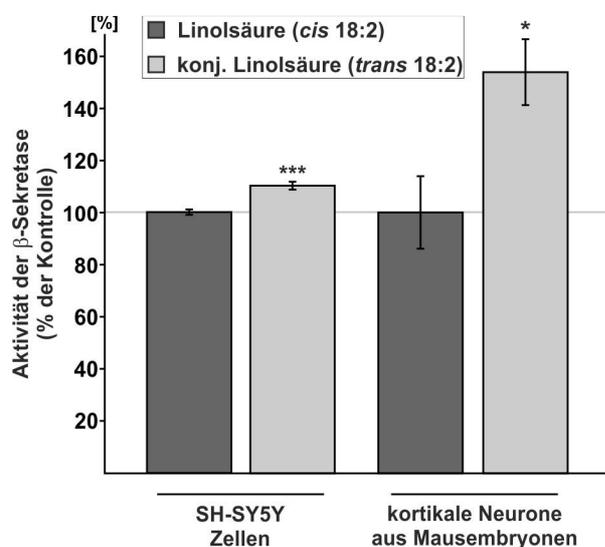


Abb. 18 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen

SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus E14 Mausembryonen gewonnene kortikale Neurone wurden in der Zellkultur mit CLA bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Linolsäure inkubiert. Die Membranen wurden isoliert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrates wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Auswertung und Statistik erfolgte wie für Abb. 15 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

Beide TFA führten also in allen verwendeten Systemen zu einer Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität und damit zu einer verstärkten Prozessierung des APP auf dem amyloidogenen Weg. Wie schon bei den APP-Prozessierungsprodukten, wurden auch bei der Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität, mit Ausnahme der Aktivität aus lebenden SH-SY5Y wt Zellen, durch CLA größere Effektstärken als durch Elaidinsäure erreicht, diese erreichten aber nicht die festgelegte Signifikanzgrenze (Tab. 24).

Tab. 24 Vergleich der Effektstärken der β -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA

Verwendetes System	Elaidinsäure	CLA	t-test
Membranen SH-SY5Y wt	115,46	119,12	0,062
Membranen Mäusegehirne	110,75	119,02	0,113
lebende SH-SY5Y wt	111,46	110,25	0,804
kortikale Neurone	132,20	153,732	0,340

Die Effektstärken der Inkubationen von Elaidinsäure und CLA auf die β -Sekretase-Aktivität wurden miteinander verglichen und die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt

4.2.3 Der Einfluss von TFA auf die Aktivität der γ -Sekretase

Die Erhöhung der A β -Sekretion in SH-SY5Y C99 Zellen nach der Inkubation mit TFA deutet auf einen zusätzlichen Einfluss dieser Fettsäuren auf die Aktivität der γ -Sekretase hin, da in dieser Zelllinie die Produktion von A β -Peptiden lediglich vom Schnitt der γ -Sekretase, nicht aber von dem der β -Sekretase abhängt. Im Folgenden wurde also ein möglicher Einfluss von Elaidinsäure und CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase untersucht. Es wurden hierbei die gleichen Systeme verwendet, wie sie schon für die Untersuchung der β -Sekretase-Aktivität beschrieben wurden.

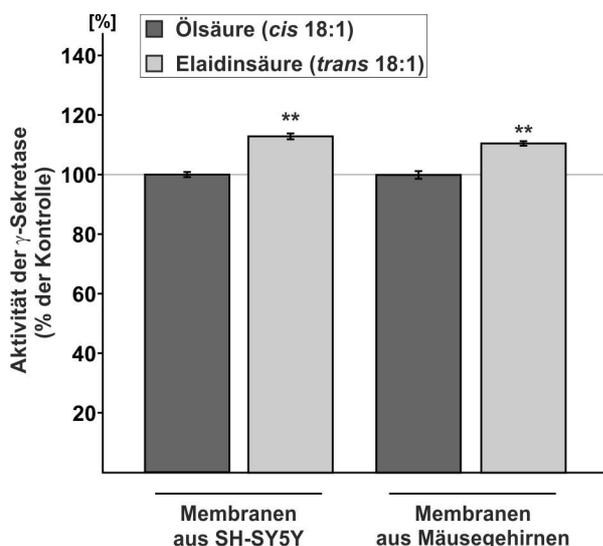


Abb. 19 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen
 Postnukleäre Fraktionen aus SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit Elaidinsäure bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Ölsäure inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrates wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der γ -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die *in vitro* Inkubation von Elaidinsäure ergab verglichen mit der von Ölsäure eine auf 113,0% (+/- 1,60%, $p = 0,005$) erhöhte Aktivität der γ -Sekretase in den Membranen von SH-SY5Y wt Zellen. Ein ähnlicher Anstieg auf 110,6% (+/- 0,77%, $p = 0,008$) war auch nach der *ex vivo* Inkubation von Elaidinsäure auf den Membranen aus Mäusegehirnen zu verzeichnen (Abb. 19). Inkubierte man Elaidinsäure auf lebenden Zellen, so war wie schon die Aktivität der β -Sekretase, auch die der γ -Sekretase signifikant erhöht, sowohl bei SH-SY5Y wt Zellen (114,1% +/- 3,15%, $p = 0,027$), als auch in kortikalen Primärneuronen aus Mausembryonen (116,7% +/- 1,91%, $p = 0,005$) (Abb. 20).

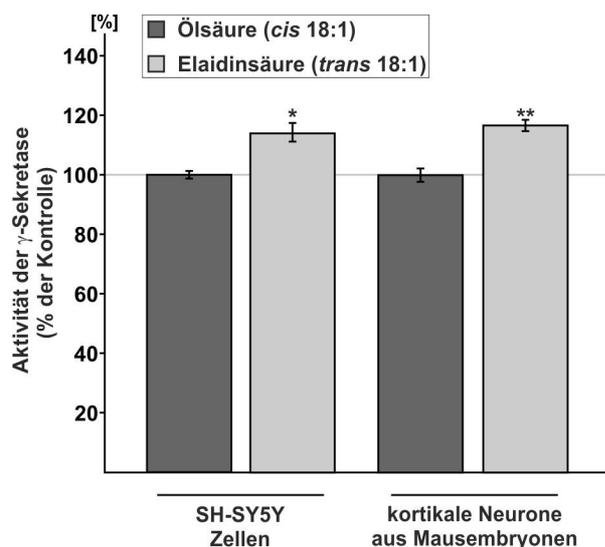


Abb. 20 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen

SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus E14 Mausembryonen gewonnene kortikale Neurone wurden in der Zellkultur mit Elaidinsäure bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Ölsäure inkubiert. Die Membranen wurden nach der Inkubation isoliert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Abb. 19 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Führte man die gleichen Inkubationen mit der zweifach ungesättigten CLA durch, ergaben sich erhöhte γ -Sekretase-Aktivitäten in allen vier verwendeten Modellen.

So war die Aktivität der γ -Sekretase nach der *in vitro* Inkubation von CLA in Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen auf 128,4% (+/- 2,43%, $p=6,17 \times 10^{-6}$), in den aus Mäusegehirnen auf 125,2% (+/- 1,93%, $p=0,0002$) erhöht (Abb. 21).

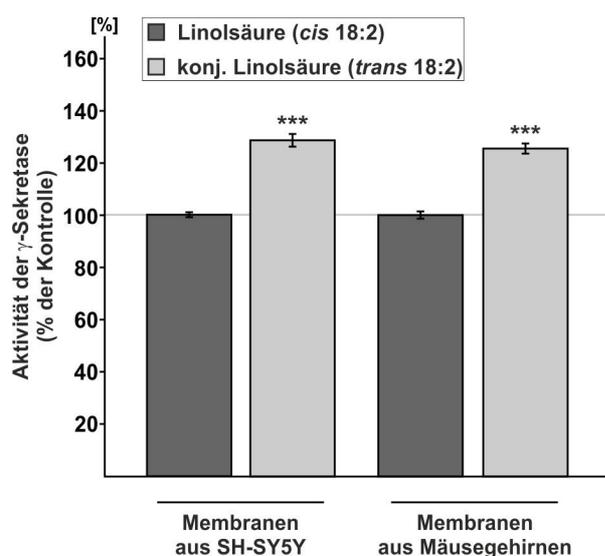


Abb. 21 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen

Postnukleäre Fraktionen aus SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit CLA bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Linolsäure inkubiert. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Abb. 19 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Nach der Inkubation über 5 Tage in der Zellkultur ergab sich eine Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität auf 139,6% (+/- 2,36%, p=0,0001) in SH-SY5Y wt Zellen bzw. auf 149,5% (+/- 3,79, p=0,009) in kortikalen Primärneuronen (Abb. 22).

Auffällig war hier die durchgehend größere Effektstärke der CLA verglichen mit den Effekten, die nach der Inkubation der Elaidinsäure beobachtet wurden. In allen verwendeten Systemen unterschieden sich diese signifikant voneinander (Tab. 25).

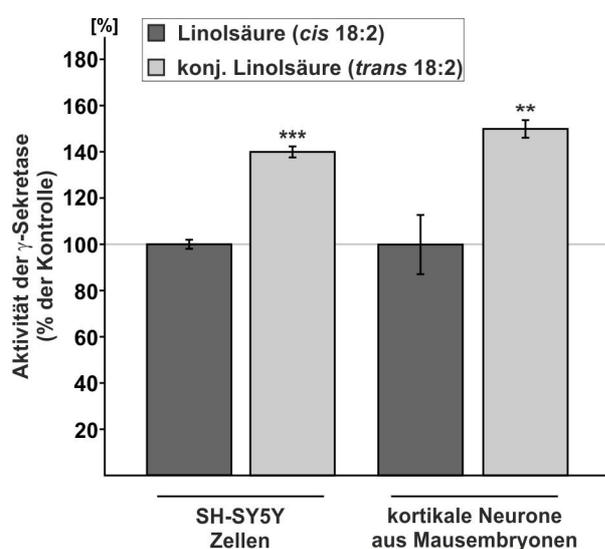


Abb. 22 Der Einfluss von CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen und kortikalen Neuronen.

SH-SY5Y wt Zellen bzw. aus E14 Mausembryonen gewonnene kortikale Neurone wurden in der Zellkultur mit CLA bzw. dem entsprechenden *cis*-Isomer Linolsäure inkubiert. Die Membranen wurden isoliert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie für Abb. 19 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Tab. 25 Vergleich der Effektstärken der γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA

Verwendetes System	Elaidinsäure	CLA	t-test
Membranen SH-SY5Y wt	112,99	128,38	0,012
Membranen Mäusegehirne	110,62	125,23	0,014
lebende SH-SY5Y wt	114,08	139,64	0,005
kortikale Neurone	116,73	149,52	0,005

Die Effektstärken der Inkubationen von Elaidinsäure und CLA auf die Aktivität der γ -Sekretase wurden miteinander verglichen und die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Vergleicht man die Effektstärken, die bei der Inkubation von TFA auf isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen und Mäusegehirnen beobachtet wurden mit denen, die durch die Inkubation der TFA auf lebenden Zellen erreicht wurde, so fällt auf, dass die Effekte auf den lebenden Zellen tendenziell größer waren, als die gemessenen *in vitro* Effekte, wenn auch nur im Falle des γ -Sekretase-Effektes durch CLA die festgelegte Signifikanzgrenze erreicht wurde (Tab. 26).

Tab. 26 Vergleich der Effektstärken der Sekretasen durch die Inkubation von TFA auf isolierten Membranen und auf lebenden Zellen

Sekretase	TFA	Membranen	Zellkultur	t-test
β -Sekretase	Elaidinsäure	113,11	121,83	0,303
	CLA	119,07	131,99	0,526
γ -Sekretase	Elaidinsäure	111,80	115,40	0,263
	CLA	115,40	144,58	0,004

Die Effektstärken durch die Inkubation mit TFA auf lebenden SH-SY5Y wt Zellen und Primärneurone wurden gemittelt und mit den gemittelten Effekten verglichen, die durch die *in vitro* Inkubation auf isolierten Membranen erreicht wurden. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

4.2.4 Der Einfluss von TFA auf die Gen-Expression der Sekretasen

Die erhöhten Aktivitäten der β - und γ -Sekretase nach der *in vitro* Inkubation von TFA sprechen für einen direkten Effekt dieser Lipide auf die Sekretase-Aktivität. Die tendenziell höheren Effekte, die durch die Inkubation auf lebenden Zellen erreicht wurden (vgl. Tab 26), sprechen darüber hinaus für einen weiteren Mechanismus, der zu gesteigerten Sekretase-Aktivitäten nach der Inkubation mit TFA führt. Deshalb wurde die Gen-Expression von der α -Sekretase ADAM10, der β -Sekretase BACE1 und den Komponenten des γ -Sekretase Komplexes PS1, PS2, APH1a, APH1b, PEN2 und Nicastrin ermittelt. Hierfür wurden SH-SY5Y wt Zellen mit den TFA und zur Kontrolle mit ihren korrespondierenden *cis*-Isomeren inkubiert und die Gen-Expression der Sekretasen mittels RT-PCR bestimmt.

Die mRNA-Level der γ -Sekretase-Komponenten PS1, PS2, APH1a, APH1b sowie Nicastrin waren nach der Inkubation mit Elaidinsäure signifikant auf 152,4% für PS1 (+/- 19,23%, p=0,009), 165,3% für PS2 (+/- 20,30%, p=0,004), 123,8% für APH1a (+/- 2,61%, p=2,9x10⁻⁶), 132,5% für APH1b (+/- 14,37%, p=0,047) und 162,5% für Nicastrin (+/- 9,75%, p=3,96x10⁻⁵) erhöht. Der γ -Sekretase-Bestandteil PEN2 lag ebenfalls, wenn auch nicht signifikant auf 110,1% (+/- 15,53%, p=0,406) erhöht vor. Auch die mRNA der β -Sekretase BACE1 lag in den Zellen, die mit Elaidinsäure inkubiert wurden, mit 159,2% (+/- 13,45%, p=0,0005) der

Kontrolle erhöht vor, während die Expression der α -Sekretase ADAM10 auf 85% (\pm 4,63%, $p=0,009$) reduziert war (Abb. 23). Diese Ergebnisse entsprechen den beobachteten Effekten der Elaidinsäure auf die APP-Prozessierungsprodukte, bei denen die α -Sekretase Produkte sAPP α und α -CTF reduziert waren.

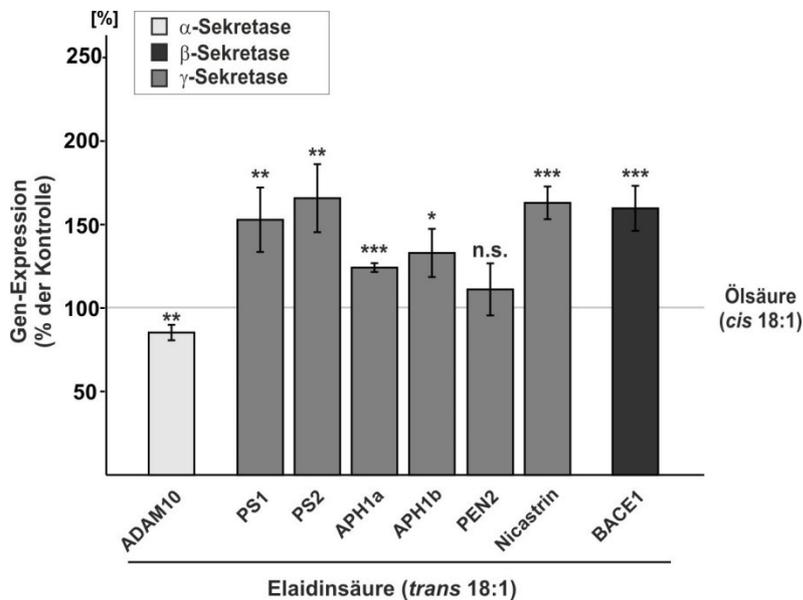


Abb. 23 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Gen-Expression der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit der TFA Elaidinsäure kultiviert. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des *cis*-Isomers Ölsäure. Per RT-PCR Analyse wurde unter Verwendung spezifischer Primer die Gen-Expression der α -Sekretase ADAM10, der β -Sekretase BACE1 sowie aller Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes bestimmt. Gezeigt ist die statistische Auswertung von 6 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Die Inkubation der zweifach ungesättigten *trans*-Fettsäure CLA erhöhte alle Komponenten des γ -Sekretase Komplexes signifikant auf 135,6% für PS1 (\pm 11,17%, $p=0,004$), 182,5% für PS2 (\pm 17,71%, $p=0,0004$), 138,4% für APO1a (\pm 9,89%, $p=0,0012$), 135,9% für APO1b (\pm 14,99%, $p=0,018$), 233,3% für PEN2 (\pm 23,57%, $p=9,65 \times 10^{-5}$) bzw. auf 144,7% für Nicastrin (\pm 23,53%, $p=0,043$). Wie schon für die Inkubation mit Elaidinsäure beschrieben, war auch mit CLA die Gen-Expression von BACE1 signifikant auf 135,6% (\pm 10,85, $p=0,003$) erhöht, während die von ADAM10 auf 76% (\pm 7,26%, $p=0,007$) reduziert war (Abb. 24).

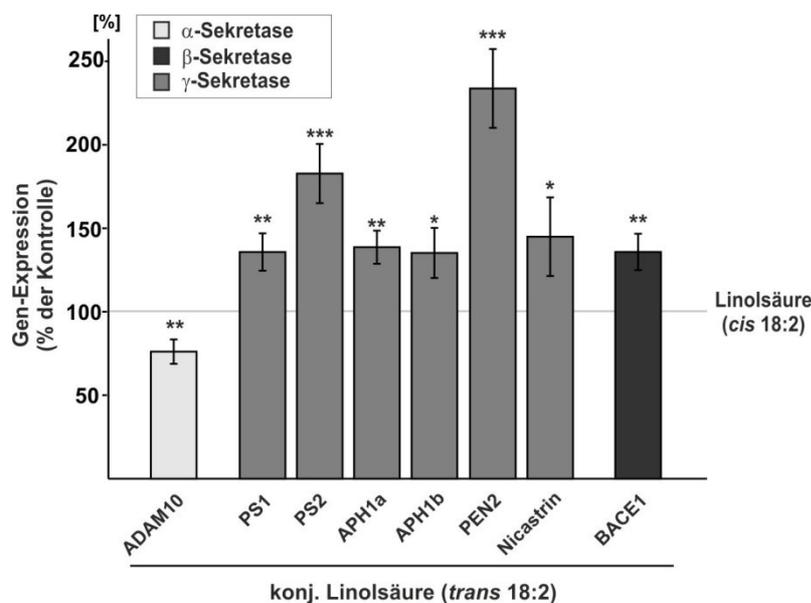


Abb. 24 Der Einfluss von CLA auf die Gen-Expression der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit der TFA CLA kultiviert. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des *cis*-Isomers Linolsäure. Die RT-PCR Analyse und Statistik erfolgte wie für Abb. 23 beschrieben. Gezeigt ist die statistische Auswertung von 6 unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend bewirkten also beide verwendeten TFA verglichen mit ihren *cis*-Isomeren eine verstärkte Transkription der Gene, die an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligt sind, reduzierten aber die von ADAM10, eine der dominanten α -Sekretasen in SH-SY5Y Zellen (Lichtenthaler, 2011), verantwortlich für die nicht amyloidogene Prozessierung. Dies verstärkt neben der direkten Wirkung auf die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase das amyloidogene Potential der TFA.

Im Gegensatz zu den Effekten auf die Sekretase-Aktivitäten waren die Effekte durch die Inkubation mit der zweifach ungesättigten CLA auf die Gen-Expression nicht größer, verglichen mit den Effekten durch die Inkubation mit der einfach ungesättigten Elaidinsäure (Tab. 27).

Tab. 27 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression nach Inkubation mit Elaidinsäure bzw. CLA

	Elaidinsäure	CLA	t-test
ADAM10	85,04	75,71	0,304
PS1	152,37	135,56	0,478
PS2	165,26	182,48	0,546
APH1a	123,84	138,41	0,204
APH1b	132,54	134,96	0,910

PEN2	110,78	233,32	0,005
Nicastrin	162,48	144,68	0,511
BACE1	159,21	135,59	0,221

Die Effektstärken der Inkubationen mit Elaidinsäure und CLA auf die Gen-Expression der Sekretasen wurden miteinander verglichen und die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Durch die Inkubation der TFA ergaben sich größere Effektstärken auf die Gen-Expression verglichen mit den Effekten auf die Aktivitäten der entsprechenden Sekretasen (Tab. 28). Im Falle der Inkubation mit Elaidinsäure unterschieden sich die Effektstärken mit $p=0,048$ für die β -Sekretase und $p=0,034$ für die γ -Sekretase signifikant.

Tab. 28 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression mit den Aktivitäten der Sekretasen

Sekretase	TFA	Aktivität	Genexpression	t-test
β -Sekretase	Elaidinsäure	121,82	159,20	0,048
	CLA	131,99	135,59	0,456
γ -Sekretase	Elaidinsäure	115,40	141,21	0,034
	CLA	144,58	161,56	0,329

Die Effektstärken der Inkubationen mit TFA auf die Gen-Expression der Sekretasen wurden mit den Effekten auf die Sekretase-Aktivitäten verglichen. Die Gen-Expression der γ -Sekretase-Komponenten wurde dabei gemittelt. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

4.2.5 Der Einfluss von TFA auf die Proteine ADAM10, BACE1 und Nicastrin

Da die Aktivitäten der Sekretasen durch die Inkubation mit TFA weniger stark geändert waren, als die mRNA-Level, wurden per Western Blot Analyse die Proteinlevel von ADAM10, BACE1 und Nicastrin, das stellvertretend für die Komponenten der γ -Sekretase ausgewählt wurde, bestimmt. Hierfür wurden SH-SY5Y wt Zellen über 5 Tage mit Elaidinsäure und CLA und zur Kontrolle mit den entsprechenden *cis*-Isomeren Ölsäure und Linolsäure inkubiert.

Der Proteinlevel von ADAM10 war nach der Inkubation mit Elaidinsäure signifikant auf 84,6% (+/- 5,15%, $p=0,001$) verringert, während die γ -Sekretase Komponente Nicastrin mit 111,5% (+/- 3,54%, $p=0,04$) der Kontrolle erhöht vorlag. Der Proteinlevel der β -Sekretase BACE1 war ebenfalls, wenn auch nicht signifikant auf 108,0% (+/- 6,12%, $p=0,314$) erhöht, verglich man die Elaidinsäure-inkubierten Zellen mit den entsprechenden Kontrollen (Abb. 25).

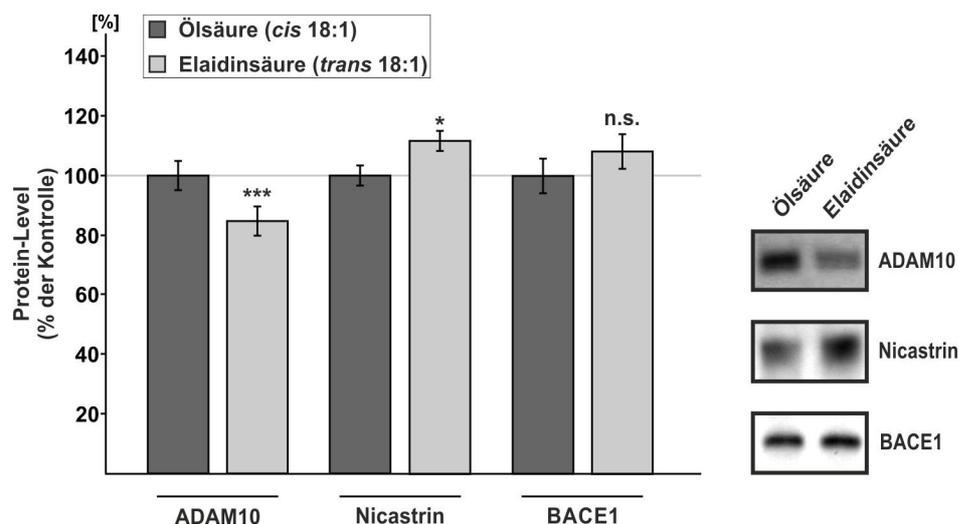


Abb. 25 Der Einfluss von Elaidinsäure auf die Proteinlevel der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit von Elaidinsäure kultiviert, die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge Ölsäure. Die Proteine wurden unter Verwendung spezifischer AK mittels Western Blot Analyse aus dem Zelllysat detektiert. Für die Detektion von ADAM10 wurde der AK ab47993, für Nicastrin N1660 und für BACE1 B0806 verwendet. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Western Blot Analyse nach der Inkubation der zweifach ungesättigten CLA und ihrer korrespondierenden Kontrolle.

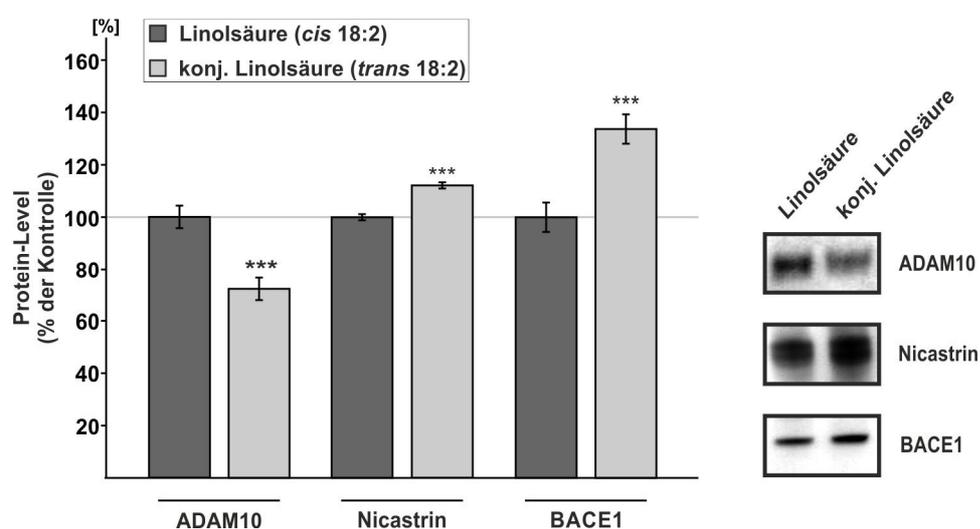


Abb. 26 Der Einfluss von CLA auf die Proteinlevel der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit von CLA kultiviert, die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge Linolsäure. Die Western Blot Analyse und Statistik erfolgte wie für Abb. 25 beschrieben. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

Wie schon nach der Inkubation mit Elaidinsäure war der ADAM10-Proteinlevel signifikant auf 72,1% (+/- 4,30%, $p=0,001$) reduziert, während der Nicastrin-Proteinlevel auf 111,9% (+/- 0,83%, $p=6,76 \times 10^{-9}$) erhöht war. Der Proteinlevel von BACE1 war nach der Inkubation mit CLA deutlich auf 133,6% (+/- 5,61%, $p=0,0001$) erhöht (Abb. 26).

Dem signifikanten Unterschied zwischen Gen-Expression und den Aktivitäten der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Elaidinsäure entsprechend, unterschieden sich die Proteinlevel von Nicastrin und BACE1 ebenfalls signifikant von ihren mRNA-Leveln (Tab. 29). Es scheinen hier weitere Mechanismen wie beispielsweise Effekte auf die Translation oder die Stabilität der Proteine eine Rolle zu spielen. Dagegen unterschieden sich die Proteinlevel von ADAM10 nach der Inkubation beider TFA nicht von von ihren mRNA-Leveln.

Tab. 29 Vergleich der Effektstärken der Gen-Expression mit den Proteinleveln der Sekretasen

TFA	Sekretase	Gen-Expression	Proteinlevel	t-test
Elaidinsäure	ADAM10	85,04	84,61	0,956
	Nicastrin	162,48	111,52	0,005
	BACE1	159,21	108,03	0,007
CLA	ADAM10	75,71	72,13	0,912
	Nicastrin	144,68	111,92	0,258
	BACE1	135,59	133,60	0,891

Die Effektstärken der Inkubationen mit TFA auf die Gen-Expression der Sekretasen wurden mit den Effekten auf die entsprechenden Proteinlevel verglichen. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

4.2.6 Der Einfluss von TFA auf den subzellulären Transport des APPs

Ein weiterer Faktor, der die amyloidogene oder nicht amyloidogene Prozessierung des APPs bestimmt, ist die Menge und die subzelluläre Lokalisation des Substrates selbst. Ist das APP an der Plasmamembran lokalisiert, so wird der Abbau auf dem nicht amyloidogenen Weg durch die α -Sekretase bevorzugt. Wird das APP aber internalisiert und ist dann in den Endosomen zu finden, wird es eher auf dem amyloidogenen Prozessierungsweg gespalten. Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse der APP-Proteinlevel im Zelllysat Elaidinsäure- bzw. CLA-behandelter SH-SY5Y wt Zellen analysiert. Wie in Abb. 27 zu sehen, ist nach der Inkubation mit beiden TFA die Menge an intrazellulär vorliegendem APP deutlich auf 137,4% (+/- 3,0%, $p=0,0009$) nach Elaidinsäure-Inkubation und auf 169,8% (+/- 1,3%, $p=2,70 \times 10^{-6}$) nach der Inkubation mit CLA erhöht. Der Effekt durch die Inkubation mit CLA war dabei mit $p=0,015$ signifikant größer als der durch Elaidinsäure.

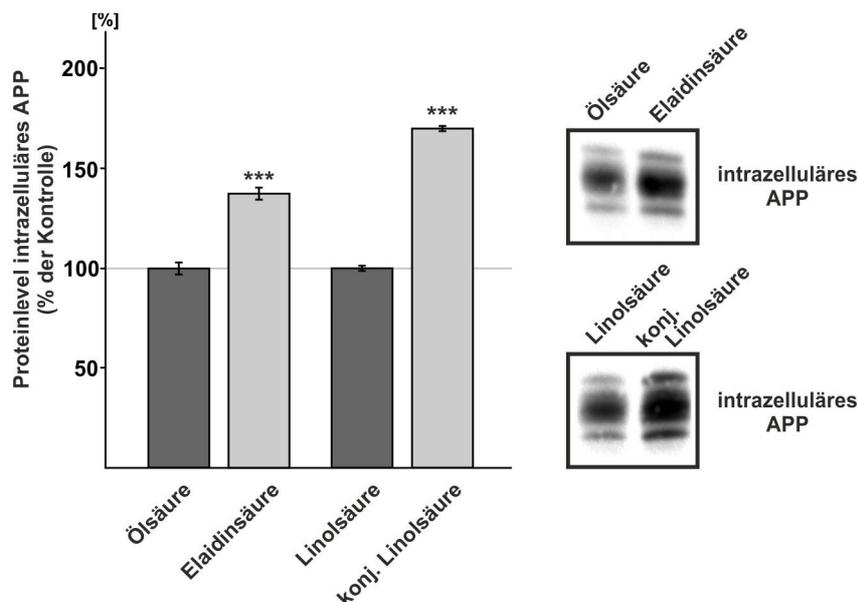


Abb. 27 Der Einfluss von TFA auf die Menge des intrazellulären APP

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit der TFA Elaidinsäure bzw. CLA kultiviert. Die Kontrollen enthielten die entsprechenden *cis*-Isomere Ölsäure bzw. Linolsäure. APP wurde unter Verwendung des AKs W02 aus dem Zelllysat der inkubierten Zellen mittels Western Blot Analyse detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung 5 unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Ein möglicher Grund für eine Erhöhung des intrazellulären APPs ist zum einen eine erhöhte Gen-Expression und zum anderen eine Beeinflussung seines Transports zur Plasmamembran. Tatsächlich zeigte die RT-PCR Analyse eine Steigerung der Gen-Expression des APP auf 159,3% (+/- 17,20%, $p = 0,002$) nach der Inkubation mit Elaidinsäure und 216% (+/- 32,92, $p = 0,002$) nach der Inkubation mit CLA (Abb. 28). Wiederum war der Effekt durch CLA-Inkubation größer, als der Elaidinsäure bedingte Effekt, die Differenz der Effektstärken erreichte mit $p = 0,177$ jedoch nicht die festgelegte Signifikanzgrenze.

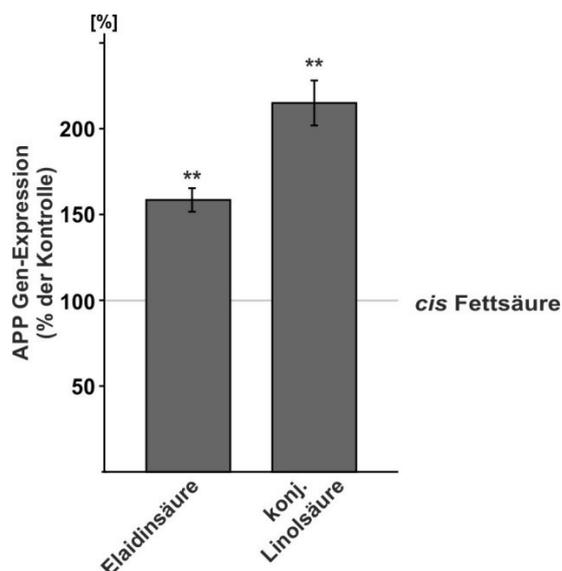


Abb. 28 Der Einfluss von TFA auf die Gen-Expression des APP

SH-SY5Y wt Zellen wurden über 5 Tage in Anwesenheit von Elaidinsäure bzw. CLA kultiviert. Die Kontrollzellen enthielten die entsprechende Menge Ölsäure bzw. Linolsäure. Per RT-PCR Analyse wurde unter Verwendung spezifischer Primer die Gen-Expression von APP bestimmt. Gezeigt ist die statistische Auswertung 6 unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Menge an APP an der Zelloberfläche wurde mittels FACS Analyse bestimmt. Bei dieser Methode wird selektiv das APP detektiert, das sich an der Zelloberfläche befindet. Die Abb. 29 zeigt eine repräsentative FACS Analyse.

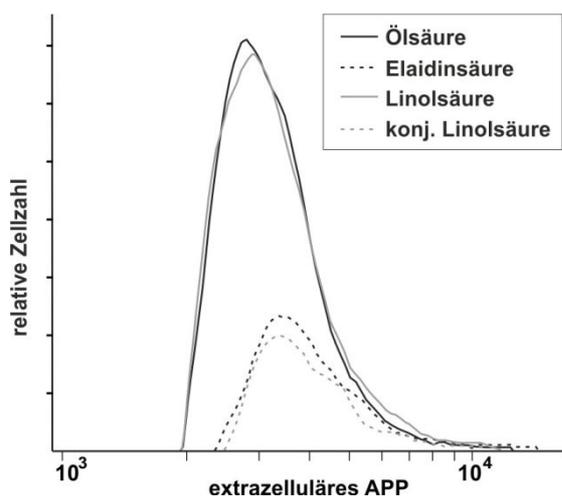


Abb. 29 Der Einfluss von TFA auf die APP-Lokalisation an der Zelloberfläche

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 5 Tage in Anwesenheit der TFA Elaidinsäure bzw. CLA kultiviert, während die Kontrollzellen die korrespondierenden *cis*-Isomere Ölsäure und Linolsäure enthielten. Per FACS Analyse wurde selektiv das an der Zelloberfläche lokalisierte APP unter Verwendung des AKs A8967 detektiert. Als Sekundär-AK diente der FITC-gekoppelte anti-rabbit-AK ab6717. Gezeigt ist eine repräsentative FACS Analyse, bei der die Intensität des FITC-Signals, welches der APP-Menge an der Zelloberfläche entspricht, gegen die relative Zellzahl aufgetragen ist.

Es zeigte sich, dass das APP-Signal an der Zelloberfläche nach der Inkubation mit Elaidinsäure oder CLA deutlich niedriger war, als das Signal der Zellen, die stattdessen die *cis*-Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure erhielten. Dies lässt vermuten, dass der Transport des APP auf dem sekretorischen Weg zur Plasmamembran durch die Inkubation mit TFA in SH-SY5Y wt Zellen inhibiert wird. Weiterhin ist eine verstärkte Endozytose und damit eine Akkumulation des APP im endozytotischen Transportweg eine mögliche Ursache.

4.2.7 Der Einfluss von TFA auf A β -Aggregation

Die Ergebnisse des Kapitels 4.2.7 wurden eingeständig von Benjamin Hundsdörfer im Rahmen einer Kooperation generiert. Wegen ihrer Bedeutung für das Projekt sollen sie an dieser Stelle ausnahmsweise kurz zitiert werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen ein amyloidogenes Potential von TFA verglichen mit ihren *cis*-Isomeren. Die Inkubation der TFA führte zu einer verstärkten Produktion von A β -Peptiden. Bei Patienten, die an der Alzheimer Krankheit leiden, finden sich Ablagerungen solcher A β -Peptide in aggregierter Form in den sogenannten senilen Plaques. Es sollte deshalb untersucht werden, ob TFA neben ihrer Wirkung auf die A β Produktion auch die Aggregation dieser Peptide beeinflussen.

Hierfür wurde synthetisches A β 40 *in vitro* für 24Std. in Anwesenheit der *cis*- und *trans*-Fettsäuren inkubiert. Im Elektronenmikroskop wurden dann Aufnahmen der A β -Aggregate angefertigt.

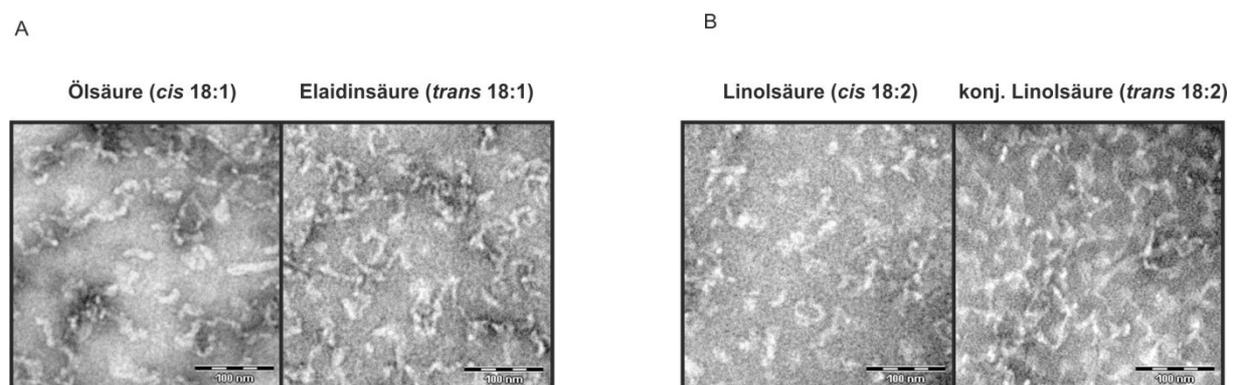


Abb. 30 TEM-Aufnahmen der A β -Aggregate in Abhängigkeit von TFA

Synthetisches A β 40 wurde für 24Std. mit den TFA Elaidinsäure (A) und CLA (B) inkubiert. Als Kontrolle dienten Proben, die mit den *cis*-Isomeren Ölsäure oder Linolsäure inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Proben auf Kupfer-Grids aufgetragen und im TEM analysiert. Die Abbildung zeigt exemplarische TEM-Abbildungen.

Wie in Abb. 30 zu sehen, war die Dichte an aggregiertem A β in den Proben, die mit TFA inkubiert wurden, deutlich höher als in den mit den korrespondierenden *cis*-Isomeren. Um eine quantitative Aussage bezüglich der Aggregation der A β -Peptide treffen zu können, wurden die Ergebnisse dieser Aufnahmen zusätzlich mittels ThT Assay überprüft.

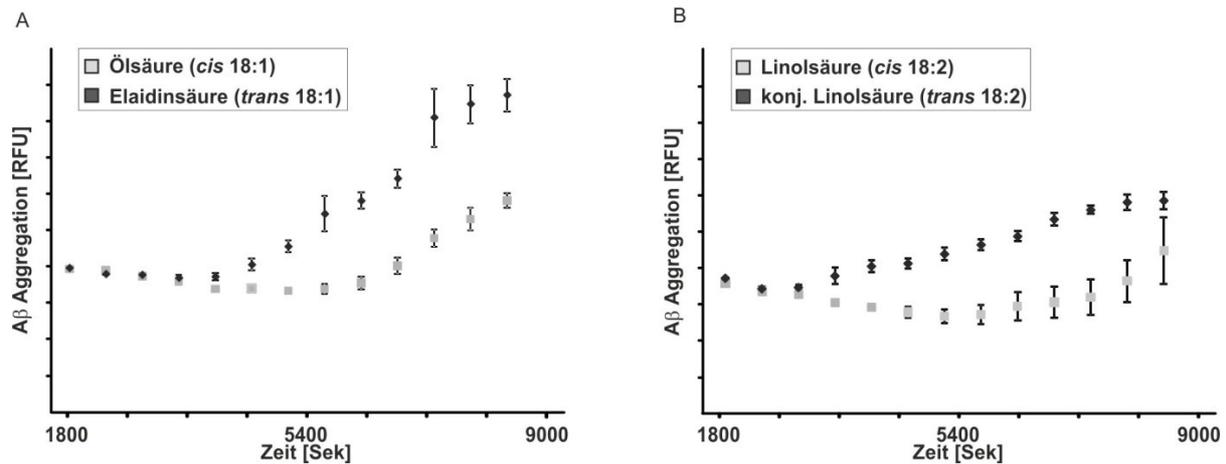


Abb. 31 ThT Analyse der Aβ-Aggregation in Abhängigkeit von TFA

Die *cis*- und *trans*-Fettsäuren wurden in einer finalen Konzentration von 10 μ M mit 50 μ M A β 40 und 20 μ M des Farbstoffs ThT inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz wurde bei 37°C unter Lichtausschluss in 10minütigen Intervallen mit einer Extinktionswellenlänge von 450nm und einer Emissionswellenlänge von 482nm in einem Safire-Fluorometer aufgezeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Diese Methode beruht auf der Bindung des Benzothiazol-Farbstoffs Thioflavin T (ThT) an β -Faltblatt reiche Strukturen, wie sie in A β -Aggregaten vorliegen, wodurch es zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums des ThT kommt, die in einem Fluorometer aufgezeichnet werden kann (LeVine, 1993, 1997). Sowohl Elaidinsäure als auch CLA führte verglichen mit Ölsäure bzw. Linolsäure zu einer schnelleren Aggregation synthetischer A β 42-Peptide (Abb. 31).

TFA bewirken also eine Verschiebung von der nicht amyloidogenen hin zur amyloidogenen APP-Prozessierung über eine Beeinflussung der Transkription der Sekretasen zum einen und einer direkten Wirkung auf die Sekretase-Aktivitäten zum anderen. In der Summe führt dies zu einer verstärkten Produktion neurotoxischer A β -Peptide. Zusätzlich wird die Aggregation dieser Peptide durch TFA begünstigt.

4.3 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die APP-Prozessierung

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht in:

- Rothhaar T.L., Grösgen S., Hauptenthal V.J., Burg V.K., Hundsdörfer B., Mett J., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2012). *Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease*. ScientificWorldJournal 2012:141240.
- Grimm M.O., Kuchenbecker J., Rothhaar T.L., Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.K., Friess P., Müller U., Grimm H.S., Riemenschneider M., Hartmann T. (2011). *Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 116(5):916-25.

Plasmalogene sind Glycerophospholipide und stellen den Hauptbestandteil neuronaler Zellmembranen dar. Im menschlichen Gehirn machen sie etwa 20% aller Glycerophospholipide aus (Farooqui and Horrocks, 2001b; Horrocks and Sharma, 1982). In *post mortem* Gehirnen von Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren, wurden reduzierte Plasmalogenspiegel beschrieben (Farooqui *et al.*, 1997a; Ginsberg *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1995). Han *et al.* konnten zeigen, dass diese Abnahme im Plasmalogen-Gehalt mit den verschiedenen klinischen Stadien der Demenz korrelieren (Han *et al.*, 2001). Unklar ist jedoch, ob diese Reduktion der Plasmalogene eine Ursache der Alzheimer-Pathologie oder eine Folge der Erkrankung darstellt. Da die APP prozessierenden Sekretasen sowie das APP selbst membranassoziierte Proteine sind, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden, ob Plasmalogene als Hauptbestandteile dieser Membranen die Sekretasen zum einen und damit die Prozessierung des APP zum anderen beeinflussen.

4.3.1 Bestimmung von Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Plasmalogenen in humanen *post mortem* Gehirnen

Nachdem in früheren Studien eine Reduktion im Gesamt-Phosphatidylethanolamin-Plasmalogen (PE-PL)-Gehalt und in einigen Phosphatidylcholin-Plasmalogen (PC-PL)-Spezies in den *post mortem* Gehirnproben von Alzheimer-Patienten festgestellt wurden (Grimm *et al.*, 2011a; Grimm *et al.*, 2011d), sollte hier analysiert werden, welche Plasmalogen-Spezies die größten Veränderungen in den Alzheimer-Gehirnen verglichen mit Gehirnen gesunder Kontrollen zeigt.

Hierzu wurden die Hauptvertreter der PC-PLs und der PE-PLs massenspektrometrisch in insgesamt 58 humanen Gehirnen bestimmt. 21 der untersuchten Gehirne stammten von gesunden Personen, 37 von Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren. Die Gehirne

unterschieden sich nicht signifikant im Alter (Kontrollgruppe 74,8 Jahre, Alzheimer-Patienten 78,4 Jahre, $p=0,100$) bzw. dem Geschlecht der Spender.

Tab. 30 PC-PL und PE-PL Spezies in humanen *post mortem* Gehirnen

Plasmalogen-Spezies	% der Kontrolle	StabwM	ttest
PC-PL 16:0/18:1(PC-PL 34:1)	64,55	1,654	0,0011
PC-PL 18:0/18:1(PC-PL 36:1)	68,93	1,814	0,0005
PC-PL 18:1/18:1(PC-PL 36:2)	49,17	1,452	0,0007
PC-PL 16:0/20:4(PC-PL 36:4)	81,56	2,681	0,0483
PC-PL 18:0/20:4(PC-PL 38:4)	85,02	1,930	0,0051
PC-PL 18:1/20:4(PC-PL 38:5)	84,58	3,744	0,1105
PC-PL 16:0/22:6(PC-PL 38:6)	88,21	2,925	0,0735
PC-PL 18:0/22:6(PC-PL 40:6)	88,99	2,388	0,0184
Alle PC-PL gewichtet	66,53	1,663	0,001
PE-PL 18:1/18:1(PE-PL 36:2)	83,18	7,252	0,2152
PE-PL 16:0/20:4(PE-PL 36:4)	78,67	7,181	0,1631
PE-PL 18:0/20:4(PE-PL 38:4)	80,55	6,795	0,1540
PE-PL 18:1/20:4(PE-PL 38:5)	93,96	6,194	0,5656
PE-PL 16:0/22:6(PE-PL 38:6)	94,07	6,250	0,5752
PE-PL 18:0/22:6(PE-PL 40:6)	86,24	5,190	0,2049
Alle PE-PL gewichtet	85,60	6,292	0,229

Die PC-PL und PE-PL Level wurden mittels Massenspektrometrie aus 37 *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten bestimmt und mit denen von 21 gesunden Personen verglichen. Die Mittelwerte der PC-PL und PE-PL wurden entsprechend ihrem Vorkommen gewichtet. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test ermittelt. StabwM=Standardabweichung des Mittelwerts.

Die Analyse ergab, dass alle untersuchten PC-PL-Spezies in den Gehirnen der an Alzheimer Erkrankten signifikant reduziert waren, verglich man sie mit denen der gesunden Kontrollgruppe. Die stärkste Abnahme auf 49,17% der Kontrolle zeigte dabei PC-PL 18:1/18:1. Gewichtet man die einzelnen PC-PL-Spezies nach ihrem Vorkommen, ergibt sich im Mittel eine signifikante Abnahme auf 66,53% (+/- 1,66%, $p=0,001$). Die Spiegel der PE-PL waren in den Gehirnen der Alzheimer-Patienten im Mittel auf 85,60% (+/- 6,29, $p=0,229$) reduziert, es wurde aber weder für die einzelnen Spezies, noch für die gewichteten Mittelwerte die Signifikanzgrenze erreicht (Tab. 30).

Da sich die größte Veränderung zwischen den Gehirnen gesunder und denen von an Alzheimer erkrankten Personen bei PC-PL 18:1 zeigte, wurde dieses Lipid für die weiteren

Analysen verwendet. Zusätzlich wurden die Plasmalogene mit längerer Fettsäurenkette und geringerem Sättigungsgrad PC-PL 20:4 und PC-PL 22:6 und zur Überprüfung möglicher Effekte, verursacht durch die jeweilige Kopfgruppe des Lipids, PE-PL 22:6 verwendet. Als Kontrolle diente das jeweils korrespondierende Phospholipid. Somit handelt es sich bei den beobachteten Effekten um Effekte, die spezifisch für Plasmalogene und damit spezifisch für die Vinylother-Bindung sind.

4.3.2 Der Effekt von Plasmalogenen auf die Expression der Sekretasen

Um einen möglichen Effekt der Plasmalogene auf die an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen und damit die Menge an sekretierten A β -Peptiden zu untersuchen, wurde zunächst die Gen-Expression von ADAM17, einem der Hauptvertreter der α -Sekretasen, von der β -Sekretase BACE1 und den einzelnen Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes PS1, PS2, APH1a, APH1b, Nicastrin und PEN2 in Abhängigkeit der Plasmalogene analysiert. Hierzu wurden SH-SY5Y wt Zellen für 24Std. mit den Plasmalogenen PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 inkubiert. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y wt Zellen mit den korrespondierenden Phospholipiden PC 18:1 bzw. PC 20:4 inkubiert. Die im Anschluss an die Inkubation ermittelten Zytotoxizitäten betragen 1,95% (+/- 0,22%) für PC-PL 18:1, 2,02% (+/- 0,16%) für PC-PL 20:4, 1,87% (+/- 0,09%) für PC 18:1 und 2,11% (+/- 0,23%) für PC 20:4. Die RT-PCR Analyse mittels spezifischer Primer für die jeweiligen Gene ergab keine signifikanten Änderungen in der Gen-Expression der Sekretasen in den mit Plasmalogenen behandelten Zellen, verglichen mit der Gen-Expression in den Zellen, die mit dem korrespondierenden Phospholipid inkubiert wurden, wie in Tab. 31 dargestellt.

Tab. 31 Gen-Expression der Sekretasen in Abhängigkeit von PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4

Plasmalogen	Sekretase	Gen	Faktor zur Kontrolle	StabwM	ttest
PC-PL 18:0/18:1	α -Sekretase	ADAM17	1,11	0,178	0,5658
	γ -Sekretase	PS1	0,96	0,117	0,7574
		PS2	1,04	0,136	0,7981
		APH1a	0,87	0,230	0,5884
		APH1b	1,06	0,186	0,7380
		NCSTN	0,87	0,204	0,5548
		PEN2	1,09	0,149	0,5734
	β -Sekretase	BACE1	1,04	0,225	0,8554

PC-PL 18:0/20:4	α -Sekretase	ADAM17	0,90	0,049	0,0878
	γ -Sekretase	PSEN1	0,95	0,099	0,6162
		PSEN2	1,10	0,105	0,3568
		APH1a	0,86	0,089	0,1676
		APH1b	0,93	0,125	0,5707
		NCSTN	0,86	0,083	0,1287
	β -Sekretase	BACE1	0,93	0,094	0,4607

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit der Plasmalogene PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 kultiviert. Die Kontrollzellen erhielten die entsprechende Menge der korrespondierenden Phospholipide. Die Gen-Expression der α -Sekretase ADAM17, der β -Sekretase BACE1 sowie der Komponenten der γ -Sekretase wurde mittels RT-PCR Analyse unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt. StabwM=Standardabweichung des Mittelwerts.

Nach der Inkubation mit Plasmalogenen wurden zusätzlich die Proteinlevel von ADAM17, BACE1 und PS1, das als katalytisches Zentrum stellvertretend für die γ -Sekretase-Komponenten ausgewählt wurde, per Western Blot Analyse bestimmt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gen-Expressionsanalyse, konnten auch hier keine Veränderungen in den Proteinspiegeln nach der Inkubation mit PC-PL 18:1 festgestellt werden (ADAM17: 99,0% +/- 5,32%, p=0,900; PS1: 96,8% +/- 6,07%, p=0,719; BACE1: 104,0% +/- 2,72, p=0,331) (Abb. 32).

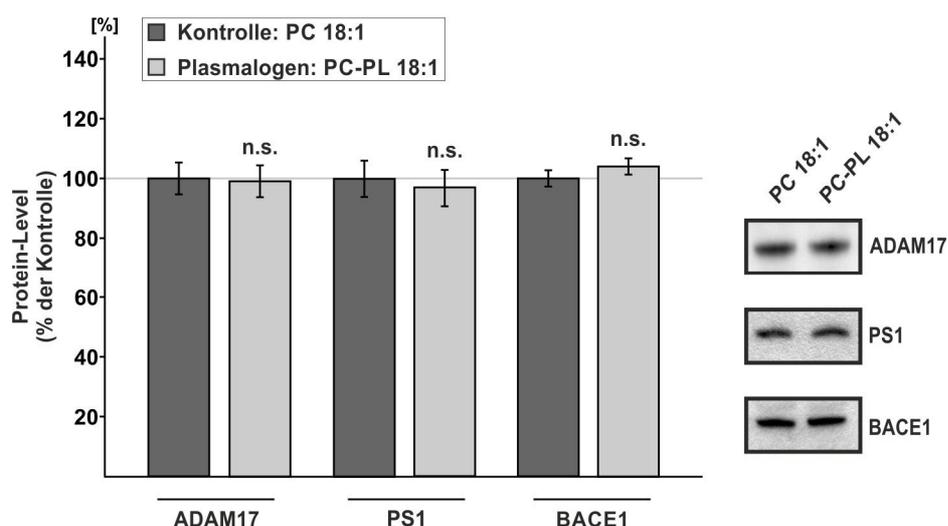


Abb. 32 Der Einfluss von PC-PL 18:1 auf die Proteinlevel der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std in Anwesenheit von PC-PL 18:1 kultiviert, die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des korrespondierenden Phospholipids PC 18:1. Die Proteine

wurden unter Verwendung spezifischer AK mittels Western Blot Analyse aus dem Zelllysate detektiert. Für die Detektion von ADAM17 wurde der AK ab39162, für PS1 sc-7860 und für BACE1 B0806 verwendet. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

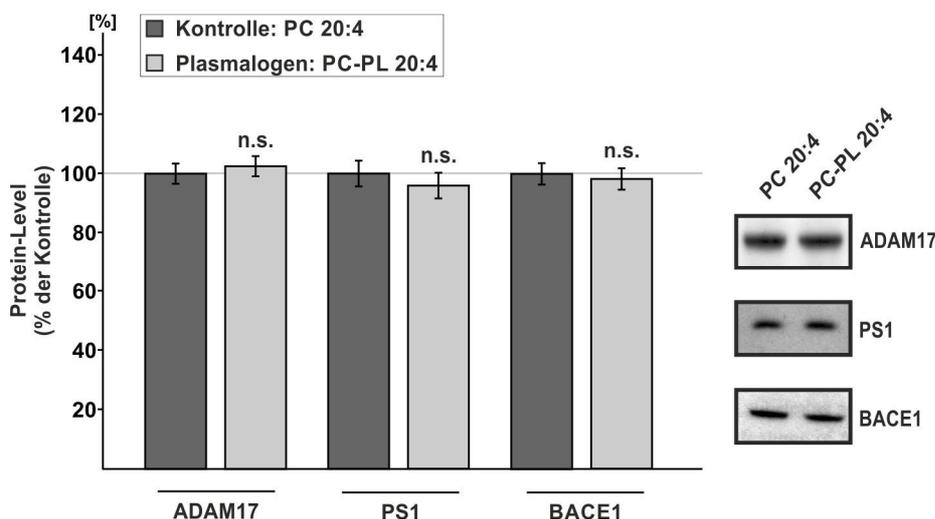


Abb. 33 Der Einfluss von PC-PL 20:4 auf die Proteinlevel der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std in Anwesenheit von PC-PL 20:4 kultiviert, die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des korrespondierenden Phospholipids PC 20:4. Bestimmung der Proteinlevel und Statistik erfolgten analog Abb. 32.

Auch nach der Inkubation mit PC-PL 20:4 waren die Proteinspiegel von ADAM17, PS1 und BACE1 in SH-SY5Y wt Zellen nicht verändert (ADAM17: 102,5% \pm 3,42%, $p = 0,615$; PS1: 95,9% \pm 4,35%, $p = 0,522$; BACE1: 98,1% \pm 3,62%, $p = 0,717$) (Abb. 33). Die Inkubation von Plasmalogenen beeinflusste also weder die Gen-Expression noch die Proteinlevel der Sekretasen in SH-SY5Y wt Zellen.

4.3.3 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase

Die Aktivität der β -Sekretase in Abhängigkeit von Plasmalogenen wurde in drei unterschiedlichen Systemen untersucht. Zunächst wurden PNFs aus SH-SY5Y wt Zellen *in vitro* mit Plasmalogenen bzw. den korrespondierenden Phospholipiden inkubiert. PNFs enthalten die Plasmamembranen der Zellen, an denen die Sekretasen lokalisiert sind. Somit lassen sich mit diesem Ansatz direkte Effekte der Lipide auf die Aktivitäten der Sekretasen messen, die unabhängig von Gen-Expressionseffekten, Proteinstabilitäten oder subzellulärer Lokalisation der Sekretasen sind. Nach der Inkubation wurden die Membranen durch

Zentrifugation isoliert und unter Verwendung eines Fluoreszenz-basierten Aktivitäts-Assays die Aktivität der β -Sekretase bestimmt.

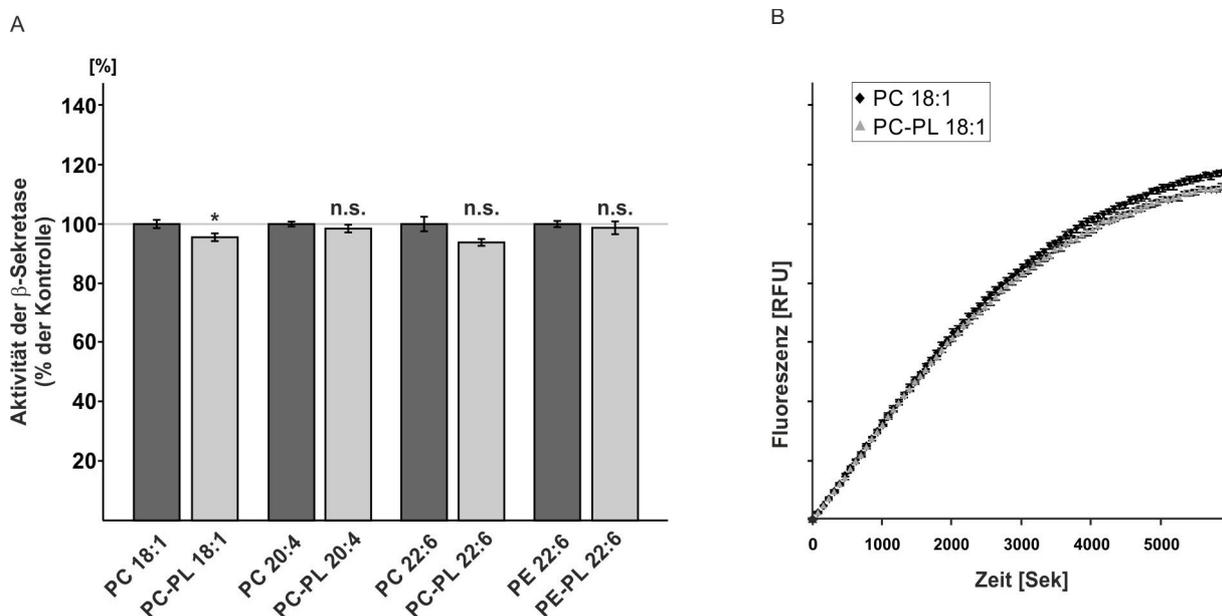


Abb. 34 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen

PNFs aus SH-SY5Y wt Zellen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrats wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der β -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. A) Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). B) zeigt die durchschnittliche Kinetik der β -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit PC-PL 18:1 verglichen mit PC 18:1. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an.

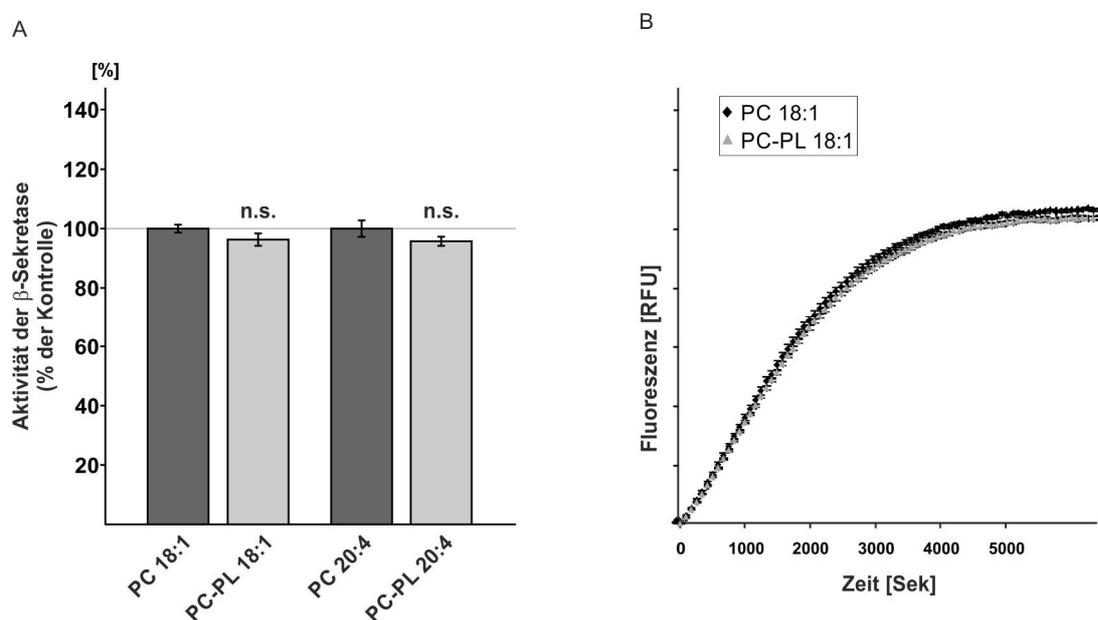
Nach der Inkubation mit PC-PL 18:1 und PC-PL 22:6 ergab sich eine geringe, im Falle von PC-PL 18:1 dennoch signifikante Reduktion der β -Sekretase-Aktivität auf 95,7% ($\pm 1,16\%$, $p=0,031$) bzw. 94,0% ($\pm 1,15\%$, $p=0,055$) verglichen mit aufgereinigten Membranen, die mit PC 18:1 bzw. PC 22:6 inkubiert wurden. Die Inkubation mit PC-PL 20:4 und PE-PL 22:6 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen von SH-SY5Y wt Zellen (PC-PL 20:4: 98,7% $\pm 1,31\%$, $p=0,434$; PE-PL 22:6: 98,9% $\pm 2,16\%$, $p=0,644$) (Abb. 34). Die einzelnen Effekstärken der Plasmalogene unterschieden sich untereinander nicht, lediglich die Differenz der Effekstärke der PC-PL 20:4 und der PC-PL 22:6-Inkubation erreichte mit $p=0,042$ knapp die festgelegte Signifikanzgrenze (Tab. 32).

Tab. 32 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die β -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y Membranen

	PC-PL 20:4	PC-PL 22:6	PE-PL 22:6
PC-PL 18:1	0,149	0,301	0,601
PC-PL 20:4		0,042	0,401
PC-PL 22:6			0,739

Die Effekte der einzelnen PL auf die Aktivität der β -Sekretase wurden untereinander mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden PNFs aus den Gehirnen von Mäusen präpariert und analog zu den SH-SY5Y Membranen *ex vivo* mit Plasmalogenen inkubiert.

**Abb. 35** Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen

PNFs aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Die Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 34 beschrieben

Die beiden verwendeten Plasmalogene PC-PL 18:1 sowie PC-PL 20:4 reduzierten leicht, wenn auch nicht signifikant die Aktivität der β -Sekretase der isolierten Membranen aus Mäusegehirnen auf 96,3% (+/- 2,10%, $p=0,147$) bzw. 95,7% (+/- 1,54%, $p=0,197$) der korrespondierenden Kontrollen (Abb. 35). Die Effektstärken der beiden PL unterschieden sich nicht voneinander ($p=0,824$).

In einem dritten Versuchsansatz wurden SH-SY5Y wt Zellen für 24Std. mit Plasmalogenen und Phospholipiden inkubiert, danach wurden die Membranen isoliert und die β -Sekretase-Aktivität wie beschrieben gemessen.

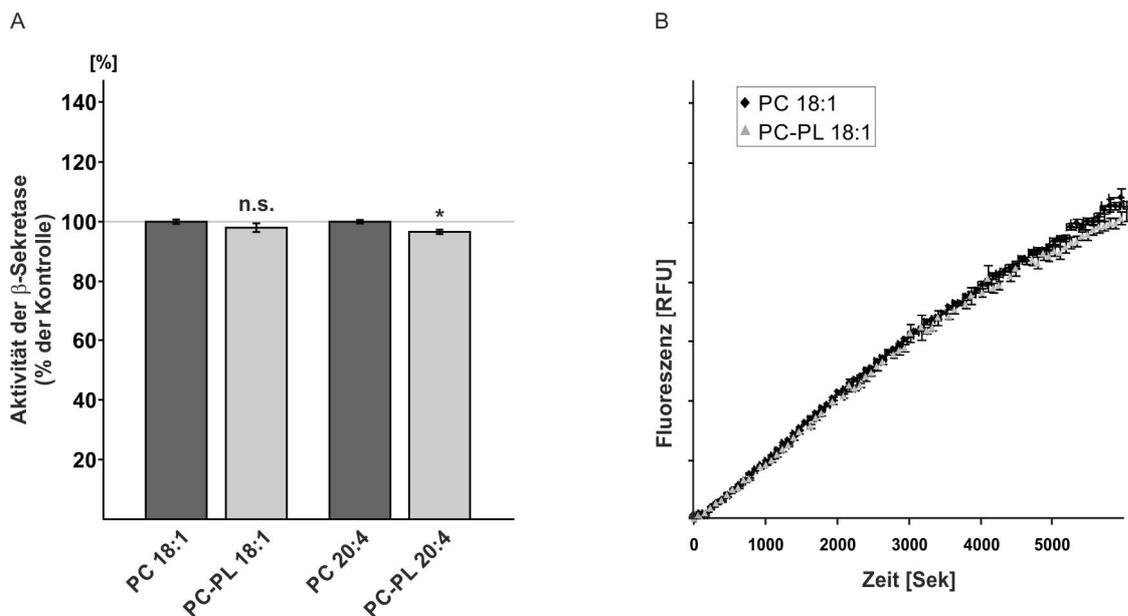


Abb. 36 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen
 SH-SY5Y wt Zellen wurde für 24Std. in Anwesenheit der Plasmalogene PC-PL18:1 und PC-PL 20:4 kultiviert. Die Kontrollzellen erhielten die korrespondierenden Phospholipide in der gleichen Konzentration. Nach der Inkubation wurden die Membranen präpariert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der β -Sekretase versetzt. Die Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 34 beschrieben

Während die Inkubation mit PC-PL 18:1 verglichen mit PC 18:1 keine Änderung der β -Sekretase-Aktivität bewirkte (PC-PL 18:1: 98,1% \pm 1,45%, $p=0,312$), war diese nach Inkubation mit PC-PL 20:4 signifikant auf 96,7% (\pm 0,74%, $p=0,025$) der Kontrolle, reduziert (Abb. 36). Die Effektstärken beider PL unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p=0,432$).

Zusammenfassend wurde für Plasmalogene keine bzw. nur eine minimale beeinflussende Wirkung auf die Aktivität der β -Sekretase gefunden.

4.3.4 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase

Während die β -Sekretase den ersten Prozessierungsschritt der amyloidogenen APP-Proteolyse katalysiert, stellt der α -Sekretase-Schnitt den ersten Schritt bei der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung dar. Durch die Spaltung innerhalb der A β -Domäne, wobei das lösliche sAPP α und das C-terminale α -CTF freigesetzt werden, wird letztlich die Bildung der in hohen Konzentrationen neurotoxischen A β -Peptide verhindert. Um einen Einfluss der Plasmalogene auf die nicht amyloidogene Prozessierung des APPs zu untersuchen, wurden PNFs von SH-SY5Y wt Zellen *in vitro* mit Plasmalogenen inkubiert. Von den verwendeten Plasmalogenen zeigten lediglich PC-PL 20:4 und PE-PL 22:6 einen

Einfluss auf die Aktivität der α -Sekretase verglichen mit den korrespondierenden Kontrollen. Beide Plasmalogene erhöhten die α -Sekretase-Aktivität signifikant auf 120,0% (+/- 3,62%, $p=0,004$) bzw. 116,9% (+/- 2,29%, $p=0,031$), während PC-PL 18:1 und PC-PL 22:6 die Aktivität der α -Sekretase in isolierten Plasmamembranen von SH-SY5Y wt Zellen nicht veränderten (PC-PL 18:1: 94,4% +/- 5,79%, $p=0,207$; PC-PL 22:6: 102,6% +/- 7,30%, $p=0,802$) (Abb. 37). Weiterhin unterschieden sich die Effektstärken von PC-PL 20:4 und PE-PL 22:6 auf die α -Sekretase-Aktivität signifikant von der Effektstärke des PC-PL 18:1 ($p=0,003$ bzw. $p=0,010$), nicht aber von der des PC-PL 22:6 ($p=0,081$ bzw. $p=0,133$) (Tab. 33).

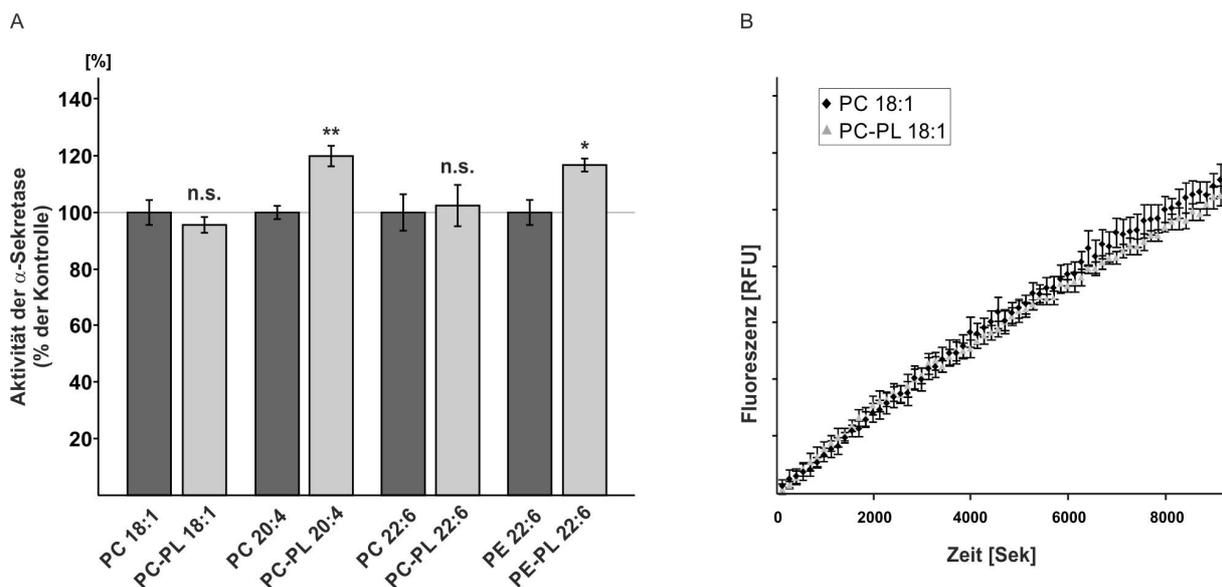


Abb. 37 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen

PNFs aus SH-SY5Y wt Zellen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der α -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrats wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der α -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. A) Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

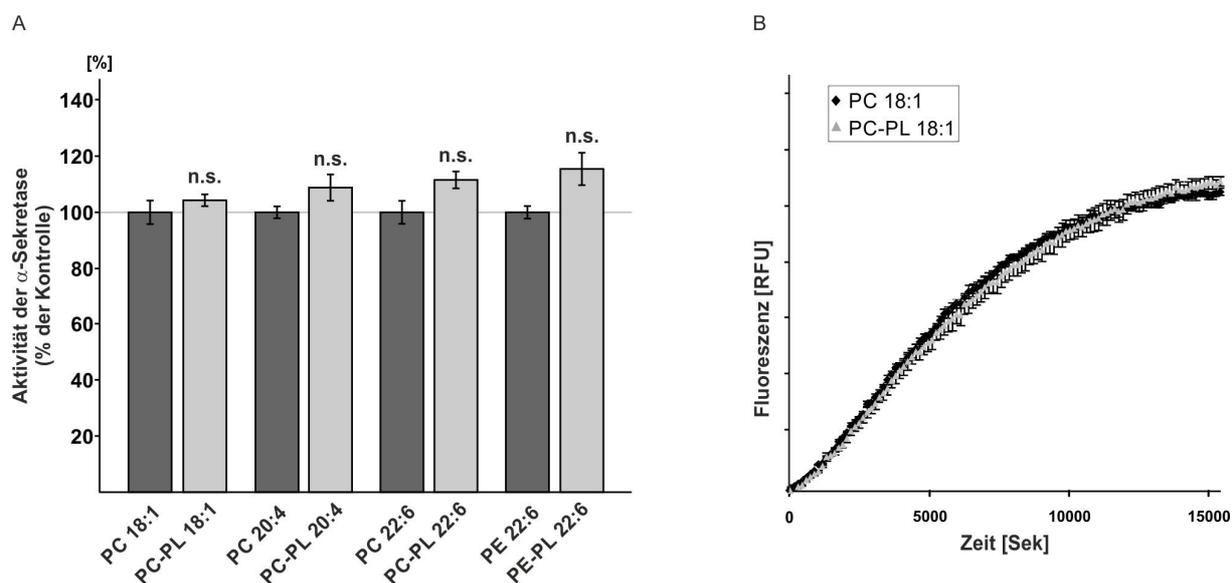
B) zeigt die durchschnittliche Kinetik der α -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit PC-PL 18:1 verglichen mit PC 18:1. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an.

Tab. 33 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die α -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y-Membranen

	PC-PL 20:4	PC-PL 22:6	PE-PL 22:6
PC-PL 18:1	0,003	0,626	0,010
PC-PL 20:4		0,081	0,502
PC-PL 22:6			0,133

Die Effekte der einzelnen PL auf die Aktivität der α -Sekretase wurden untereinander mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Inkubierte man die Plasmalogene *ex vivo* auf PNFs aus Mäusegehirnen, war die Aktivität der α -Sekretase in den isolierten Membranen tendenziell mit allen verwendeten Plasmalogenen erhöht. Mit PC-PL 18:1 ergab sich eine Erhöhung auf 104,4% (+/- 1,66%, p=0,119), mit PC-PL 20:4 auf 108,5% (+/- 3,17%, p=0,167), mit PC-PL 22:6 auf 111,2% (+/- 2,23%, p=0,117) und mit PE-PL 22:6 auf 115,1% (+/- 4,04%, p=0,121) der Kontrolle, die Effekte erreichten aber keine statistische Signifikanz (Abb. 38). Zwischen den Effektstärken der einzelnen PL auf die Aktivität der α -Sekretase wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Tab. 34).

**Abb. 38** Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der α -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen

PNFs aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der α -Sekretase versetzt. Die Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 37 beschrieben

Tab. 34 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die α -Sekretase-Aktivität in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen

	PC-PL 20:4	PC-PL 22:6	PE-PL 22:6
PC-PL 18:1	0,494	0,162	0,205
PC-PL 20:4		0,665	0,454
PC-PL 22:6			0,625

Die Effekte der einzelnen PL auf die Aktivität der α -Sekretase wurden untereinander mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

4.3.5 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase

In Analogie zu den Aktivitätsmessungen der α - und β -Sekretase wurden die oben beschriebenen Versuchsansätze für die Bestimmung der γ -Sekretase durchgeführt. Wurden die Plasmalogene PC-PL 18:1, PC-PL 20:4, PC-PL 22:6 oder PE-PL 22:6 auf PNFs, die aus SH-SY5Y wt Zellen gewonnen wurden, inkubiert, so war die γ -Sekretase-Aktivität in den aufgereinigten Membranen mit allen verwendeten Plasmalogenen reduziert, verglichen mit der Aktivität aus Membranen, die mit den korrespondierenden Phospholipiden inkubiert wurden. Der größte Effekt ergab sich nach der Inkubation mit PC-PL 22:6, hier war die Aktivität der γ -Sekretase verglichen mit der nach Inkubation mit PC 22:6 auf 60,0% (\pm 3,45%, $p=3,54 \times 10^{-5}$) verringert. PC-PL 18:1 reduzierte die γ -Sekretase-Aktivität auf 83,2% (\pm 2,30%, $p=2,71 \times 10^{-8}$), PC-PL 20:4 auf 75,7% (\pm 3,47%, $p=1,60 \times 10^{-5}$) und nach der Inkubation mit PE-PL 22:6 war die Aktivität der γ -Sekretase auf 87,4% (\pm 1,91%, $p=1,05^{-5}$) reduziert (Abb. 39). Der Effekt von PC-PL 22:6 war dabei signifikant größer als die Effekte von PC-PL 18:1 ($p=0,035$) und PE-PL 22:6 ($p=0,026$), unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem Effekt durch PC-PL 20:4 ($p=0,081$) (Tab. 35).

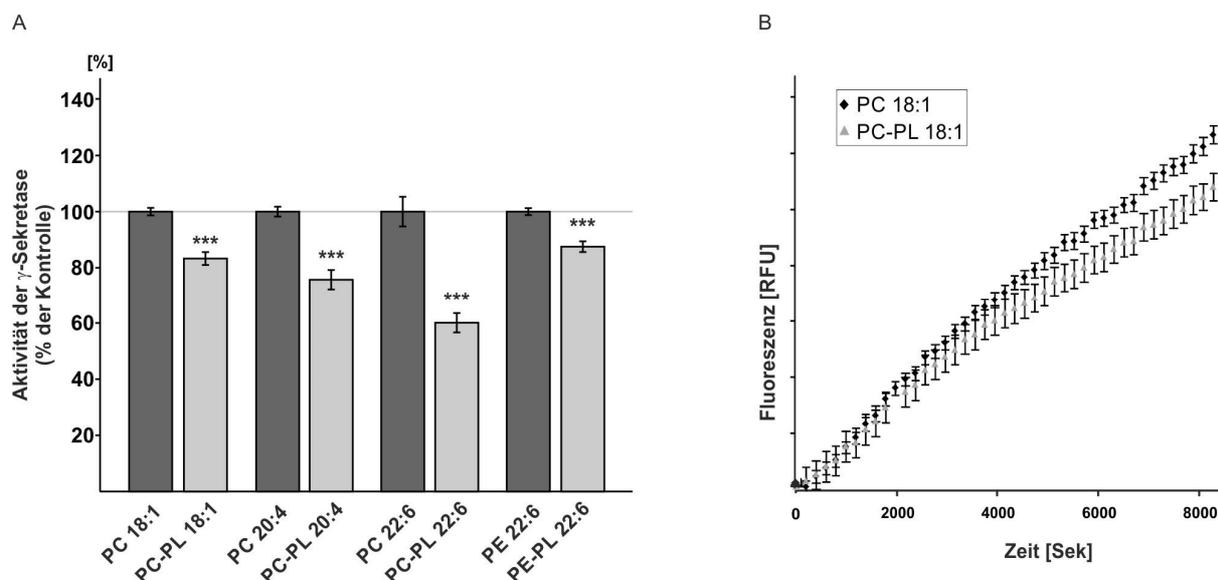


Abb. 39 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen aus SH-SY5Y wt Zellen

PNFs aus SH-SY5Y wt Zellen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt und die Umsetzung des Substrats wurde im Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der γ -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit.

A) Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

B) zeigt die durchschnittliche Kinetik der γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit PC-PL 18:1 verglichen mit PC 18:1. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an.

Tab. 35 Signifikanzen zwischen den Effekten der PL auf die γ -Sekretase-Aktivität in isolierten SH-SY5Y-Membranen

	PC-PL 20:4	PC-PL 22:6	PE-PL 22:6
PC-PL 18:1	0,248	0,035	0,402
PC-PL 20:4		0,081	0,130
PC-PL 22:6			0,026

Die Effekte der einzelnen PL auf die Aktivität der γ -Sekretase wurden untereinander mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Inkubierte man die Plasmalogene PC-PL 18:1 oder PC-PL 20:4 *ex vivo* auf isolierten Membranen aus Mäusegehirnen, so war auch hier eine signifikante Abnahme auf 82,3% (\pm 2,20%, $p = 0,0003$) der Kontrolle für PC-PL 18:1 bzw. auf 85,8% (\pm 1,72%, $p = 0,0005$) der Kontrolle für PC-PL 20:4 zu verzeichnen (Abb. 40). Beide Effektstärken unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,354$).

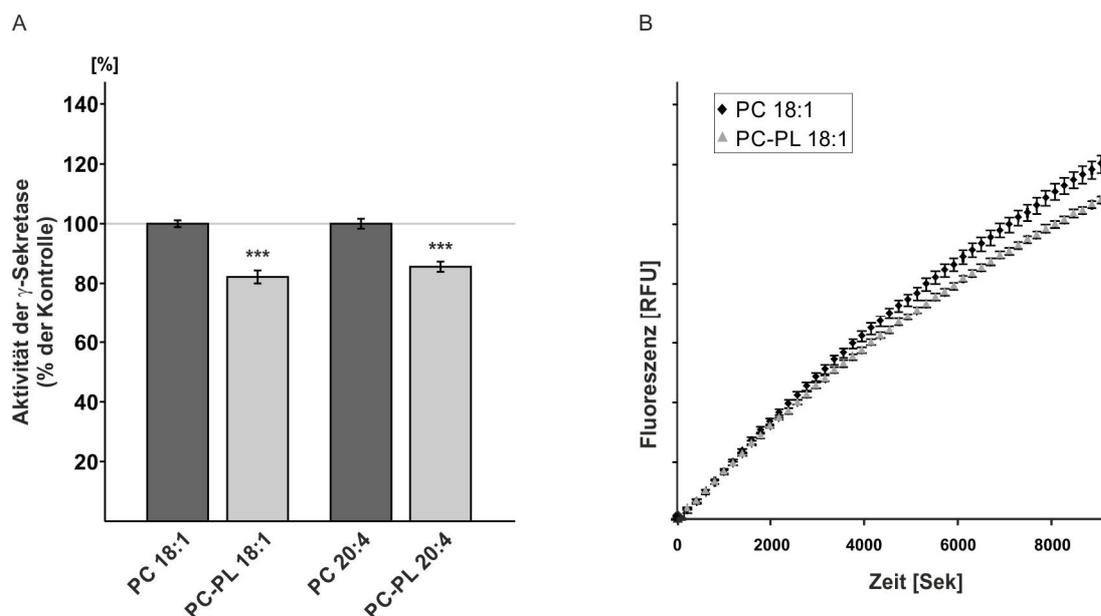


Abb. 40 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in isolierten Membranen aus Mäusegehirnen

PNFs aus Mäusegehirnen wurden für 15min mit Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden inkubiert. Nach der Isolation der Membranen wurden diese mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt. Die Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 39 beschrieben

Wurden SH-SY5Y wt Zellen über 24Std. in Anwesenheit der Plasmalogene PC-PL 18:1 oder PC-PL 20:4 bzw. der korrespondierenden Phospholipide PC 18:1 oder PC 20:4 kultiviert, so war die Aktivität der γ -Sekretase in den danach isolierten Zellmembranen, die Plasmalogene erhielten ebenfalls reduziert.

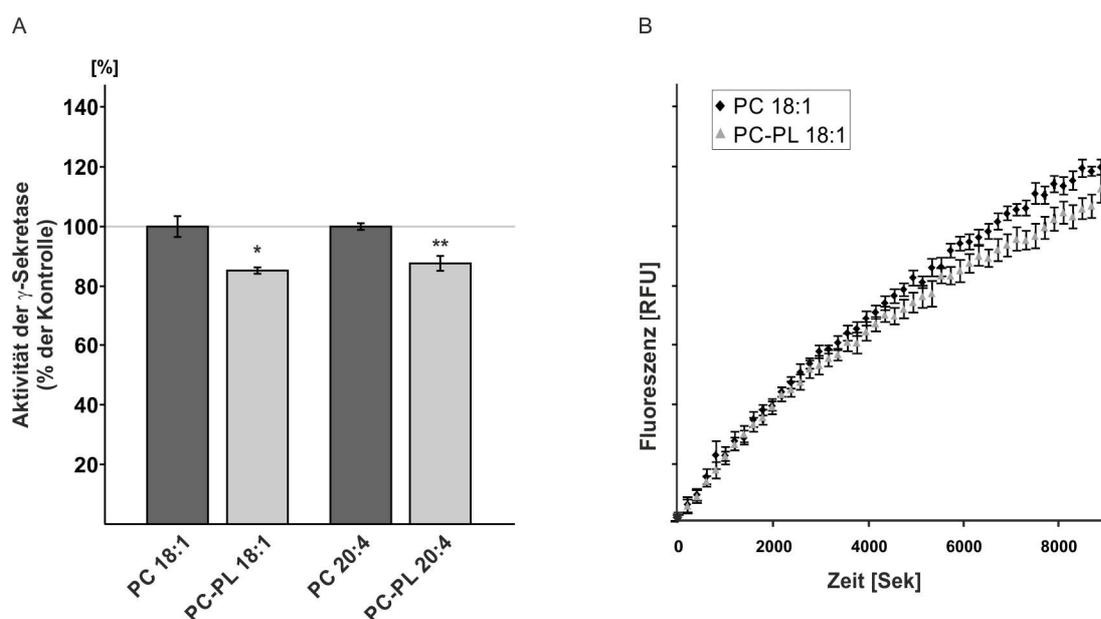


Abb. 41 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen

SH-SY5Y wt Zellen wurde für 24Std. in Anwesenheit der Plasmalogene PC-PL18:1 und PC-PL 20:4 kultiviert. Die Kontrollzellen erhielten die korrespondierenden Phospholipide in der gleichen Konzentration. Nach der Inkubation wurden die Membranen präpariert und mit einem spezifischen fluorogenen Substrat der γ -Sekretase versetzt. Die Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 39 beschrieben

Für SH-SY5Y wt Zellen, die mit PC-PL 18:1 inkubiert wurden, betrug die Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität 85,2% (+/- 1,77%, p=0,017) der Kontrolle, wurden die Zellen mit PC-PL 20:4 inkubiert, war die γ -Sekretase-Aktivität auf 87,6% (+/- 1,81%, p=0,009) reduziert (Abb. 41). Beide Effekte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (p=402). Beim Vergleich der Effektstärken, die nach der *in vitro* Inkubation von PC-PL 18:1 bzw. PC-PL 20:4 auf SH-SY5Y Membranen detektiert wurden mit denen nach der Inkubation der PL auf lebenden Zellen, waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Tab. 36). Dies entspricht den Ergebnissen der mRNA- und Proteinlevel der Sekretasen nach Inkubation mit PL, nach denen es keine Effekte auf die Transkription oder die Proteinlevel durch die Inkubation mit PL gibt.

Tab. 36 Vergleich der Effektstärken der PL auf die γ -Sekretase-Aktivität in isolierten Membranen und lebenden SH-SY5Y wt Zellen

	Membranen	Zellkultur	t-test
PC-PL 18:1	82,78	85,22	0,190
PC-PL 20:4	80,75	87,62	0,234

Die Effekte der PL auf die Aktivität der γ -Sekretase auf isolierten Membranen wurden mit den Effekten durch die Inkubation auf lebenden Zellen verglichen. Dabei wurden die Effekte der isolierten Membranen aus SH-SY5Y Zellen und Mäusegehirnen gemittelt. Signifikanzen wurden mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Plasmalogene reduzieren also signifikant die Aktivität der γ -Sekretase und inhibieren somit den letzten Schritt der APP-Prozessierung, der zur Freisetzung der A β -Peptide führt. Es handelt sich dabei um eine direkte Beeinflussung der Enzymaktivität, ohne eine Veränderung der Transkription oder der Proteinlevel.

4.3.6 Der Einfluss von PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 auf die γ -Sekretase in humanen *post mortem* Gehirnen

Die gezeigten Ergebnisse sprechen für eine inhibitorische Wirkung der Plasmalogene auf die Aktivität der γ -Sekretase und damit auf die amyloidogene APP-Prozessierung. Umgekehrt könnten also die reduzierten PC-PL-Spiegel in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten die γ -Sekretase-Aktivität und damit die Menge an sekretierten A β -Peptiden erhöhen. Im Folgenden

sollte nun überprüft werden, ob eine Erhöhung der Plasmalogen-Level prinzipiell eine Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität in den Gehirnen von Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren, bewirken kann.

Hierzu wurden die Membranen von 6 verschiedenen *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten isoliert und *ex vivo* mit PC-PL 18:1, der am deutlichsten verminderten Plasmalogen-Spezies in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten, inkubiert. In 5 der 6 analysierten Gehirne führte die Inkubation von PC-PL 18:1 zu einer Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität verglichen mit der Inkubation von PC 18:1 in PNFs der gleichen Gehirnproben (Gehirn 1: 93,0%; Gehirn 2: 68,5%; Gehirn 3: 78,2%; Gehirn 4: 46,0%; Gehirn 6: 89,4%). Lediglich die Proben aus einem Gehirn zeigten nach der Inkubation mit PC-PL 18:1 eine leichte Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität auf 107,9%. Im Mittel ergab sich eine Reduktion auf 80,5% (+/- 8,79%), die mit einem p-Wert von 0,0508 knapp nicht die festgelegte Signifikanzgrenze von 0,05 erreichte (Abb. 42).

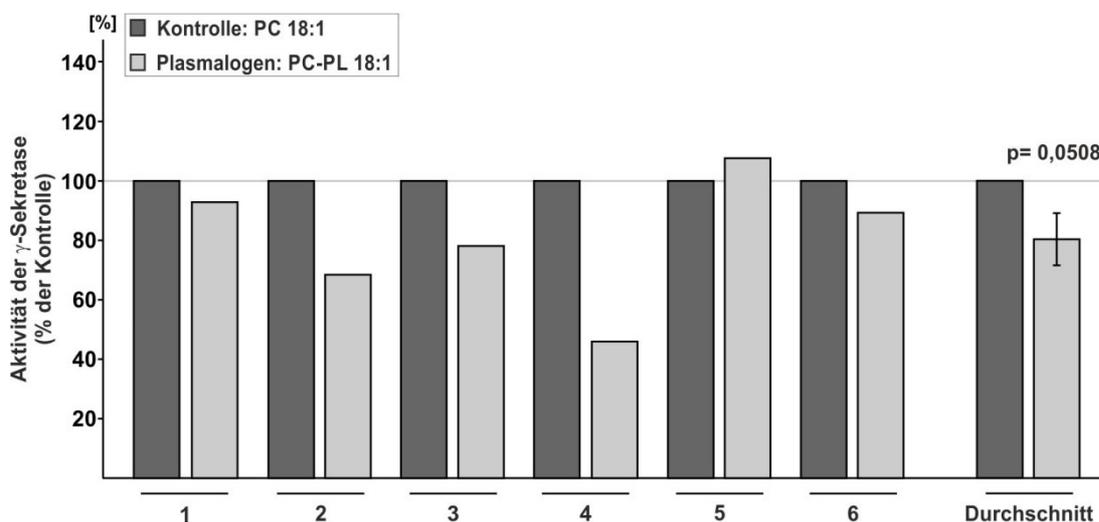


Abb. 42 Der Einfluss von PC-PL 18:1 auf die Aktivität der γ -Sekretase in humanen *post mortem* Gehirnproben

Aus 6 verschiedenen humanen *post mortem* Gehirnproben von Alzheimer-Patienten wurden postnukleäre Fraktionen gewonnen. Diese wurden aufgeteilt und für 15min mit PC-PL 18:1 bzw. zur Kontrolle mit dem korrespondierenden Phospholipid PC 18:1 inkubiert. Nach Isolierung der Membranen wurde die Aktivität der γ -Sekretase über die Umsetzung eines spezifischen Substrats fluorometrisch bestimmt. Ausgewertet wurde die Steigung der Fluoreszenz über die Zeit. Gezeigt sind die Werte der einzelnen Gehirnproben, sowie der Durchschnitt aller Gehirne. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach der Inkubation von PNFs humaner Gehirne mit PC-PL 20:4 zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität in 5 Gehirnproben. Gehirn 1 zeigte eine Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität auf 51,4%, Gehirn 2 auf 89,3%, Gehirn 3 auf 75,8%, Gehirn 4 auf 70,6 und Gehirn 6 auf 90,1% der Kontrolle (Abb. 43). Wie bei der Inkubation von PC-PL 18:1

zeigte die Probe des gleichen Gehirns (Gehirn 5) eine Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität auf 138,5% und damit den gegenteiligen Effekt.

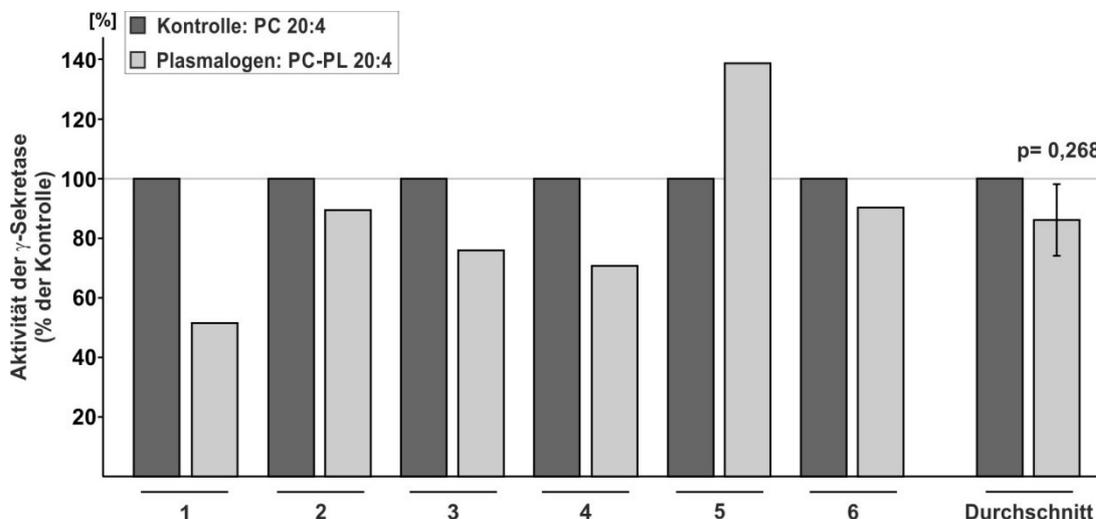


Abb. 43 Der Einfluss von PC-PL 20:4 auf die Aktivität der γ -Sekretase in humanen *post mortem* Gehirnproben

Aus 6 verschiedenen humanen *post mortem* Gehirnproben von Alzheimer-Patienten wurden postnukleäre Fraktionen gewonnen. Diese wurden aufgeteilt und für 15min mit PC-PL 20:4 bzw. zur Kontrolle mit dem korrespondierenden Phospholipid PC 20:4 inkubiert. Die Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 42 beschrieben.

Mittelt man die gemessenen Effekte aller 6 Gehirnproben, so reduzierte die Inkubation mit PC-PL 20:4 in den isolierten Membranen die Aktivität der γ -Sekretase auf 85,9% (+/- 11,99%, p=0,268) der Kontrolle.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse ein inhibitorisches Potential der Plasmalogene bezüglich der amyloiden APP-Prozessierung und damit der Bildung von A β -Peptiden. Die reduzierten Plasmalogenkonzentrationen, wie sie in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden wurden, könnten also eine Rolle in der Progression der Alzheimer Krankheit spielen.

4.3.7 Bestimmung der AGPS-Proteinlevel in humanen Alzheimer-Gehirnen

Die vorliegenden Analysen ergaben reduzierte Plasmalogenkonzentrationen in post mortem Gehirnen von Alzheimer-Patienten. Frühere Ergebnisse unseres Labors zeigten jedoch eine erhöhte Transkription des geschwindigkeitslimitierenden Enzyms der Plasmalogen-Synthese, der Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS) (Grimm *et al.* 2011d). Im Folgenden wurden deshalb die AGPS-Proteinlevel der humanen Alzheimer-Gehirne bestimmt und mit

der Kontrollgruppe verglichen. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der AGPS-Proteinlevel auf 91,68% (+/- 4,17%, $p=0,0025$) (Abb. 44).

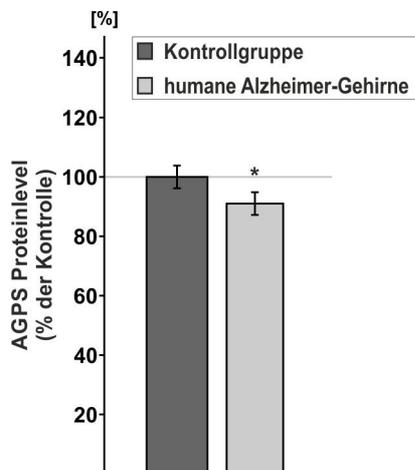


Abb. 44 Bestimmung des AGPS-Proteinlevels in humanen *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten

Die AGPS-Proteinlevel wurden mittels Western Blot Analyse mit dem spezifischen anti-AGPS-AK (ab90642) aus 37 *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten bestimmt und mit denen von 21 gesunden Personen verglichen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

In Übereinstimmung mit den reduzierten Plasmalogenspiegeln in humanen Alzheimer-Gehirnen waren also auch die Proteinlevel der AGPS reduziert. Diese Reduktion der AGPS-Proteinlevel könnte eine Folge peroxisomaler Dysfunktion durch oxidativen Stress in den *post mortem* Gehirnen der Alzheimer-Patienten sein. Deshalb wurde die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Lipidperoxidation in den Gehirnproben mittels Fluoreszenz-basierter Nachweise bestimmt. Es ergab sich eine auf 122,84% (+/- 4,06%, $p=0,004$) erhöhte Lipidperoxidation sowie auf 167,58% (+/- 2,95%, $p=8,56 \times 10^{-05}$) erhöhte ROS-Werte in den Alzheimer-Gehirnproben verglichen mit den Gehirnhomogenaten der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 45).

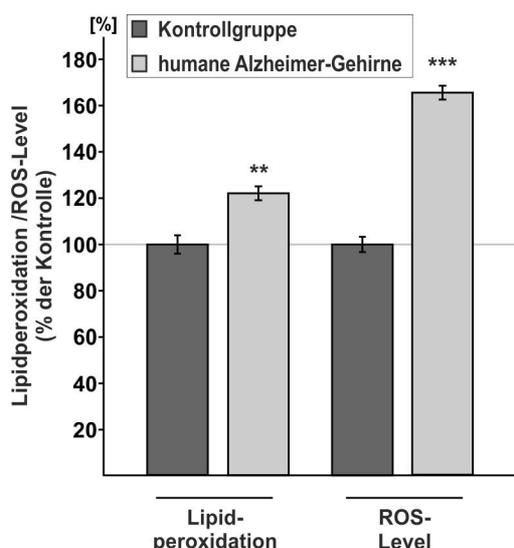


Abb. 45 Bestimmung der Lipidperoxidation und der ROS-Level in *post mortem* Alzheimer-Gehirnen

Homogenate von 37 *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden wegen Limitierung des Materials gepoolt und in jeweils drei unabhängigen Experimenten wurden die Lipidperoxidation mittels Aminophenylfluorescein (APF) bzw die ROS-Level mittels Amplex Red-Nachweis bestimmt. Diese wurden mit gepoolten Gehirnhomogenaten von 21 gesunden Personen verglichen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt.

Die Reduktion der Plasmalogenspiegel in den *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten ist also bedingt durch die Reduktion des Proteinlevels des

geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Plasmalogen-Synthese. Dies ist möglicherweise eine Folge von erhöhtem Aufkommen von reaktiven Sauerstoffspezies in diesen Gehirnen.

4.4 Der Einfluss von funktionellen aSMase Inhibitoren auf die APP-Proteolyse

Die folgenden Daten sind Inhalt des sich in Vorbereitung befindlichen Manuskriptes:

Rothhaar T.L., Grimm H.S., Hauptenthal V.J., Mett J., Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.K., Stahlmann C.P., Zimmer V.C., Schwarz L.K., Hentschel L.M., Lehmann J., Schäfer K.H., Friedrich R.P., Wanker E.E., Hartmann T., Grimm M.O. (2013). *Amitriptyline and other antidepressants decrease amyloidogenic processing of the Alzheimer's amyloid precursor protein by affecting sphingolipid homeostasis via acid Sphingomyelinases.*

Post mortem Gehirne von Alzheimer-Patienten zeigen verglichen mit Gehirnen gesunder Kontrollgruppen Veränderungen im Gehalt von Sphingolipiden. So wurden sowohl in den Gehirnen als auch in der Spinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten erhöhte Konzentrationen an Ceramid nachgewiesen (Han *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005). Eine Expressionsanalyse der im Sphingolipidstoffwechsel beteiligten Enzyme in Gehirnen von an Alzheimer Erkrankten ergab zudem eine Erhöhung der Enzyme der Ceramid *de novo* Synthese, während die Enzyme, die an der Glycosphingolipid-Synthese beteiligt sind, niedriger exprimiert wurden (Katsel *et al.*, 2007). Sphingomyelinasen (SMasen) katalysieren den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin und stellen somit einen wichtigen Regulator der Sphingolipidhomöostase dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Antidepressiva, die zur Gruppe funktioneller Inhibitoren der azidischen SMase (FIASMA, engl.: Funktional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase) gehören, auf die Prozessierung des APPs untersucht.

4.4.1 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Produktion der APP Spaltprodukte

Um einen möglichen Einfluss des Antidepressivums Amitriptylin auf die APP-Prozessierung festzustellen, wurden SH-SY5Y Zellen mit 30µM Amitriptylin inkubiert und zunächst die Prozessierungsprodukte des APPs per Western Blot Analyse untersucht. Die empfohlene therapeutische Plasmakonzentration für Amitriptylin liegt bei 60-220ng/ml (Vandel *et al.*, 1978). Amitriptylin sowie andere trizyklische Antidepressiva akkumulieren bei chronischer Gabe im Gehirn der Patienten an und erreichen dort Konzentrationen, die in der Literatur mit dem 8-125fachen der Plasmakonzentration angegeben werden (Bickel, 1975a, b; Glotzbach and Preskorn, 1982; Sunshine and Baeumler, 1963). Somit sollte die Konzentration im Gehirn bei einem Plasmalevel von 220ng/ml rechnerisch zwischen 1,8 und 27,5µg/ml liegen. Die von uns gewählte Konzentration von 30µM entspricht ca. 9,4µg/ml und liegt damit im mittleren Bereich der im Gehirn erreichten Dosis. Die ermittelte Zytotoxizität nach der Inkubation mit Amitriptylin betrug 1,93% (+/- 0,4%).

Nach Inkubation des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin auf SH-SY5Y Zellen, die stabil mit APP695 transfiziert sind, zeigte sich eine Abnahme sekretierter A β -Peptide im Inkubationsmedium auf 73,1% (+/- 2,54%, $p=1,33 \times 10^{-6}$), verglichen mit Zellen, die zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel H $_2$ O inkubiert wurden. Auch die amyloidogenen Prozessierungsprodukte β -CTF und sAPP β waren nach Inkubation mit Amitriptylin auf 63,65% (+/- 3,08, $p=1,33 \times 10^{-7}$) bzw. 69,80% (+/- 2,38%, $p=4,71 \times 10^{-8}$) verringert (Abb. 46).

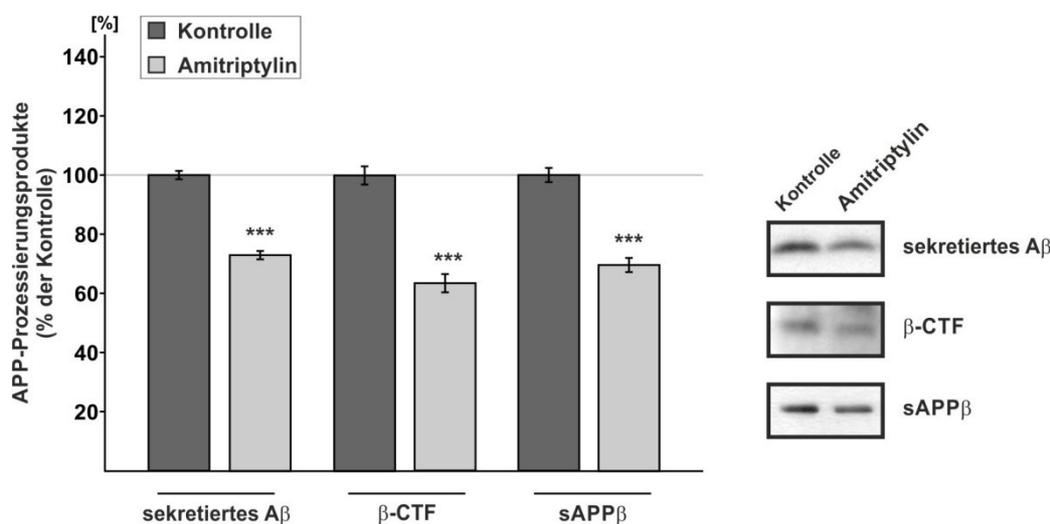


Abb. 46 Der Effekt von Amitriptylin auf die Produkte der amyloidogenen APP-Prozessierung

SH-SY5Y wt Zellen, bzw. SH-SY5Y Zellen, die APP695 überexprimierten, wurden für 24Std. in Anwesenheit von 30 μ M Amitriptylin kultiviert. Die APP-Fragmente A β und β -CTF wurden mittels Immunopräzipitation mit dem AK W02 aus dem Inkubationsmedium (A β) bzw. dem Zelllysat (β -CTF) der SH-SY5Y APP695 Zellen angereichert und per Western Blot Analyse nachgewiesen. sAPP β wurde direkt aus dem Inkubationsmedium der SH-SY5Y wt Zellen per Western Blot mit dem anti-sAPP β -AK detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 10 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Die Analyse der auf dem nicht amyloidogenen Prozessierungsweg entstehenden APP-Spaltprodukte ergab hingegen eine Erhöhung des α -CTFs auf 134,92% (+/- 5,75%, $p=0,0004$) nach der Inkubation mit Amitriptylin auf SH-SY5Y APP. Das lösliche sAPP α war im Inkubationsmedium von Amitriptylin-inkubierten SH-SY5Y wt Zellen auf 156,44% (+/- 3,34, $p=0,0002$) erhöht (Abb. 47).

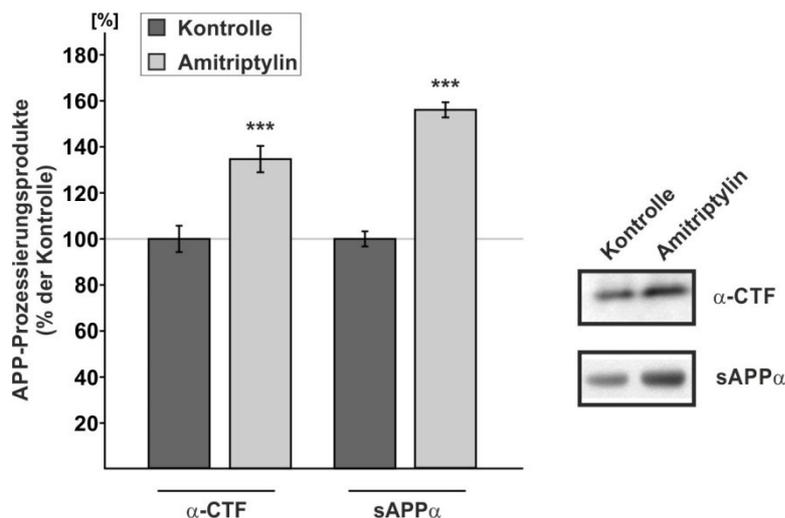


Abb. 47 Der Effekt von Amitriptylin auf die Produkte der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung

SH-SY5Y wt Zellen, bzw. SH-SY5Y Zellen, die APP695 überexprimierten, wurden für 24Std. in Anwesenheit von 30 μ M Amitriptylin kultiviert. Das APP-Fragment α -CTF wurden mittels Immunpräzipitation mit dem AK 2214 aus dem Zelllysat der SH-SY5Y APP695 Zellen angereichert und per Western Blot Analyse nachgewiesen. sAPP α wurde direkt aus dem Inkubationsmedium der SH-SY5Y wt Zellen per Western Blot mit dem AK W02 detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 10 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

4.4.2 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität und die Proteinlevel der α -, β - und γ -Sekretase

Nachdem die Analyse der APP-Spaltprodukte nach Amitriptylin-Inkubation auf eine Erhöhung der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung hindeutet, während der amyloidogene APP-Prozessierungsweg reduziert zu sein scheint, wurden die Aktivitäten der an der proteolytischen Spaltung des APPs beteiligten Sekretasen mittels Fluoreszenz-basierter Assays untersucht.

Die Aktivität der α -Sekretase war nach Inkubation mit Amitriptylin auf 121,13% (+/- 1,83%, $p = 0,0002$) erhöht. Damit unterschied sich der Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase nicht signifikant von dem auf α -CTF (134,92%, $p = 0,268$), war aber signifikant niedriger als der Effekt auf das sAPP α -Level (156,44%, $p = 0,0004$). Die Analyse der β -Sekretase-Aktivität ergab eine Reduktion auf 75,51% (+/- 3,49%, $p = 5,94 \times 10^{-5}$), die der γ -Sekretase eine Reduktion auf 72,8% (+/- 2,77%, $p = 1,74 \times 10^{-6}$) der Kontrolle in Zellen, die zuvor mit Amitriptylin inkubiert wurden (Abb. 48).

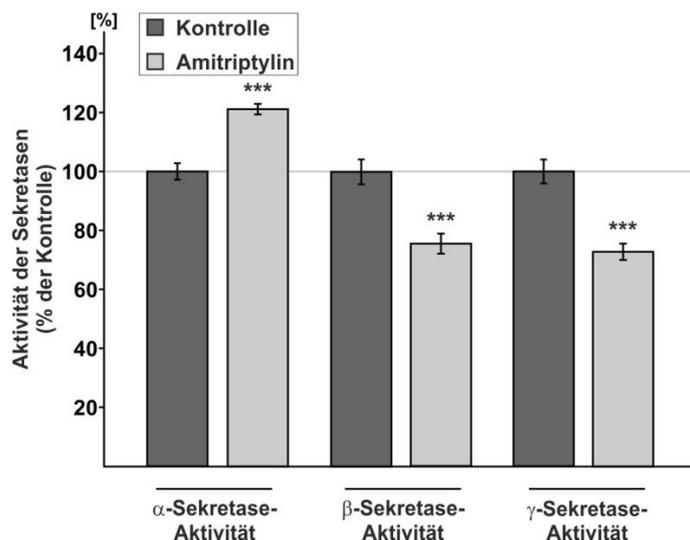


Abb. 48 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität der Sekretasen

SH-SY5Y wt Zellen wurden in 96-Loch Zellkulturschalen für 24Std. mit 30 μ M Amitriptylin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit spezifischen Substraten der α -, β - und γ -Sekretase, verdünnt in Cell-Imaging-Solution inkubiert und die Umsetzung der Substrate wurde direkt von den lebenden Zellen in einem Infinite-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität der Sekretasen entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 12 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Der Effekt auf die Aktivität der β -Sekretase unterschied sich damit nicht signifikant von den Effekten auf die Produkte des β -Sekretase-Schnitts β -CTF ($p = 0,120$) und sAPP β ($p = 0,364$). Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Aktivität der α -Sekretase durch eine Erhöhung des Proteinlevels der Enzyme mit α -Sekretase-Aktivität bedingt ist, wurden per Western Blot Analyse die Proteinlevel von ADAM10 und ADAM17, die beiden Hauptvertreter der α -Sekretase in neuronalen Zellen (Allinson *et al.*, 2004; Buxbaum *et al.*, 1998), bestimmt.

Wie Abb. 49 zeigt, war der ADAM10 Proteinlevel nach Inkubation mit Amitriptylin in SH-SY5Y wt Zellen unverändert (99,62% \pm 1,59%, $p = 0,871$), während der Proteinlevel von ADAM17 auf 120% (\pm 2,25%, $p = 5,07 \times 10^{-6}$) erhöht war. Die mRNA-Level beider α -Sekretasen waren hingegen unverändert (ADAM10: 97,0% \pm 12,98%, $p = 0,82$; ADAM17: 99,9% \pm 19,95%, $p = 0,99$).

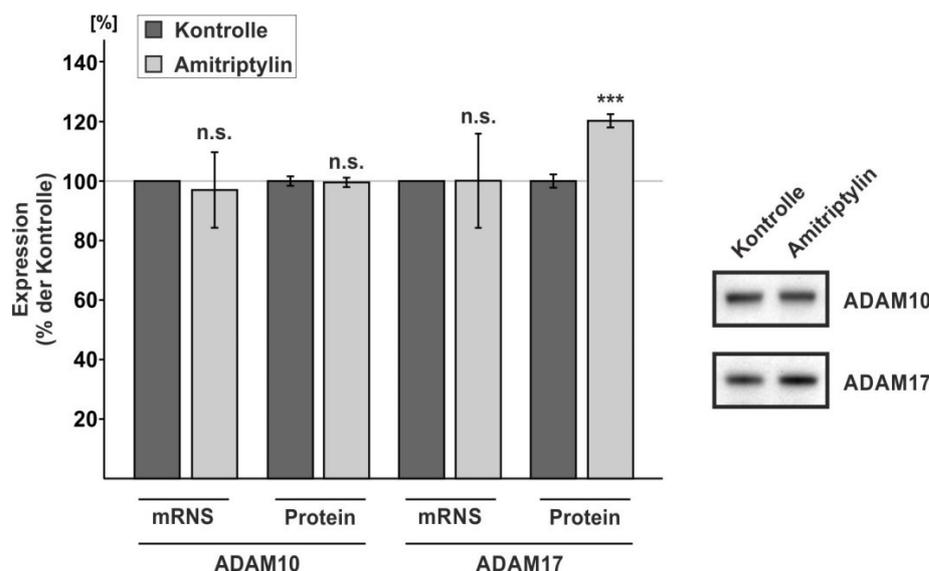


Abb. 49 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von ADAM10 und ADAM17

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von Amitriptylin kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen bezüglich ihrer Expression der α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 analysiert. Mittels RT-PCR Analyse wurde unter Verwendung spezifischer Primer die Gen-Expression der α -Sekretasen bestimmt. Die Proteinspiegel wurden per Western Blot mit den Antikörpern anti-ADAM10 (735-749) und anti-ADAM17 (ab39162) detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Die Amitriptylin abhängige Erhöhung des löslichen sAPP α im Zellkulturmedium inkubierter SH-SY5Y wt Zellen die mit 156,44% signifikant höher als lag als der Effekt auf das ADAM17 Proteinlevel ($p = 0,00039$), deutet auf eine zusätzliche Wirkung auf die Aktivität der α -Sekretase. Es wurde deshalb in einem zellfreien Versuchsansatz die Wirkung von Amitriptylin auf die Aktivität eines aufgereinigten ADAM17 Enzyms untersucht.

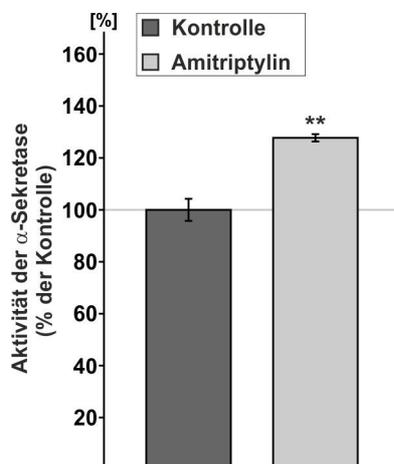


Abb. 50 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität von ADAM17 *in vitro*

Aufgereinigtes ADAM17-Enzym wurde zusammen mit einem Lipidextrakt aus humanen *post mortem* Gehirnproben *in vitro* mit 30 μ M Amitriptylin inkubiert. Nach Zugabe eines spezifischen ADAM17-Substrates wurde die Umsetzung unter Fluoreszenz-Emission im Infinite-Fluorometer aufgezeichnet. Die Aktivität der α -Sekretase entspricht der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Aktivität des aufgereinigten ADAM17-Enzyms war in Anwesenheit von Amitriptylin auf 129,1% (+/- 2,51%, $p=0,007$) erhöht (Abb. 50), was auf eine direkte Aktivierung der α -Sekretase-Aktivität durch Amitriptylin deutet.

Das Proteinlevel der β -Sekretase BACE1 war nach Amitriptylin-Inkubation in SH-SY5Y wt Zellen verglichen mit den Kontrollzellen auf 76,3% (+/- 1,74%, $p=2,18 \times 10^{-10}$) verringert, was tendenziell der gezeigten Reduktion der β -Sekretase-Aktivität auf 75,5% entspricht ($p=0,840$). Die Transkriptions-Analyse mittels RT-PCR ergab hingegen eine Erhöhung der BACE-Transkription auf 123,9% (+/- 21,50%), die allerdings nicht signifikant war ($p=0,298$) (Abb. 51).

Stellvertretend für die γ -Sekretase, die aus 4 Untereinheiten besteht, wurde der Proteinlevel von PS1, dem katalytisch aktiven Zentrum der γ -Sekretase, mittels Western Blot Analyse untersucht.

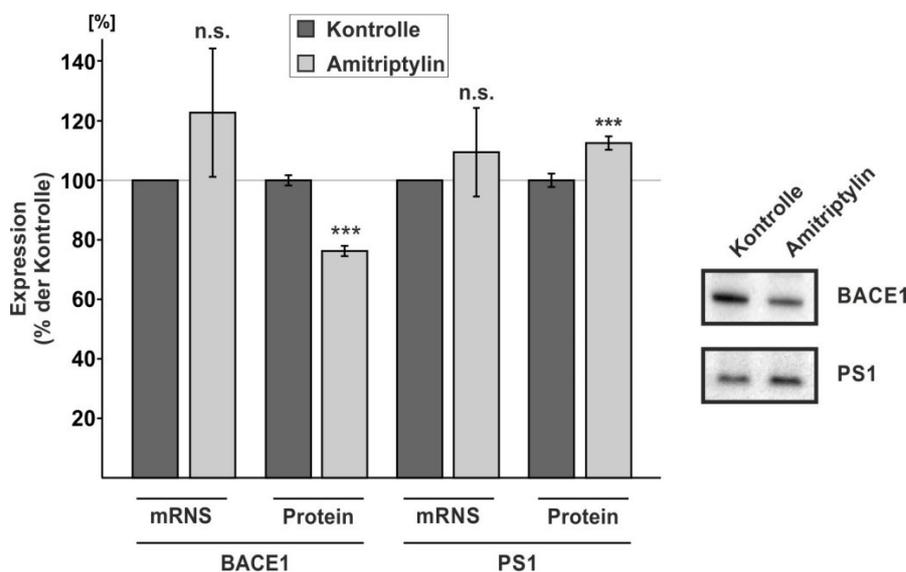


Abb. 51 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von BACE1 und PS1

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von Amitriptylin kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen bezüglich ihrer Expression der β -Sekretase BACE1 und des aktiven Zentrums der γ -Sekretase PS1 analysiert. Mittels RT-PCR Analyse wurde unter Verwendung spezifischer Primer die Gen-Expression bestimmt. Die Proteinspiegel wurden per Western Blot mit den Antikörpern anti-BACE1 (B0806) und anti-PS1 (sc-7860) detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Im Gegensatz zur γ -Sekretase-Aktivität, die eine Abnahme zeigte, ergab die Analyse des PS1 Proteinlevels eine Erhöhung auf 112,6% (+/- 2,26%, $p=0,0009$). In Übereinstimmung mit dem PS1-Proteinlevel, war auch die PS1-Expression, wenn auch nicht signifikant auf 110,4% (+/- 14,73%, $p=0,499$) erhöht (Abb. 51).

Zusätzlich wurde der Proteinlevel des Substrates APP bestimmt, das keine Veränderung nach der Inkubation mit Amitriptylin zeigte (96,64% +/- 5,96%, p=0,694) (Abb. 52).

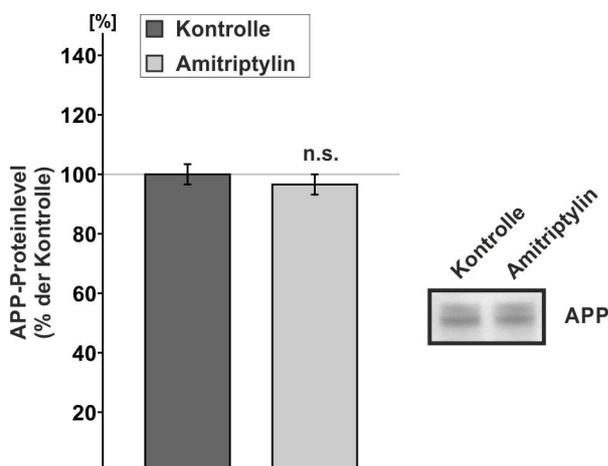


Abb. 52 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Expression von APP

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von Amitriptylin kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen bezüglich des APP-Proteinlevels analysiert. Das APP-Protein wurde per Western Blot Analyse aus dem Zelllysate mit dem Antikörper W02 detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von 15 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Rechts ist ein repräsentativer Ausschnitt der Western Blots dargestellt.

4.4.3 Der Einfluss von Amitriptylin auf die γ -Sekretase Verteilung in den Lipid Rafts

Einem mehrfach postulierten Modell zufolge findet die amyloidogene Prozessierung des APPs bevorzugt in Cholesterin- und Sphingolipidreichen Membranmikrodomänen, den sogenannten Lipid Rafts statt (Ehehalt *et al.*, 2003; Hur *et al.*, 2008; Tun *et al.*, 2002), während die nicht amyloidogene APP-Proteolyse durch die α -Sekretase in den Non-Raft Bereichen der Plasmamembran lokalisiert ist (Harris *et al.*, 2009; Kojro *et al.*, 2001). Da die γ -Sekretase sowohl das durch die β -Sekretase generierte β -CTF, als auch das auf dem nicht amyloidogenen Weg entstandene α -CTF schneidet, ist die Lokalisation der γ -Sekretase entscheidend für die Entstehung des A β -Peptids. Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine signifikante Differenz zwischen der reduzierten Aktivität der γ -Sekretase und dem erhöhten Proteinlevel der γ -Sekretasen-Komponente PS1 ($p=1,22 \times 10^{-6}$). Deshalb wurde die γ -Sekretase-Aktivität sowie das PS1 Proteinlevel in den Lipid Raft Domänen bestimmt. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Saccharose-Gradienten wurden die Lipid Rafts aus SH-SY5Y wt Zellen isoliert, die zuvor mit Amitriptylin bzw. mit H₂O inkubiert wurden. Zur Identifikation des Bereiches des Gradienten, der die Lipid Rafts enthielt, wurden 16

einzelnen Fraktionen mittels Western Blot Analyse untersucht (Abb. 53). Als Marker für die Lipid Raft reichen Fraktionen wurde ein anti-Flotillin-AK verwendet, für die Non-Raft Bereiche wurde der Plasmamembran-Marker Cadherin benutzt.

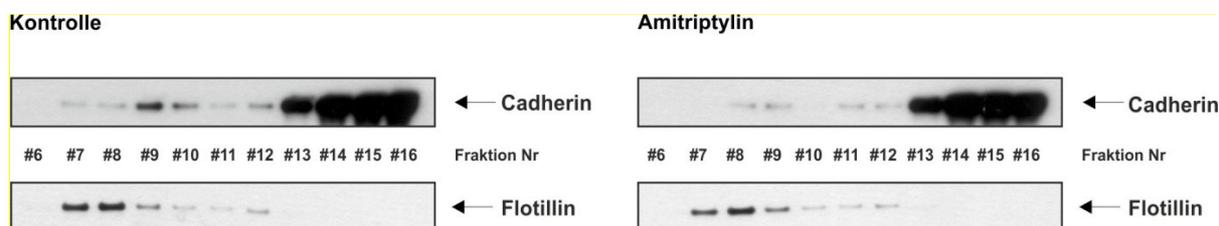


Abb. 53 Lokalisation der Lipid Raft- und Non-Raft-Fraktionen

SH-SY5Y wt Zellen wurden mit Amitriptylin inkubiert und das Zellhomogenat wurde über einen Saccharose-Dichtegradienten mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die Gradienten wurden in 16 einzelnen Fraktionen gesammelt und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Per Western Blot unter Verwendung spezifische Antikörper gegen den Lipid Raft-Marker Flotillin und den Plasmamembran-Marker Cadherin wurden die Lipid Raft-positiven und Non-Raft-Fraktionen identifiziert. Die Abbildung zeigt exemplarische Western Blots der Fraktionen nach Amitriptylin-Inkubation bzw. der Kontrollen.

Die Analyse der γ -Sekretase-Aktivität in den vereinigten Flotillin-positiven, also Lipid Raft reichen Fraktionen ergab eine signifikante Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität auf 93,56% (\pm 0,700%, $p=6,87 \times 10^{-5}$), in den Non-Raft Fraktionen war die γ -Sekretase-Aktivität dagegen auf 113,92% (\pm 1,02%, $p=2,16 \times 10^{-6}$) erhöht (Abb. 54 A). Somit ergab sich eine signifikante Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität in den Lipid Rafts im Verhältnis zu der in den Non-Rafts von 82,1% (\pm 1,04%, $p=1,73 \times 10^{-7}$) (Abb. 54 B).

Während das PS1 Proteinlevel in den Lipid Rafts durch die Inkubation mit Amitriptylin nicht signifikant geändert war (96,34% \pm 3,73%, $p=0,503$), lag es in den Non-Rafts mit 138,64% (\pm 4,12%, $p=5,82 \times 10^{-5}$) signifikant erhöht vor (Abb. 54 A). Analog zur Aktivität der γ -Sekretase war also das PS1 Proteinlevel in den Lipid Raft-Fraktionen im Verhältnis zu den Non-Rafts signifikant auf 69,0% (\pm 5,58%, $p=0,003$) der Kontrolle reduziert (Abb. 54 B), was auf eine Umverteilung der γ -Sekretase aus den Lipid Rafts hin zu den Non-Raft-Bereichen hinweist, was letztlich zu einer Verschiebung der APP-Proteolyse zum nicht amyloidogenen Weg führt.

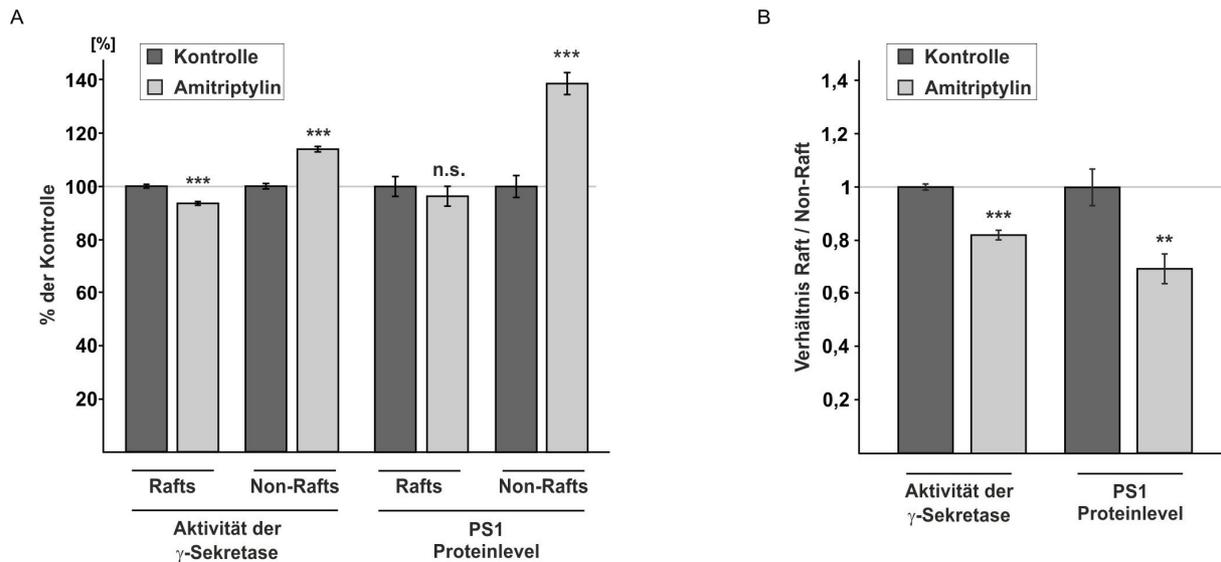


Abb. 54 Die Verteilung der γ -Sekretase in den Lipid Rafts und Non-Rafts in Abhängigkeit von Amitriptylin

Die Flotillin-positiven Lipid Raft-Fraktionen (7-9) sowie die Cadherin-positiven Non-Raft-Fraktionen (13-16) wurden vereinigt und unter Verwendung eines fluorogenen γ -Sekretase-Substrates auf die Aktivität der γ -Sekretase analysiert. Per Western Blot Analyse mit dem anti-PS1 AK sc7860 wurde zudem das PS1 Proteinlevel der Lipid Raft und Non-Raft Fraktionen bestimmt. A) Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Aktivität der γ -Sekretase und der PS1 Proteinlevel in den Lipid Rafts und den Non-Rafts. B) Gezeigt ist Verhältnis der γ -Sekretase-Aktivität bzw. des PS1 Proteinlevels in den Lipid Rafts zu der in den Non-Raft-Fraktionen in Abhängigkeit der Amitriptylin-Inkubation. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts 6 unabhängiger Experimente an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.4 Der Einfluss von Amitriptylin auf die Degradation der A β -Peptide

Neben dem Verhältnis von amyloidogener zu nicht amyloidogener APP-Prozessierung wird die Menge an sekretierten A β -Peptiden im Zellkulturmedium auch von dessen Degradation bestimmt. Das „insulin-degrading-enzyme“ IDE ist neben Neprilysin eines der hauptsächlichen A β -degradierenden Enzyme (Farris *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 1998). Um einen Amitriptylin-medierten Effekt auf die A β -Degradation durch IDE zu untersuchen, wurden SH-SY5Y wt Zellen mit Amitriptylin bzw. H₂O inkubiert und das Zellkulturmedium, das sekretierte IDE-Enzyme enthielt, wurde für 24Std. in einem zellfreien Ansatz mit synthetischen A β -Peptiden inkubiert.

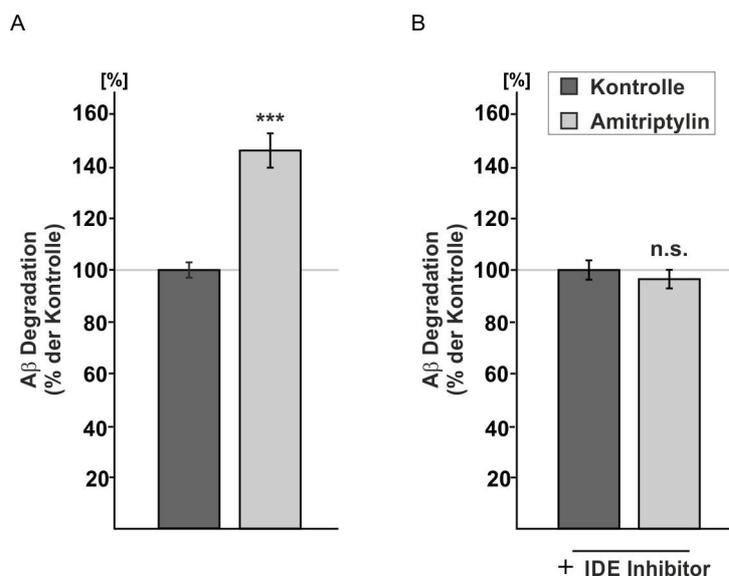


Abb. 55 Die Degradation von Aβ durch IDE in Abhängigkeit von Amitriptylin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von Amitriptylin kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und zellfrei für 24Std. bei 37°C mit synthetischem Aβ40 inkubiert. Zur Bestimmung der spezifischen Aβ-Degradation durch IDE wurden zusätzlich Proben mit 1mM des IDE-Inhibitors NEM versetzt (B). Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das verbliebene Aβ wurde im Western Blot mit dem AK W02 detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung 12 unabhängiger Experimente. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die nachfolgende Western Blot Analyse der verbliebenen, also nicht degradierten Aβ-Peptide ergab eine auf 145,8% (+/- 7,47%, $p = 0,0006$) gesteigerte Degradation im Zellkulturmedium der SH-SY5Y wt Zellen, die zuvor mit Amitriptylin inkubiert wurden, verglichen mit dem der Kontrollzellen (Abb. 55 A). Enthielt der zellfreie Inkubationsansatz zusätzlich den IDE-Inhibitor NEM, so war kein Unterschied in der Menge des verbliebenen Aβs im Zellkulturmedium der Amitriptylin-inkubierten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen mehr detektierbar (Abb. 55 B). Somit scheint die erhöhte Aβ-Degradation durch einen IDE-medierten Effekt des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin bedingt.

4.4.5 Der Effekt von Amitriptylin auf die aSMase, Sphingomyelin und Ceramid

Das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin gehört zur Gruppe der FIASMA und inhibiert das Enzym azidische Sphingomyelinase (aSMase) (Becker *et al.*, 2010b; Teichgraber *et al.*, 2008). Die aSMase katalysiert den Abbau von Sphingomyelin, wobei Ceramid und Phosphorylcholin entsteht.

Um zu überprüfen ob und in welchem Maße unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen die aSMase durch Amitriptylin gehemmt wird, wurden SH-SY5Y wt Zellen über 24Std. mit Amitriptylin inkubiert und die Aktivität der aSMase wurde bestimmt.

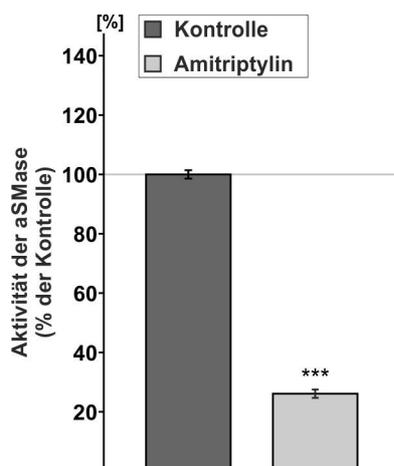


Abb. 56 Die Inhibition der aSMase durch Amitriptylin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. mit Amitriptylin inkubiert. Im Zellhomogenat wurde die Aktivität der aSMase unter Verwendung eines aSMase Aktivitäts Kits fluorometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung 5 unabhängiger Experimente, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Es ergab sich eine Reduktion der aSMase-Aktivität auf 29,4% ($\pm 2,05\%$, $p = 5,54 \times 10^{-9}$) nach der Inkubation mit Amitriptylin verglichen mit der der Kontrollzellen (Abb. 56). Somit sollte der Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid inhibiert sein, was mittels massenspektrometrischer Analyse der Sphingomyelin- und Ceramidspiegel überprüft wurde.

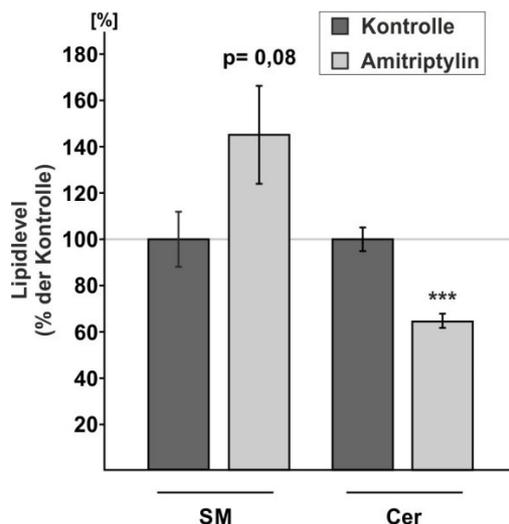


Abb. 57 Die Veränderung des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels durch Amitriptylin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von 30 μ M Amitriptylin kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden im Zellhomogenat mittels Massenspektrometrie die Sphingomyelin- und Ceramidspiegel bestimmt. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Erwartungsgemäß zeigte sich eine Erhöhung der Sphingomyelin-Level auf 145,2% ($\pm 21,23\%$, $p = 0,084$) in den Homogenaten Amitriptylin-inkubierter SH-SY5Y wt Zellen bei einer gleichzeitigen Verringerung der Ceramid-Mengen auf 64,7% ($\pm 3,07\%$, $p = 0,0004$) der Kontrollzellen (Abb. 57).

Wie in Abb. 54 gezeigt, war die Verteilung der γ -Sekretase zwischen den Lipid Raft- und Non-Raft-Bereichen nach Inkubation mit Amitriptylin verändert. Massenspektrometrische Analyse der Lipid Raft- und Non-Raft-Fractionen, die wie beschrieben aus Amitriptylin-inkubierten SH-SY5Y wt Zellen isoliert wurden, ergab eine Erhöhung des Sphingomyelin-Anteils in den Lipid Rafts auf 161,1% ($\pm 2,34\%$, $p = 1,31 \times 10^{-13}$). Diese war damit signifikant

stärker ($p=1,02 \times 10^{-10}$) als die in den Non-Raft-Fractionen, in denen die Menge an Sphingomyelin auf lediglich 113,6% ($\pm 2,22\%$, $p=0,036$) erhöht war (Abb. 58).

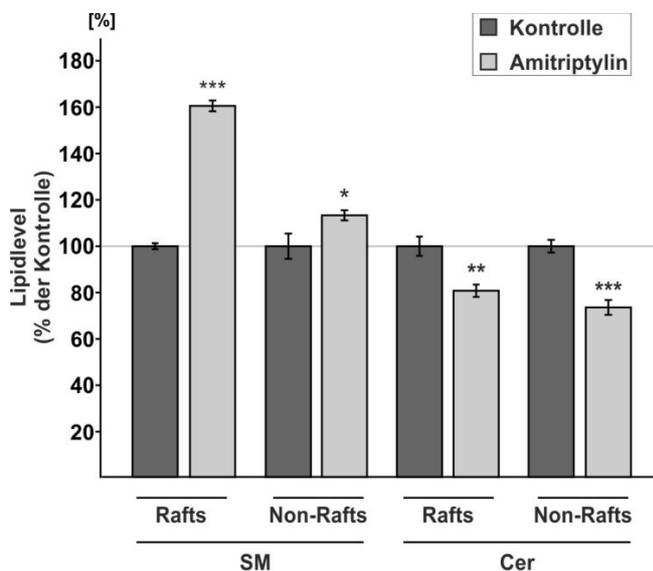


Abb. 58 Analyse des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels in den Lipid Rafts und Non-Rafts

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit von 30 μ M Amitriptylin kultiviert. Das Zellhomogenat wurde über einen Saccharose-Dichtegradienten mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die Flotillin-positiven Lipid Raft-Fractionen (7-9) sowie die Cadherin-positiven Non-Raft-Fractionen (13-16) wurden vereinigt und massenspektrometrisch auf die Menge an Sphingomyelin und Ceramid untersucht. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Somit scheint sich das durch die Inkubation mit Amitriptylin angereicherte Sphingomyelin bevorzugt in den Lipid Raft-Mikrodomänen der Membran einzulagern. Hingegen ergab die Analyse der Ceramid-Mengen in den Lipid Raft- und Non-Raft-Fractionen nach Amitriptylin-Behandlung Reduktionen des Ceramids auf 80,7% ($\pm 2,69\%$, $p=0,0013$) in den Lipid Rafts und 73,6% ($\pm 3,22\%$, $p=1,24 \times 10^{-5}$) in den Non-Raft-Bereichen, welche sich nicht signifikant von einander unterschieden ($p=0,361$).

4.4.6 Der Effekt von Amitriptylin auf die APP-Prozessierung über Sphingomyelin und Ceramid

Zusammenhänge zwischen der APP-Prozessierung und der Sphingolipid-Homöostase wurden mehrfach postuliert. So fanden He *et al.* eine signifikante Korrelation der α SMase- und der A β -Mengen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten (He *et al.*, 2010). Zudem wurde gezeigt, dass Ceramid über die posttranslationale Stabilisierung des BACE1 Proteinlevels die Produktion von A β -Peptiden erhöht (Puglielli *et al.*, 2003).

Im Folgenden sollte deshalb in verschiedenen Ansätzen untersucht werden, ob eine Verschiebung des Verhältnisses von Sphingomyelin zu Ceramid die Amitriptylin-medierten Effekte auf die APP-Proteolyse bedingt.

4.4.6.1 aSMase-Knockdown

Die Expression der aSMase wurde in SH-SY5Y wt Zellen durch Transfektion mit einer aSMase spezifischen siRNS inhibiert. Zur Kontrolle wurden SH-SY5Y wt Zellen mit einer siRNS transfiziert, die eine Sequenz enthielt, die in der Zelle nicht bindet. Die Effizienz des Knockdowns (KD) der aSMase wurde zum einen mittels RT-PCR mit spezifischen Primern und zum anderen über die Bestimmung der aSMase-Aktivität kontrolliert.

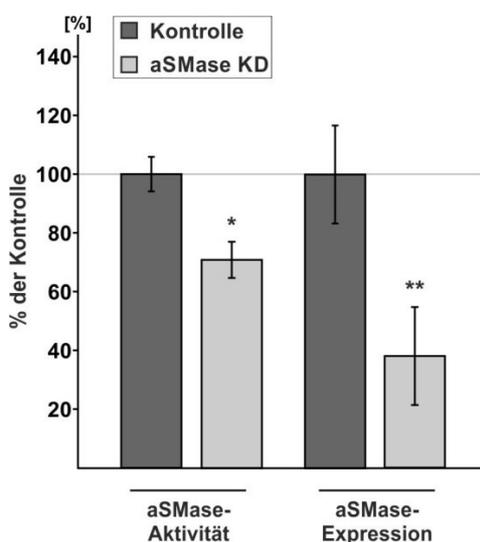


Abb. 59 Analyse der aSMase-Aktivität und Expression in aSMase-Knockdown Zellen

SH-SY5Y wt Zellen wurden mit einer spezifischen aSMase-siRNS und Lipofectamin 2000 als Transfektionsreagenz transient transfiziert. Die Kontrollzellen erhielten eine siRNS mit einer nicht bindenden Sequenz. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden 24Std. nach der Transfektion die aSMase-Aktivität und die aSMase-Gen-Expression bestimmt. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wie Abb. 59 zeigt, war die Expression der aSMase in den aSMase-KD Zellen auf 38,2% ($\pm 16,68\%$, $p=0,010$) verringert. Die Messung der aSMase-Aktivität ergab eine Reduktion auf 71,0% ($\pm 6,17\%$, $p=0,027$) verglichen mit den Kontrollzellen. Die Differenz der beiden Effektstärken könnte durch eine höhere Halbwertszeit des aSMase Proteins verglichen mit seiner mRNS bedingt sein.

Es wurde nun überprüft, ob die Inhibition der aSMase durch den aSMase-KD einen Effekt auf die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase und die A β -Degradation verursacht, wie es nach der Inkubation mit Amitriptylin der Fall war.

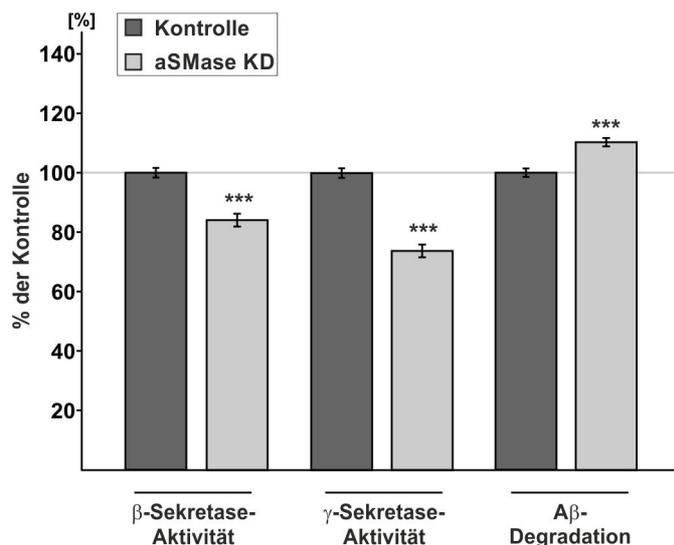


Abb. 60 Analyse der Aktivität der β- und γ-Sekretase und der Aβ-Degradation in aSMase-KD Zellen

Die Transfektion fand wie für Abb. 59 beschrieben statt. 36Std. nach der Transfektion wurden den Zellen spezifische Substrate der β- und γ-Sekretase in Cell-Imaging-Solution zugegeben und die direkte Umsetzung in den lebenden Zellen wurde in einem Infinite-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivitäten ergaben sich aus der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Zusätzlich wurde aus dem Zellkulturmedium der transfizierten Zellen die Aβ-Degradation, wie für Abb. 55 beschrieben, nachgewiesen. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tatsächlich waren die Aktivitäten der β- und γ-Sekretase in den aSMase-KD Zellen auf 84,2% (+/- 2,12%, $p = 1,27 \times 10^{-7}$) bzw. 73,8% (+/- 2,16%, $p = 1,62 \times 10^{-10}$) reduziert. Zudem zeigte die Analyse der Aβ-Degradation einen signifikanten Anstieg auf 110,5% (+/- 0,76%, $p = 0,0006$) in den aSMase-KD Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit der nicht bindenden siRNS transfiziert wurden (Abb. 60).

Geht man davon aus, dass die Reduktion der β- und γ-Sekretase-Aktivität nach der Inkubation mit Amitriptylin durch die Inhibierung der aSMase bedingt ist, so sollte in Amitriptylin-inkubierten aSMase-KD Zellen diese Reduktion nicht vorhanden sein. Um dies zu überprüfen wurden mit aSMase siRNS transfizierte SH-SY5Y Zellen für 24 Std. mit Amitriptylin inkubiert und die Aktivitäten der Sekretasen wurden gemessen.

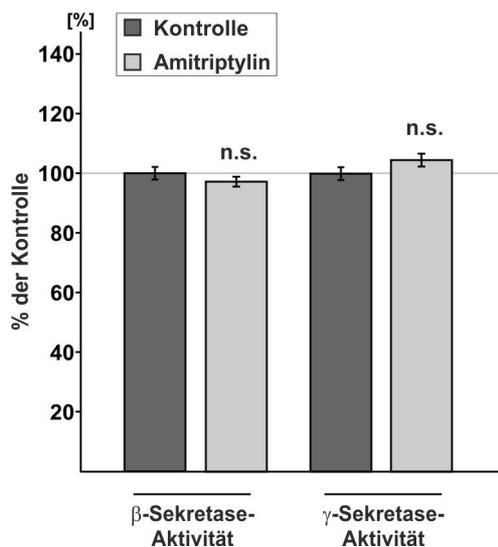


Abb. 61 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Amitriptylin in aSMase-KD Zellen

Die Transfektion fand wie für Abb. 59 beschrieben statt. 12Std. nach der Transfektion wurden die Zellen für 24Std. mit Amitriptylin inkubiert. Die Aktivität der Sekretasen wurde wie unter Abb. 60 beschrieben ermittelt. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von 12 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach der Inkubation mit Amitriptylin waren die Aktivitäten der Sekretasen in den aSMase-KD Zellen mit 97,3% (+/- 1,66%, $p = 0,231$) bzw. 104,5% (+/- 2,16%, $p = 0,162$) nicht verändert (Abb. 61). Die Amitriptylin abhängige Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität ist also durch die inhibitorische Wirkung des Amitriptylins auf die aSMase bedingt.

4.4.6.2 Inhibition der neutralen Sphingomyelinase

Ein weiteres Enzym, das in der Zelle den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert, ist die neutrale Sphingomyelinase (nSMase), die im Gegensatz zur aSMase im Zytosol lokalisiert ist und ihr pH-Optimum im neutralen Bereich hat. Eine Inhibierung der nSMase sollte also analog zur Inhibierung der aSMase einen Anstieg der Sphingomyelin- und eine Reduktion der Ceramid-Mengen zur Folge haben. Um den Effekt der Verschiebung des Sphingomyelin-Ceramid Verhältnisses auf die APP-Prozessierung weiter zu verifizieren, wurde die Wirkung der nSMase-Inhibition bezüglich der Aktivitäten der β - und γ -Sekretase getestet. Hierzu wurden SH-SY5Y wt Zellen mit dem nSMase-Inhibitor GW4869 inkubiert und zunächst die inhibitorische Wirkung kontrolliert.

Die Messung der nSMase-Aktivität mit Hilfe eines nSMase-Aktivitäts Kits der Firma Invitrogen ergab eine vergleichsweise schwache, aber dennoch signifikante Inhibition der nSMase-Aktivität auf 93,7% (+/- 1,92%, $p = 0,042$) der Kontrolle nach Inkubation mit GW4869 (Abb. 62). Die Zytotoxizität nach der Inkubation mit dem Inhibitor betrug 1,86% (+/- 0,07%).

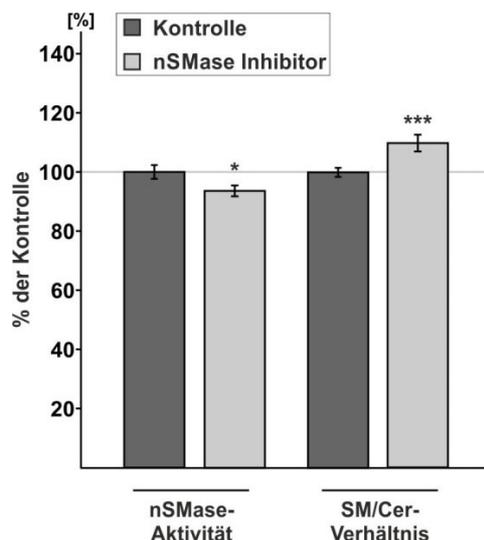


Abb. 62 Analyse der nSMase-Aktivität und der Sphingomyelin- und Ceramidspiegel nach Inkubation mit GW4869

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit des nSMase-Inhibitors GW4869 kultiviert. Die Kontrollzellen enthielten die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO. Die Inhibition der nSMase wurde unter Verwendung eines kommerziellen nSMase-Aktivitäts Kits bestimmt. Zusätzlich wurden die SM- und Cer-Spiegel der inkubierten Zellen massenspektrometrisch analysiert. Angegeben ist das Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Folglich sollte die Menge an Sphingomyelin nach Inkubation des nSMase-Inhibitors erhöht sein, während die Ceramid-Menge reduziert vorliegen sollte. Wie die massenspektrometrische Lipid-Analyse ergab, stieg das Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid durch die Inhibition der nSMase auf 109,7% (+/- 2,15%, $p = 0,0008$).

Die Bestimmung der Sekretase-Aktivität in Abhängigkeit des nSMase-Inhibitors zeigte eine Reduktion der β -Sekretase-Aktivität auf 87,7% (+/- 3,90%, $p = 0,011$), die der γ -Sekretase war auf 88,4% (+/- 2,98%, $p = 0,003$) der Kontrolle verringert (Abb. 63).

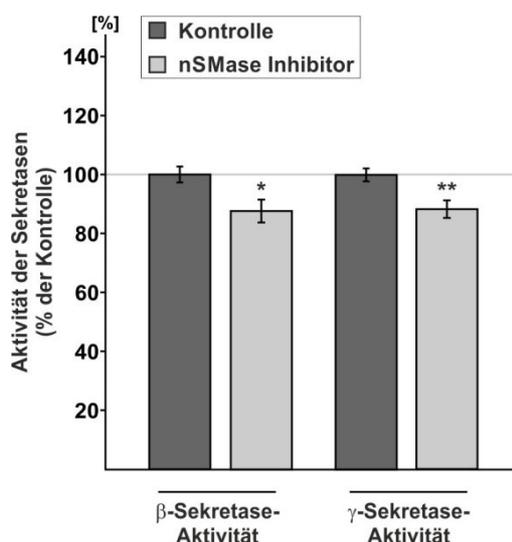


Abb. 63 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inhibierung der nSMase

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit des nSMase-Inhibitors GW4869 kultiviert. Die Kontrollzellen enthielten das Lösungsmittel DMSO. Den Zellen wurden spezifische Substrate der β - und γ -Sekretase in Cell-Imaging-Solution zugegeben und die Messung der Sekretase-Aktivität erfolgte wie für Abb. 60 beschrieben. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.6.3 Inkubation von Sphingomyelin und Ceramid

Nachdem die gezeigten Ergebnisse auf einen Sphingomyelin- bzw. Ceramid-abhängigen Effekt des Antidepressivums Amitriptylin auf die APP-Prozessierung hinweisen, sollte über die Inkubation der beiden Lipide eine Simulation der gleichen Effekte möglich sein. So wurden SH-SY5Y wt Zellen über 24Std. mit Sphingomyelin inkubiert, was ebenso wie der aSMase-KD und die Inhibition der aSMase-Aktivität zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Sphingomyelin und Ceramid, hin zum Sphingomyelin führt. Die Zytotoxizität nach der Inkubation lag bei 1,46% (+/- 0,10%). Die Analyse der Sekretase-Aktivitäten ergab eine Reduktion der β -Sekretase-Aktivität auf 75,1% (+/- 3,75%, $p=2,24 \times 10^{-5}$), die der γ -Sekretase war auf 88,0% (+/- 2,20%, $p=0,0003$) reduziert (Abb. 64).

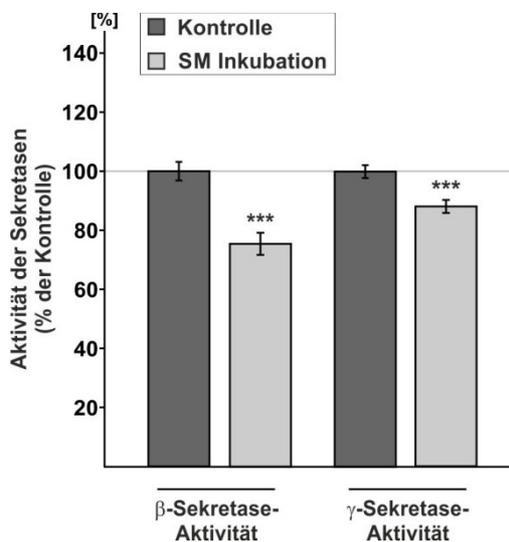


Abb. 64 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Sphingomyelin

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit von 50 μ M Sphingomyelin kultiviert. Die Kontrollzellen enthielten das Lösungsmittel EtOH. Die Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten erfolgte analog Abb. 60. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Umgekehrt ergab eine Erhöhung des Ceramid-Levels durch die Inkubation von Ceramid in SH-SY5Y wt Zellen eine Steigerung der β -Sekretase-Aktivität auf 115,9% (+/- 2,62%, $p=0,010$), wohingegen die γ -Sekretase-Aktivität nicht verändert war (96,8% +/- 3,60%, $p=0,44$) (Abb. 65). Die Zytotoxizität nach der Inkubation mit Ceramid betrug 1,77% (+/- 0,07).

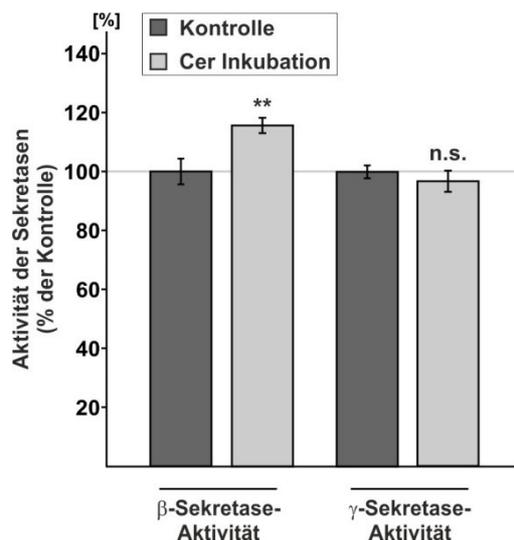


Abb. 65 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit Ceramid

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit von 10 μ M Ceramid kultiviert. Die Kontrollzellen erhielten das Lösungsmittel EtOH. Die Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten erfolgte analog Abb. 60. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Reduktion in der Aktivität der γ -Sekretase nach der Inkubation von Amitriptylin ist also lediglich von den erhöhten Sphingomyelin-Leveln, nicht aber von Ceramid abhängig, während der Effekt auf die β -Sekretase sowohl durch eine Erhöhung des Sphingomyelins als auch durch eine Reduktion des Ceramids bedingt ist.

4.4.6.4 Inkubation von aufgereinigtem aSMase-Enzym

Während die Inkubation mit Inhibitoren der SMasen zu einer Erhöhung des Sphingomyelin- und einer Reduktion des Ceramidspiegels führen, resultiert die Zugabe von aufgereinigtem aSMase-Enzym in einem vermehrten Abbau des Sphingomyelins, was zur Erhöhung des Ceramid-Levels führt.

Die Inkubation von aufgereinigtem aSMase-Enzym auf SH-SY5Y wt Zellen ergab eine signifikante Erhöhung der Aktivitäten der β - und γ -Sekretase auf 119,7% (+/-2,32%, $p = 0,011$) bzw. 112,5% (+/- 3,66%, $p = 0,029$) (Abb. 66).

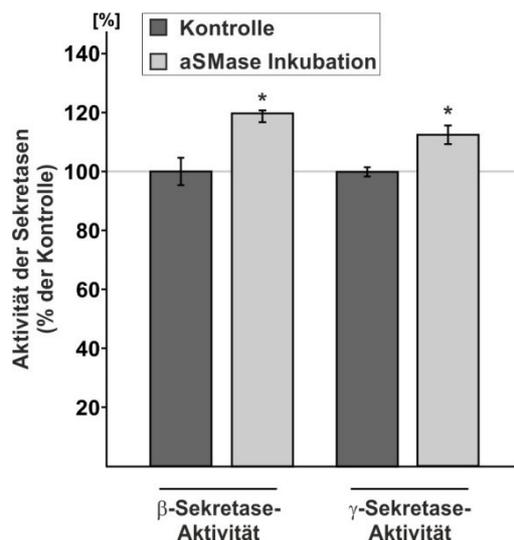


Abb. 66 Analyse der Aktivität der β - und γ -Sekretase nach Inkubation mit aSMase-Enzym

SH-SY5Y wt Zellen wurden 5Std. in Anwesenheit von aSMase-Enzym in einer finalen Konzentration von 1U pro ml des Inkubationsmediums kultiviert. Die Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten erfolgte analog Abb. 60. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Folglich führt die Erhöhung des Ceramid- und die Reduktion des Sphingomyelinpiegels in SH-SY5Y wt Zellen zu einer Verschiebung der APP-Proteolyse hin zum amyloidogenen Prozessierungsweg.

4.4.7 Die Effekte von Sphingomyelin und Ceramid auf die Aktivität der α -Sekretase

Die amyloidogene Prozessierung des APP durch die β - und γ -Sekretase werden wie bereits gezeigt durch die Veränderung des Verhältnisses von Sphingomyelin zu Ceramid in SH-SY5Y wt Zellen beeinflusst. Die Inkubation mit Amitriptylin ergab eine Erhöhung der α -Sekretase-Aktivität über eine Erhöhung des ADAM17 Proteinlevels sowie einem direkten Effekt auf die ADAM17-Aktivität. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die beschriebenen Effekte ebenfalls durch eine Veränderung der Mengen von Sphingomyelin und Ceramid, wie im Falle der Effekte auf die β - und γ -Sekretase bedingt waren.

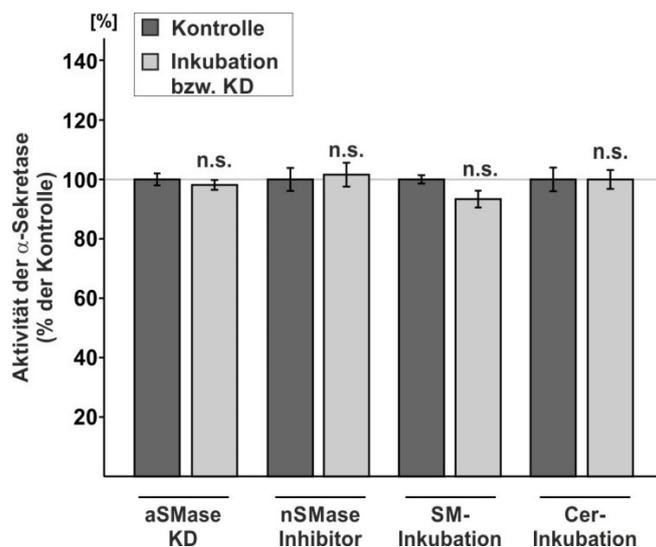


Abb. 67 Analyse der Aktivität der α -Sekretase in Abhängigkeit des Sphingomyelin- bzw. Ceramidspiegels

Die Aktivität der α -Sekretase wurde nach der Veränderung der Sphingomyelin- und Ceramidspiegel in der Zelle durch aSMase-Knockdown, nSMase-Inhibition, Sphingomyelin- oder Ceramid-Inkubation analysiert. Die Umsetzung des spezifischen fluorogenen Substrats wurde direkt in den lebenden Zellen in einem Safire-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivität ergab sich aus der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Messung der α -Sekretase-Aktivität in aSMase-KD Zellen ergab keine Veränderung der Aktivität verglichen mit den Kontrollzellen (98,28% \pm 1,66%, $p = 0,518$). Ebenso führten weder die Inkubationen mit Sphingomyelin und Ceramid, noch die Inhibition der nSMase-Aktivität zu signifikanten Änderungen der α -Sekretase-Aktivität verglichen mit den jeweiligen Kontrollen (SM: 96,15% \pm 2,67%, $p = 0,310$; Cer: 100,3% \pm 3,19%, $p = 0,954$; GW4869: 101,7% \pm 4,03%, $p = 0,760$) (Abb. 67). Die Steigerung des nicht-amyloidogenen APP-Prozessierungswegs durch Amitriptylin scheint also unabhängig von der Verschiebung des Sphingomyelin/Ceramid- Verhältnisses und damit unabhängig von der Inhibition der aSMase zu sein.

4.4.8 Der Einfluss von Sphingomyelin und Ceramid auf die Aggregation von A β -Peptiden

A β -Peptide, insbesondere das hydrophobe A β 42, neigen zur Bildung von Oligomeren und Fibrillen, die sich letztlich als senile Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten manifestieren (Jarrett *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1985). Es sollte deshalb analysiert werden, ob die Menge an Sphingomyelin und Ceramid neben der Prozessierung des APPs auch die

Aggregation des amyloiden Endprodukts dieser Prozessierung beeinflussen. Zunächst wurde das Aggregationsverhalten von synthetischen A β 42-Peptiden in Anwesenheit von Sphingomyelin bzw. Ceramid mittels Thioflavin T Assay untersucht. Der Benzothiazol-Farbstoff Thioflavin T bindet an β -Faltblatt reiche Strukturen, wie sie in A β -Aggregaten vorliegen. Diese Bindung verursacht eine Änderung des Thioflavin T-typischen Emissionsspektrums und kann somit in einem Fluorometer aufgezeichnet werden (LeVine, 1993, 1997). In Anwesenheit von Sphingomyelin aggregierten weniger synthetische A β 42-Peptide, zudem verlief die Aggregation deutlich langsamer, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Wurden A β 42-Peptide hingegen mit Ceramid inkubiert, war eine gesteigerte Aggregation zu beobachten (Abb. 68).

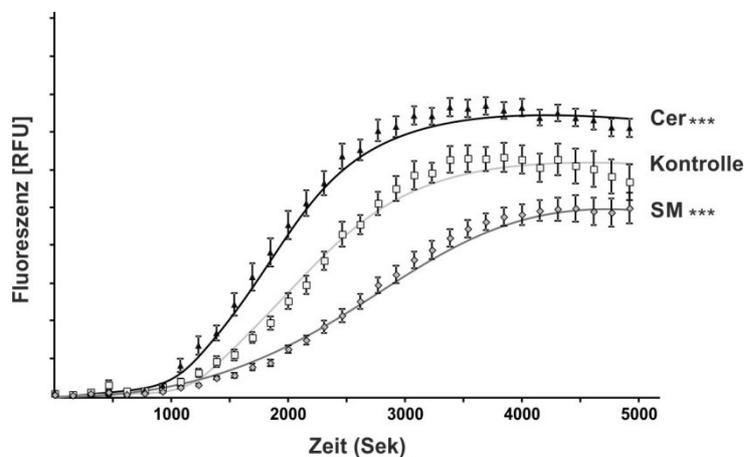


Abb. 68 ThT-Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Sphingomyelin und Ceramid

Sphingomyelin und Ceramid wurden in finalen Konzentrationen von 10 μ M mit 18 μ M synthetischen A β 42-Peptiden in PBS inkubiert, die Kontrolle enthielt die entsprechende Menge des Lösungsmittels EtOH. Pro ml wurden 19,6 μ g des Benzothiazol-Farbstoffs ThT zugegeben. Die durch die Bindung des ThTs an A β -Aggregate emittierte Fluoreszenz wurde kontinuierlich bei 37°C unter Lichtausschluss in einem Safire-Fluorometer aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt die gemittelte Kinetik von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Wurden hingegen A β -Peptide *in vitro* mit Amitriptylin inkubiert, führte dies laut ThT Analyse nicht zu einer Veränderung ihres Aggregationsverhaltens (97,4% +/- 12,54%, p=0,857) (Abb. 69). Die Aggregation von A β -Peptiden wird also durch die Lipide Sphingomyelin und Ceramid beeinflusst, die *in vitro* Inkubation von Amitriptylin, bei der die Level von Ceramid und Sphingomyelin unverändert bleiben, hat dagegen keinen Effekt auf die A β -Aggregation.

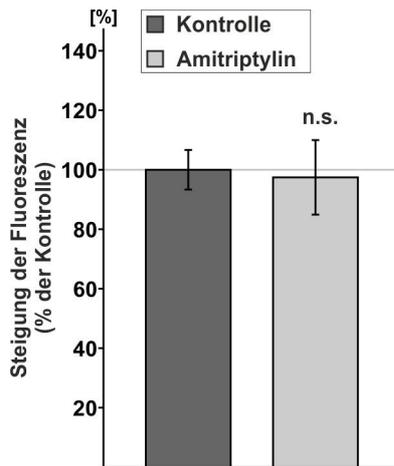


Abb. 69 ThT-Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Amitriptylin

Amitriptylin wurde in einer finalen Konzentration von 30 μ M mit 18 μ M synthetischen A β 42-Peptiden in PBS inkubiert, die Kontrolle enthielt die entsprechende Menge H₂O. Die ThT Analyse wurde wie für Abb. 66 beschrieben durchgeführt. Die Abbildung zeigt die gemittelte Steigung der Fluoreszenz über die Zeit aus 7 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Mittels Western Blot Analyse wurde analysiert, ob die Anwesenheit von Sphingomyelin oder Ceramid auch die Art der vorliegenden A β -Aggregate beeinflusst. Hierfür wurden zwei spezifische Antikörper verwendet, von denen einer nur kleinere A β -Aggregate (Antikörper A11) (Kayed *et al.*, 2003) und der andere lediglich A β -Fibrillen (Antikörper OC) (Kayed *et al.*, 2007) detektiert.

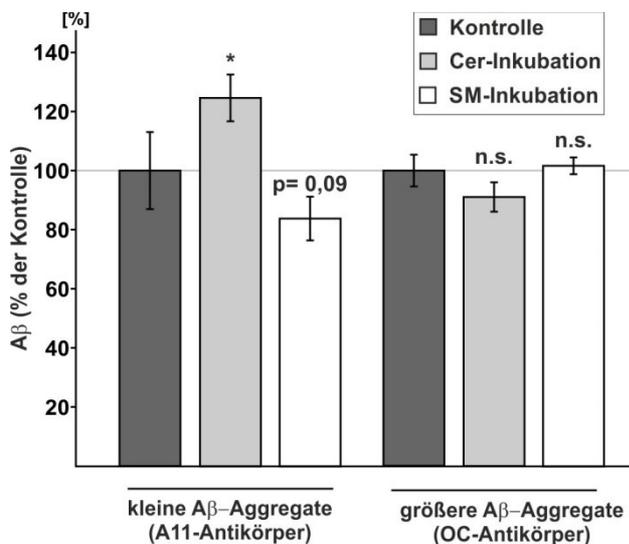


Abb. 70 Dot Blot Analyse der A β -Aggregation in Abhängigkeit von Sphingomyelin und Ceramid

Sphingomyelin und Ceramid wurden in finalen Konzentrationen von 10 μ M mit 18 μ M synthetischen A β 42-Peptiden für 24Std. bei 37°C in PBS inkubiert, die Kontrolle enthielt die entsprechende Menge des Phospholipids PC18:1. Im Dot Blot Verfahren wurden die Proben nach der Inkubation auf Nitrozellulosemembranen aufgetragen. Für die Detektion kleiner A β -Aggregate wurde der A11-AK eingesetzt, die Detektion größerer Aggregate und A β -Fibrillen fand unter Verwendung des OC-AKs statt. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Während die Aggregation zu kleineren Aggregaten in Anwesenheit von Ceramid auf 124,8% (+/- 7,93%, p=0,038) erhöht war, reduzierte die Inkubation mit Sphingomyelin die Bildung

kleinerer Aggregate auf 83,9% (+/- 5,06%, $p=0,094$). Die Formierung von A β -Fibrillen war hingegen unbeeinflusst von der Anwesenheit der beiden Lipide (Abb. 70).

Aufnahmen von Proben, bestehend aus synthetischem A β 42 und Sphingomyelin bzw. Ceramid mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM), bestätigten eine reduzierte A β -Aggregation durch die Anwesenheit von Sphingomyelin, während die A β -Peptide in Anwesenheit von Ceramid ein verstärktes Aggregationsverhalten zeigen (Abb. 71).

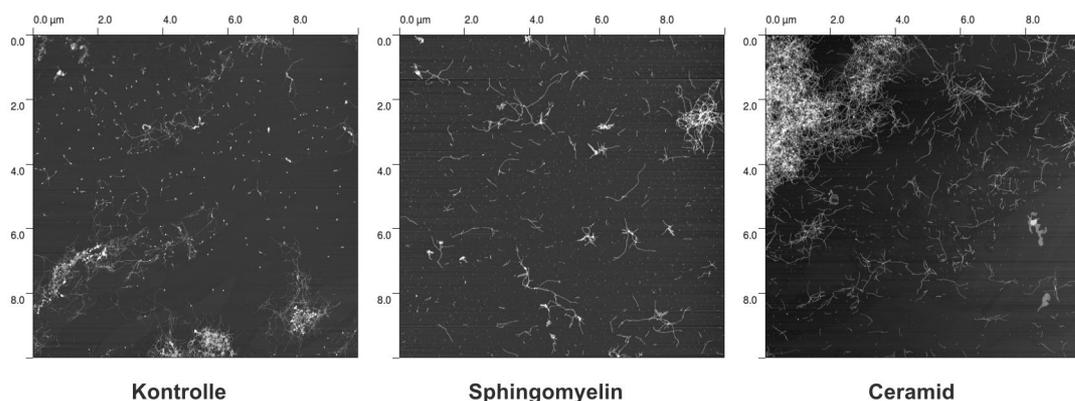


Abb. 71 AFM-Aufnahmen der A β -Aggregate in Anwesenheit von Sphingomyelin und Ceramid

Für die Aufnahmen der A β -Aggregate mittels AFM fand die Inkubation der Lipide mit A β wie unter Abb. 70 beschrieben statt. Die Aufnahmen von 10x10 μ m mit 512x512 Pixeln wurden mit dem AFM NanoWizard II (JPK Instruments, Berlin), montiert auf einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit der Kamera HAL 100 und mit einer Messfrequenz von 1 Hz im Intermittent Contact (Air)-Mode angefertigt. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen.

Da die Inkubation mit Amitriptylin das Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid in Richtung des Sphingomyelins verschiebt, sollte dies neben der reduzierten Bildung und der verstärkten Degradation von A β -Peptiden auch zu einer verringerten A β -Aggregation führen.

4.4.9 Die Effekte anderer Antidepressiva auf die Bildung von A β

Neben dem trizyklischen Antidepressivum Amitriptylin gibt es eine Reihe weiterer in der Humanmedizin eingesetzter Antidepressiva, die ebenfalls zur Gruppe der FIASMA zählen. Ist das A β -reduzierende Potential des Amitriptylins durch die Inhibierung der aSMase und damit durch die Verschiebung des Sphingomyelin zu Ceramid Verhältnisses bedingt, sollte mit anderen Antidepressiva, die ebenfalls als aSMase-Inhibitoren fungieren, der gleiche Effekt zu erzielen sein. Es wurden das trizyklische Antidepressivum Desipramin (Hurwitz *et al.*, 1994), das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin (Kornhuber *et al.*, 2010) und der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Fluoxetin (Brunswick *et al.*, 2002) für weitere Analysen ausgewählt. Die gemessene Zytotoxizität nach der Inkubation der Antidepressiva betrug

1,41% (+/- 0,06%) für Desipramin, 2,08% (+/- 0,60%) für Maprotilin und 1,82% (+/- 0,12%) für Fluoxetin.

Zunächst wurde analog zu Amitriptylin die inhibitorische Wirkung auf die aSMase-Aktivität nach der Inkubation mit Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin in SH-SY5Y wt Zellen überprüft.

Die Messung der aSMase Aktivität ergab eine deutliche Reduktion nach Inkubation aller verwendeten Antidepressiva auf 30,7% (+/- 1,55%, $p=0,0008$) aSMase-Aktivität für Desipramin, 13,2% (+/- 2,75%, $p=0,0004$) für Maprotilin und 21,4% (+/- 2,59%, $p=0,0005$) für Fluoxetin (Abb. 72).

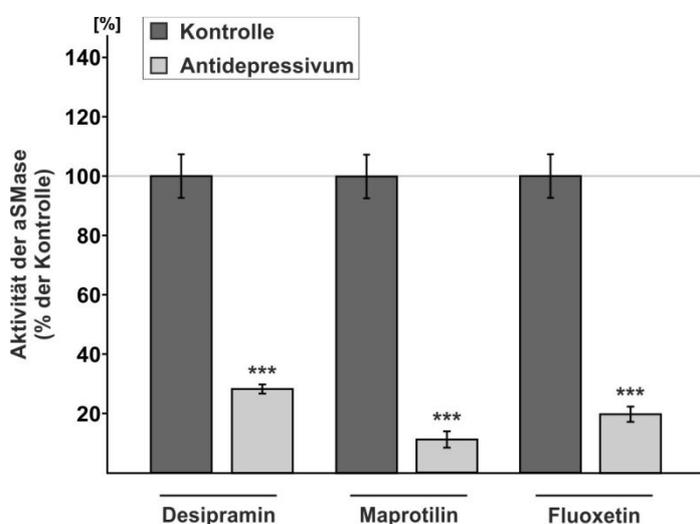


Abb. 72 Analyse der aSMase-Aktivität nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin in einer finalen Konzentration von 10 μ M kultiviert. Die Bestimmung der aSMase-Aktivität erfolgte unter Verwendung des aSMase-Aktivitäts-Kit der Firma Echelon. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung 5 unabhängiger Experimente, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Folglich sollten nach der Behandlung mit diesen Antidepressiva auch die Mengen an Sphingomyelin erhöht sein, während Ceramid in geringeren Mengen vorliegen müsste.

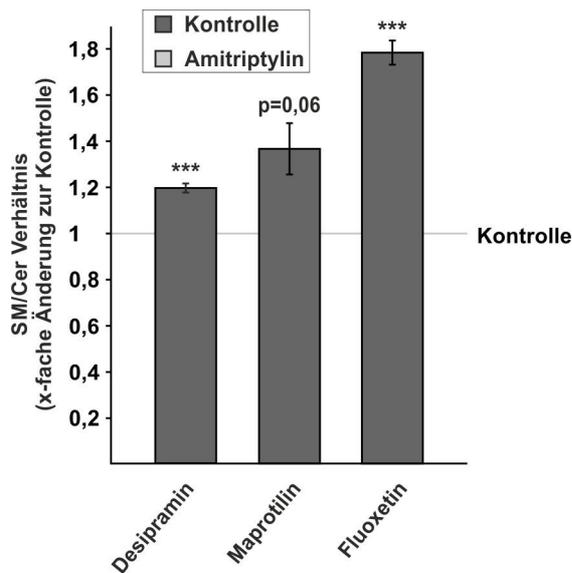


Abb. 73 Analyse des Sphingomyelin- und Ceramidspiegels nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin kultiviert. Das Zellhomogenat wurde massenspektrometrisch auf die Menge an Sphingomyelin und Ceramid untersucht. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung 5 unabhängiger Experimente. Angegeben ist das Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid. Die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an, die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die massenspektrometrische Analyse bestätigte, dass nach der Inkubation mit Desipramin in SH-SY5Y wt Zellen das Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid auf das 1,2fache der Kontrollzellen erhöht war. Nach der Inkubation mit Maprotilin war das Sphingomyelin-Ceramid Verhältnis um den Faktor 1,4, nach Inkubation mit Fluoxetin um den Faktor 1,8 erhöht (Abb. 73).

Folglich wurden SH-SY5Y APP Zellen mit den Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin inkubiert und der Einfluss dieser Antidepressiva auf die amyloide APP-Prozessierung überprüft.

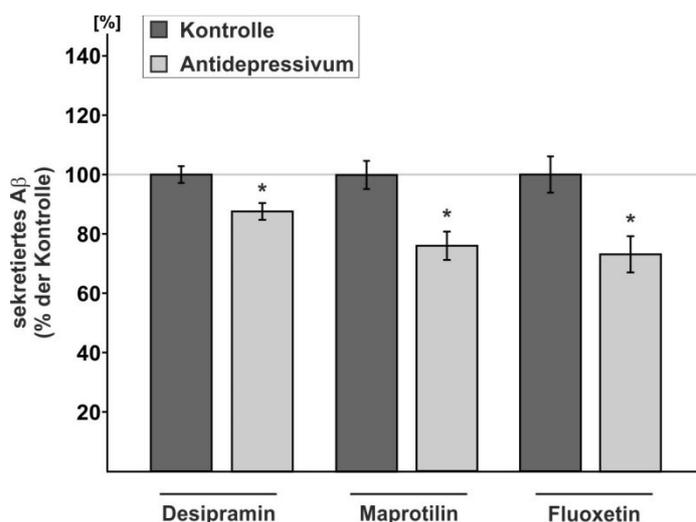


Abb. 74 Analyse der Aβ-Sekretion nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden für 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin kultiviert. Sekretiertes Aβ wurde mittels Immunopräzipitation mit dem AK W02 aus dem Inkubationsmedium angereichert und im Western Blot unter Verwendung des gleichen AKs detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 5 unabhängigen

Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Western Blot Analyse der A β -Peptide ergab, dass alle inkubierten Antidepressiva die Menge an sekretiertem A β reduzierten. Nach Inkubation mit Desipramin war die A β -Menge im Medium der SH-SY5Y APP Zellen auf 88,6% (+/- 3,52%, $p = 0,026$) der Kontrolle, nach Inkubation mit Maprotilin auf 76,3% (+/- 5,42%, $p = 0,015$) und nach der mit Fluoxetin auf 73,3% (+/- 6,12%, $p = 0,015$) verringert, verglichen mit Zellen, die mit H₂O inkubiert wurden (Abb. 74).

Zusätzlich wurde die Aktivität der an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen nach der Inkubation der Antidepressiva bestimmt. Die Analyse der β -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y wt Zellen nach der Inkubation der Antidepressiva, ergab reduzierte Aktivitäten von 92,4% (+/- 1,68%, $p = 0,002$) nach Desipramin-Inkubation, 88,5% (+/- 3,25%, $p = 0,004$) nach der Inkubation von Maprotilin und 89,4% (+/- 2,66%, $p = 0,002$) nach Inkubation mit Fluoxetin (Abb. 75).

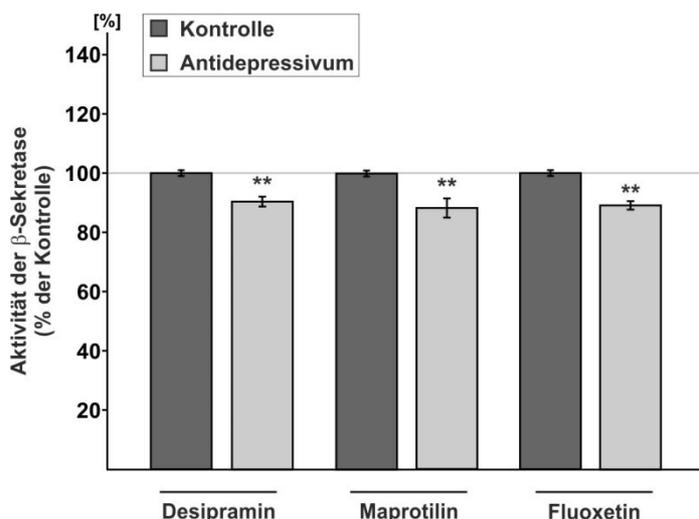


Abb. 75 Analyse der Aktivität der β -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin kultiviert. Den Zellen wurde ein spezifisches Substrat der β -Sekretase in Cell-Imaging-Solution zugegeben und die direkte Umsetzung in den lebenden Zellen wurde in einem Infinite-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivitäten ergaben sich aus der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung von mindestens 8 unabhängigen Experimenten, die eingetragenen Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Aktivität der γ -Sekretase war nach der Inkubation von Desipramin nur auf 94,9% (+/- 1,39%, $p = 0,045$) reduziert. Die Inkubation mit Maprotilin reduzierte die Aktivität der γ -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen auf 79,6% (+/- 5,89%, $p = 0,014$) während nach der

Inkubation von Fluoxetin mit 99,6% (+/- 1,45%, $p=0,829$) kein signifikanter Effekt auf die γ -Sekretase-Aktivität zu verzeichnen war (Abb. 76).

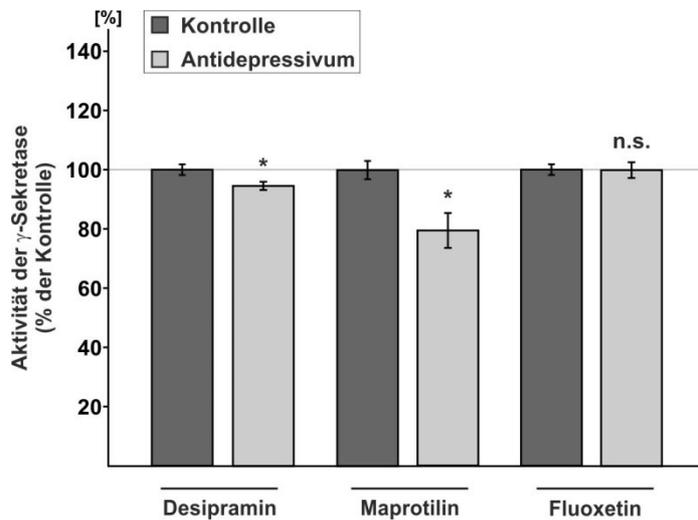


Abb. 76 Analyse der Aktivität der γ -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin kultiviert. Den Zellen wurde ein spezifisches Substrat der γ -Sekretase in Cell-Imaging-Solution zugegeben. Die Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 75 beschrieben.

Bei der Analyse der α -Sekretase-Aktivität nach der Inkubation mit Desipramin, Maprotilin oder Fluoxetin wurden keine signifikanten Änderungen detektiert (Desipramin: 96,7 +/- 3,79%, $p=0,609$; Maprotilin: 113,5 +/- 3,15%, $p=0,052$; Fluoxetin: 105,1 +/- 3,21%, $p=0,398$) (Abb. 77), was die vorhergehenden Ergebnisse bestätigt, nach denen keine Abhängigkeit der α -Sekretase-Aktivität vom Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid besteht, sondern diese vielmehr durch Amitriptylin direkt beeinflusst wird.

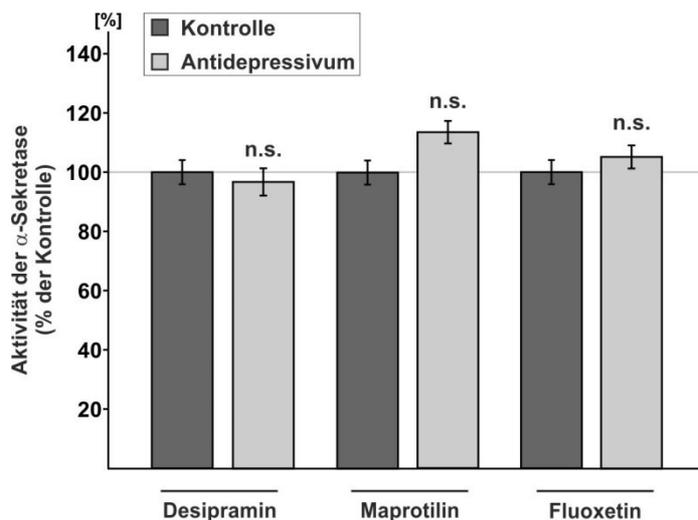


Abb. 77 Analyse der Aktivität der α -Sekretase nach Inkubation von Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin

SH-SY5Y wt Zellen wurden 24Std. in Anwesenheit der Antidepressiva Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin kultiviert. Den Zellen wurde ein spezifisches Substrat der α -Sekretase in Cell-Imaging-Solution zugegeben. Die Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität, Auswertung und Statistik erfolgten wie für Abb. 75 beschrieben.

4.4.10 Die Gen-Expression der Sphingomyelinasen in humanen *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die Menge an sekretierten A β -Peptiden in SH-SY5Y Zellen abhängig von den Sphingomyelin- und Ceramidspiegeln und lässt sich durch Veränderung der SMase Aktivität beeinflussen. In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden sowohl das Vorkommen seniler Plaques bestehend aus aggregierten A β -Peptiden (Masters *et al.*, 1985), als auch eine Erhöhung der Ceramid-Level (Han *et al.*, 2002) beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob die Gen-Expression der häufigsten SMasen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten verändert ist.

Hierfür wurden 3 verschiedene Hirnregionen von 30 *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten mittels RT-PCR auf die RNS Level der am häufigsten vorkommenden SMasen untersucht. Diese wurden mit denen von 14 Kontrollgehirnen gesunder Personen verglichen, die sich mit einem mittleren Alter von 77,4 Jahren nicht signifikant von den Alzheimer-Patienten mit einem mittleren Alter von 78 Jahren unterschieden ($p=0,803$).

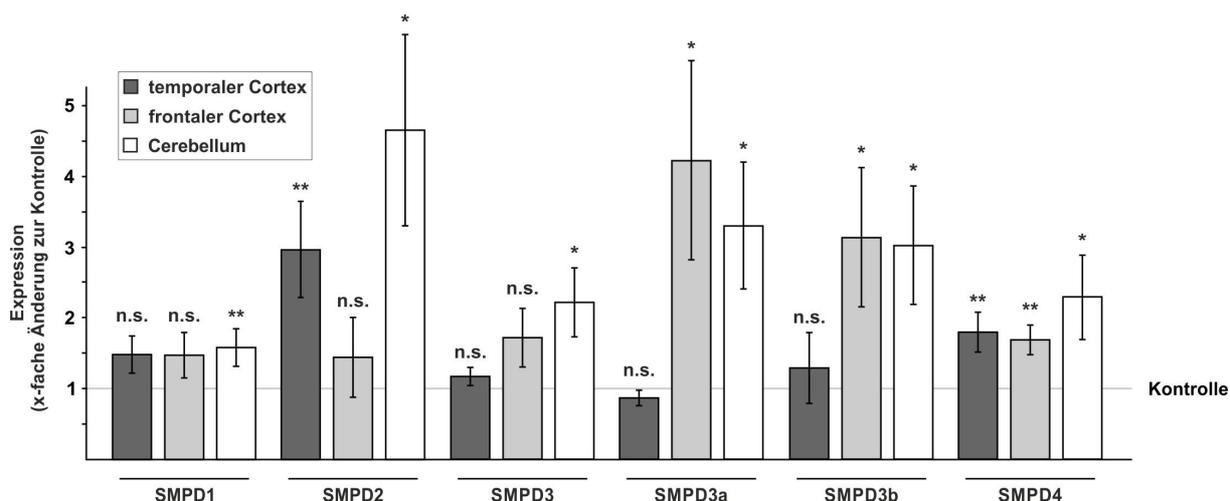


Abb. 78 Analyse der SMase-Gen-Expression in humanen *post mortem* Alzheimer-Gehirnen

3 verschiedene Hirnregionen aus 30 *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden mittels RT-PCR auf die Gen-Expression der am häufigsten vorkommenden SMasen analysiert und mit der in den Gehirnen einer altersgleichen Kontrollgruppe ($n=14$) verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

SMPD1= azidische lysosomale SMase, SMPD2, SMPD3 & SMPD4= neutrale membrangebundene SMasen, SMPD3a & SMPD3b= „acidic-like“ SMasen.

Die Gen-Expression der azidischen lysosomalen SMase (SMPD1) war im Cerebellum der Alzheimer-Patienten signifikant auf 156% erhöht, in temporalem und frontalem Cortex wurden ebenfalls erhöhte, wenn auch nicht signifikant veränderte RNS-Mengen des SMPD1 Gens gefunden. Darüber hinaus zeigten die *post mortem* Gehirne der Alzheimer-Patienten erhöhte RNA-Level der nSMasen. Die nSMase2 (SMPD2) war im temporalen Cortex und im

Cerebellum signifikant auf 293% bzw. 460% erhöht, die RNS der nSMase3 (SMPD3) lag im Cerebellum auf 219% erhöht vor. Die Transkription der nSMase4 (SMPD4) war in allen untersuchten Hirnregionen der Alzheimer-Patienten signifikant erhöht. Die RNS der beiden sogenannten „acidic-like“-SMasen SMPD3a und SMPD3b lag sowohl im frontalen Cortex als auch im Cerebellum der Alzheimer-Patienten um das 2,99- bis 4,18fache erhöht vor (Abb. 78). Im Mittel lagen alle SMasen im frontalen Cortex der Alzheimer-Patienten um das 2,26fache (+/- 0,46, $p=0,021$) und im Cerebellum um das 2,81fache (+/- 0,44, $p=0,002$) signifikant erhöht vor, während im temporalen Cortex eine nicht signifikante Erhöhung ($p=0,083$) auf das 1,58fache (+/- 0,30) der Kontrollen festgestellt wurde. Alle Gen-Expressions-Daten mit Standardabweichung und Signifikanz können der Tab. 37 entnommen werden.

Tab. 37 Gen-Expression der SMasen in humanen *post mortem* Alzheimer-Gehirnen

Hirnregion	Gen	Faktor zur Kontrolle	StabwM	t-test
frontaler Cortex	Smpd1	1,50	0,32	0,121
	Smpd2	1,42	0,56	0,454
	Smpd3	1,70	0,41	0,095
	Smpd3a	4,18	1,40	0,030
	Smpd3b	3,10	0,98	0,038
	Smpd4	1,67	0,21	0,003
	gemittelt	2,26	0,46	0,021
Cerebellum	Smpd1	1,56	0,20	0,009
	Smpd2	4,60	1,34	0,013
	Smpd3	2,19	0,48	0,017
	Smpd3a	3,27	0,89	0,016
	Smpd3b	2,99	0,83	0,025
	Smpd4	2,27	0,59	0,042
	gemittelt	2,81	0,44	0,002
temporaler Cortex	Smpd1	1,46	0,26	0,081
	Smpd2	2,93	0,68	0,006
	Smpd3	1,16	0,13	0,222
	Smpd3a	0,86	0,07	0,057
	Smpd3b	1,27	0,50	0,615
	Smpd4	1,77	0,28	0,008
	gemittelt	1,58	0,30	0,083

Alle Hirnregionen	Smpd1	1,51	0,03	$6,03 \times 10^{-5}$
	Smpd2	2,99	0,92	0,097
	Smpd3	1,68	0,30	0,085
	Smpd3a	2,77	0,99	0,149
	Smpd3b	2,46	0,59	0,070
	Smpd4	1,90	0,18	0,008
	gemittelt	2,22	0,25	$6,22 \times 10^{-4}$

Detaillierte Auflistung der Gen-Expressions-Analyse der humanen *post mortem* Gehirne. Analyse, Statistik und Abkürzungen der Gene wie für Abb. 78 beschrieben.

Da alle diese Enzyme den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid katalysieren, könnte die verstärkte Expression der SMasen die beschriebene Veränderung des Ceramid-Gehaltes in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten verursachen.

4.5 Weitere Lipide und ihr Einfluss auf die Aktivitäten der Sekretasen

Die vorhergehenden Kapitel belegen den Effekt verschiedener Lipidklassen auf die Prozessierung des APP. Im Rahmen mehrerer Kooperationsprojekte wurde der Einfluss weiterer Lipide auf die Aktivität der Sekretasen, bzw. auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. Diese Ergebnisse sowie ihre Bedeutung für den Gesamtzusammenhang des jeweiligen Projekts sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

4.5.1 Der Effekt von Phospholipiden auf die Aktivität der α -Sekretase

Die folgenden Daten wurden publiziert in:

Grimm M.O., Haupenthal V.J., Rothhaar T.L., Zimmer V.C., Grösgen S., Hundsdörfer B., Lehmann J., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). *Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci. 14(3):5879-98.

Das Projekt untersuchte den Einfluss verschiedener Phospholipide auf die Aktivität der α -Sekretase. Dabei wurden Phospholipide mit variabler Fettsäuren-Kettenlänge, sowie variablem Sättigungsgrad *in vitro* auf isolierten Plasmamembranen von SH-SY5Y wt Zellen und direkt auf lebenden SH-SY5Y wt Zellen inkubiert und die Aktivität der α -Sekretase bestimmt. Vorhegehende Ergebnisse zeigten einen Effekt der Phospholipide auf die α -Sekretase-Aktivität, der sowohl von ihrer Fettsäuren-Kettenlänge als auch von ihrem Sättigungsgrad abhing. So erhöhten Phospholipide mit kürzerer Fettsäuren-Kettenlänge, wie PC 10:0, 12:0 und 14:0 die Aktivität der α -Sekretase ebenso wie Phospholipide mit steigender Anzahl an Doppelbindungen wie PC 18:3 und PC 22:6 (Grimm *et al.* 2013). Die Tatsache, dass dieser Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase auch bei der *in vitro*-Inkubation auf isolierten Plasmamembranen beobachtet wurde, spricht für einen direkten Effekt der Phospholipide, der unabhängig von Expressions- oder Lokalisations-Effekten ist. Dies wurde überprüft durch die Inkubation von isoliertem ADAM10-Enzym mit PC 12:0, welches in den vorhergehenden Messungen den größten Effekt auf die α -Sekretase zeigte.

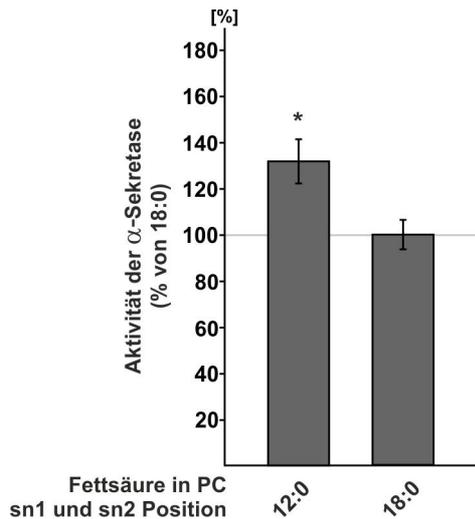


Abb. 79 Der Einfluss PC 12:0 auf die Aktivität von ADAM10

25 μ M Phospholipid wurden mit einem Lipidextrakt aus humanen *post mortem* Gehirnen und 100ng/100 μ l isoliertem ADAM10-Enzym für 1Std. bei 4°C inkubiert und anschließend 15min sonifiziert. Die Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität erfolgte wie für Abb. 50 beschrieben unter Verwendung des α -Sekretase-Substrats II. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarstem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Messung ergab eine auf 132,0% (+/- 9,60%, $p = 0,011$) erhöhte Aktivität der α -Sekretase nach der Inkubation mit PC 12:0 verglichen mit dem Phospholipid PC 18:0, das als Referenz-Lipid ausgewählt wurde, weil es selbst die α -Sekretase-Aktivität nicht beeinflusste (Abb. 79).

Die Inkubation von PC18:3 erhöhte die α -Sekretase-Aktivität des aufgereinigten ADAM10-Enzyms auf 148,2% (+/- 4,2%, $p = 0,0002$) während das sechsfach ungesättigte PC 22:6 die α -Sekretase-Aktivität auf 229,7% (+/- 2,7%, $p = 4,07 \times 10^{-8}$) im Vergleich zu PC 18:0 steigerte (Abb. 80).

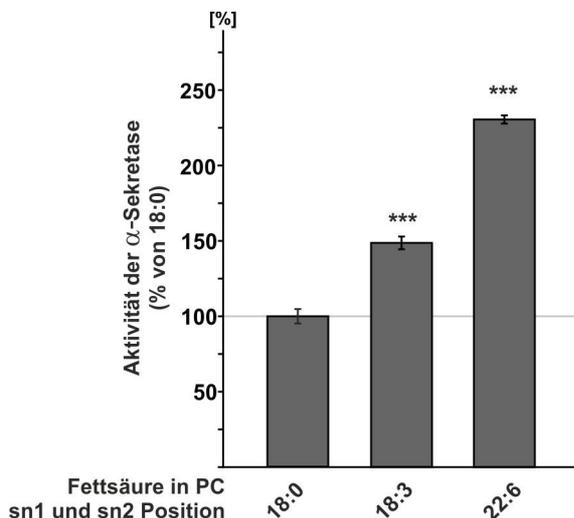


Abb. 80 Der Einfluss von PC 18:3 und PC 22:6 auf die Aktivität von ADAM10

Die Inkubation der Phospholipide und die Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität erfolgte wie für Abb. 79 bzw. Abb. 50 beschrieben.

Der zuvor beobachtete direkte aktivierende Effekt der Phospholipide mit kurzen Fettsäureketten auf die Aktivität der α -Sekretase konnte also durch die Inkubation eines isolierten ADAM10-Enzyms ebenso bestätigt werden, wie der der Phospholipide mit steigender Anzahl an Doppelbindungen.

4.5.2 Der Einfluss von Phytosterolen auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase

Die folgenden Daten sind Inhalt des Manuskriptes:

Burg V.K., Rothhaar T.L., Grösgen S., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Zimmer V.C., Mett J., Weingärtner O., Laufs U., Broersen L.M., Tanila H., Vanmierlo T., Lütjohann D., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2013). *Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study.* J Neurosci.

Das Projekt untersuchte den Einfluss verschiedener Phytosterole auf die APP-Prozessierung. Da Cholesterin bereits vielfach mit der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht wurde, sollte ermittelt werden, inwieweit sich Phytosterole, die pflanzlichen Äquivalente des tierischen Cholesterins, auf die APP-Prozessierung auswirken. Für die Analyse wurden die Phytosterole Stigmasterol, β -Sitosterol, Brassicasterol und Campesterol sowie Cholesterin verwendet. Bei vorangegangenen Experimenten zur Beeinflussung des A β -Levels nach Inkubation mit Phytosterolen zeigte lediglich das Phytosterol Stigmasterol eine Reduktion des sezernierten A β s, während β -Sitosterol und Brassicasterol den A β -Level erhöhten und die Inkubation mit Campesterol keinen Effekt zeigte. Die größte Erhöhung des A β -Levels war nach der Inkubation mit Cholesterin zu beobachten.

Es sollte im Folgenden der Einfluss der Phytosterole auf die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase untersucht werden. Dazu wurden PNFs, die zuvor aus Mäusegehirnen gewonnen wurden *in vitro* mit Phytosterolen bzw. Cholesterin inkubiert und die Sekretase-Aktivitäten bestimmt. Es zeigte sich nach Inkubation mit allen Phytosterolen, ausgenommen Stigmasterol, eine Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität in den isolierten Membranen der Mäusegehirne.

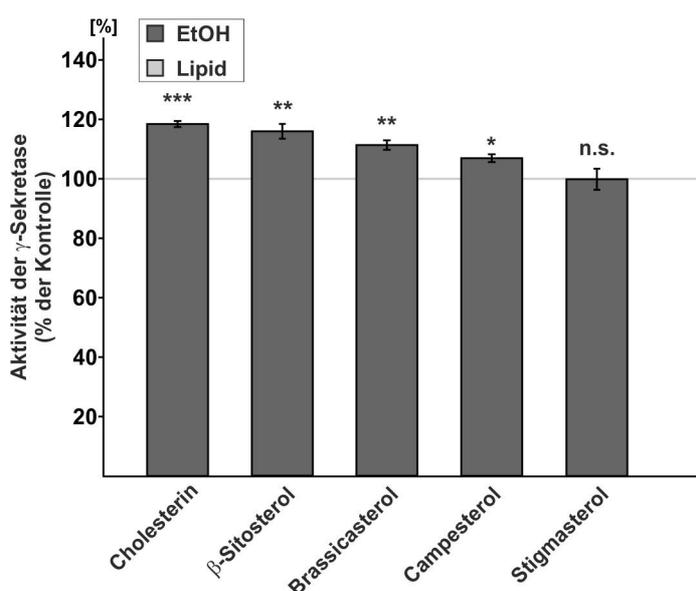


Abb. 81 Der Effekt von Phytosterolen und Cholesterin auf die Aktivität der γ -Sekretase

PNFs aus Mäusegehirnen wurden für 15min bei 37°C unter Schütteln mit 100µM Phytosterolen bzw. Cholesterin inkubiert. Die Kontrollen enthielten die entsprechende Menge des Lösungsmittels EtOH. Die Membranen wurden isoliert und die Aktivität der γ -Sekretase wurde in einem Safire-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivitäten ergaben sich aus der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 6 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

β -Sitosterol erhöhte die γ -Sekretase-Aktivität signifikant auf 115,93% (+/- 2,48, $p = 0,0006$), Brassicasterol auf 111,35% (+/- 1,59%, $p = 0,005$) und Campesterol auf 106,86% (+/- 1,31%, $p = 0,046$). Die Inkubation von Stigmasterol hatte keinen Effekt auf die γ -Sekretase-Aktivität (99,96% +/- 3,55%, $p = 0,993$), wohingegen die Inkubation von Cholesterin mit 118,40% (+/- 1,02%, $p = 4,77 \times 10^{-6}$) den größten Effekt zeigte (Abb. 81).

Die β -Sekretase-Aktivität der Membranen von Mäusegehirnen nach der Inkubation mit Phytosterolen war nach der Stigmasterol-Inkubation signifikant auf 84,92% (+/- 1,47%, $p = 9,35 \times 10^{-10}$) reduziert. Die anderen Phytosterole ebenso wie Cholesterin führten zu einer signifikanten Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität (β -Sitosterol: 109,83% +/- 1,01%, $p = 3,87 \times 10^{-7}$; Brassicasterol: 106,56% +/- 1,68%, $p = 0,018$; Campesterol: 104,78% +/- 1,41%, $p = 0,0496$; Cholesterin: 116,15% +/- 0,59%, $p = 3,21 \times 10^{-15}$) (Abb. 82)

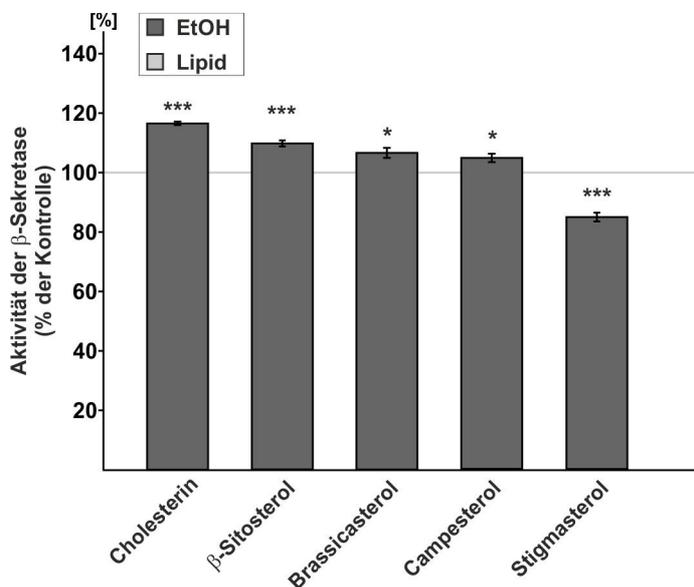


Abb. 82 Der Effekt von Phytosterolen und Cholesterin auf die Aktivität der β -Sekretase

Die Inkubation der Phytosterole erfolgte analog Abb. 81. Die Membranen wurden isoliert und die Aktivität der β -Sekretase wurde in einem Safire-Fluorometer kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aktivitäten ergaben sich aus der Steigung der Fluoreszenz im linearen Bereich über die Zeit. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von mindestens 6 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Übereinstimmend mit den reduzierten A β -Leveln nach Inkubation mit Stigmasterol, war also auch die Aktivität der β -Sekretase reduziert. Da der direkte Effekt auf die Aktivität der β -

Sekretase mit einer Reduktion auf 84,92 aber deutlich kleiner war als der beobachtete Effekt auf die A β -Sekretion und eine Reduktion der BACE1-Expression durch vorrangegangene Experimente ausgeschlossen werden konnte, wurde die subzelluläre Lokalisation von BACE1 nach der Inkubation mit Stigmasterol untersucht.

Mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Iodixanol-Gradienten wurden aus SH-SY5Y wt Zellen, die zuvor mit Stigmasterol inkubiert wurden, die Endosomen angereichert. Die Fraktionen welche Endosomen enthielten wurden im Western Blot mit einem AK gegen das „early endosomal antigen-1“ (EEA1) identifiziert (Abb. 83)



Abb. 83 Identifikation der endosomalen Fraktionen des Iodixanol-Gradienten

SH-SY5Y wt Zellen wurden mit Stigmasterol inkubiert und ihre Homogenate auf einen kontinuierlichen Iodixanol-Gradienten geladen. Nach Zentrifugation für 18Std. bei 48.000g und 4°C wurden 20 einzelne Fraktionen von oben abgenommen und im Western Blot mittels EEA1-spezifischem AK untersucht. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot.

Die Fraktionen 1-4 wurden als EEA1-positive Fraktionen identifiziert und für die weiteren Analysen vereinigt. Die Analyse der β -Sekretase-Aktivität ergab eine signifikant auf 85,80% (+/- 1,80%, p=0,0002) reduzierte Aktivität in den endosomalen Fraktionen der Stigmasterol-inkubierten Zellen, verglichen mit den Endosomen der Kontrollzellen. Die Western Blot Analyse des BACE1-Proteinlevels der EEA1-positiven Fraktionen ergab eine Reduktion auf 86,88% (+/- 1,89%, p=0,0006) (Abb. 84).

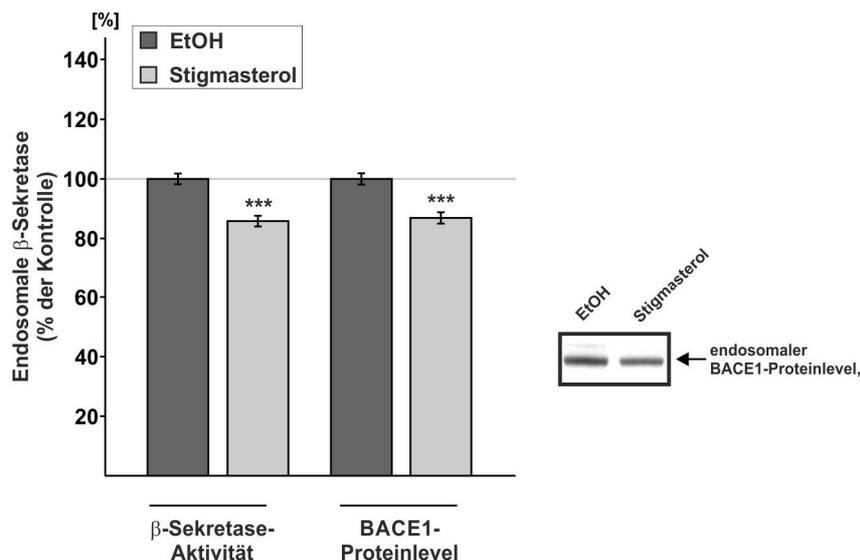


Abb. 84 Die endosomale Aktivität der β -Sekretase und das BACE1-Proteinlevel in Abhängigkeit von Stigmasterol

Die Anreicherung der Endosomen erfolgte wie für Abb. 83 beschrieben. Die EEA1-positiven Fraktionen wurden gepoolt und mit β -Sekretase-Substrat versetzt. Die Messung der β -Sekretase-Aktivität und Auswertung erfolgte wie für Abb. 81 beschrieben. Zur Bestimmung des BACE1-Proteinlevels wurden die vereinigten EEA1-positiven Fraktionen über ein SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und BACE1 wurde mit dem anti-BACE1-AK (B0806) detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von 6 unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots dargestellt.

Somit scheinen die Lokalisation von BACE1 und damit auch seine Aktivität in den Endosomen durch die Inkubation mit Stigmasterol reduziert zu sein, obwohl vorangegangene Analysen zeigten, dass der BACE1-Proteinlevel insgesamt unverändert ist. Eine reduzierte Lokalisation in den Endosomen könnte durch eine veränderte endozytotischen Aufnahme von der Plasmamembran bedingt sein. Deshalb wurde mittels Biotinylierung das BACE1-Proteinlevel selektiv an der Zelloberfläche ermittelt. Es zeigte sich eine Stigmasterol-abhängige Erhöhung des BACE1-Proteinlevels an der Zelloberfläche der SH-SY5Y Zellen auf 137,44% (+/- 7,96%, $p = 0,016$). Die Menge an Oberflächen-APP war hingegen unverändert (95,92% +/- 3,98%, $p = 0,478$) (Abb. 85).

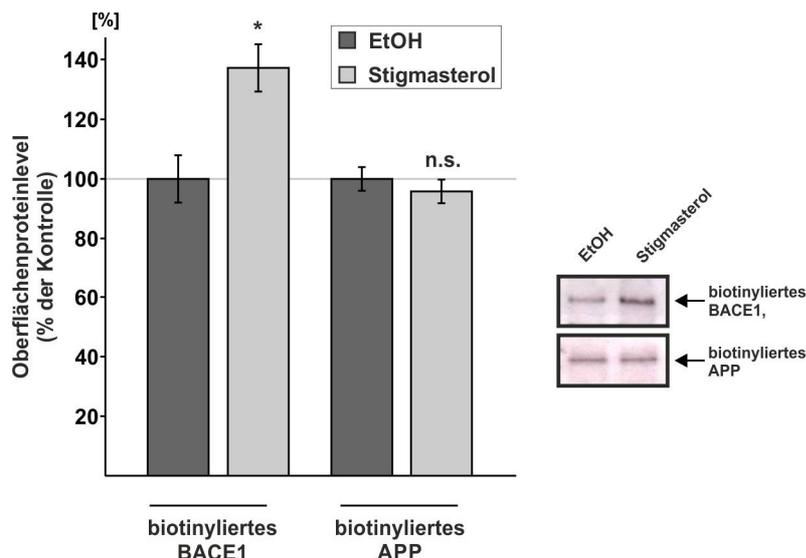


Abb. 85 Analyse der Lokalisation von BACE1 und APP an der Zelloberfläche

SH-SY5Y wt Zellen wurden mit Stigmasterol inkubiert, abgeschabt und für 30min unter leichtem Schütteln mit 0,5mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin bei 4°C inkubiert. Die Biotinylierung wurde mit 100mM Glycin in PBS abgestoppt, ungebundenes Biotin abgewaschen und die Zellen wurden lysiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit Streptavidin-Agarose immunopräzipitiert und BACE1 und APP wurden im Western Blot mit dem anti-BACE1-AK B0806 bzw. dem anti-APP-AK W02 detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung von 6 unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Rechts sind repräsentative Ausschnitte der Western Blots dargestellt.

Die reduzierten BACE1-Level in den Endosomen scheinen also durch eine reduzierte endozytotische Aufnahme bedingt, wodurch BACE1 an der Zelloberfläche anakkumuliert. Dieser Effekt scheint spezifisch für BACE1 zu sein, da sein Substrat APP an der Zelloberfläche in unveränderten Mengen vorliegt.

Eine Lokalisation von BACE1 an der Zelloberfläche und die damit verbundene Reduktion in den Endosomen könnte aufgrund des pH-Optimums von BACE1 im sauren Bereich seine Aktivität und damit die amyloidogene APP-Prozessierung reduzieren und zu der beobachteten verringerten A β -Sekretion führen.

Um zu untersuchen, ob Stigmasterol auch *in vivo* einen Effekt auf die Sekretase-Aktivitäten hat, wurden Gehirne und Blutzellen von Mäusen untersucht, die zuvor mit Stigmasterol-angereicherten Diäten gefüttert wurden.

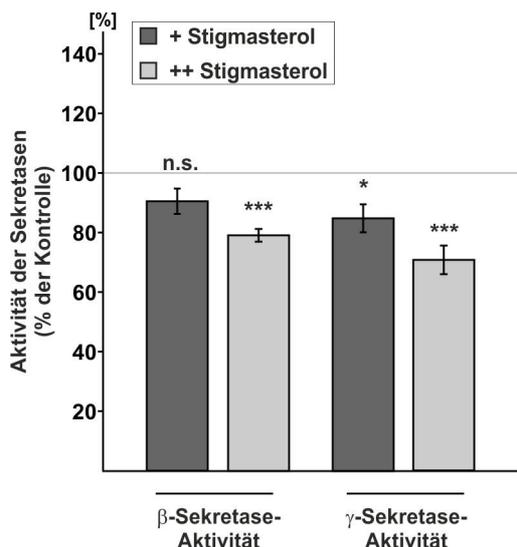


Abb. 86 Der Einfluss einer Stigmasterolreichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen im Gehirn

Je 6 wt-Mäuse wurden mit 3 verschiedenen Diäten, die kein Stigmasterol (Kontroll-Diät), 0,19% (+ Stigma) bzw. 0,39% (++) Stigmasterol enthielten über einen Zeitraum von 6 Wochen gefüttert. Nach dem Abtöten der Mäuse wurden die Membranen aus den Gehirnen isoliert und die Sekretase-Aktivitäten wurden, wie für Abb. 81 beschrieben, fluorometrisch bestimmt. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Aktivität der β -Sekretase war in den Gehirnen der Mäuse, die die geringere Stigmasterol-Konzentration erhielten nicht signifikant auf 90,48% (+/- 4,26%, $p = 0,106$) reduziert, wohingegen die höher konzentrierte Stigmasterol-Diät die β -Sekretase-Aktivität signifikant auf 79,06% (+/- 2,14, $p = 0,0008$) verringerte. Die Aktivität der γ -Sekretase war durch beide Stigmasterol-Diäten dosisabhängig signifikant auf 84,77% (+/- 4,69%, $p = 0,033$) bzw. auf 70,82% (+/- 4,80%, $p = 0,0009$) reduziert (Abb. 86). In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Sekretase-Aktivitäten aus den Blutzellen der Mäuse, die die Stigmasterol-Diäten erhielten, bestimmt.

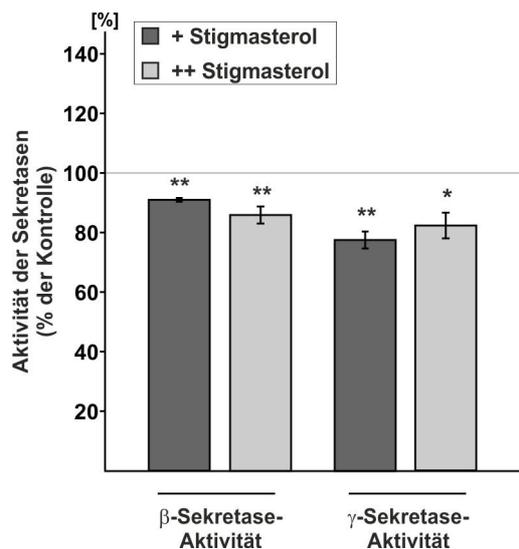


Abb. 87 Der Einfluss einer Stigmasterolreichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen in den Blutzellen

Die Fütterung der Versuchstiere erfolgte wie für Abb. 86 beschrieben. Die Sekretase-Aktivitäten wurden aus den isolierten Membranen der Blutzellen bestimmt. Dafür wurden die Blutzellen homogenisiert, der Proteingehalt angeglichen und die Membranen per Ultrazentrifugation angereichert. Die Messung erfolgte fluorometrisch wie für Abb. 81 beschrieben. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die β -Sekretase-Aktivität in den Membranen der Blutzellen war durch die Fütterung beider Stigmasterol-Diäten signifikant auf 90,97% (+/- 0,63%, $p = 0,0013$) für die Stigma (+)-Diät bzw. auf 85,87% (+/- 2,86%, $p = 0,003$) für die Stigma (++)-Diät reduziert. Für die Aktivität der γ -Sekretase ergaben sich signifikante Reduktionen auf 77,49% (+/- 2,84%, $p = 0,003$) und 82,34% (+/- 4,31%, $p = 0,021$) in den Blutzellmembranen der gefütterten Mäuse (Abb. 87).

Weitere Versuche im Rahmen dieses Projektes ergaben zudem eine signifikante Reduktion der Komponenten der γ -Sekretase, sowie eine Reduktion des Cholesterin-Gehaltes der Lipid Rafts durch die Inkubation von Stigmasterol in SH-SY5Y Zellen. Zusammen mit den gezeigten *in vivo*-Daten sprechen die Ergebnisse dieser Studie für einen protektiven Effekt des Stigmasterols auf das Risiko an der Alzheimer Krankheit zu erkranken.

4.5.3 Der Einfluss von DHA auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase

Die folgenden Daten wurden publiziert in:

Grimm M.O., Kuchenbecker J., Grösgen S., Burg V.K., Hundsdörfer B., Rothhaar T.L., Friess P., de Wilde M.C., Broersen L.M., Penke B., Péter M., Vígh L., Grimm H.S., Hartmann T. (2011). *Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms*. J Biol Chem. 286(16):14028-39

In der Vergangenheit wurde mehrfach die Aufnahme der sechsfach ungesättigten Omega-3 Fettsäure DHA mit einem verminderten Alzheimer-Risiko in Verbindung gebracht (Morris *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004; Barberger-Gateau *et al.*, 2002; Schaefer *et al.*, 2006; Albanese *et al.*, 2009). Ziel dieser Studie war es den Effekt von DHA auf die APP-Prozessierung und den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu analysieren. Vorausgegangene Experimente zeigten einen inhibitorischen Effekt von DHA auf die amyloidogene APP-Prozessierung durch Reduzierung der β - und γ -Sekretase-Aktivitäten, während die nicht amyloidogene APP-Prozessierung durch eine erhöhte Proteinstabilität von ADAM17 gesteigert wurde (Grimm *et al.*, 2011c).

Im Rahmen dieses Projekts sollte der Einfluss einer Fütterung mit einer DHA-reichen Diät auf die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase in den Gehirnen gefütterter Mäuse analysiert werden

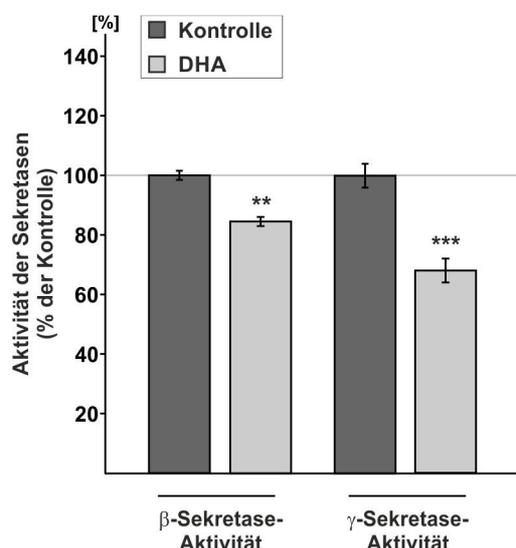


Abb. 88 Der Einfluss einer DHA-reichen Diät auf die Aktivität der Sekretasen im Gehirn

Jeweils 6 Mäuse wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen mit zwei verschiedenen Diäten gefüttert. Die Kontroll-Diät enthielt 1,9% Sojaöl, 0,9% Kokosöl und 2,2% Maisöl, die DHA-Diät bestand aus 0,1% Kokosöl, 1,9% Maisöl und 3,0% Fischöl. Nach dem Abtöten der Mäuse wurden die Membranen der Gehirne isoliert und die Sekretase-Aktivitäten, wie für Abb. 81 beschrieben, fluorometrisch bestimmt. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Aktivitäten beider Sekretasen waren in den Gehirnen derjenigen Mäuse, die mit der DHA-reichen Diät gefüttert wurden, verglichen mit der Kontrollgruppe reduziert. Für die β -Sekretase-Aktivität ergab sich eine signifikante Reduktion auf 84,33% (+/- 1,54%, $p=0,002$), die γ -Sekretase-Aktivität der DHA-reich gefütterten Mäuse war auf 67,95% (+/- 4,00%, $p=0,0002$) reduziert (Abb. 88).

In weiteren Experimenten wurde zum einen eine Verschiebung der γ -Sekretase-Aktivität von den Lipid Raft- in die Non-Raft-Bereiche und zum anderen eine reduzierte Internalisierung von BACE1 in die Endosomen beobachtet. Beides führt zu einer Reduktion der amyloidogenen APP-Prozessierung. Zusammengefasst ergab die Studie einen reduzierenden Effekt des DHA auf die amyloidogene APP-Prozessierung sowie eine Steigerung der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung über einen multifaktoriellen Mechanismus, wodurch es insgesamt zu einer Verringerung der A β -Produktion kommt.

4.5.4 Der Einfluss von Gangliosiden auf die Aktivität der γ -Sekretase

Die folgenden Daten entstanden im Rahmen eines Projektes, das teilweise veröffentlicht wurde in:

Grimm M.O., Zinser E.G., Grösgen S., Hundsdörfer B., Rothhaar T.L., Burg V.K., Kaestner L., Bayer T.A., Lipp P., Müller U., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). *Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism*. PLoS One. 2012;7(3):e34095.

Neben den bisher beschriebenen Lipiden konnte auch für die Lipidklasse der Ganglioside ein Einfluss auf die APP-Prozessierung nachgewiesen werden. Umgekehrt wurde gezeigt, dass die APP-Spaltprodukte A β und AICD die Gangliosid-Homöostase beeinflussen. In PS1/2-defizienten Zellen wurden erhöhte Level der b-Serien-Ganglioside GD3, GD1b und GT1b nachgewiesen, während die Ganglioside GM1, GM3 und GD1a reduziert vorlagen. Die mRNS-Level der GD3-Synthase (GD3S), dem Enzym, das die Synthese der Ganglioside der b-Serie katalysiert, lag in APP-KO Mäuse ebenso wie in den Gehirnen von FAD-Patienten erhöht vor, was für eine Regulation der GD3S über die APP-Prozessierungsprodukte spricht. Es konnte gezeigt werden, dass die GD3S-Expression über das APP-Spaltprodukt AICD inhibiert wird. Zeitgleich wird die Substratverfügbarkeit der GD3S durch die Bindung von A β an GM3 reduziert (Grimm *et al.*, 2012). Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob umgekehrt eine Abhängigkeit der γ -Sekretase-Aktivität von der Aktivität der GD3S besteht.

Hierzu wurden isolierte Membranen aus den Gehirnen von GD3S-KO Mäusen auf ihre γ -Sekretase-Aktivität untersucht. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität auf 76,26% (+/- 5,56%, $p=0,0049$) in den Gehirnmembranen der GD3S-defizienten Mäuse verglichen mit denen von Wildtyp-Mäusen (Abb. 89).

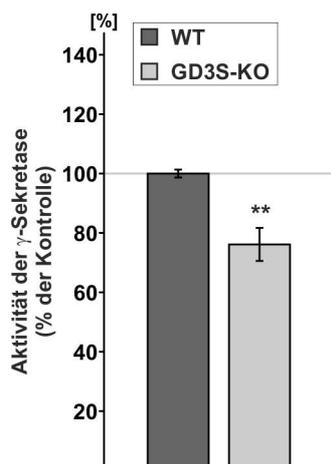


Abb. 89 Die Aktivität der γ -Sekretase in den Gehirnen von GD3S-KO Mäusen

Aus den Gehirnen von GD3S-defizienten Mäusen wurden die Membranen isoliert und auf ihre γ -Sekretase-Aktivität untersucht. Diese wurde mit der Aktivität von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität erfolgte fluorometrisch wie für Abb. 81 beschrieben. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt den statistischen Durchschnitt von 3 unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass GD3, ein Produkt der GD3S, die Produktion von A β erhöht, während GM3, das zu den α -Serien-Gangliosiden zählt, die A β -Produktion reduziert. Es ergibt sich also ein negativer „Feedback“-Mechanismus, bei dem durch die Aktivität der GD3S die APP-Prozessierung erhöht wird, während die Produkte der APP-Prozessierung über verschiedene Mechanismen zu einer Reduktion der GD3S-Aktivität führen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Prozessierung des APPs und vor allem die Aktivität der APP-prozessierenden Sekretasen eng mit der Lipidhomöostase verknüpft sind. Eine Beeinflussung der Sekretase-Aktivitäten konnte für Lipide der verschiedensten Klassen belegt werden. Somit ist eine Veränderung der Lipidhomöostase durch die Beeinflussung der Enzyme des Lipidstoffwechsels zum einen oder eine gezielte Aufnahme bestimmter Lipide über die Nahrung zum anderen ein vielversprechender Ansatz in der Prävention und Therapie der Alzheimer Krankheit.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von TFA auf die APP-Prozessierung

5.1.1 TFA und das Alzheimer-Risiko – Die epidemiologische Datenlage

TFA sind ungesättigte Fettsäuren mit einer oder mehreren Doppelbindungen in *trans*-Konformation. Sie entstehen zum einen auf natürlichem Weg durch bakterielle Fermentation im Magen wiederkäuender Säugetiere, wodurch sie sowohl in dem Fleisch der Tiere, als auch in Milch und Milchprodukten wie Käse, Butter oder Sahne enthalten sind. Zum anderen werden die in *cis*-Konfiguration vorliegenden Fettsäureester in pflanzlichen Ölen beim Erhitzen über eine Temperatur von etwa 150°C in ihre *trans*-Form umgewandelt (Suliman, 2013). Darüberhinaus fallen sie als Nebenprodukt bei der industriellen Härtung von pflanzlichen Ölen durch Hydrierung ungesättigter Fettsäuren an. Die so gewonnenen gehärteten oder teilweise gehärteten Fette zeichnen sich durch eine geringere Anfälligkeit gegenüber Oxidationsprozessen aus und sind so länger haltbar als die unverarbeiteten Pflanzenöle. Sie kommen deshalb in großen Mengen in der industriellen Nahrungsmittelverarbeitung, insbesondere bei der Herstellung von Instant- und Tiefkühlprodukten zum Einsatz. Durch die Veränderung der Essgewohnheiten hin zum Verzehr von Fastfood und Tiefkühlware ist die Menge an aufgenommenen TFA in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen (Emken, 1984). Während mehrere Studien eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von TFA und dem Risiko für koronare Herzerkrankungen und Arteriosklerose fanden (Hu *et al.*, 1997; Jakobsen *et al.*, 2008; Motard-Belanger *et al.*, 2008; Stender *et al.*, 2008; Stender *et al.*, 1995), liegen über eine Erhöhung des Alzheimer-Risikos durch TFA Aufnahme keine einheitlichen Daten vor. Laut der Rotterdam Studie von Engelhart *et al.* geht der Konsum von TFA nicht mit einem erhöhten Risiko für Demenz-Erkrankungen einher (Engelhart *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Studie wurden über 5000 Personen über 65 Jahre, die zu Beginn der Erhebungen nicht unter kognitiven Beeinträchtigungen litten, über die Dauer von 10 Jahren begleitet und in regelmäßigen Abständen untersucht. Dabei wurde kein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von *trans*-Fetten und dem Auftreten von Alzheimer-Erkrankungen gefunden. Allerdings gab es laut dieser Studie auch keine Korrelation zwischen dem Alzheimer-Risiko und der hohen Aufnahme von gesättigten Fetten und Cholesterin oder der geringen Aufnahme an mehrfach ungesättigten Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren, was von anderen Studien bereits mehrfach beobachtet wurde (Cherubini *et al.*, 2007; Kalmijn *et al.*, 1997; Kalmijn *et al.*, 2004; Petursdottir *et al.*, 2008). Auch andere epidemiologische Studien von Naqvi *et al.* (Naqvi *et al.*, 2011) und Okereke *et al.* (Okereke *et al.*, 2012) konnten keinen Zusammenhang zwischen der TFA Aufnahme und abnehmenden kognitiven Fähigkeiten

finden. Dagegen stehen mehrere Studien, die über einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten kognitiver Beeinträchtigungen und der Aufnahme von TFA bei Frauen mit Diabetes Typ 2 (Devore *et al.*, 2009) oder bei Personen, die zusätzlich hohen Dosen von Kupfer ausgesetzt sind (Morris *et al.*, 2006) berichten. Morris *et al.* fanden das Alzheimer-Risiko bei älteren Personen über 65 Jahren mit einem täglichen Verzehr von 4,8g TFA im Mittel 5,2fach erhöht, verglichen mit einer Gruppe, bei der der Verzehr bei lediglich 1,8g pro Tag lag. Eine mittlere Einnahme von 2,3 – 3,7g TFA pro Tag ging mit einem um 3,1 bis 4,2fach erhöhten Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung einher. Bei dieser Studie wurden die relativen Risiken an Alzheimer zu erkranken nicht nur auf allgemeine Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Rasse, ApoE-Status und Bildungsstatus angepasst, sondern erfolgten auch unter Einbeziehung der anderen von den Teilnehmern aufgenommen Fetten (Morris *et al.*, 2003).

Während die epidemiologischen Studien zu diesem Thema kontroverse Ergebnisse liefern, fehlten bisher Studien, die die Wirkung von TFA mechanistisch untersuchten, um so Rückschlüsse auf eine mögliche Erhöhung des Alzheimer-Risikos zu ziehen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von TFA auf die Prozessierung des APPs untersucht. Als Modellsystem wurden zum einen die Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y verwendet, bei der es sich um eine Zelllinie mit neuronalem Charakter handelt. Die Resultate wurden durch die Verwendung kortikaler Primärneuronen von Mäuseembryonen abgesichert, was die Relevanz für neuronale Zellen unterstreicht. Als TFA wurde die einfach ungesättigte Elaidinsäure ausgewählt, die den Hauptteil an TFA in industriell gefertigter Nahrung ausmacht (Kuhnt *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden die Versuche mit der zweifach ungesättigten CLA durchgeführt, um den Effekt einer zweiten Doppelbindung zu analysieren. Die Effekte der beiden TFA wurden in Bezug zu ihren jeweiligen *cis*-Isomeren, der Ölsäure und der Linolsäure, untersucht. Auf den Vergleich mit einer entsprechenden Lösungsmittelkontrolle wurde deshalb verzichtet, weil der spezifische Effekt der *trans*-Konfiguration der Doppelbindung, wie er bei der industriellen Härtung von pflanzlichen Fetten entsteht, ermittelt werden sollte. Dieser sollte verglichen werden mit dem Effekt der jeweiligen *cis*-Konformation, wie sie in den unverarbeiteten Pflanzenfetten natürlicherweise vorliegt.

5.1.2 TFA beeinflussen die APP-Prozessierung

In der Vergangenheit wurde für eine Reihe von verschiedenen Lipiden gezeigt, dass diese einen Einfluss auf die Prozessierung des APPs nehmen und somit die Produktion von A β beeinflussen können. So erhöht beispielsweise Cholesterin die A β Produktion, während die

mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäure DHA eine Reduktion des sezernierten A β s hervorruft (Grimm *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2011c).

Die Inkubation mit TFA zeigte, verglichen mit der Inkubation mit den entsprechenden *cis*-Isomeren, eine erhöhte A β -Sekretion in SH-SY5Y Zellen. Die Produkte des nicht amyloidogenen Prozessierungswegs sAPP α und α -CTF waren im Gegensatz zum erhöhten A β -Level reduziert, was auf eine Verschiebung der APP-Prozessierung von der nicht amyloidogenen hin zur A β -produzierenden amyloidogenen Proteolyse deutet. Die Erhöhung des sekretierten A β s war in SH-SY5Y Zellen, die mit APP695 transfiziert waren, ebenso zu beobachten, wie in Zellen, die das C99 Konstrukt überexprimierten. Bei SH-SY5Y C99 ist die Produktion des A β -Peptids lediglich vom Schnitt der γ -Sekretase abhängig, während in den Zellen, die APP in der vollen Länge exprimieren, der Schnitt beider Sekretasen für die A β -Produktion notwendig ist (Grimm *et al.*, 2003). Bei beiden verwendeten TFA ergab die Inkubation auf SH-SY5Y APP Zellen aber eine größere Differenz in der sekretierten A β -Menge im Vergleich zur Inkubation des *cis*-Isomers, als es bei der Inkubation auf SH-SY5Y C99 der Fall war. Dies deutet auf einen kombinierten Effekt der TFA, der sowohl die γ - als auch die β -Sekretase betrifft. Dafür spricht auch die Analyse des β -CTF, das bei der amyloidogenen Prozessierung als Produkt des Schnitts der β -Sekretase entsteht. Die Western Blot Analyse zeigte verminderte β -CTF Level nach der Inkubation mit TFA. In Folge einer Erhöhung des β -Schnitts sollten diese eigentlich erhöht vorliegen, durch die gleichzeitige Erhöhung des γ -Schnitts wird das β -CTF aber direkt weiterprozessiert, was letztlich zu reduzierten Mengen führt.

5.1.3 TFA reduzieren die nicht amyloidogene APP-Prozessierung

Wie die Analyse der beiden α -Sekretase Produkte sAPP α und α -CTF zeigte, verminderte die Inkubation mit TFA die Prozessierung des APPs über den α -Sekretase mediierten nicht amyloidogenen Weg. Ein Grund hierfür stellt die reduzierte Transkription des ADAM10 Gens dar. Die Zink-Metalloprotease ADAM10 ist neben ADAM17 eine der hauptsächlich an der APP-Prozessierung beteiligten α -Sekretasen (Buxbaum *et al.*, 1998; Lammich *et al.*, 1999). Die Reduktion der Transkription von ADAM10 resultierte, wie die Western Blot Analyse zeigte, in einem reduzierten ADAM10-Proteinlevel. Hierbei ergab sich für die zweifach ungesättigte CLA eine größere Reduktion im Proteinlevel als bei der Inkubation der einfach ungesättigten Elaidinsäure. Dies reflektiert die Ergebnisse der Analyse der APPs Spaltprodukte. Auch hier ergaben sich größere Reduktionen im sAPP α und α -CTF Level durch die Inkubation der CLA als es nach der Inkubation mit Elaidinsäure der Fall war.

Da α - und β -Sekretase um die Prozessierung des Substrats APP konkurrieren (Harris *et al.*, 2009; Skovronsky *et al.*, 2000), ist eine Inhibierung der proteolytischen Spaltung durch die α -Sekretase ein Hinweis auf eine gleichzeitige Erhöhung des amyloidogenen Wegs.

Zusätzlich zur Beeinflussung der α -Sekretase scheint die nicht amyloidogene APP-Prozessierung durch eine Beeinträchtigung des APP-Transportes zur Plasmamembran inhibiert zu werden. Die FACS Analyse ergab reduzierte APP-Level an der Oberfläche der mit TFA inkubierten Zellen. Zusammen mit der Erhöhung an intrazellulärem APP spricht dies für eine Blockierung des APP-Transports zur Plasmamembran oder eine Verstärkung der endozytotischen Aufnahme. Unter physiologischen Bedingungen durchläuft APP während seiner Maturierung den konstitutiven sekretorischen Weg. Währenddessen wird es posttranslationalen Modifikationen wie O- und N-Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Sulfatierungen unterzogen (Hung and Selkoe, 1994; Oltersdorf *et al.*, 1990; Selkoe *et al.*, 1996; Weidemann *et al.*, 1989). Das APP erreicht schließlich die Zelloberfläche von wo aus es internalisiert wird und im endosomalen Kompartiment und dem trans-Golgi-Netzwerk dem Schnitt durch BACE1 unterliegt (Cook *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1997; Vetrivel and Thinakaran, 2006). Dagegen findet die α -Sekretase medierte APP-Proteolyse an der Zelloberfläche statt (Ikezu *et al.*, 1998; Parvathy *et al.*, 1999; Sisodia, 1992). Reduzierte APP-Level an der Zelloberfläche könnten also grundsätzlich über mindestens drei verschiedene Mechanismen zustande kommen. Zum einen könnte APP, sobald es die Zelloberfläche erreicht hat, der proteolytischen Spaltung durch die α -Sekretase unterliegen. Davon ist in diesem Fall nicht auszugehen, da sich nach der Inkubation mit TFA gezeigt hat, dass die nicht amyloidogene APP-Prozessierung durch eine Reduktion der ADAM10-Transkription reduziert war. Des Weiteren wäre die Akkumulation des intrazellulären APPs über diesen Mechanismus nicht zu erklären. Als zweite Möglichkeit könnte eine Beeinträchtigung schon bei der Reifung des APPs und seinem Transport zur Plasmamembran durch die Inkubation mit TFA vorliegen. In diesem Fall käme es zur intrazellulären Akkumulation des APP, wie sie nach der Inkubation mit TFA beobachtet wurde. Der dritte potentielle Mechanismus ist die verstärkte Internalisierung von APP in die Endosomen. Ein solcher Effekt auf die APP Lokalisation wurde für Cholesterin bereits beschrieben. Malnar *et al.* zeigten, dass in Nieman-Pick Zellen (NPC), in denen es zur Akkumulation von Cholesterin kommt, die Internalisierung von APP erhöht ist, was mit einer Erhöhung des β -Schnitts in den Endosomen und damit einer verstärkten A β -Produktion einhergeht (Malnar *et al.*, 2012). Da im Falle einer Inkubation mit TFA die Produktion von A β -Peptiden erhöht war, wäre dieser Mechanismus auch hier denkbar. Weitere Analysen müssen zeigen, ob TFA über eine Anreicherung des APP in den Endosomen zur verstärkten proteolytischen Spaltung durch BACE1 führen.

5.1.4 TFA erhöhen die amyloidogene APP-Prozessierung über einen multifaktoriellen Mechanismus

Im Gegensatz zur denen der nicht amyloidogenen Prozessierung ergab die Analyse der Produkte, die über den amyloidogenen Weg entstehen, mit Ausnahme des β -CTFs, eine deutliche Erhöhung. Beim amyloidogenen Prozessierungsweg wird APP zunächst durch die β -Sekretase geschnitten, wodurch das sekretorische sAPP β und das membranständige β -CTF entstehen. Der nachfolgende γ -Schnitt des β -CTFs im Inneren der Membran führt zur Freisetzung des A β -Peptids.

Die RT-PCR Analyse der beiden beteiligten Sekretasen ergab, dass sowohl die Expression von BACE1, das als β -Sekretase bei der APP-Prozessierung identifiziert wurde, als auch der Komponenten des γ -Sekretase Komplexes PS1, PS2, Nicastrin APH1a, APH1b und PEN2 durch die Inkubation mit TFA erhöht ist. In Übereinstimmung damit zeigte die Western Blot Analyse eine Erhöhung des Protein-Levels von BACE1, auch wenn diese im Falle von Elaidinsäure nicht signifikant war. Nach einer Studie von von Rotz *et al.* wird die Transkription von BACE1 über die intrazelluläre APP Domäne AICD erhöht (von Rotz *et al.*, 2004). AICD entsteht ebenfalls durch den γ -Schnitt bei der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung, jedoch scheint das auf diesem Weg entstandene AICD nicht transkriptionell aktiv zu sein (Flammang *et al.*, 2012). In der gleichen Studie konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von APP selbst durch die transkriptionelle Regulation über AICD gezeigt werden (von Rotz *et al.*, 2004). Auch nach der Inkubation mit TFA war die Transkription von BACE1 und APP erhöht. Dies könnte also ein Resultat der Aktivierung der amyloidogenen Prozessierung durch die Inkubation mit TFA sein. Auf diese Weise entstünde ein *circulus vitiosus*, bei dem die amyloidogene APP-Prozessierung zu einer Erhöhung der Expression der an ihr beteiligten Sekretase zum einen, und zum anderen zur vermehrten Produktion ihres eigenen Vorläufers führt, was wiederum in einer Steigerung der amyloidogenen Prozessierung resultiert.

Die Bestimmung der Aktivitäten der β - und γ -Sekretase aus isolierten Membranen zuvor inkubierter SH-SY5Y Zellen oder kortikaler Mausneurone ergaben erhöhte Aktivitäten beider Sekretasen nach der Inkubation mit Elaidinsäure oder CLA. Dies ist nicht nur auf die erhöhte Expression von BACE1 sowie der γ -Sekretase Komponenten zurückzuführen, sondern auch auf einen direkten Effekt auf die Aktivität der beiden Sekretasen, wie die Inkubation auf PNFs zeigte. Wurden TFA auf PNFs inkubiert, die zuvor aus SH-SY5Y Zellen oder aus den *post mortem* Gehirnen von Mäusen isoliert wurden, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Aktivität sowohl der γ - als auch der β -Sekretase. Die PNFs enthalten die Plasmamembran der Zellen, sowie Membranen von Zellorganellen mit den membranassoziierten Sekretasen. In diesem System werden Effekte durch veränderte

Transkription, Proteinstabilität oder subzelluläre Lokalisation der Sekretasen oder des Substrates nicht detektiert, weshalb die ermittelten Effekte ausschließlich auf direkte Effekte der TFA auf die Enzym-Aktivität der Sekretasen zurückzuführen sind. Der direkte Effekt der TFA auf die Aktivität der γ -Sekretase wird durch eine aktuelle Studie von Holmes *et al.* bestätigt. Die Autoren wiesen in einem zellfreien System bestehend aus isolierten humanen γ -Sekretase-Komplexen in Vesikeln mit definierter Lipidzusammensetzung eine Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität mit zunehmender Erhöhung des *trans/cis*-Verhältnisses nach (Holmes *et al.*, 2012).

Effekte von TFA auf die Aktivität verschiedener anderer Enzyme wurden bereits in der Vergangenheit beschrieben. Larqué *et al.* zeigten eine reduzierte Aktivität der Delta-6-Desaturase und der Glukose-6-Phosphatase in den Mikrosomen der Leber bei mit TFA gefütterten Mäusen (Larque *et al.*, 2003). Die Enzyme UDP-Glucuronyltransferase und Anilin-Hydroxylase wurden durch eine TFA-reiche Diät bei Ratten in ihrer Aktivität gesteigert. Interessanterweise handelt es sich bei diesen Enzymen wie bei den APP prozessierenden Sekretasen um membranassoziierte Enzyme (Morgado *et al.*, 1998). In einer Zellkultur-Studie von Engelhard *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung von intakten Plasmamembranen von Mausfibroblasten mit TFA die Aktivität des membrangebundenen Enzyms Adenylat-Zyklase beeinflusst. Dieser Effekt war nicht mehr zu beobachten, wurde das Enzym durch den Einsatz von Detergenzien solubilisiert und somit aus seiner Lipidumgebung gelöst. Dies verdeutlicht die Abhängigkeit membrangebundener Enzyme von der Lipidzusammensetzung der sie umgebenden Membranen (Engelhard *et al.*, 1976).

Eine wichtige Eigenschaft biologischer Membranen ist ihre Fluidität. Sie beeinflusst die laterale Diffusion membrangebundener Proteine und bestimmt somit den Grad der Wechselwirkung der Proteine zueinander. Die Membranfluidität ist neben der Temperatur abhängig von der Lipidkomposition. So beeinflusst sowohl die Kohlenwasserstoff-Kettenlänge der Membranlipide als auch ihr Sättigungsgrad die Fluidität der Membran (Calder *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2011; Zavodnik *et al.*, 1997). Diäten, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind, können die Fluidität der Membranen verschiedener Zelltypen erhöhen, besonders für die Omega-3 Fettsäure DHA wurde dieser Effekt mehrfach postuliert (Fukaya *et al.*, 2007; Horrocks and Farooqui, 2004; McLauren Dorrance *et al.*, 2000). Cholesterin und ebenso gesättigte Fettsäuren reduzieren hingegen die Membranfluidität (Colell *et al.*, 2003; Gleason *et al.*, 1991; Rog *et al.*, 2008; Zavodnik *et al.*, 1997), was durch die zusätzliche Gabe von DHA verhindert werden kann (Hashimoto *et al.*, 2006). Weiterhin hängt die Membranfluidität von dem Verhältnis von *trans*- zu *cis*-Fettsäuren ab (Kitagawa *et al.*, 1990; Loffhagen *et al.*, 2004). So reduziert die Fütterung von Ratten mit TFA die Membranfluidität ihrer Adipozyten (Ibrahim *et al.*, 2005), während die *in vitro* Inkubation

boviner Blutzellen mit *cis*-Fettsäuren zu einer erhöhten Fluidität der Plasmamembranen führte (Kitagawa *et al.*, 1990). Roach *et al.* testeten Lipid-Mono- und Bilayer bestehend aus Phosphatidylcholinen (PCs), die entweder gesättigte Fettsäuren oder zwei bzw. vier Doppelbindungen in *cis*- oder *trans*-Konformation trugen auf ihre Übergangstemperatur (engl.: transition temperatur). Die Übergangstemperatur gibt die Temperatur an, unterhalb der eine Membran sich vom fluiden Zustand in einen „Gel-artigen“ Zustand mit stark eingeschränkter Beweglichkeit der Membranlipide begibt. Die Untersuchung ergab, dass die Übergangstemperaturen der Membranen mit TFA enthaltenden PCs eine um 25-30°C höhere Übergangstemperatur aufwiesen, als Membranen mit den korrespondierenden *cis*-Isomeren. Nach weiteren Untersuchungen der physikalischen Membraneigenschaften wie Permeabilität und Moleküldynamik schlossen die Autoren, dass TFA in Lipidmembranen näher an den Eigenschaften gesättigter Fettsäuren, als an denen ihrer *cis*-Isomere sind (Roach *et al.*, 2004). Nach Auffassung von Soni *et al.* ist dies in der stärkeren „Knickung“ der Kohlenwasserstoffkette durch eine Doppelbindung in *cis*-Konformation begründet. Die *trans*-Stellung der Doppelbindung erlaubt demnach durch ihre eher lineare Ausrichtung ein dichteres Packen der Lipide in der Membran, was zu einer verringerten Fluidität führt (Soni *et al.*, 2009).

Wie bereits erwähnt, sind alle an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen Membranproteine, weshalb sie einer Beeinflussung durch die Membranfluidität unterliegen. Deshalb kann die Manipulation der Lipidkomposition der Membran Einfluss auf die proteolytische Spaltung des APPs nehmen. So geht eine Erhöhung der Membranfluidität mit einer gesteigerten nicht amyloidogenen Prozessierung des APPs durch die α -Sekretase einher (Kojro *et al.*, 2001). Die beobachtete Verschiebung von nicht amyloidogener hin zu amyloidogener APP-Prozessierung nach der Inkubation von Elaidinsäure oder CLA ist also möglicherweise eine Konsequenz der Reduktion der Membranfluidität durch den Einbau der TFA. Diese These wird gestützt durch die Tatsache, dass mehrfach gezeigt wurde, dass die Aufnahme bzw. der Einbau von TFA in die Membran direkt die TFA-Level der jeweiligen Diäten widerspiegelt (Larque *et al.*, 2003; Morgado *et al.*, 1998; Selenskas *et al.*, 1984). Die Anreicherung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DHA in Zellmembranen erhöht dagegen die Membranfluidität und damit die Prozessierung des APPs durch die α -Sekretase (Yang *et al.*, 2011). Interessanterweise zeigte eine Fütterungsstudie von Phivilay *et al.*, bei der dreifach transgene Alzheimer-Modellmäuse mit TFA gefüttert wurden, dass in den Gehirnen der Mäuse der Gehalt an DHA signifikant abnahm (Phivilay *et al.*, 2009), was zu einer Abnahme der Membranfluidität und dementsprechend zu einer gesteigerten amyloidogenen Prozessierung des APPs führen müsste. Allerdings wurden im Rahmen dieser Studie keine Veränderungen der A β -Ablagerungen detektiert (Phivilay *et al.*, 2009).

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass TFA weniger reaktiv sind und somit der Zelle weniger Schutz vor Oxidation bieten als ihre *cis*-Isomere (Sargis and Subbaiah, 2003). In *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und eine vermehrte Lipidperoxidation gefunden (Grimm *et al.*, 2011d). Weiterhin wurde festgestellt, dass oxidativer Stress die Expression von PS1 und BACE1 ebenso erhöht, wie die Aktivität der γ - und β -Sekretase (Borghini *et al.*, 2007; Tamagno *et al.*, 2008). Eine aktuelle Studie von Tan *et al.* zeigt eine Abhängigkeit der A β -Produktion von oxidativem Stress. Es wurde gezeigt, dass geringer oxidativer Stress, der nicht mit einer Beeinträchtigung der Zellviabilität einhergeht, zu einer vermehrten Lokalisation des BACE1 Proteins in den Endosomen und im trans-Golgi-Netzwerk und damit zu einer Erhöhung der amyloidogenen APP-Prozessierung führt (Tan *et al.*, 2013). Gwon *et al.* zeigten, dass durch 4-Hydroxynonenal (HNE), das in Folge von Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies entsteht, die γ -Sekretase-Aktivität erhöht und gleichzeitig die γ -Sekretase-Komponente Nicastrin so verändert wird, dass sie die Substrat-Bindung der γ -Sekretase an C99 verstärkt. Die Autoren zeigten eine Erhöhung der A β 42-Level durch HNE sowohl in Zellkulturversuchen, als auch in einem dreifach transgenen Alzheimer-Mausmodell (Gwon *et al.*, 2012). Die Einlagerung von TFA in Membran-Phospholipide und der damit verbundene oxidative Stress könnten somit potentiell zu einer Manifestation des Krankheitsbildes der Alzheimer Krankheit beitragen oder dieses verstärken.

5.1.5 TFA erhöhen die Aggregation von A β -Peptiden

Zusätzlich zu der Verstärkung der amyloidogenen APP-Prozessierung durch TFA und der damit verbundenen Erhöhung der A β -Produktion, bewirken diese, zumindest in *in vitro* Versuchen, eine verstärkte Aggregation dieser Peptide, wie durch die Analyse mittels Elektronenmikroskop und Thioflavin T-Assay gezeigt wurde. A β -Peptide, insbesondere das hydrophobe A β 42, neigen dazu, Aggregate zu bilden (Bernstein *et al.*, 2005). Dies geschieht in einem mehrstufigen Prozess: Wenige monomere A β -Peptide bilden zunächst kleinere lösliche Oligomere, die sich zu größeren Protofibrillen zusammenlagern. Diese bestehen aus mehr als 20 A β -Molekülen und weisen bereits die β -Faltblattstruktur auf. Schließlich formen sich die unlöslichen A β -Fibrillen (Caughey and Lansbury, 2003; Chiti and Dobson, 2006; Haass and Selkoe, 2007; Hardy and Selkoe, 2002). Diese bilden in der Folge den Hauptbestandteil der senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten (Masters *et al.*, 1985).

Die Aggregation der A β -Peptide hängt von mehreren Faktoren wie zum Beispiel der Interaktion mit Metallionen oder Membranstrukturen und der Primärstruktur der A β -

Monomere ab (Lau *et al.*, 2006; Verdier *et al.*, 2004; Waschuk *et al.*, 2001). Während das ursprüngliche A β -Peptid als Teil der transmembranen α -Helix des APPs vorliegt (Askarova *et al.*, 2011), bestehen die toxischen Aggregate aus A β in β -Faltblattkonformation (Song *et al.*, 2009). Der Übergang von der α -helikalen in die β -Faltblattstruktur stellt wahrscheinlich den entscheidenden Schritt bei der Formation toxischer A β -Oligomere dar (Song *et al.*, 2009). Dieser Schritt scheint von der Zusammensetzung der Membran beeinflusst zu werden. So bewirkt eine Änderung in der Membranstruktur und damit eine Änderung in ihren physikalischen Eigenschaften die vermehrte Umwandlung von A β -Peptiden in ihre β -Faltblattstruktur (Mandal *et al.*, 2004; Mandal and Pettegrew, 2004). Auch die Inkorporation von TFA in die Phospholipide einer Membran hat, wie oben beschrieben, eine Veränderung deren physikalischer Eigenschaften zur Folge. Dies ist möglicherweise der Grund für das veränderte Aggregationsverhalten der A β -Peptide durch die Anwesenheit von TFA.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass A β selbst die Membraneigenschaften verändern kann. Oligomere aus A β 40-Peptiden reduzieren einer Studie von Peters *et al.* zufolge die Membranfluidität, wodurch die amyloidogene APP-Prozessierung stimuliert wird (Peters *et al.*, 2009). Auch für A β 42 wurde dieser Effekt gezeigt (Eckert *et al.*, 2010; Kremer *et al.*, 2000; Waschuk *et al.*, 2001). So könnte neben der Reduktion der Membranfluidität durch die Inkorporation der TFA selbst, auch durch die gesteigerte A β -Produktion und Aggregation durch *trans*-Fette die Fluidität der Membran weiter abnehmen. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung der amyloidogenen Prozessierung und damit der A β -Produktion, wodurch sich ein sich selbst verstärkendes System einstellt.

5.1.6 TFA und die Alzheimer Krankheit – Ein Fazit

Die vorliegende Studie hat deutlich gezeigt, dass TFA die Proteolyse des APPs von der nicht amyloidogenen hin zur amyloidogenen Prozessierung verschieben. Dies geschieht durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren: Die nicht amyloidogene APP-Proteolyse wird zum einen durch die Reduktion der Transkription der α -Sekretase ADAM10 und zum anderen durch den veränderten Transport ihres Substrates APP gehemmt. Gleichzeitig wird der amyloidogene Abbau des APPs durch die erhöhte Transkription der β - und γ -Sekretase und einer zusätzlichen Aktivierung dieser Sekretasen gefördert. Dadurch steigt die Menge an A β -Peptiden, die unter der Einwirkung von TFA zudem schneller aggregieren.

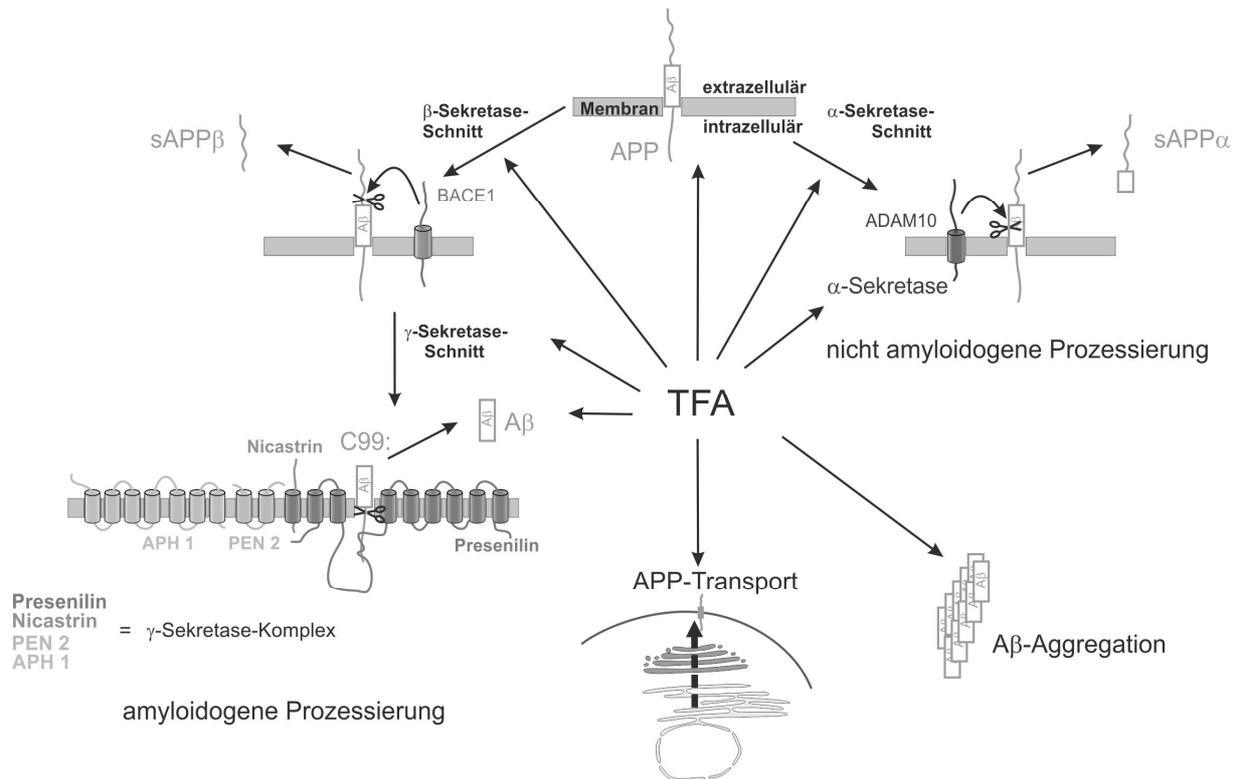


Abb. 90 Übersicht der Effekte von TFA auf die APP-Prozessierung

(Abb. modifiziert nach Grimm *et al.*, 2012)

TFA beeinflussen die APP-Prozessierung über einen multifaktoriellen Mechanismus. Zum einen werden die Aktivitäten sowie die Proteinlevel der β - und γ -Sekretase erhöht und somit der amyloidogene Prozessierungsweg verstärkt, zum anderen wird die nicht amyloidogene Prozessierung über eine Verminderung der ADAM10-Expression gehemmt. Die intrazelluläre Lokalisation des APPs führt zudem zu einer bevorzugten Prozessierung auf dem amyloidogenen Weg. All dies bedingt eine verstärkte Produktion von A β -Peptiden, die zudem durch den Einfluss von TFA vermehrt aggregieren.

Obwohl die einzelnen Effekte, die durch die Inkubation von TFA hervorgerufen werden, verhältnismäßig klein erscheinen, so wirken sie doch alle synergistisch und resultieren in einer Verstärkung der A β -Produktion, was den Konsum von TFA zu einem potentiellen Risikofaktor für die Manifestation einer Alzheimer-Erkrankung macht.

Nach einer Studie von Laryea *et al.*, die die Lipidzusammensetzung der Erythrozytenmembran von Kindern untersuchte, akkumulieren TFA im Gegensatz zu Fettsäuren mit Doppelbindungen in *cis*-Konformation über die Zeit im Körper, was das Risiko zusätzlich amplifizieren könnte (Laryea *et al.*, 1990).

Fraglich bleibt, wieso die epidemiologischen Studien zu diesem Themenkomplex bisher sehr widersprüchliche Daten hervorbrachten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte im Design der Studien an sich liegen. Diese Studien beobachten über festgelegte Zeiträume, in der Regel über mehr als 3 Jahre, die Ernährungsgewohnheiten ihrer Probanden und ermitteln in der Folgezeit die Anzahl derjenigen, die eine Alzheimer-Erkrankung entwickeln oder generell

eine Abnahme der kognitiven Fähigkeiten zeigen. Bei der benötigten möglichst hohen Anzahl an Probanden sowie dem langen Erfassungszeitraum ist die Kontrolle der aufgenommenen Nahrung nur über sogenannte Food Frequency Questionnaires (FFQ) möglich. Bei dieser Art von Datenerhebung wird von den Probanden selbst die Verzehrhäufigkeit sowie die in der Regel aufgenommene Menge eines bestimmten Nahrungsmittels in einem Fragenkatalog angegeben. Dies setzt zum einen die ehrliche Beantwortung der Fragen durch den Teilnehmer voraus. Zum anderen werden die Angaben auch vom Erinnerungsvermögen der Probanden und ihrer Fähigkeit die aufgenommenen Mengen realistisch einschätzen zu können, beeinflusst (Bowman *et al.*, 2011). Gerade bei älteren Menschen mit kognitiver Beeinträchtigung sind die letzteren Punkte zur Diskussion zu stellen. Weiterhin wird bei dieser Analyseverfahren die von Mensch zu Mensch unterschiedliche Absorption der Inhaltsstoffe der konsumierten Lebensmittel nicht berücksichtigt (Bowman *et al.*, 2012). Bei den vergangenen Studien wurde zudem in der Regel die Ernährung älterer Menschen analysiert. Im Falle von Cholesterin konnte aber gezeigt werden, dass hohe Cholesterinspiegel im mittleren Lebensabschnitt das Risiko im Alter an der Alzheimer Krankheit zu erkranken, erhöhen (Kivipelto *et al.*, 2002).

Eine neue Herangehensweise wurde kürzlich von Bowman *et al.* veröffentlicht. Die Autoren analysierten die Ernährungsgewohnheiten über Biomarker im Plasma der Studienteilnehmer und korrelierten sie mit den kognitiven Fähigkeiten und dem über Magnetresonanztomografie ermittelten Gehirnvolumen. Diese Studie zeigte eine deutliche Abnahme der kognitiven Fähigkeiten, die mit einer Abnahme im Gehirnvolumen einherging, bei jenen Teilnehmern, bei denen hohe Konzentrationen an TFA im Plasma gemessen wurden (Bowman *et al.*, 2012). In einer Fütterungsstudie von Collison *et al.* zeigten Mäuse, die eine TFA-reiche Diät zusammen mit Mononatriumglutamat erhielten, deutlich schlechtere Ergebnisse im „Morris Water Maze“-Test, der das Lernverhalten von Labortieren dokumentiert (Collison *et al.*, 2010). Dies ist vor allem im Hinblick auf die Verwendung des Geschmacksverstärkers Mononatriumglutamat bei vielen Fertig- und Fastfoodgerichten bedenklich, da ebendort auch hohe Konzentrationen an TFA anfallen.

Diese Daten zusammen mit der vorliegenden Zellkulturstudie sprechen deutlich für eine Zunahme des relativen Alzheimer-Risikos durch den Konsum von TFA. Im Hinblick auf die ohnehin bekannte Erhöhung des Risikos für koronare Herzerkrankungen und Arteriosklerose sollte daher über eine Einführung einer Beschränkung der Konzentrationen von TFA in Lebensmitteln nachgedacht werden, wie es sie bereits seit 2003 in Dänemark gibt. Zumindest eine Kennzeichnung der Lebensmittel, die TFA enthalten, wäre vorteilhaft. Beides ist bisher in Deutschland nicht der Fall, obwohl an dieser Stelle erwähnt werden soll, dass eine Studie von Kuhnt *et al.*, die zwischen 2007 und 2009 Lebensmittel aus deutschen

Supermärkten sowie Fastfood-Ketten auf ihren Gehalt an *trans*-Fetten untersuchten, ergab, dass in vielen Lebensmitteln bereits eine Reduktion der TFA verglichen mit früheren Analysen festgestellt werden konnte (Kuhnt *et al.*, 2011).

5.1.7 Ausblick

Nachdem die vorliegende Studie eine Erhöhung der amyloidogenen APP-Prozessierung durch TFA zeigt, sollten weiterführende Experimente auf eine Aufklärung der subzellulären Lokalisation der Sekretasen und ihrem Substrat APP nach der Inkubation von TFA abzielen. Ändert sich die Verteilung der Sekretasen in den zellulären Kompartimenten oder wird die APP-Prozessierung möglicherweise durch die Steigerung der Koloalokalisation des Substrats APP und der β - oder γ -Sekretase, beispielsweise in den Endosomen oder den Lipid Rafts, erhöht? Weiterhin sollte analysiert werden, ob die TFA gleichmäßig in die Zellmembranen inkorporieren oder ob diese bevorzugt in den Lipid Raft-Strukturen akkumulieren, wie es bereits für Cholesterin beschrieben wurde?

Eine Analyse der TFA-Konzentrationen in *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu der in den Gehirnen einer gesunden Kontrollgruppe könnte weitere Hinweise auf die Beteiligung von TFA an der Alzheimer-Pathologie liefern.

Offen ist zudem die Frage, ob generell alle TFA das Potential aufweisen, die APP-Prozessierung zu beeinflussen, oder ob dies nur für einige TFA gilt. Dies erscheint vor allem im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen den industriell entstehenden und den natürlicherweise vorkommenden TFA notwendig. Während die von uns untersuchte Elaidinsäure den Hauptanteil der TFA in industriell verarbeiteten Produkten ausmacht, kommt in Milchprodukten überwiegend Vaccensäure, eine weitere einfach ungesättigte TFA vor. Diese trägt die Doppelbindung in *trans*-Konformation an C11 (*trans*11) und stellt somit ein Positionsisomer der Elaidinsäure (*trans*9) dar (Craig-Schmidt, 2006; Field *et al.*, 2009; Kuhnt *et al.*, 2011). Weitere Analysen müssen zeigen, ob auch diese TFA einen vergleichbaren Effekt auf die APP-Prozessierung zeigt. Dies scheint vor allem vor dem Hintergrund einiger Studien sinnvoll, nach denen es, im Gegensatz zu anderen TFA, keinen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von *trans*-Vaccensäure und koronaren Herz-Kreislaufkrankungen gibt (Field *et al.*, 2009; Jakobsen *et al.*, 2008; Motard-Belanger *et al.*, 2008; Stender *et al.*, 2008).

5.2 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die APP-Prozessierung

5.2.1 Plasmalogene bei der Alzheimer Krankheit

In der Vergangenheit konnten mehrere unabhängige Studien reduzierte PE-PL-Level in den *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten feststellen (Farooqui *et al.*, 1995; Ginsberg *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 2011a; Grimm *et al.*, 2011d; Guan *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1995). PE-PL sind ein Hauptbestandteil neuronaler Membranen und machen dort einen Anteil von 90mol% aller PE-Spezies und etwa 30mol% des gesamten Phospholipidgehalts aus (Han *et al.*, 2001; Horrocks and Sharma, 1982). Im menschlichen Gehirn sind 60mol% aller PE-Spezies in der grauen bzw. 90mol% in der weißen Substanz PE-Plasmalogene (Han, 2010). Han *et al.* zeigten per massenspektrometrischer Shotgun-Analyse eine Abnahme des PE-PL-Gehaltes in der grauen Substanz von 15mol% im frühen Stadium einer Alzheimer-Erkrankung, die sich im fortgeschrittenen Stadium sogar auf 30mol% steigerte. In der weißen Substanz konnten die Autoren PE-PL Reduktionen von bis zu 40mol% verzeichnen (Han, 2010). Zudem fand die gleiche Gruppe bereits in einer früheren Studie Abnahmen von bis zu 10mol% des Gesamt-PL-Gehaltes in den Gehirnen von zwei verschiedenen transgenen Alzheimer-Modellmäusen (APPV717F und APP^{swe}) (Han *et al.*, 2001).

Durch die Analyse von 37 *post mortem* Gehirnproben von Alzheimer-Patienten verglichen mit denen von 21 nicht von Alzheimer betroffenen Kontrollpersonen, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der PE-PLs gezeigt werden, die Reduktion der einzelnen PE-PL Spezies erreichten aber keine Signifikanzen. Wesentlich stärker geändert waren unserer Analyse zufolge die PC-PLs, darunter besonders PC-PL 18:1, das auf ca. 50% reduziert war. Dies spricht für eine Beteiligung der PC-PLs bei der Alzheimer-Pathologie, auch wenn sie verglichen mit den PE-PLs in neuronalen Membranen in geringerem Maße zu finden sind (Farooqui and Horrocks, 2001b; Miyazawa *et al.*, 2006).

Ein entscheidender Faktor bei der Alzheimer-Pathologie kommt der Produktion der A β -Peptide zu, die in ihrer aggregierten Form den Hauptbestandteil der senilen Plaques in den Gehirnen der Betroffenen bilden. Diese Peptide entstehen durch sequenzielle proteolytische Spaltung des APPs durch die β - und darauffolgend durch die γ -Sekretase. Durch ihr hohes Vorkommen in neuronalen Membranen könnte eine Veränderung des PL-Gehalts die physikalischen und chemischen Eigenschaften einer Membran beeinflussen. Dies kann, wie schon im vorhergehenden Kapitel beschrieben, mit einer Beeinflussung der Sekretasen einhergehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von PC-PL und PE-PL auf die Aktivitäten der Sekretasen und damit auf die APP-Prozessierung untersucht.

5.2.2 Der Einfluss von Plasmalogenen auf die Sekretasen der APP-Prozessierung

Um einen möglichen Einfluss der Plasmalogene auf die Sekretasen und somit letztlich auf die Produktion der neurotoxischen A β -Peptide zu untersuchen, wurden PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 auf der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y wt inkubiert. Da der spezifische Effekt der Vinyletherbindung der Plasmalogene analysiert werden sollte, dienten die korrespondierenden Phospholipide PC 18:1 sowie PC 20:4, die anstelle des Vinylether- eine Esterbindung tragen, als Kontrollen.

Die Analyse der Gen-Expression der β -Sekretase BACE1 und der Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes PS1, PS2, APH1a, APH1b, Nicastrin und PEN2 ergab keine signifikanten Änderungen durch die Inkubation mit Plasmalogenen. Analog dazu zeigte die Überprüfung der Proteinlevel von BACE1 und PS1, das als katalytisches Zentrum stellvertretend für die Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes ausgewählt wurde, keine Veränderung durch die Inkubation mit Plasmalogenen.

Auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt Zellen war nach der Inkubation von PC-PL 18:1 kein Effekt detektierbar, PC-PL 20:4 reduzierte die β -Sekretase-Aktivität nur geringfügig, wenn auch signifikant. Inkubierte man Membranen, die zuvor aus SH-SY5Y Zellen isoliert wurden, mit Plasmalogenen, so ergab sich eine minimale signifikante Reduktion der β -Sekretase nach der Inkubation mit PC-PL 18:1, für alle anderen verwendeten Plasmalogene zeigten sich keine signifikanten Effekte. Auch nach der Inkubation der Plasmalogene auf den Membranen aus den Gehirnen von Mäusen waren keine signifikanten Effekte auf die β -Sekretase-Aktivität messbar.

Ein anderes Bild ergab sich dagegen bei der Messung der γ -Sekretase. Nach der Inkubation von SH-SY5Y wt Zellen mit Plasmalogenen war die Aktivität der γ -Sekretase signifikant reduziert. Da die γ -Sekretase den letzten Schritt der APP-Proteolyse unter der Freisetzung von A β und AICD katalysiert, reicht eine Reduktion der γ -Sekretase aus, um die Produktion der neurotoxischen A β -Peptide zu verringern, auch wenn die Aktivität der β -Sekretase unverändert ist. Da weder auf die Gen-Expression, noch auf die Proteinlevel der Sekretasen ein Effekt durch die Inkubation mit Plasmalogenen zu detektieren war, handelt es sich hierbei um eine direkte Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität durch die Plasmalogene. Dies konnte durch die *in vitro* Inkubation von aus SH-SY5Y Zellen oder Mäusegehirnen isolierten Membranen bestätigt werden. Bei dieser Art von Inkubation werden nur direkte Effekte auf die Aktivität der Sekretase detektiert, die durch die Veränderung der Membraneigenschaften oder eine direkte Interaktion des Lipids mit dem Enzym bedingt sind. Indirekte Effekte, wie eine Veränderung der Gen-Expression, der Proteinstabilität oder der subzellulären Lokalisation werden bei dieser Inkubation, die keine intakten Zellen, sondern nur die

Membranen mit den dort lokalisierten Enzymen enthält, nicht erfasst. Alle verwendeten Plasmalogene reduzierten *in vitro* die Aktivität der γ -Sekretase deutlich. Die Effektstärke nahm dabei bei den PC-PL-Spezies mit zunehmender Kettenlänge und mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen zu. So ergab sich nach der Inkubation mit PC-PL 22:6 der stärkste Effekt auf die γ -Sekretase in aufgereinigten Membranen aus SH-SY5Y Zellen. Dies scheint im Hinblick auf eine frühere Studie interessant, die einen inhibierenden Effekt der freien Fettsäure 22:6 (DHA) auf die γ -Sekretase zeigte (Grimm *et al.*, 2011c). Die Inkubation mit PE-PL 22:6 hingegen zeigte einen schwächeren Effekt auf die γ -Sekretase, als alle PC-PL-Spezies. Dies, zusammen mit der Tatsache, dass die PC-PLs in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten stärker geändert waren als die PE-PLs, spricht für eine größere Relevanz der PC-PLs in der Alzheimer-Pathologie. Der Effekt des Vinylethers auf die Aktivität der γ -Sekretase scheint also zum einen durch die Sättigung und zum anderen durch die Kopfgruppe des Lipids moduliert zu werden.

Neben der amyloidogenen APP-Prozessierung über die β -Sekretase, kann APP über einen zweiten Weg gespalten werden. Bei der nicht amyloidogenen Prozessierung, die von der α -Sekretase initiiert wird, kommt es nicht zur Freisetzung von A β . Nach der Inkubation mit Plasmalogenen waren die Gen-Expression und das Proteinlevel von ADAM17 nicht verändert. ADAM17 wurde neben ADAM10 als eine der hauptsächlich an der APP-Prozessierung beteiligten α -Sekretasen beschrieben (Buxbaum *et al.*, 1998). Da ein indirekter Effekt der Plasmalogene auf die α -Sekretase deshalb unwahrscheinlich schien, wurden in der Folge lediglich *in vitro* Inkubationen auf isolierten Membranen analysiert. Im Gegensatz zur γ -Sekretase, war die Aktivität der α -Sekretase erhöht, wenn auch nur für einzelne PL-Spezies. In isolierten Membranen aus SH-SY5Y Zellen zeigte nur die Inkubation mit PC-PL 20:4 und PE-PL 22:6 einen signifikanten Anstieg der α -Sekretase-Aktivität. Dies deutet auf einen Einfluss der Kopfgruppe bzw. der Fettsäure der Phospholipide, die den Effekt der Vinyletherbindung der Plasmalogene auf die Aktivität der α -Sekretase zu modulieren scheinen. In den Membranen der Mausgehirne war die α -Sekretase durch alle verwendeten Plasmalogene nicht signifikant verändert, wenn die Aktivitäten auch tendenziell einen Anstieg zeigten. Nun sind mehrere verschiedene Metalloproteasen der ADAM-Familie an der proteolytischen Spaltung des APPs beteiligt (Blacker *et al.*, 2002; Buxbaum *et al.*, 1998; Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999), und diese werden in verschiedenen Geweben und damit auch in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert (Karkkainen *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2010; Llano *et al.*, 2002). Somit könnten die Unterschiede in den Effekten der Plasmalogene zwischen den Membranen aus den SH-SY5Y Zellen und denen aus Mäusegehirnen durch unterschiedlich starke Beteiligungen einzelner α -Sekretasen an der Gesamt- α -Aktivität bedingt sein. Dies könnte zum einen

gewebespezifisch, zum anderen aber, da es sich bei der SH-SY5Y Zelllinie um humane Zellen handelt, auch speziesabhängig sein.

Zusammengefasst zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass Plasmalogene die APP-Prozessierung über eine direkte Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität reduzieren. Durch die Inhibierung der γ -Sekretase, die den letzten Schnitt der APP-Proteolyse vollzieht, bei dem es zur Freisetzung des A β s kommt, wird die Produktion des in hohen Konzentrationen neurotoxischen Peptids reduziert.

Die Analyse der PL-Level in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten ergab eine Reduktion der PC-PLs. Weiterhin ist bekannt, dass es bei Personen, die an Alzheimer erkrankt sind, zu einer massiven Akkumulation von A β im Gehirn kommt. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Supplementierung humaner *post mortem* Alzheimer-Gehirne mit PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 überprüft. Dafür wurden Membranen 6 verschiedener Gehirne von an Alzheimer erkrankten Personen isoliert und *in vitro* mit den Plasmalogenen inkubiert. Tatsächlich zeigten 5 der 6 Gehirne eine Abnahme der γ -Sekretase-Aktivität in Anwesenheit von PC-PL 18:1 und PC-PL 20:4 verglichen mit den korrespondierenden Phospholipiden. So scheint prinzipiell ein "Auffüllen" der bei der Progression der Alzheimer-Erkrankung verlorenen Plasmalogene möglich und eine Reduktion der γ -Sekretase zu bewirken, was folglich mit der Abnahme der A β -Produktion einherginge.

5.2.3 Plasmalogene und die APP-Prozessierung – Physiologische und pathologische Aspekte

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich eine Beeinflussung der APP-Prozessierung durch einen direkten Effekt der Plasmalogene auf die γ -Sekretase-Aktivität. Interessanterweise konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie unseres Labors zeigen, dass umgekehrt auch ein Spaltprodukt der APP-Prozessierung, das neben A β durch den γ -Schnitt entstehende AICD die Synthese der Plasmalogene beeinflusst. So war die Expression des geschwindigkeitslimitierenden Enzyms der Plasmalogen-Synthese, der Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS) (de Vet *et al.*, 1998) in PS- und APP-defizienten Mausfibroblasten signifikant reduziert. Auch in den Gehirnen von APP-Knockout-Mäusen lagen niedrigere AGPS-Level als in WT-Mäusen vor. Die Analyse der APP-deltaCT15-Zelllinie, die ein APP-Konstrukt exprimiert, dem die letzten 15 Aminosäuren fehlen, was einen Verlust eines funktionalen AICD bedeutet, zeigte eine deutlich verringerte AGPS-Expression. AICD scheint also die Transkription der AGPS zu regulieren (Grimm *et*

al., 2011d). Gen-regulatorische Aktivität des AICD wurde in der Vergangenheit für mehrere verschiedene Zielgene postuliert (Cao and Sudhof, 2001). So scheinen unter anderen BACE1, APP, Neprilysin, KAI1, die GSK-3 β , der EGF-Rezeptor und der TRPC5 durch AICD reguliert zu sein (Baek *et al.*, 2002; Pardossi-Piquard *et al.*, 2005; Raychaudhuri and Mukhopadhyay, 2011; von Rotz *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Aus der regulatorischen Funktion des AICD auf die AGPS ergibt sich ein Regelkreis, bei dem die APP-Prozessierung mit der Freisetzung des AICD die Plasmalogen-Synthese erhöht, während die Plasmalogene die APP-Prozessierung über die Inhibition der γ -Sekretase reduzieren. Nun wurde in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine erhöhte AGPS-Transkription gefunden (Grimm *et al.*, 2011d), was zwar im Einklang mit der erhöhten APP-Proteolyse in diesen Gehirnen steht, aber auf den ersten Blick einen Widerspruch zu den reduzierten Plasmalogen-Gehalten darstellt. Zudem war das AGPS-Proteinlevel in den untersuchten Gehirnen trotz erhöhter Transkription reduziert. Eine Erklärung ergibt sich aus der Unterscheidung zwischen den physiologischen Verhältnissen und der pathologischen Situation einer Alzheimer-Erkrankung. Unter physiologischen Bedingungen erhöht AICD die Synthese der Plasmalogene, unter den pathologischen Umständen einer Alzheimer-Erkrankung induziert die hohe Konzentration an A β die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und führt damit zu oxidativem Stress. Dieser wurde mit dem Auftreten peroxisomaler Dysfunktion assoziiert (Cimini *et al.*, 2009; Schrader and Fahimi, 2004), was zu einer Verminderung der Proteinstabilität der AGPS führt (Biermann *et al.*, 1999). Durch die Reduktion der AGPS-Proteinstabilität wird also die Plasmalogen-Synthese in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten reduziert. Darüber hinaus reduziert A β zusätzlich den Plasmalogengehalt durch vermehrte Oxidation der Plasmalogene, die wegen ihrer Vinyletherbindung besonders anfällig gegen den von A β ausgelösten oxidativen Stress sind (Cheng *et al.*, 2003; Han, 2005). Zusätzlich bewirkt A β einen Anstieg der Aktivität der cPLA2 (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008), einem Enzym, das bevorzugt Plasmalogene spaltet. So wird der Plasmalogen-Gehalt in Alzheimer-Gehirnen durch A β über mehrere Mechanismen reduziert. Der reduzierte Plasmalogen-Gehalt führt, wie die vorliegende Arbeit zeigt, zu einer Aktivierung der γ -Sekretase, wodurch die Produktion der A β -Peptide weiter ansteigt. Dies führt zu einem sich selbst verstärkenden System, was zeigt, dass Plasmalogene eine wichtige Rolle in der Alzheimer-Pathologie spielen könnten.

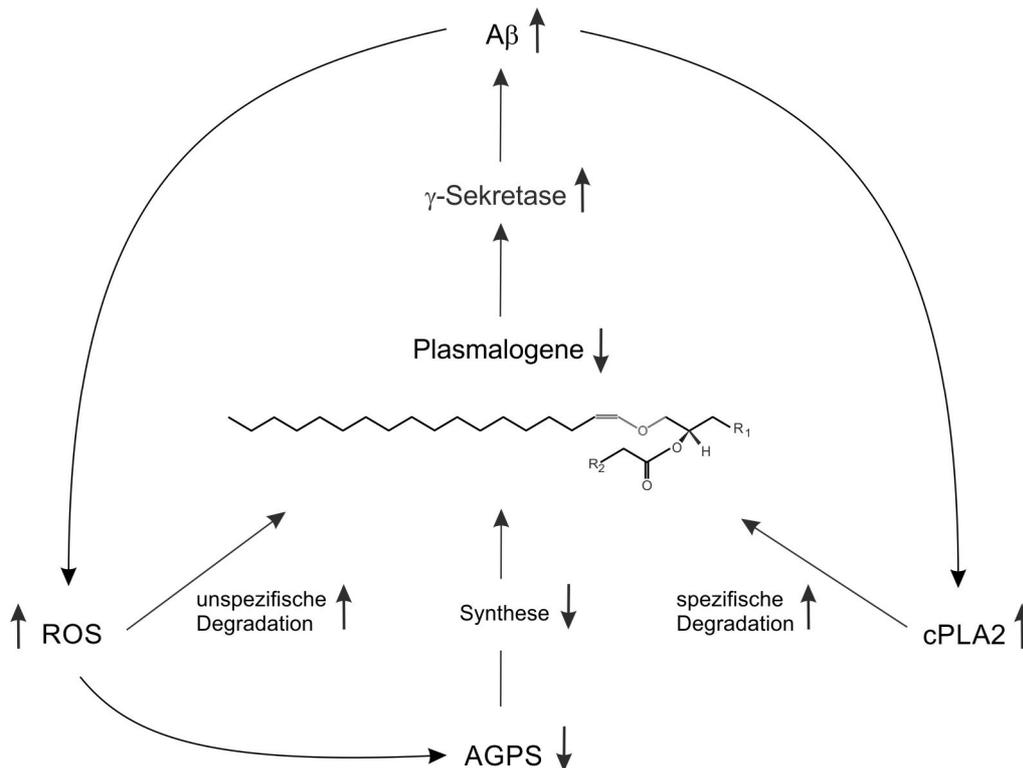


Abb. 91 Modell der pathologischen Vorgänge im Alzheimer-Gehirn

Durch reduzierte Plasmalogenspiegel steigt die Aktivität der γ -Sekretase, wodurch verstärkt A β -Peptide entstehen. Diese führen zu einer Aktivierung der cPLA2, die Plasmalogene spaltet. Außerdem kommt es durch erhöhte A β -Level zu oxidativem Stress durch ROS, was zum einen zu einer vermehrten Oxidation von Plasmalogenen führt und zum anderen die AGPS-Proteinstabilität reduziert, wodurch die Plasmalogen-Synthese vermindert wird.

5.2.4 Ausblick

Die vorliegenden Daten sowie die angeführten Studien sprechen wie beschrieben für einen *circulus vitiosus* bei dem die Plasmalogen-Reduktion einen Anstieg der A β -Produktion bewirkt, was zu einem weiteren Abbau von Plasmalogenen führt. Weiterhin offen bleibt die Frage ob in der Reduktion des Plasmalogengehalts im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine Ursache der Alzheimer-Pathologie zu sehen ist oder ob es sich dabei um einen Nebeneffekt handelt, der aber aufgrund der wegfallenden Inhibierung der γ -Sekretase durch die Plasmalogene zumindest zu einer weiteren Verschlechterung des Krankheitsbildes beitragen könnte. Weitere Analysen sollten untersuchen, inwieweit ein Eingreifen in das beschriebene „feed-forward“-System eine wirkungsvolle Therapie der Alzheimer-Erkrankung darstellen könnte. Dies könnte beispielsweise durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der PLA2 erreicht werden, wodurch ein weiterer Abbau der Plasmalogene inhibiert würde. Erste Versuche im Mausmodell zeigten bereits eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten durch die Inhibierung der cPLA2G4 (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008). Die Inhibierung der PLA2

führte außerdem zu einer Reduktion der A β -induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Andersen *et al.*, 2003).

Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob eine Einnahme der Fettsäuren, die häufig in Plasmalogenen vorkommen, zu einer Erhöhung der Plasmalogen Spiegel führen und somit der Abnahme der Plasmalogene, wie sie im Gehirn von Alzheimer-Patienten beschrieben wurden, entgegen gewirkt werden kann.

5.3 Der Einfluss funktioneller aSMase Inhibitoren auf die APP-Prozessierung

Seit der Entdeckung von Cholesterin als Risikofaktor für die Alzheimer Krankheit ist der Lipidstoffwechsel bei Alzheimer-Patienten Gegenstand intensiver Forschungen. Eine weitere Klasse von Lipiden, die in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten verändert vorliegen, sind die Sphingolipide. Das Sphingolipid Ceramid, von dem ausgehend komplexere Sphingolipide synthetisiert werden, wurde sowohl in den Gehirnen, als auch in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Alzheimer-Patienten erhöht vorgefunden (Cutler *et al.*, 2004; Filippov *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2002; Satoi *et al.*, 2005) und wurde mit dem neuronalen Untergang in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten in Verbindung gebracht (Cutler *et al.*, 2004). Nach einer Studie von Mielke *et al.* gehen erhöhte Ceramid-Level im Plasma mit einer Erhöhung des Risikos an Alzheimer zu erkranken einher (Mielke *et al.*, 2012), sie werden sogar als Biomarker in der Alzheimer-Früherkennung bzw. -Prognose diskutiert (Mielke and Haughey, 2012). Dagegen scheinen sich hohe Sphingomyelin Plasma-Level sogar positiv bei einer bereits bestehenden Alzheimer-Erkrankung auszuwirken (Mielke *et al.*, 2011). Dies zeigte eine Studie mit 120 Alzheimer-Patienten, deren Plasmasphingolipid-Level massenspektrometrisch analysiert wurde. Die Kontrolle der kognitiven Fähigkeiten über einen Zeitraum von 2,3 Jahren ergab eine signifikant langsamere Progression der Erkrankung bei den Patienten, die hohe Sphingomyelin- und Dihydrosphingomyelin-Konzentrationen im Plasma bzw. hohe Verhältnisse von Sphingomyelin zu Ceramid aufwiesen (Mielke *et al.*, 2011).

Die Synthese von Sphingomyelin aus Ceramid wird über das Enzym SMS1 vermittelt, die umgekehrte Reaktion, also der Abbau von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin wird durch die SMasen katalysiert. Auch bei Personen, die an einer Depressionen leiden, wurden erhöhte Ceramid-Level festgestellt, was mit einer hohen Aktivität der aSMase einhergeht (Kornhuber *et al.*, 2005; Kornhuber *et al.*, 2009). Eine Reihe von Antidepressiva zielen auf die Inhibition der aSMase ab und werden unter der Bezeichnung FIASMA (functional inhibitors of acidic sphingomyelinase) zusammengefasst (Kornhuber *et al.*, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob die Inhibition der aSMase durch den Einsatz von Antidepressiva ein möglicher Ansatzpunkt für die Prävention und die Therapie der Alzheimer-Krankheit darstellt.

Das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin verhindert die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt in Nervenzellen und wird zur Behandlung von Depressionen eingesetzt. In der Schmerztherapie findet es ebenfalls Anwendung, hauptsächlich in der Behandlung und Vorbeugung von Migräne und

Spannungskopfschmerzen (Bigal *et al.*, 2008; Evans, 2013; Israil *et al.*, 2013; Miller, 2012). Aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf die α SMase wird es zudem seit einiger Zeit in der Behandlung der Mukoviscidose eingesetzt, einer Erkrankung bei der es zur Akkumulation von Ceramid im respiratorischen Trakt der Patienten kommt (Becker *et al.*, 2010a; Teichgraber *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Amitriptylin auch die proteolytische Spaltung des APPs beeinflusst.

5.3.1 Amitriptylin reduziert die A β -Produktion durch Inhibierung der amyloidogenen APP-Prozessierung

Die Menge an sekretiertem A β sowie die beiden Produkte des amyloidogenen β -Schnitts β -CTF und sAPP β werden durch die Inkubation mit Amitriptylin deutlich reduziert. Dagegen sind die Level von α -CTF und sAPP α , die als Folge des Schnittes durch die α -Sekretase bei der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung entstehen, in Anwesenheit von Amitriptylin erhöht. Dies spricht für eine Verschiebung der APP-Prozessierung von der amyloidogenen, A β produzierenden Proteolyse hin zur nicht amyloidogenen Variante. Die Aktivität der β -Sekretase, die die amyloidogene Prozessierung einleitet, war nach der Inkubation mit Amitriptylin reduziert, was sich im Proteinlevel von BACE1, das als β -Sekretase bei der APP-Prozessierung identifiziert wurde, widerspiegelt. Die Analyse der BACE1 mRNA-Level mittels RT-PCR ergab aber eine Steigerung der Transkription. Die Reduktion des Proteinlevels kann zum einen an einer Blockade der posttranskriptionellen Proteinsynthese, zum anderen aber an einem vermehrten Abbau des BACE1 Proteins liegen. Ebenso wie andere Antidepressiva, die den FIASMA zugeordnet werden, ist auch Amitriptylin eine kationisch amphiphile Substanz (KAS). Die KAS sind schwache organische Basen, die sich in Zellkompartimente mit saurem pH-Wert, vor allem den Lysosomen anreichern (MacIntyre and Cutler, 1988). Dort liegen sie aufgrund des niedrigen pH-Werts protoniert vor, können somit nicht mehr frei über die Membran diffundieren und akkumulieren so in den Lysosomen (de Duve *et al.*, 1974). Durch die starke Anreicherung kommt es zur Verdrängung der α SMase aus der Lysosomenmembran und in der Folge zur Degradation des Enzyms (Hurwitz *et al.*, 1994; Kolzer *et al.*, 2004; Kornhuber *et al.*, 2008). Dieser Mechanismus erklärt die Inhibierung der α SMase durch das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin (Becker *et al.*, 2010b). BACE1 ist wie die α SMase ein membranassoziiertes Enzym mit einem sauren pH-Optimum und schneidet sein Substrat APP bevorzugt in den Endosomen und im trans-Golgi-Netzwerk (Gruninger-Leitch *et al.*, 2002; Haass *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1999). Da es sich bei den Endosomen ebenfalls um Organellen mit niedrigem pH-Wert handelt, so sollte sich Amitriptylin als KAS neben den Lysosomen auch dort anreichern. Für BACE1 wäre demnach

ein ähnlicher Degradations-Mechanismus wie für die α SMase denkbar, wodurch sich die Differenz zwischen BACE1 Transkription und Proteinlevel erklären ließe. Eine andere Erklärung ergibt sich aus einer Publikation von Puglielli *et al.*, die eine Abhängigkeit des BACE1-Proteinlevels vom Ceramidgehalt der Zelle nachwies. Die Autoren zeigten durch „pulse-chase“-Experimente in C6-Ceramid inkubierten CHO-Zellen, dass das BACE1-Protein durch Ceramid posttranslational stabilisiert wird. Versuche, bei denen CHO-Zellen mit Ceramid inkubiert und dann die Proteinbiosynthese durch die Behandlung mit dem Translationshemmer Cycloheximid inhibiert wurde, ergaben eine Erhöhung der Halbwertszeit des BACE1-Proteins von 20Std. in unbehandelten Zellen auf ca. 56Std. in Zellen, die in Anwesenheit von C6-Ceramid kultiviert wurden (Puglielli *et al.*, 2003). Durch die α SMase-inhibierende Wirkung des Amitriptylins sinken die Ceramidspiegel in der Zelle, was im Umkehrschluss zu einer Verringerung der Stabilität des BACE1-Proteins führen könnte.

Die γ -Sekretase, die durch den Schnitt im β -CTF für die Freisetzung des A β -Peptids verantwortlich ist, war durch die Inkubation mit Amitriptylin ebenso wie die β -Sekretase in ihrer Aktivität reduziert. Die Analyse des Proteinlevels der katalytischen Untereinheit der γ -Sekretase PS1 (Herreman *et al.*, 2000), ergab hingegen eine Erhöhung. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine gleichzeitige Reduktion einer der anderen γ -Sekretase Komponenten PS2, APH1, PEN2 oder Nicastrin sein, was aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht überprüft wurde. Die Analyse der PS1 Lokalisation ergab eine Reduktion in den Lipid Rafts bei einer gleichzeitigen Erhöhung von PS1 in den Non-Raft Bereichen. Analog dazu war auch die γ -Sekretase-Aktivität in den Lipid Rafts reduziert, während sie in den Non-Rafts erhöht war. Bei den Lipid Rafts handelt es sich um Membranmikrodomänen, die reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind (Eehalt *et al.*, 2003; Rajendran and Simons, 2005; Tun *et al.*, 2002). Nicht nur für BACE1 sondern auch für alle Komponenten der γ -Sekretase konnte gezeigt werden, dass sie zumindest teilweise in den Lipid Rafts lokalisiert sind (Hattori *et al.*, 2006; Hur *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1998; Vetrivel *et al.*, 2004). Harris *et al.* zeigten, dass die α -Sekretase ADAM10 unter physiologischen Bedingungen nicht in den Lipid Rafts vorkommt (Harris *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass die amyloidogene Prozessierung des APPs durch die Lokalisation in den Lipid Raft Domänen begünstigt wird, während die nicht amyloidogene Prozessierung durch die α -Sekretase außerhalb der Lipid Rafts stattfindet (Cordy *et al.*, 2003; Eehalt *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1998; Tun *et al.*, 2002). Nach einem Modell von Eehalt *et al.* (Eehalt *et al.*, 2003), weiterentwickelt von Hicks *et al.* (Hicks *et al.*, 2012) sind APP und die γ -Sekretase sowohl innerhalb als auch außerhalb der Lipid Rafts lokalisiert. Von den Lipid Rafts ausgehend findet die Abschnürung von Endosomen statt, die sowohl APP, als auch die β - und γ -Sekretase beinhalten. Die endosomale Lokalisation ist wegen des niedrigen pH-Werts essentiell für die Aktivität der β -Sekretase, die die amyloidogene Prozessierung einleitet (Eehalt *et al.*, 2003). Außerhalb

der Lipid Rafts, in den sogenannten Non-Raft Bereichen, wird APP dagegen auf nicht amyloidogenem Weg durch die α -Sekretasen prozessiert (Kojro *et al.*, 2001). Somit ist eine Verschiebung des PS1 und damit der γ -Sekretase-Aktivität, wie sie nach der Inkubation mit Amitriptylin beobachtet wurde, von den Lipid Rafts in die Non-Raft Bereiche, gleichbedeutend mit einer Verschiebung der APP-Prozessierung hin zum nicht amyloidogenen Weg. Die beobachtete Reduktion in der Aktivität der γ -Sekretase ist über eine bloße Verschiebung von den Lipid Rafts in die Non-Rafts jedoch nicht zu erklären. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die γ -Sekretase grundsätzlich in den Lipid Rafts eine höhere Aktivität aufweist, als außerhalb. Diese These wird durch eine Studie von Hur *et al.* unterstützt, die hohe γ -Sekretase-Aktivitäten in isolierten Lipid Rafts aus humanen *post mortem* Gehirnen messen konnten (Hur *et al.*, 2008). Auch Urano *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität der γ -Sekretase in den Lipid Raft Fraktionen von SH-SY5Y Zellen höher als in den Non-Rafts Fraktionen war, was nach Auffassung der Autoren mit dem hohen Cholesterin-Gehalt dieser Membranstrukturen zusammenhängt (Urano *et al.*, 2005).

5.3.2 Amitriptylin beeinflusst die amyloidogene APP-Prozessierung über das SM/Cer-Verhältnis

Der Grund für die Inhibierung der amyloidogenen APP-Prozessierung liegt in der inhibitorischen Wirkung des Amitriptylins auf die aSMase und der damit verbundenen Erhöhung des Sphingomyelin-Levels, während zeitgleich der Gehalt an Ceramid reduziert wird. So konnte neben der pharmakologischen Inhibition durch Amitriptylin auch der genetische Ansatz des aSMase Knockdowns die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase reduzieren. Wurden diese aSMase-KD Zellen mit Amitriptylin inkubiert, war der zuvor gezeigte Effekt der Sekretase-Inhibition nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis validiert für die beobachtete Hemmung der Sekretasen den vorgeschlagenen molekularen Wirkmechanismus der Beeinflussung der aSMase-Funktion, gleichzeitig schließt diese Beobachtung andere Interpretationsmöglichkeiten praktisch aus. Weiterhin zeigte die Inkubation mit aSMase, wodurch vermehrt Sphingomyelin abgebaut wird, eine Erhöhung der β - und γ -Sekretase. Dieses Ergebnis müsste entsprechend des oben genannten und gemäß der bekannten Funktion der aSMase gefordert werden. Auch dieses Ergebnis ist daher in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen molekularen Mechanismus. Inkubierte man die Zellen mit Sphingomyelin oder Ceramid, zeigte sich nach der Inkubation mit Sphingomyelin eine reduzierte β - und γ -Sekretase-Aktivität, Ceramid hingegen erhöhte zwar die β -Sekretase-Aktivität, hatte aber keinen Einfluss auf die der γ -Sekretase. Nach einer Studie von Puglielli *et al.* wird die Aktivität der β -Sekretase durch Ceramid erhöht, was durch eine posttranslationale Stabilisierung des BACE1-Proteins bedingt ist. In Analogie zu den

Ergebnissen dieser Arbeit fanden die Autoren keinen Effekt von Ceramid auf die Menge ausgewählter γ -Sekretase-Produkte (Puglielli *et al.*, 2003). Wird das BACE1-Protein durch Ceramid stabilisiert, so könnte, wie bereits beschrieben, nach der Inkubation mit Amitriptylin BACE1 durch sinkende Ceramidspiegel verstärkt abgebaut werden.

Die pharmakologische Inhibition der neutralen SMase mit dem spezifischen Inhibitor GW4869, verringerte ebenfalls die Aktivität der β - und γ -Sekretase. Die vergleichsweise kleinen Effekte sind dadurch bedingt, dass auch die Inhibition der nSMase durch den Inhibitor weniger stark war, als die durch Amitriptylin und damit auch das SM/Cer-Verhältnis nur wenig erhöht wurde. Der Effekt einer nSMase Inhibition auf die amyloidogene APP-Prozessierung wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Inhibition der nSMase zu einer Reduzierung der A β -Produktion kommt (Grimm *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde gezeigt, dass umgekehrt die Inkubation von A β 42 zu einer Verringerung des Sphingomyelin-Gehaltes über eine Aktivierung der nSMase führt (Grimm *et al.*, 2005). Mehrere Mechanismen scheinen zu dieser Aktivierung beizutragen. Zum einen konnte ein direkter Effekt von A β 42 Peptiden auf die nSMase gezeigt werden (Grimm *et al.*, 2005), zum anderen wurde diskutiert ob oxidativer Stress, wie er durch hohe Konzentrationen von A β 42 und fibrillärem A β 42 verursacht wird, für die Aktivierung der nSMase verantwortlich ist (Alessenko *et al.*, 2004; Jana and Pahan, 2004). Ein weiterer möglicher Weg der Aktivierung der nSMase ist der über die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2), ein Enzym, das die Acylgruppen an der *sn*-2 Position von Phospholipiden spaltet, was zur Freisetzung von Arachidonsäure führt (Ghosh *et al.*, 2006). Sanchez-Mejia *et al.* zeigten, dass A β -Oligomere in Primärneuronen eine Aktivierung dieses Enzyms bewirken (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurden erhöhte cPLA2 Aktivitäten in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008), was mit reduzierten Leveln an Phospholipid-gebundener Arachidonsäure einhergeht, wie sie für Alzheimer-Gehirne beschrieben wurden (Prasad *et al.*, 1998). Die durch die cPLA2 Aktivität freigesetzte Arachidonsäure führt nun zu einer Aktivierung der nSMase und der aSMase (Malaplate-Armand *et al.*, 2006), wodurch es zu einem verstärkten Abbau von Sphingomyelin und einer Akkumulation von Ceramid kommt. So kommt es zur Ausbildung eines sich selbst verstärkenden Systems, bei dem Ceramid über die Stabilisierung von BACE1 die A β -Produktion erhöht, während A β seinerseits durch die Aktivierung der SMasen die Ceramidlevel weiter ansteigen lässt. In diesem Fall könnte die Anwendung von Amitriptylin zumindest die Aktivierung der aSMase verhindern und somit in diesem Kreislauf regulatorisch eingreifen.

Die Analyse des Sphingomyelin- und Ceramid-Gehaltes der Zelle nach der Inkubation mit Amitriptylin zeigte wie erwartet eine Erhöhung des Sphingomyelinspiegels während Ceramid

gleichzeitig reduziert wurde. Interessanterweise scheint sich Sphingomyelin dabei bevorzugt in den Lipid Raft-Membrandomänen anzureichern. Dort war die Erhöhung des Sphingomyelin-Gehaltes nach der Inkubation mit Amitriptylin deutlich ausgeprägter als in den Non-Raft-Domänen. Die Reduktion des Ceramids betraf dagegen Lipid Rafts und Non-Rafts in ähnlichem Maße. Nun wird, wie bereits beschrieben sowohl die γ - als auch die β -Sekretase durch Sphingomyelin in ihrer Aktivität gehemmt. Somit könnte eine Erhöhung des Sphingomyelins in den Lipid Rafts durch die enge räumliche Assoziation des Lipids mit den Sekretasen zu einer effektiven Inhibierung beitragen. Denkbar ist zudem, dass es durch die starke Akkumulation von Sphingomyelin zu einer Verdrängung und somit zu einer Abnahme des Cholesterin-Gehaltes in den Lipid Raft-Domänen kommt. Nun scheint Cholesterin die Lokalisation der γ -Sekretase in den Lipid Rafts zu begünstigen. So zeigten Urano *et al.* eine Verschiebung der γ -Sekretase aus den Lipid Rafts in die Non-Raft-Bereiche, sowohl nach der Depletion von Cholesterin mit Methyl- β -Cyclodextrin als auch nach einer Reduktion der Cholesterin *de novo* Synthese durch Statine (Urano *et al.*, 2005). Somit könnte die durch Amitriptylin verursachte Verschiebung von PS1 in die Non-Rafts erklärt werden.

5.3.3 Amitriptylin erhöht die nicht amyloidogene APP-Prozessierung über ADAM17

Zusätzlich zu der inhibitorischen Wirkung von Amitriptylin auf die amyloidogene Prozessierung von APP konnte eine Erhöhung der nicht amyloidogenen APP-Proteolyse festgestellt werden. Diese ging mit einer Erhöhung der α -Sekretase Produkte sAPP α und α -CTF einher. In Analogie dazu zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Metalloprotease ADAM17, die neben ADAM10 als die Haupt- α -Sekretase bei der APP-Prozessierung gilt (Buxbaum *et al.*, 1998). Die Analyse der Proteinlevel ergab eine Erhöhung bei ADAM17, nicht aber bei ADAM10, die Gen-Expression beider α -Sekretasen war hingegen unverändert. Die Erhöhung des ADAM17-Proteinlevels ist also nicht durch eine erhöhte Transkription des ADAM17-Gens sondern wohl über eine Stabilisierung des ADAM17-Proteins bedingt. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht detaillierter untersucht, ein solcher Effekt auf die ADAM17-Proteinstabilität konnte aber bereits in der Vergangenheit für DHA gezeigt werden (Grimm *et al.*, 2011c). Zusätzlich wurde die Aktivität von ADAM17 durch Amitriptylin erhöht, was die Inkubation von aufgereinigtem ADAM17 Enzym mit Amitriptylin zeigte. Der Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase durch Amitriptylin war allerdings weniger deutlich als er aufgrund der recht hohen Level an sAPP α und α -CTF zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte an der Reduktion der amyloidogenen Prozessierung des APPs liegen, wodurch der α -Sekretase generell mehr Substrat zur Verfügung steht. Bemerkenswert ist, dass die Erhöhung des nicht amyloidogenen Wegs nicht wie bei der Reduktion der amyloidogenen Prozessierung eine Folge der Verschiebung des SM/Cer-Verhältnisses ist, sondern davon

unabhängig zu sein scheint. So hatte weder die Inkubation mit Sphingomyelin oder Ceramid, noch der Knockdown der aSMase einen Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings die durch die α -Sekretase produzierten APP-Spaltprodukte sAPP α und α -CTF nach einer Erhöhung des SM/Cer-Verhältnisses durch Inkubation der Lipide oder den aSMase-Knockdown nicht überprüft. Es ist aber davon auszugehen, dass der nicht amyloidogene Weg alleine wegen der Inhibierung der amyloidogenen Prozessierung bevorzugt ablaufen dürfte. Die Aktivierung der α -Sekretase ADAM17 durch ein erhöhtes ADAM17-Proteinlevel und einen zusätzlichen direkten Effekt auf die Aktivität scheint jedoch durch einen anderen Mechanismus des Antidepressivums Amitriptylin als den der aSMase-Inhibition hervorgerufen zu werden.

5.3.4 Amitriptylin reduziert A β über eine verstärkte Degradation und inhibiert dessen Aggregation

Die Menge an A β -Peptiden wird, neben dem Verhältnis zwischen amyloidogener und nicht amyloidogener APP-Prozessierung, auch über deren Degradation über A β -spaltende Enzyme reguliert. Als Enzyme, die in der Lage sind A β zu degradieren, wurden unter anderen Nephilysin (Howell *et al.*, 1995; Iwata *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2000), das „endothelin-converting enzyme-1“ (ECE-1) (Eckman *et al.*, 2001), das „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) (Hu *et al.*, 2001), Cathepsin D (Hamazaki, 1996), die Gelatinase A (Yamada *et al.*, 1995), die Matrix-Metalloendopeptidase-9 (Carvalho *et al.*, 1997), sowie das Insulin-degradierende Enzym (IDE) (Kurochkin and Goto, 1994; McDermott and Gibson, 1997; Qiu *et al.*, 1998) identifiziert. Bei letzterem handelt es sich um eine Zink-Metalloendopeptidase, die neben A β auch Insulin, Glukagon, Amylin, β -Endorphin und AICD schneidet (Duckworth *et al.*, 1998; Selkoe, 2001; Wang *et al.*, 2006). Transgene Mäuse, die IDE überexprimierten, zeigten eine Reduktion der Bildung seniler Plaques (Leissring *et al.*, 2003), während IDE-Knockout-Mäuse eine deutliche Erhöhung von A β im Gehirn aufwiesen (Farris *et al.*, 2003). In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden reduzierte IDE mRNA- sowie Proteinlevel gefunden (Cook *et al.*, 2003). Nach der Inkubation mit Amitriptylin konnte eine Erhöhung der Degradation synthetischer A β -Peptide festgestellt werden. In Anwesenheit eines spezifischen IDE-Inhibitors war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Dieser Effekt auf IDE ist im Gegensatz zu dem Effekt auf die α -Sekretase abhängig von der Veränderung des SM/Cer-Verhältnisses. So zeigten auch die Zellen, in denen die aSMase-Aktivität durch den Knockdown reduziert war, eine erhöhte A β -Degradation. Amitriptylin reduziert also die A β -Menge zusätzlich zur Verringerung der Produktion auch über eine Erhöhung der Degradation durch IDE.

Entscheidend für die Manifestation der Alzheimer-Pathologie ist nicht nur die Produktion von A β , sondern auch dessen Aggregation, wodurch es zu den Ablagerungen der senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten kommt. Die Umwandlung der A β -Peptide von der α -helikalen Konformation in die β -Faltblattstruktur ist notwendig für die Ausbildung von Oligomeren und Protofibrillen. Mehrere Studien zeigen eine Abhängigkeit dieser Konformationsänderung und der damit verbundenen Aggregation von den Lipid Raft-Mikrodomänen. Dies wurde bisher hauptsächlich mit der Anwesenheit von Gangliosiden in den Lipid Raft-Strukturen in Zusammenhang gebracht (Kim *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2008). Da Lipid Rafts reich an Sphingomyelin sind, könnte auch dieses Lipid potentiell eine Rolle bei der Lipid Raft-medierten Aggregation von A β spielen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass die Inkubation mit Sphingomyelin die Aggregation synthetischer A β 42-Peptide reduziert. Vor allem die Bildung kleinerer A β -Oligomere, die als die toxische Form der A β -Aggregate gelten (Kayed *et al.*, 2003), wird durch Sphingomyelin inhibiert. Dagegen zeigt A β 42 in Anwesenheit von Ceramid eine verstärkte Bildung dieser löslichen Aggregate. Die Inkubation von Amitriptylin dagegen hatte in diesem zellfreien Ansatz, bei dem die Sphingomyelin- und Ceramidspiegel unbeeinflusst bleiben, keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der A β -Peptide. Durch sein Potential, Sphingomyelin zu erhöhen und gleichzeitig Ceramid zu reduzieren, kann Amitriptylin aber Einfluss auf die Aggregation von A β nehmen. Dies wird belegt durch eine Studie von Chadwick *et al.*, die transgene Alzheimer-Modellmäuse mit Amitriptylin behandelten. Sie konnten zeigen, dass zytotoxische A β -Dimere abnahmen, was mit einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse einherging (Chadwick *et al.*, 2011).

5.3.5 Andere FIASMA als therapeutische Targets für die Alzheimer Krankheit

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin die A β -Produktion über eine Inhibierung der amyloidogenen Prozessierung senkt, zudem die Degradation fördert und die Aggregation reduziert. All diese Effekte sind bedingt durch die Veränderung des Verhältnisses von Sphingomyelin zu Ceramid. Deshalb sollten auch andere Antidepressiva, die zur Gruppe der FIASMA gehören, also die aSMase inhibieren, die A β -Produktion reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass Desipramin, das ebenfalls zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva zählt (Hurwitz *et al.*, 1994), die Menge an sekretiertem A β reduzierte, indem es die γ - und die β -Sekretase-Aktivität verringerte. Auch das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin (Kornhuber *et al.*, 2010) und Fluoxetin, das als selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer beschrieben wird (Brunswick *et al.*, 2002), reduzierten die A β -Sekretion signifikant. Während Maprotilin ebenso wie Desipramin und Amitriptylin die Aktivität der β - und der γ -Sekretase reduzierte, hatte Fluoxetin zwar eine

inhibierende Wirkung auf die β -, nicht aber auf die γ -Sekretase. Weder Desipramin, noch Maprotilin oder Fluoxetin beeinflussten signifikant die Aktivität der α -Sekretase, was die Annahme bestätigt, dass der Effekt von Amitriptylin auf ADAM17 nicht aus der Veränderung der Sphingomyelin- oder Ceramid-Level resultiert, sondern es sich um einen Nebeneffekt handelt, der spezifisch für Amitriptylin zu sein scheint.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewandt, um eine Veränderung des SM/Cer-Verhältnis zu erreichen. Es wurden zum einen Antidepressiva aus der Gruppe der FIASMA eingesetzt, zum anderen wurde ein aSMase-Knockdown erstellt und die nSMase wurde pharmakologisch inhibiert. Alle Ansätze resultierten in einem Anstieg des Verhältnisses von Sphingomyelin zu Ceramid und zu einer Abnahme der β -Sekretase-Aktivität. Im Falle der γ -Sekretase konnte dagegen für das Antidepressivum Fluoxetin kein Einfluss auf die γ -Sekretase festgestellt werden. Fluoxetin scheint also die γ -Sekretase zusätzlich über andere Mechanismen zu beeinflussen als über den SM/Cer vermittelten Weg.

5.3.6 Antidepressiva als möglicher Therapie-Ansatz bei der Alzheimer Krankheit – Ein Fazit

Antidepressiva, die eine Inhibierung der aSMase bewirken, sind in der Lage die A β -Menge in SH-SY5Y Zellen über verschiedene Mechanismen deutlich zu reduzieren. In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurden nicht nur erhöhte Ceramid-Level nachgewiesen (Cutler *et al.*, 2004; Filippov *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2002), die vorliegenden Daten zeigen zudem eine erhöhte Expression der SMasen. Dies wird durch die Ergebnisse einer Studie von He *et al.* belegt, die Gehirne von Alzheimer-Patienten auf verschiedene Sphingolipide und Aktivitäten mehrerer am Sphingolipid-Metabolismus beteiligter Enzyme untersuchten. Die Autoren beschrieben erhöhte aSMase-Proteinlevel und -Aktivitäten verbunden mit einer Reduktion der Sphingomyelin-Level. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Level der aSMase signifikant mit den A β -Leveln in den untersuchten Gehirnen korrelierten. Zudem fanden sie erhöhte Level der sauren Ceramidase, dem Enzym, das die Degradation von Ceramid zu Sphingosin katalysiert, vermutlich als Folge der hohen Ceramid-Konzentrationen. Demzufolge lag Sphingosin in den Gehirnen der Alzheimer-Patienten erhöht vor (He *et al.*, 2010). Darüber hinaus zeigten Katsel *et al.*, die die Expressionsprofile von Enzymen des Sphingolipid-Metabolismus in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten in verschiedenen klinischen Stadien der Demenz untersuchten, eine Erhöhung der Enzyme, die an der Ceramid *de novo* Synthese beteiligt sind. Diese Erhöhung korrelierte mit dem klinischen Stadium der Alzheimer-Erkrankung (Katsel *et al.*, 2007). Wie bereits beschrieben, führen hohe Ceramid-

Level zu einer erhöhten A β -Produktion und hohe A β -Level bewirken umgekehrt über verschiedene Mechanismen eine weitere Erhöhung der Ceramide. Der daraus resultierende *circulus vitiosus* könnte durch den Einsatz von Antidepressiva, die gezielt die aSMase inhibieren, durchbrochen werden.

Mielke *et al.* zeigten, dass hohe Sphingomyelin-Level bzw. hohe Sphingomyelin zu Ceramid-Verhältnisse im Plasma von Personen, die bereits an Alzheimer erkrankt waren, mit einer langsameren Progression der Krankheit assoziiert waren (Mielke *et al.*, 2011). Somit könnte sich der Einsatz aSMase-inhibierender Antidepressiva nicht nur in der Prävention, sondern auch bei der Therapie einer bestehenden Alzheimer-Erkrankung positiv auswirken.

Depressionen sind häufig eine Begleiterscheinung der Alzheimer Krankheit und so wurden Amitriptylin sowie andere FIASMA bereits bei der Behandlung depressiver Zustände auch bei Alzheimer-Patienten eingesetzt. Eine Studie von Taragano *et al.*, bei der Alzheimer-Patienten mit Amitriptylin oder Fluoxetin behandelt wurden, ergab nicht nur eine Verbesserung der Depressions-Symptomatik, sondern die Probanden erzielten auch bessere Ergebnisse beim Mini-Mental-Status-Test (MMST). Die Autoren führten dies in erster Linie auf eine Verbesserung des depressiven Zustandes zurück, auch weil beide Antidepressiva auf den ersten Blick unterschiedliche Wirkmechanismen verfolgen. Während Fluoxetin die Serotonin-Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt hemmt, wirkt Amitriptylin eher auf die Noradrenalin-Rezeptoren. Trotzdem war die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bei beiden Gruppen fast identisch (Taragano *et al.*, 1997). Die Gemeinsamkeit beider Antidepressiva die aSMase zu reduzieren, zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, sprechen eher für einen Sphingomyelin und Ceramid vermittelten Effekt.

Eine Behandlung mit aSMase-reduzierenden Antidepressiva könnte also in vielfacher Hinsicht von Nutzen in der Alzheimer-Therapie sein. Zum einen reduzieren Amitriptylin, Desipramin, Maprotilin, Fluoxetin und wahrscheinlich auch andere Antidepressiva aus der Gruppe der FIASMA die A β -Produktion, zum anderen konnte zumindest für Amitriptylin gezeigt werden, dass zusätzlich die A β -Degradation stimuliert wird. Durch die Erhöhung des SM/Cer-Verhältnisses wirken sie sich außerdem inhibierend auf die A β -Aggregation aus. Daneben bekämpfen sie in ihrer Eigenschaft als Antidepressiva die häufig als Begleiterscheinung einer Alzheimer Erkrankung auftretenden depressiven Verstimmungen.

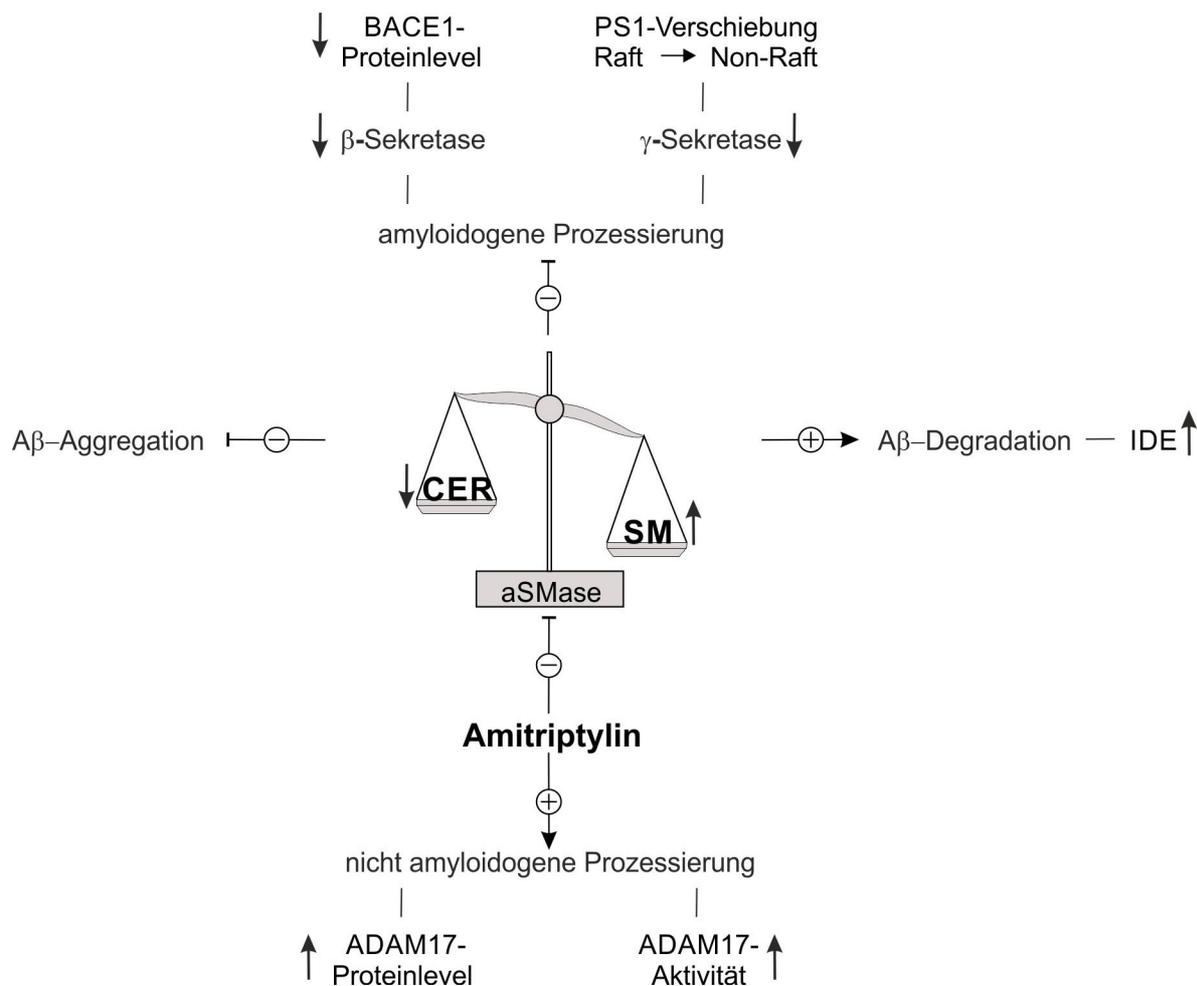


Abb. 92 Übersicht der Effekte von Amitriptylin auf die APP-Prozessierung

Durch die Inhibierung der aSMase bewirkt Amitriptylin eine Erhöhung des Sphingomyelinpiegels bei gleichzeitiger Reduktion des Ceramidlevels. Dies führt zu einer Reduktion des BACE1-Proteinlevels und zu einer Verschiebung von PS1 von den Lipid Rafts in die Non-Rafts. Beides bedingt eine Reduktion der amyloidenen APP-Prozessierung und damit eine reduzierte A β -Produktion. Gleichzeitig wird die Degradation dieser Peptide durch IDE verstärkt und die Aggregation vermindert. Unabhängig von der Änderung der Sphingomyelin- und Ceramidspiegels kommt es durch die Inkubation von Amitriptylin zu einer Aktivierung des nicht amyloidenen Prozessierungswegs durch eine Erhöhung des ADAM17-Proteinlevels und der ADAM17-Aktivität.

Zahlreiche FIASMA sind bereits als pharmakologische Wirkstoffe in Medikamenten auf dem Markt, wodurch langwierige Zulassungsverfahren vermieden werden könnten. Sie werden in der Regel gut über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen und können die Blut-Hirn-Schranke passieren (Kornhuber *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurden erhöhte Ceramid-Level auch mit dem Auslösen von Inflammation, oxidativem Stress und neuronaler Apoptose in Verbindung gebracht, Mechanismen die ebenfalls mit der Alzheimer-Pathologie in Zusammenhang stehen (Ballou *et al.*, 1996; Cutler *et al.*, 2004; Cuvillier *et al.*, 1996; de la Monte, 2012; Toman *et al.*, 2002). Auch diese Faktoren könnten durch die Behandlung mit FIASMA positiv beeinflusst werden.

An dieser Stelle soll betont werden, dass für jedes der beschriebenen Antidepressiva eine Reihe von Nebenwirkungen, besonders auch in Kombination mit der Einnahme anderer Medikamente, beschrieben wurde. Durch die Einnahme von Amitriptylin beispielsweise kommt es häufig zu zentralnervösen Störungen wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Tremor und Schwindel, zu Beeinträchtigungen des Herz-Kreislauf-Systems, zu gastro-intestinalen Beschwerden wie Verstopfung und Übelkeit oder zu übermäßigem Schwitzen und Gewichtszunahme. Die 2010 veröffentlichte PRISCUS-Liste führt Amitriptylin als potentiell inadäquate Medikation (PIM) bei älteren Patienten auf (Holt *et al.*, 2010). Diese Liste, die in Anlehnung an die 1997 in den USA eingeführte Beers-Liste (Beers, 1997) erstellt wurde, enthält 83 Wirkstoffe, deren Verabreichung nach Befragung von Experten sowie Auswertung internationaler PIM-Listen und Literaturrecherche als potentiell mit einem hohen Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkung bei älteren Patienten verbunden ist (Holt *et al.*, 2010). Nach Angaben der PRISCUS-Liste besteht durch die Gabe von Amitriptylin bei älteren Patienten ein erhöhtes Risiko für delirante Syndrome, Hüftfrakturen, anticholinerge Nebenwirkungen und venöse Tromboembolien. Besonders bei Begleiterkrankungen wie z.B. kardialen Erkrankungen, Niereninsuffizienz, urologischen Störungen, Leberfunktionsstörungen und Störungen des ZNS, auch Demenzen, sollte die Verabreichung von Amitriptylin vermieden und auf alternative Wirkstoffe zurück gegriffen werden. Die PRISCUS-Liste stellt allerdings keine generelle „Verbots-Liste“ dar und so schlägt sie, falls die aufgeführten Wirkstoffe nach eingehender Risiko-Nutzen-Abwägung doch verabreicht werden sollen, eine Reihe von Kontrollmaßnahmen vor, die das Risiko minimieren sollen (Holt *et al.*, 2010). Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Antidepressiva Maprotilin und Fluoxetin sind laut PRISCUS-Liste bei älteren Patienten nur unter Einhaltung regelmäßiger Kontrollen zu verabreichen oder ganz zu vermeiden. Als alternativer Wirkstoff zu den genannten Antidepressiva wird unter anderem der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Sertralin vorgeschlagen, welcher ebenfalls zur Gruppe der aSMase-Inhibitoren zählt. Durch die breite Palette an verschiedenen FIASMA bestünde vermutlich die Möglichkeit für jeden Patienten individuell das am besten verträglichste Medikament zu finden. Bei Patienten, bei denen depressive Episoden im mittleren Lebensabschnitt auftreten, was das Risiko einer späteren Alzheimer-Erkrankung erhöht (Saczinsky *et al.*, 2010; Barnes *et al.*, 2006; Jorm *et al.*, 1991; Speck *et al.*, 1995; Green *et al.*, 2003), kommt die beschriebene Problematik ohnehin nicht zum Tragen.

5.3.7 Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt eine inhibierende Wirkung von aSMase-Inhibitoren auf die amyloidogene APP-Prozessierung, wodurch die Menge an in hohen Konzentrationen toxischen A β -Peptiden reduziert werden kann. Zusätzlich wird die Degradation dieser Peptide verstärkt und deren Aggregation reduziert. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob sich die Ergebnisse dieser Zellkultur-Studie auch im Tiermodell reproduzieren lassen und letztlich auf den Alzheimer-Patienten übertragbar sind. Besonders im Hinblick auf den vielfach postulierten Zusammenhang zwischen der Alzheimer Krankheit und dem Auftreten von Depressionen erscheint ein solcher Therapieansatz sinnvoll, auch wenn die kausale Verbindung der beiden Krankheitsbilder nach wie vor umstritten ist. Während einige Autoren in der Depression eine frühe Begleiterscheinung der Alzheimer-Pathologie sehen (Berger *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2011), gehen andere davon aus, dass depressive Episoden das Risiko für eine spätere Alzheimer-Erkrankung erhöhen. Mittlerweile konnten mehrere Studien belegen, dass Depressionen in früheren Lebensabschnitten das spätere Risiko einer Demenzerkrankung auf das bis zu Zweifache erhöhen (Saczinsky *et al.*, 2010; Barnes *et al.*, 2006; Jorm *et al.*, 1991; Speck *et al.*, 1995; Green *et al.*, 2003). Eine Depression in einem späteren Lebensabschnitt scheint dagegen eher eine frühe Manifestation der Alzheimer Krankheit zu sein (Barnes *et al.*, 2012). In beiden Fällen erscheint eine Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva, die als aSMase-Inhibitoren wirken, Erfolg versprechend. Dies würde darüber hinaus die Unterscheidung und Abgrenzung der frühen Symptome der Alzheimer Krankheit von einer depressiven Verstimmung, die sich in der Praxis oft schwierig gestaltet, überflüssig machen. Die molekulare Gemeinsamkeit der Erhöhung der aSMasen und damit der Ceramidspiegel, die sowohl bei Depressionen als auch bei der Alzheimer Krankheit auftreten, macht die Entwicklung spezifischer, nebenwirkungsfreier aSMase-Inhibitoren zu einem attraktiven Ansatzpunkt der Alzheimer-Therapie.

6 Literatur

1. Alam, S.Q., Ren, Y.F., Alam, B.S. (1989). Effect of dietary trans fatty acids on some membrane-associated enzymes and receptors in rat heart. *Lipids* 24, 39-44.
2. Albouz, S., Le Saux, F., Wenger, D., Hauw, J.J., Baumann, N. (1986). Modifications of sphingomyelin and phosphatidylcholine metabolism by tricyclic antidepressants and phenothiazines. *Life Sci* 38, 357-363.
3. Alessenko, A.V., Bugrova, A.E., Dudnik, L.B. (2004). Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 32, 144-146.
4. Allinson, T.M., Parkin, E.T., Condon, T.P., Schwager, S.L., Sturrock, E.D., Turner, A.J., Hooper, N.M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur J Biochem* 271, 2539-2547.
5. Allison, D., Denke, M., Dietschy, J., Emken, E., Kris-Etherton, P., Nicolosi, R. (1995). Trans fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 62, 655S-708S; discussion 518-626.
6. Andersen, J.M., Myhre, O., Fonnum, F. (2003). Discussion of the role of the extracellular signal-regulated kinase-phospholipase A2 pathway in production of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 28, 319-326.
7. Arawaka, S., Hasegawa, H., Tandon, A., Janus, C., Chen, F., Yu, G., Kikuchi, K., Koyama, S., Kato, T., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. (2002). The levels of mature glycosylated nicastrin are regulated and correlate with gamma-secretase processing of amyloid beta-precursor protein. *J Neurochem* 83, 1065-1071.
8. Aro, A., Amaral, E., Kesteloot, H., Rimestad, A., Thamm, M., van Poppel, G. (1998a). Trans Fatty Acids in French Fries, Soups, and Snacks from 14 European Countries: The TRANSFAIR Study. *J Food Compost Anal* 11, 170-177.
9. Aro, A., Antoine, J.M., Pizzoferrato, L., Reykdal, O., van Poppel, G. (1998b). Trans Fatty Acids in Dairy and Meat Products from 14 European Countries: The TRANSFAIR Study. *J Food Compost Anal* 11, 150-160.
10. Aro, A., van Amelsvoort, J., Becker, W., Van Erp-Baart, M.A., Kafatos, A., Leth, T., Van Poppel, G. (1998c). Trans Fatty Acids in Dietary Fats and Oils from 14 European Countries: The TRANSFAIR Study. *J Food Compost Anal* 11, 137-149.
11. Askarova, S., Yang, X., Lee, J.C. (2011). Impacts of membrane biophysics in Alzheimer's disease: from amyloid precursor protein processing to abeta Peptide-induced membrane changes. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 134971.
12. Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (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.
13. Ballou, L.R., Lauderkind, S.J., Rosloniec, E.F., Raghov, R. (1996). Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1301, 273-287.
14. Barker, W.W., Luis, C.A., Kashuba, A., Luis, M., Harwood, D.G., Loewenstein, D., Waters, C., Jimison, P., Shepherd, E., Sevush, S., Graff-Radford, N., Newland, D., Todd, M., Miller, B., Gold, M., Heilman, K., Doty, L., Goodman, I., Robinson, B., Pearl, G., Dickson, D., Duara, R. (2002). Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16, 203-212.
15. Barnes, D.E., Alexopoulos, G.S., Lopez, O.L., Williamson, J.D., Yaffe, K. (2006). Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study. *Archives of general psychiatry*, 63(3), 273.
16. Barnes, D.E., Yaffe, K., Byers, A.L., McCormick, M., Schaefer, C., Whitmer, R.A. (2012). Midlife vs late-life depressive symptoms and risk of dementia: differential effects for Alzheimer disease and vascular dementia. *Archives of general psychiatry*, 69(5), 493.

17. Batsch, N.L., Mittelman, M.S. (2012). World Alzheimer Report 2012, Overcoming the stigma of dementia. London, Alzheimer's Disease International.
18. Becker, J.T., Overman, A.A. (2002). [The semantic memory deficit in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 35, 777-783.
19. Becker, K.A., Riethmuller, J., Luth, A., Doring, G., Kleuser, B., Gulbins, E. (2010a). Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 716-724.
20. Becker, K.A., Riethmuller, J., Zhang, Y., Gulbins, E. (2010b). The role of sphingolipids and ceramide in pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J* 4, 39-47.
21. Becker, W., Brasseur, D., Bresson, J.L., Flynn, A., Jackson, A.A., Lagiou, P., Mingrone, G., Moseley, B., Palou, A., Przyrembel, H., Salminen, S., Strobel, S., van Loveren, H. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. *The EFSA Journal* 81, 1-49.
22. Beers, M.H. (1997). Explicit criteria for determining potentially inappropriate medication use by the elderly. An update. *Archives of internal medicine* 157, 1531-1536.
23. Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., Chrétien, M., Seidah, N.G. (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.
24. Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.C., Citron, M., Vassar, R. (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* 275, 37712-37717.
25. Berger, A.K., Fratiglioni, L., Forsell, Y., Winblad, B., Bäckman, L. (1999). The occurrence of depressive symptoms in the preclinical phase of AD A population-based study. *Neurology*, 53(9), 1998-1998
26. Bernstein, S.L., Wyttenbach, T., Baumketner, A., Shea, J.E., Bitan, G., Teplow, D.B., Bowers, M.T. (2005). Amyloid beta-protein: monomer structure and early aggregation states of Abeta42 and its Pro19 alloform. *Journal of the American Chemical Society* 127, 2075-2084.
27. Beyreuther, K., Masters, C.L. (1997). Serpents on the road to dementia and death. Accumulating evidence from several studies points to the normal function of presenilin 1 and suggests how the mutant protein contributes to deposition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Nat Med* 3, 723-725.
28. Bickel, M.H. (1975a). Binding of chlorpromazine and imipramine to red cells, albumin, lipoproteins and other blood components. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 27, 733-738.
29. Bickel, M.H. (1975b). Poisoning by tricyclic antidepressant drugs: general and pharmacokinetic considerations. *International journal of clinical pharmacology and biopharmacy* 11, 145-176.
30. Biermann, J., Gootjes, J., Wanders, R.J., van den Bosch, H. (1999). Stability of alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase in human control and peroxisomal disorder fibroblasts. *IUBMB Life* 48, 635-639.
31. Bigal, M.E., Rapoport, A.M., Hargreaves, R. (2008). Advances in the pharmacologic treatment of tension-type headache. *Curr Pain Headache Rep* 12, 442-446.
32. Blacker, M., Noe, M.C., Carty, T.J., Goodyer, C.G., LeBlanc, A.C. (2002). Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. *J Neurochem* 83, 1349-1357.
33. Boer, J.M., Ehnholm, C., Menzel, H.J., Havekes, L.M., Rosseneu, M., O'Reilly, D.S., Tiret, L. (1997). Interactions between lifestyle-related factors and the ApoE polymorphism on

- plasma lipids and apolipoproteins. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1675-1681.
34. Borghi, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Gabriella, C., Patrizio, O., Massimo, T. (2007). The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 1009-1014.
 35. Bowman, G.L., Shannon, J., Ho, E., Traber, M.G., Frei, B., Oken, B.S., Kaye, J.A., Quinn, J.F. (2011). Reliability and validity of food frequency questionnaire and nutrient biomarkers in elders with and without mild cognitive impairment. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 25, 49-57.
 36. Bowman, G.L., Silbert, L.C., Howieson, D., Dodge, H.H., Traber, M.G., Frei, B., Kaye, J.A., Shannon, J., Quinn, J.F. (2012). Nutrient biomarker patterns, cognitive function, and MRI measures of brain aging. *Neurology* 78, 241-249.
 37. Braak, H., Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
 38. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
 39. Brunswick, D.J., Amsterdam, J.D., Fawcett, J., Quitkin, F.M., Reimherr, F.W., Rosenbaum, J.F., Beasley, C.M., Jr. (2002). Fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during relapse-prevention treatment. *J Affect Disord* 68, 243-249.
 40. Bryleva, E.Y., Rogers, M.A., Chang, C.C., Buen, F., Harris, B.T., Rousselet, E., Seidah, N.G., Oddo, S., LaFerla, F.M., Spencer, T.A., Hickey, W.F., Chang, T.-Y. (2010). ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3081-3086.
 41. Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-27767.
 42. Calder, P.C., Yaqoob, P., Newsholme, E.A. (1994). Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerols on lymphocyte proliferation. *Biochem J* 298 Pt 3, 605-611.
 43. Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65, 664-670.
 44. Cao, X., Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
 45. Capell, A., Behr, D., Prokop, S., Steiner, H., Kaether, C., Shearman, M.S., Haass, C. (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem* 280, 6471-6478.
 46. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 30849-30854.
 47. Carlesimo, G.A., Oscar-Berman, M. (1992). Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychol Rev* 3, 119-169.
 48. Carvalho, K.M., Franca, M.S., Camarao, G.C., Ruchon, A.F. (1997). A new brain metalloendopeptidase which degrades the Alzheimer beta-amyloid 1-40 peptide producing soluble fragments without neurotoxic effects. *Braz J Med Biol Res* 30, 1153-1156.
 49. Caughey, B., Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26, 267-298.
 50. Celis, J.E. (1998). *Cell Biology. A laboratory handbook*, 2nd Revised edition edn (San Diego: Academic Press).

51. Chadwick, W., Mitchell, N., Carroll, J., Zhou, Y., Park, S.S., Wang, L., Becker, K.G., Zhang, Y., Lehrmann, E., Wood, W.H., 3rd, Martin, B., Maudsley, S. (2011). Amitriptyline-mediated cognitive enhancement in aged 3xTg Alzheimer's disease mice is associated with neurogenesis and neurotrophic activity. *PLoS One* 6, e21660.
52. Chavez-Gutierrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P.C., de Strooper, B. (2008). Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem* 283, 20096-20105.
53. Chen, P., Ganguli, M., Mulsant, B.H., DeKosky, S.T. (1999). The temporal relationship between depressive symptoms and dementia: a community-based prospective study. *Archives of general psychiatry*, 56(3), 261.
54. Cheng, H., Xu, J., McKeel, D.W., Jr., Han, X. (2003). Specificity and potential mechanism of sulfatide deficiency in Alzheimer's disease: an electrospray ionization mass spectrometric study. *Cellular and molecular biology* 49, 809-818.
55. Cherubini, A., Andres-Lacueva, C., Martin, A., Lauretani, F., Iorio, A.D., Bartali, B., Corsi, A., Bandinelli, S., Mattson, M.P., Ferrucci, L. (2007). Low plasma N-3 fatty acids and dementia in older persons: the InCHIANTI study. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 62, 1120-1126.
56. Chiti, F., Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333-366.
57. Cimini, A., Benedetti, E., D'Angelo, B., Cristiano, L., Falone, S., Di Loreto, S., Amicarelli, F., Ceru, M.P. (2009). Neuronal response of peroxisomal and peroxisome-related proteins to chronic and acute Abeta injury. *Curr Alzheimer Res* 6, 238-251.
58. Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Lluís, J.M., Coll, O., Mari, M., Fernandez-Checa, J.C. (2003). Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 278, 33928-33935.
59. Collison, K.S., Makhoul, N.J., Inglis, A., Al-Johi, M., Zaidi, M.Z., Maqbool, Z., Saleh, S.M., Bakheet, R., Mondreal, R., Al-Rabiah, R., Shoukri, M., Milgram, N.W., Al-Mohanna, F.A. (2010). Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory. *Physiol Behav* 99, 334-342.
60. Cook, D.G., Forman, M.S., Sung, J.C., Leight, S., Kolson, D.L., Iwatsubo, T., Lee, V.M., Doms, R.W. (1997). Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 3, 1021-1023.
61. Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.W., Kovacina, K.S., Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 162, 313-319.
62. Cooper, J.H. (1974). Selective amyloid staining as a function of amyloid composition and structure. Histochemical analysis of the alkaline Congo red, standardized toluidine blue, and iodine methods. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 31, 232-238.
63. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
64. Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., Turner, A.J. (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.
65. Costantini, C., Ko, M.H., Jonas, M.C., Puglielli, L. (2007). A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J* 407, 383-395.
66. Coulson, E.J., Barrett, G.L., Storey, E., Bartlett, P.F., Beyreuther, K., Masters, C.L. (1997). Down-regulation of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. *Brain Res* 770, 72-80.

67. Craig-Schmidt, M.C. (2006). World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis Supplements* 7, 1-4.
68. Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P. (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.
69. Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803.
70. Daigle, I., Li, C. (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12045-12049.
71. Datta, N.S., Wilson, G.N., Hajra, A.K. (1984). Deficiency of enzymes catalyzing the biosynthesis of glycerol-ether lipids in Zellweger syndrome. A new category of metabolic disease involving the absence of peroxisomes. *N Engl J Med* 311, 1080-1083.
72. Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., Sirinathsinghji, D.J. (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.
73. de Duve, C., de Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F. (1974). Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 23, 2495-2531.
74. de la Monte, S.M. (2012). Triangulated mal-signaling in Alzheimer's disease: roles of neurotoxic ceramides, ER stress, and insulin resistance reviewed. *J Alzheimers Dis* 30 Suppl 2, S231-249.
75. de Vet, E.C., Ijlst, L., Oostheim, W., Wanders, R.J., van den Bosch, H. (1998). Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. Fate in peroxisome biogenesis disorders and identification of the point mutation underlying a single enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273, 10296-10301.
76. Devore, E.E., Stampfer, M.J., Breteler, M.M., Rosner, B., Hee Kang, J., Okereke, O., Hu, F.B., Grodstein, F. (2009). Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 635-640.
77. Dislich, B., Lichtenthaler, S.F. (2012). The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3, 8.
78. Doell, D., Folmer, D., Lee, H., Honigfort, M., Carberry, S. (2012). Updated estimate of trans fat intake by the US population. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(6), 861-874.
79. Duckworth, W.C., Bennett, R.G., Hamel, F.G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19, 608-624.
80. Duhm, J., Engelmann, B., Schonhauer, U.M., Streich, S. (1993). Accelerated maximal velocity of the red blood cell Na⁺/K⁺ pump in hyperlipidemia is related to increase in 1-palmitoyl,2-arachidonoyl-plasmalogen phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1149, 185-188.
81. Eckert, G.P., Wood, W.G., Muller, W.E. (2010). Lipid membranes and beta-amyloid: a harmful connection. *Curr Protein Pept Sci* 11, 319-325.
82. Eckman, E.A., Reed, D.K., Eckman, C.B. (2001). Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 276, 24540-24548.
83. Eehalt, 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.
84. Emken, E.A. (1984). Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Annu Rev Nutr* 4, 339-376.

85. Engelhard, V.H., Esko, J.D., Storm, D.R., Glaser, M. (1976). Modification of adenylate cyclase activity in LM cells by manipulation of the membrane phospholipid composition in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4482-4486.
86. Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Ruitenber, A., Van Swieten, J.C., Hofman, A., Witteman, J.C., Breteler, M.M. (2002). Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study. *Neurology* 59, 1915-1921.
87. Engelmann, B. (2004). Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans* 32, 147-150.
88. Enig, M.G., Atal, S., Keeney, M., Sampugna, J. (1990). Isomeric trans fatty acids in the U.S. diet. *J Am Coll Nutr* 9, 471-486.
89. Evans, R.W. (2013). A rational approach to the management of chronic migraine. *Headache* 53, 168-176.
90. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (2001a). Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J Mol Neurosci* 16, 263-272; discussion 279-284.
91. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (2001b). Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist* 7, 232-245.
92. Farooqui, A.A., Rapoport, S.I., Horrocks, L.A. (1997a). Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem Res* 22, 523-527.
93. Farooqui, A.A., Rosenberger, T.A., Horrocks, L.A. (1997b). Arachidonic Acid, Neurotrauma, and Neurodegenerative Diseases. In *Handbook of Essential Fatty Acid Biology*, S. Yehuda, and D.I. Mostofsky, eds. (Totowa: Humana Press), pp. 277-296.
94. Farooqui, A.A., Wells, K., Horrocks, L.A. (1995). Breakdown of membrane phospholipids in Alzheimer disease. Involvement of excitatory amino acid receptors. *Mol Chem Neuropathol* 25, 155-173.
95. Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4162-4167.
96. Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., Hartmann, T. (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.
97. Favrelere, S., Stadelmann-Ingrand, S., Huguet, F., De Javel, D., Piriou, A., Tallineau, C., Durand, G. (2000). Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiol Aging* 21, 653-660.
98. Ferlinz, K., Hurwitz, R., Sandhoff, K. (1991). Molecular basis of acid sphingomyelinase deficiency in a patient with Niemann-Pick disease type A. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 1187-1191.
99. Field, C.J., Blewett, H.H., Proctor, S., Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 34, 979-991.
100. Filippov, V., Song, M.A., Zhang, K., Vinters, H.V., Tung, S., Kirsch, W.M., Yang, J., Duerksen-Hughes, P.J. (2012). Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 29, 537-547.
101. Filley, C.M., Rollins, Y.D., Anderson, C.A., Arciniegas, D.B., Howard, K.L., Murrell, J.R., Boyer, P.J., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Ghetti, B. (2007). The genetics of very early onset Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol* 20, 149-156.
102. Flammang, B., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Debayle, D., Dabert-Gay, A.S., Thevenet, A., Lauritzen, I., Checler, F. (2012). Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis* 30, 145-153.

103. Ford, D.A., Hale, C.C. (1996). Plasmalogen and anionic phospholipid dependence of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger. *FEBS Lett* 394, 99-102.
104. Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 437, 55-75.
105. Fraering, P.C., LaVoie, M.J., Ye, W., Ostaszewski, B.L., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J., Wolfe, M.S. (2004). Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry* 43, 323-333.
106. Frank, E.M. (1994). Effect of Alzheimer's disease on communication function. *J S C Med Assoc* 90, 417-423.
107. Fraser, P.E., Levesque, L., McLachlan, D.R. (1993). Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clinical biochemistry* 26, 339-349.
108. Frears, E.R., Stephens, D.J., Walters, C.E., Davies, H., Austen, B.M. (1999). The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10, 1699-1705.
109. Fukaya, T., Gondaira, T., Kashiyae, 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.
110. Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59, 1381-1389.
111. Funamoto, S., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Hirotsu, N., Saido, T.C., 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.
112. Geeraert, L., Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P.P. (1997). Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J* 327 (Pt 1), 125-132.
113. Ghafoorunissa, S.A. (2001). Influence of dietary partially hydrogenated fat high in trans fatty acids on lipid composition and function of intestinal brush border membrane in rats. *J Nutr Biochem* 12, 116-120.
114. Ghosh, M., Tucker, D.E., Burchett, S.A., Leslie, C.C. (2006). Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Progress in lipid research* 45, 487-510.
115. Ginsberg, L., Rafique, S., Xuereb, J.H., Rapoport, S.I., Gershfeld, N.L. (1995). Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 698, 223-226.
116. Glaser, P.E., Gross, R.W. (1994). Plasménylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry* 33, 5805-5812.
117. Gleason, M.M., Medow, M.S., Tulenko, T.N. (1991). Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 69, 216-227.
118. Glotzbach, R.K., Preskorn, S.H. (1982). Brain concentrations of tricyclic antidepressants: single-dose kinetics and relationship to plasma concentrations in chronically dosed rats. *Psychopharmacology* 78, 25-27.
119. Goedert, M., Sisodia, S.S., Price, D.L. (1991). Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 1, 441-447.
120. Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.
121. Green, R.C., Cupples, L.A., Kurz, A., Auerbach, S., Go, R., Sadovnick, D., Duara, R., Kukull, W.A., Chui, H., Edeki, T., Griffith, P.A., Friedland, R.P., Bachman, D., Farrer, L. (2003). Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. *Archives of neurology*, 60(5), 753.

122. Grimm, H.S., Beher, D., Lichtenthaler, S.F., Shearman, M.S., Beyreuther, K., Hartmann, T. (2003). gamma-Secretase cleavage site specificity differs for intracellular and secretory amyloid beta. *J Biol Chem* 278, 13077-13085.
123. Grimm, M.O., Grimm, H.S., Patzold, A.J., Zinser, E.G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J.A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., Hartmann, T. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7, 1118-1123.
124. Grimm, M.O., Grimm, H.S., 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.
125. Grimm, M.O., Grosgen, S., Riemenschneider, M., Tanila, H., Grimm, H.S., 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.
126. Grimm, M.O., Grosgen, S., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Friess, P., Muller, U., Fassbender, K., Riemenschneider, M., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2011b). Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 695413.
127. Grimm, M.O., Hauptenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Zimmer, V.C., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Lehmann, J., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2013). Effect of Different Phospholipids on alpha-Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 14, 5879-5898.
128. Grimm, M.O., Kuchenbecker, J., Grosgen, S., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Rothhaar, T.L., Friess, P., de Wilde, M.C., Broersen, L.M., Penke, B., Péter, M., Víg, L., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2011c). Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286, 14028-14039.
129. Grimm, M.O., Kuchenbecker, J., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Burg, V.K., Friess, P., Muller, U., Grimm, H.S., Riemenschneider, M., Hartmann, T. (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.
130. Grimm, M.O., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Friess, P., Kins, S., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2012). Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem* 23, 1214-1223.
131. Grimm, M.O., Zinser, E.G., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Kaestner, L., Bayer, T.A., Lipp, P., Müller, U., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2012). Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PloS one*, 7(3), e34095.
132. Gross, R.W. (1985). Identification of plasmalogen as the major phospholipid constituent of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 24, 1662-1668.
133. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.
134. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.
135. Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelbock, P., Dobeli, H. (2002). Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem* 277, 4687-4693.
136. Grziwa, B., Grimm, M.O., Masters, C.L., Beyreuther, K., Hartmann, T., Lichtenthaler, S.F. (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.

137. Gu, M., Kerwin, J.L., Watts, J.D., Aebersold, R. (1997). Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 244, 347-356.
138. Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., Li, W., Ruan, X., Luthra, A., Mount, H.T., Tandon, A., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. (2003). APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem* 278, 7374-7380.
139. Guan, Z., Wang, Y., Cairns, N.J., Lantos, P.L., Dallner, G., Sindelar, P.J. (1999). Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 740-747.
140. Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Luth, A., Bohmer, C., Amato, D., Muller, C.P., Tischbirek, C.H., Groemer, T.W., Tabatabai, G., Becker, K.A., Tripal, P., Staedtler, S., Ackermann, T.F., van Brederode, J., Alzheimer, C., Weller, M., Lang, U.E., Kleuser, B., Grassmé, H., Kornhuber, J. (2013). Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med*.
141. Gwon, A.R., Park, J.S., Arumugam, T.V., Kwon, Y.K., Chan, S.L., Kim, S.H., Baik, S.H., Yang, S., Yun, Y.K., Choi, Y., e Kim, S., Tang, S.C., Hyun, D.H., Cheng, A., Dann, C.E. 3rd, Bernier, M., Lee, J., Markesbery, W.R., Mattson, M.P., Jo, D.G. (2012). Oxidative lipid modification of nicastrin enhances amyloidogenic gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 11, 559-568.
142. Haapasalo, A., Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25, 3-28.
143. Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Oltersdorf, T., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1993). Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695, 109-116.
144. Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
145. Haass, C., Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
146. Hamazaki, H. (1996). A beta-amyloid peptide variant related with familial Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis is poorly eliminated by cathepsin D. *FEBS Lett* 397, 313-315.
147. 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.
148. Han, X. (2010). Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and the altered lipids at the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801, 774-783.
149. Han, X., D, M.H., McKeel, D.W., Jr., Kelley, J., Morris, J.C. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82, 809-818.
150. Han, X., Holtzman, D.M., McKeel, D.W., 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.
151. Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1632, 16-30.
152. Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., Katta, V., Rogers, G., Vassar, R., Citron, M. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* 275, 21099-21106.

153. Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
154. Harris, B., Pereira, I., Parkin, E. (2009). Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 1296, 203-215.
155. Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3, 1016-1020.
156. Hashimoto, M., Hossain, S., Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem* 293, 1-8.
157. Hattori, C., Asai, M., Onishi, H., Sasagawa, N., Hashimoto, Y., Saido, T.C., Maruyama, K., Mizutani, S., Ishiura, S. (2006). BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J Neurosci Res* 84, 912-917.
158. He, X., Chang, W.P., Koelsch, G., Tang, J. (2002). Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett* 524, 183-187.
159. He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.X., Schuchman, E.H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 398-408.
160. He, X., Li, F., Chang, W.P., Tang, J. (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* 280, 11696-11703.
161. He, X., Zhu, G., Koelsch, G., Rodgers, K.K., Zhang, X.C., Tang, J. (2003). Biochemical and structural characterization of the interaction of memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain with the VHS domain of GGA proteins. *Biochemistry* 42, 12174-12180.
162. Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6, e257.
163. Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., De Strooper, B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2, 461-462.
164. Heymans, H.S., Schutgens, R.B., Tan, R., van den Bosch, H., Borst, P. (1983). Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature* 306, 69-70.
165. Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2012). Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol* 3, 189.
166. Holmes, O., Paturi, S., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2012). Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry* 51, 3565-3575.
167. Holt, S., Schmiedl, S., Thurmann, P.A. (2010). Potentially inappropriate medications in the elderly: the PRISCUS list. *Deutsches Arzteblatt international* 107, 543-551.
168. Hoogenraad, T.U., Jansen, G.H. (1994). Alzheimer type II cells in multiple system atrophy? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 9, 472-473.
169. Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D.P., Ferlinz, K., Bisgaier, C.L., Sandhoff, K., Desnick, R.J., Stewart, C.L., Schuchman, E.H. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* 10, 288-293.
170. Horrocks, L.A., Farooqui, A.A. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 70, 361-372.
171. Horrocks, L.A., Sharma, M. (1982). Plasmalogen and O-alkyl glycerophospholipids. In *Phospholipids*, J.N. Hawthorne, and G.B. Ansell, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 51-93.
172. Howell, S., Nalbantoglu, J., Crine, P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 16, 647-652.

173. Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Hennekens, C.H., Willett, W.C. (1997). Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 337, 1491-1499.
174. Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M., Nakagawa, H. (2001). Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem* 276, 47863-47868.
175. Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-1525.
176. Hulshof, K.F., van Erp-Baart, M.A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S.M., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A.H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J.M., Aro, A., Kafatos, A.G., Lanzmann-Petithory, D., van Poppel, G. (1999). Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *European journal of clinical nutrition* 53, 143-157.
177. Hung, A.Y., Koo, E.H., Haass, C., Selkoe, D.J. (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.
178. Hung, A.Y., Selkoe, D.J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13, 534-542.
179. Hur, J.Y., Welander, H., Behbahani, H., Aoki, M., Franberg, J., Winblad, B., Frykman, S., Tjernberg, L.O. (2008). Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J* 275, 1174-1187.
180. Hurwitz, R., Ferlinz, K., Sandhoff, K. (1994). The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 447-450.
181. Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., Doms, R.W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 33729-33737.
182. Ibrahim, A., Natrajan, S., Ghafoorunissa, R. (2005). Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism* 54, 240-246.
183. Ikezu, T., Trapp, B.D., Song, K.S., Schlegel, A., Lisanti, M.P., Okamoto, T. (1998). Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273, 10485-10495.
184. Israil, A., Ahmed, S., Rahman, K.M., Uddin, M.J., Dey, S.K., Battacharjee, M., Mondal, G., Ali, M.A., Alam, M.N., Miah, A.H., Uddin, M.S. (2013). Efficacy of amitriptyline, pizotifen and propranolol in the prevention of migraine. *Mymensingh Med J* 22, 93-100.
185. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., Saido, T.C. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550-1552.
186. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6, 143-150.
187. Iwatsubo, T. (1998). Abeta42, presenilins, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19, S11-13.
188. 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.
189. Jakobsen, M.U., Overvad, K., Dyerberg, J., Heitmann, B.L. (2008). Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 37, 173-182.

190. 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.
191. Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
192. Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631.
193. Jorm, A.F., Van Duijn, C.M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A.B., Heyman, A., Kokmen, E., Kondo, K., Mortimer, J. A., Rocca, W.A., Shalat, S.L., Soininen, H. (1991). Psychiatric history and related exposures as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. *International Journal of Epidemiology*, 20(Supplement 2), S43-S47.
194. Kaduszkiewicz, H., Zimmermann, T., Beck-Bornholdt, H.P., van den Bussche, H. (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ* 331, 321-327.
195. Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., Breteler, M.M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42, 776-782.
196. Kalmijn, S., van Boxtel, M.P., Ocke, M., Verschuren, W.M., Kromhout, D., Launer, L.J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62, 275-280.
197. Kang, E.L., Cameron, A.N., Piazza, F., Walker, K.R., Tesco, G. (2010). Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem* 285, 24108-24119.
198. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., 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.
199. Kaplan, H.A., Woloski, B.M., Hellman, M., Jamieson, J.C. (1983). Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *J Biol Chem* 258, 11505-11509.
200. Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., Huovila, A.P. (2000). Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 15, 547-560.
201. Katsel, P., Li, C., Haroutunian, V. (2007). Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 32, 845-856.
202. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L.H., Wen-Lang, L., Dickson, D.W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K.H., Younkin, S.G. (2004). Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 3801-3809.
203. Kaye, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Nacula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., Glabe, C.G. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Molecular neurodegeneration* 2, 18.
204. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489.
205. Kehoe, P.G., Wilcock, G.K. (2007). Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 6, 373-378.

206. Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M., Woolf, C.J., Kovacs, D.M. (2007a). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* 9, 755-764.
207. Kim, J., Kleizen, B., Choy, R., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., Schekman, R.W. (2007b). Biogenesis of gamma-secretase early in the secretory pathway. *J Cell Biol* 179, 951-963.
208. Kim, S.I., Yi, J.S., Ko, Y.G. (2006). Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts. *J Cell Biochem* 99, 878-889.
209. Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275, 3173-3178.
210. Kitagawa, S., Kotani, K., Kametani, F. (1990). Inhibitory mechanism of cis-polyunsaturated fatty acids on platelet aggregation: the relation with their effects on Ca²⁺ mobilization, cyclic AMP levels and membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1054, 114-118.
211. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H. (2002). Apolipoprotein E ϵ 4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Annals of Internal Medicine*, 137(3), 149-155.
212. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447-1451.
213. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2, 371-375.
214. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5815-5820.
215. Kolzer, M., Werth, N., Sandhoff, K. (2004). Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Lett* 559, 96-98.
216. Koo, E.H., Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269, 17386-17389.
217. Kornhuber, J., Medlin, A., Bleich, S., Jendrossek, V., Henkel, A.W., Wiltfang, J., Gulbins, E. (2005). High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *J Neural Transm* 112, 1583-1590.
218. Kornhuber, J., Muehlbacher, M., Trapp, S., Pechmann, S., Friedl, A., Reichel, M., Muhle, C., Terfloth, L., Groemer, T.W., Spitzer, G.M., Liedl, K.R., Gulbins, E., Tripal, P. (2011). Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PLoS One* 6, e23852.
219. Kornhuber, J., Reichel, M., Tripal, P., Groemer, T.W., Henkel, A.W., Muhle, C., Gulbins, E. (2009). The role of ceramide in major depressive disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259 Suppl 2, S199-204.
220. Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Muhle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., Gulbins, E. (2010). Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* 26, 9-20.
221. Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Terfloth, L., Bleich, S., Wiltfang, J., Gulbins, E. (2008). Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model. *J Med Chem* 51, 219-237.
222. Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.W., Moir, R.D., Merriam, D.E., Hollister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., Hyman, B.T., Tanzi, R.E., Wasco, W. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 2, 224-229.

223. Kovacs, D.M., Gersbacher, M.T., Kim, D.Y. (2010). Alzheimer's secretases regulate voltage-gated sodium channels. *Neurosci Lett* 486, 68-72.
224. Kremer, J.J., Pallitto, M.M., Sklansky, D.J., Murphy, R.M. (2000). Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* 39, 10309-10318.
225. Kuczynski, B., Reo, N.V. (2006). Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem Res* 31, 639-656.
226. Kuhnt, K., Baehr, M., Rohrer, C., Jahreis, G. (2011). Trans fatty acid isomers and the trans-9/trans-11 index in fat containing foods. *Eur J Lipid Sci Technol* 113, 1281-1292.
227. Kurochkin, I.V., Goto, S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345, 33-37.
228. 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.
229. Larque, E., Garcia-Ruiz, P.A., Perez-Llamas, F., Zamora, S., Gil, A. (2003). Dietary trans fatty acids alter the compositions of microsomes and mitochondria and the activities of microsome delta6-fatty acid desaturase and glucose-6-phosphatase in livers of pregnant rats. *J Nutr* 133, 2526-2531.
230. Laryea, M., Cieslicki, P., Diekmann, E., Wendel, U. (1990). Age-dependent fatty acid composition of erythrocyte membrane phospholipids in healthy children. *Z Ernährungswiss* 29, 284-294.
231. Lau, T.L., Ambroggio, E.E., Tew, D.J., Cappai, R., Masters, C.L., Fidelio, G.D., Barnham, K.J., Separovic, F. (2006). Amyloid-beta peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *J Mol Biol* 356, 759-770.
232. Lawson, R.E., Moss, A.R., Givens, D.I. (2001). The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutrition research reviews* 14, 153-172.
233. Lazarov, O., Morfini, G.A., Lee, E.B., Farah, M.H., Szodorai, A., DeBoer, S.R., Koliatsos, V.E., Kins, S., Lee, V.M., Wong, P.C., Price, D.L., Brady, S.T., Sisodia, S.S. (2005). Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *J Neurosci* 25, 2386-2395.
234. Lee, S.J., Liyanage, U., Bickel, P.E., Xia, W., Lansbury, P.T., Jr., Kosik, K.S. (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* 4, 730-734.
235. Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., Selkoe, D.J. (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093.
236. LeVine, H., 3rd (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2, 404-410.
237. LeVine, H., 3rd (1997). Stopped-flow kinetics reveal multiple phases of thioflavin T binding to Alzheimer beta (1-40) amyloid fibrils. *Arch Biochem Biophys* 342, 306-316.
238. Li, G., Wang, L.Y., Shofer, J.B., Thompson, M.L., Peskind, E.R., McCormick, W., Bowen, J.D., Crane, P.K., Larson, E. B. (2011). Temporal relationship between depression and dementia: findings from a large community-based 15-year follow-up study. *Archives of general psychiatry*, 68(9), 970.
239. Li, R., Lindholm, K., Yang, L.B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., Shen, Y. (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3632-3637.
240. Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Jalbert, S.M., Schaefer, E.J. (1999). Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N Engl J Med* 340, 1933-1940.

241. Lichtenthaler, S.F. (2006). Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis* 3, 262-269.
242. Lichtenthaler, S.F. (2011). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116, 10-21.
243. Lin, J., Yan, X., Markus, A., Redies, C., Rolfs, A., Luo, J. (2010). Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. *Dev Dyn* 239, 1246-1254.
244. Liu, Q., Zerbini, C.V., Zhang, J., Hoe, H.S., Wang, B., Cole, S.L., 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.
245. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 402-408.
246. Llano, E., Adam, G., Pendas, A.M., Quesada, V., Sanchez, L.M., Santamaria, I., Noselli, S., Lopez-Otin, C. (2002). Structural and enzymatic characterization of Drosophila Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 277, 23321-23329.
247. Loffhagen, N., Hartig, C., Babel, W. (2004). Pseudomonas putida NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the trans/cis ratio of fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 317-323.
248. Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S.J., Creemers, J., Seidah, N., Checler, F. (2001). Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem* 76, 1532-1539.
249. Love, S., Saitoh, T., Quijada, S., Cole, G.M., Terry, R.D. (1988). Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 47, 393-405.
250. Luo, L.Q., Martin-Morris, L.E., White, K. (1990). Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10, 3849-3861.
251. MacIntyre, A.C., Cutler, D.J. (1988). The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases. *Biopharm Drug Dispos* 9, 513-526.
252. Malaplate-Armand, C., Florent-Bechard, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J.L., Oster, T., Pillot, T. (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23, 178-189.
253. Malnar, M., Kosicek, M., Lisica, A., Posavec, M., Krolo, A., Njavro, J., Omerbasic, D., Tahirovic, S., Hecimovic, S. (2012). Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1270-1283.
254. Mandal, P.K., McClure, R.J., Pettegrew, J.W. (2004). Interactions of Abeta(1-40) with glycerophosphocholine and intact erythrocyte membranes: fluorescence and circular dichroism studies. *Neurochem Res* 29, 2273-2279.
255. Mandal, P.K., Pettegrew, J.W. (2004). Alzheimer's disease: soluble oligomeric Abeta(1-40) peptide in membrane mimic environment from solution NMR and circular dichroism studies. *Neurochem Res* 29, 2267-2272.
256. Mandel, H., Sharf, R., Berant, M., Wanders, R.J., Vreken, P., Aviram, M. (1998). Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 369-373.
257. Marchesini, N., Hannun, Y.A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* 82, 27-44.
258. Marchesini, N., Luberto, C., Hannun, Y.A. (2003). Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 278, 13775-13783.

259. Masliah, E., Westland, C.E., Rockenstein, E.M., Abraham, C.R., Mallory, M., Veinberg, I., Sheldon, E., Mucke, L. (1997). Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience* 78, 135-146.
260. Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245-4249.
261. Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A., Pfrieder, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354-1357.
262. Mayeux, R., Ottman, R., Tang, M.X., Noboa-Bauza, L., Marder, K., Gurland, B., Stern, Y. (1993). Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol* 33, 494-501.
263. McDermott, J.R., Gibson, A.M. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res* 22, 49-56.
264. McGeer, P.L., McGeer, E.G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 22, 799-809.
265. McLauren Dorrance, A., Graham, D., Dominiczak, A., Fraser, R. (2000). Inhibition of nitric oxide synthesis increases erythrocyte membrane fluidity and unsaturated fatty acid content. *Am J Hypertens* 13, 1194-1202.
266. McShane, R., Areosa Sastre, A., Minakaran, N. (2006). Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003154.
267. Mielke, M.M., Bandaru, V.V., Haughey, N.J., Xia, J., Fried, L.P., Yasar, S., Albert, M., Varma, V., Harris, G., Schneider, E.B., Rabins, P.V., Bandeen-Roche, K., Lyketsos, C.G., Carlson, M.C. (2012). Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 79, 633-641.
268. Mielke, M.M., Haughey, N.J. (2012). Could plasma sphingolipids be diagnostic or prognostic biomarkers for Alzheimer's disease? *Clin Lipidol* 7, 525-536.
269. Mielke, M.M., Haughey, N.J., Bandaru, V.V., Weinberg, D.D., Darby, E., Zaidi, N., Pavlik, V., Doody, R.S., Lyketsos, C.G. (2011). Plasma sphingomyelins are associated with cognitive progression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 27, 259-269.
270. Miller, S. (2012). The acute and preventative treatment of episodic migraine. *Ann Indian Acad Neurol* 15, S33-39.
271. Miyazawa, T., Kanno, S., Eitsuka, T., Nakagawa, K. (2006). Plasmalogen: A Short Review and Newly-discovered Functions. In *Dietary Fats and Risk of Chronic Disease*, Y. Yanagita, H.R. Knapp, and Y.S. Huang, eds. (AOCS Publishing), pp. 196-202.
272. Morgado, N., Galleguillos, A., Sanhueza, J., Garrido, A., Nieto, S., Valenzuela, A. (1998). Effect of the degree of hydrogenation of dietary fish oil on the trans fatty acid content and enzymatic activity of rat hepatic microsomes. *Lipids* 33, 669-673.
273. Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Aggarwal, N., Schneider, J., Wilson, R.S. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60, 194-200.
274. Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Wilson, R.S. (2004). Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology* 62, 1573-1579.
275. Morris, M.C., Evans, D.A., Tangney, C.C., Bienias, J.L., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Scherr, P.A. (2006). Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol* 63, 1085-1088.
276. Motard-Belanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., Lamarche, B. (2008). Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 87, 593-599.

277. Motoki, K., Kume, H., Oda, A., Tamaoka, A., Hosaka, A., Kametani, F., Araki, W. (2012). Neuronal beta-amyloid generation is independent of lipid raft association of beta-secretase BACE1: analysis with a palmitoylation-deficient mutant. *Brain and behavior* 2, 270-282.
278. Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 354, 1601-1613.
279. Murphy, E.J., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I., Shetty, H.U. (2000). Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain. *Brain Res* 867, 9-18.
280. Naqvi, A.Z., Harty, B., Mukamal, K.J., Stoddard, A.M., Vitolins, M., Dunn, J.E. (2011). Monounsaturated, trans, and saturated Fatty acids and cognitive decline in women. *J Am Geriatr Soc* 59, 837-843.
281. Ogawa, M., Tsukuda, M., Yamaguchi, T., Ikeda, K., Okada, T., Yano, Y., Hoshino, M., Matsuzaki, K. (2011). Ganglioside-mediated aggregation of amyloid beta-proteins (Abeta): comparison between Abeta-(1-42) and Abeta-(1-40). *J Neurochem* 116, 851-857.
282. Okada, T., Ikeda, K., Wakabayashi, M., Ogawa, M., Matsuzaki, K. (2008). Formation of toxic Abeta(1-40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in Abeta(1-40) fibrils. *J Mol Biol* 382, 1066-1074.
283. Okereke, O.I., Rosner, B.A., Kim, D.H., Kang, J.H., Cook, N.R., Manson, J.E., Buring, J.E., Willett, W.C., Grodstein, F. (2012). Dietary fat types and 4-year cognitive change in community-dwelling older women. *Ann Neurol* 72, 124-134.
284. Oltersdorf, T., Ward, P.J., Henriksson, T., Beattie, E.C., Neve, R., Lieberburg, I., Fritz, L.C. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 265, 4492-4497.
285. Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2008). Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem* 283, 22529-22540.
286. Panchal, M., Loeper, J., Cossec, J.C., Perruchini, C., Lazar, A., Pompon, D., Duyckaerts, C. (2010). Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51, 598-605.
287. Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Muller, U., St George Hyslop, P., Checler, F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554.
288. Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38, 9728-9734.
289. Peters, I., Igbavboa, U., Schutt, T., Haidari, S., Hartig, U., Rosello, X., Bottner, S., Copanaki, E., Deller, T., Kogel, D., Wood, W.G., Müller, W.E., Eckert, G.P. (2009). The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim Biophys Acta* 1788, 964-972.
290. Pettegrew, J.W., Panchalingam, K., Hamilton, R.L., McClure, R.J. (2001). Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 26, 771-782.
291. Petursdottir, A.L., Farr, S.A., Morley, J.E., Banks, W.A., Skuladottir, G.V. (2008). Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on brain lipid fatty acid composition, learning ability, and memory of senescence-accelerated mouse. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 63, 1153-1160.
292. Phivilay, A., Julien, C., Tremblay, C., Berthiaume, L., Julien, P., Giguere, Y., Calon, F. (2009). High dietary consumption of trans fatty acids decreases brain docosahexaenoic acid but does not alter amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 159, 296-307.
293. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., Mahley, R.W. (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917, 148-161.

294. Prasad, M.R., Lovell, M.A., Yatin, M., Dhillon, H., Markesbery, W.R. (1998). Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 23, 81-88.
295. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.
296. Prince, M., Bryce, R., Ferri, C. (2011). World Alzheimer Report 2011, the benefits of early diagnosis and intervention. London, Alzheimer's Disease International.
297. Prince, M., Jackson, J. (2009). World Alzheimer Report 2009. London, Alzheimer's Disease International.
298. Prokop, S., Haass, C., Steiner, H. (2005). Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem* 94, 57-62.
299. Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-23261.
300. Puglielli, L., Ellis, B.C., Saunders, A.J., Kovacs, D.M. (2003). Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* 278, 19777-19783.
301. Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., Ihara, Y. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
302. Qiu, W.Q., Walsh, D.M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M.B., Rosner, M.R., Safavi, A., Hersh, L.B., Selkoe, D.J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273, 32730-32738.
303. Rajendran, L., Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-1102.
304. Rankin, C.A., Gamblin, T.C. (2008). Assessing the toxicity of tau aggregation. *J Alzheimers Dis* 14, 411-416.
305. Raychaudhuri, M., Mukhopadhyay, D. (2011). AICD Overexpression in Neuro 2A Cells Regulates Expression of PTCH1 and TRPC5. *Int J Alzheimers Dis* 2011.
306. Riddell, D.R., Christie, G., Hussain, I., Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Current biology : CB* 11, 1288-1293.
307. Roach, C., Feller, S.E., Ward, J.A., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Stillwell, W. (2004). Comparison of cis and trans fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry* 43, 6344-6351.
308. Rog, T., Stimson, L.M., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M. (2008). Replacing the cholesterol hydroxyl group with the ketone group facilitates sterol flip-flop and promotes membrane fluidity. *J Phys Chem B* 112, 1946-1952.
309. Rohan de Silva, H.A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L.S., Wilkinson, S.L., Patel, A.J. (1997). Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 47, 147-156.
310. Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G., Sandhoff, K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 14-20.
311. Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hauptenthal, V.J., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Mett, J., Riemenschneider, M., Grimm, H.S., Hartmann, T., Grimm, M.O. (2012). Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012, 141240.

312. Saczynski, J.S., Beiser, A., Seshadri, S., Auerbach, S., Wolf, P.A., Au R. (2010). Depressive symptoms and risk of dementia: The Framingham Heart Study. *Neurology* 6, 75(1): 35–41.
313. Sanchez-Mejia, R.O., Newman, J.W., Toh, S., Yu, G.Q., Zhou, Y., Halabisky, B., Cisse, M., Scearce-Levie, K., Cheng, I.H., Gan, L., Palop, J.J., Bonventre, J.V., Mucke, L. (2008). Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 11, 1311-1318.
314. Sandbrink, R., Hartmann, T., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1996). Genes contributing to Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 1, 27-40.
315. Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1994). APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol Dis* 1, 13-24.
316. Sargis, R.M., Subbaiah, P.V. (2003). Trans unsaturated fatty acids are less oxidizable than cis unsaturated fatty acids and protect endogenous lipids from oxidation in lipoproteins and lipid bilayers. *Biochemistry* 42, 11533-11543.
317. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports* 2, 835-841.
318. Sato, H., Tomimoto, H., Ohtani, R., Kitano, T., Kondo, T., Watanabe, M., Oka, N., Akiguchi, I., Furuya, S., Hirabayashi, Y., Okazaki, T. (2005). Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 130, 657-666.
319. Saunders, A.M., Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E4 allele frequency, ischemic cerebrovascular disease, and Alzheimer's disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 24, 1416-1417.
320. Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., Roses, A.D. (1993). Association of apolipoprotein E4 allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472.
321. Schagger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
322. Schedin, S., Sindelar, P.J., Pentchev, P., Brunk, U., Dallner, G. (1997). Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 272, 6245-6251.
323. Schott, J.M., Price, S.L., Frost, C., Whitwell, J.L., Rossor, M.N., Fox, N.C. (2005). Measuring atrophy in Alzheimer disease: a serial MRI study over 6 and 12 months. *Neurology* 65, 119-124.
324. Schrader, M., Fahimi, H.D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122, 383-393.
325. Selenskas, S.L., Ip, M.M., Ip, C. (1984). Similarity between trans fat and saturated fat in the modification of rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 44, 1321-1326.
326. Selkoe, D.J. (2001). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32, 177-180.
327. Selkoe, D.J., Wolfe, M.S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131, 215-221.
328. Selkoe, D.J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M.B., Koo, E.H., Teplow, D.B., 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.
329. Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M.K., Berezovska, O., Hyman, B.T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P.C., Karran, E., Wiltfang, J., D'Hooge, R.,

- De Strooper, B. (2009). gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* 324, 639-642.
330. Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Sudhof, T., Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
331. Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., Nukina, N. (2008). Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Mol Cell Biol* 28, 3663-3671.
332. Shirotani, K., Edbauer, D., Kostka, M., Steiner, H., Haass, C. (2004). Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem* 89, 1520-1527.
333. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460-6464.
334. Simons, M., Schwarzler, F., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Beyreuther, K., Dichgans, J., Wormstall, H., Hartmann, T., Schulz, J.B. (2002). Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 52, 346-350.
335. Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6075-6079.
336. Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., Lee, V.M. (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* 275, 2568-2575.
337. Smith, A.D., Smith, S.M., de Jager, C.A., Whitbread, P., Johnston, C., Agacinski, G., Oulhaj, A., Bradley, K.M., Jacoby, R., Refsum, H. (2010). Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 5, e12244.
338. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
339. Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Müller, U., Kins, S., Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24, 3624-3634.
340. Soininen, H., Liu, Y., Rueckert, D., Lötjönen, J. (2012). Hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis Manag*, 197-209.
341. Song, H., Ritz, S., Knoll, W., Sinner, E.K. (2009). Conformation and topology of amyloid beta-protein adsorbed on a tethered artificial membrane probed by surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *J Struct Biol* 168, 117-124.
342. Soni, S.P., Ward, J.A., Sen, S.E., Feller, S.E., Wassall, S.R. (2009). Effect of trans unsaturation on molecular organization in a phospholipid membrane. *Biochemistry* 48, 11097-11107.
343. Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Lopez, J., Launer, L.J., Browne, P., Wasser, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., Ziolkowski, C. (2005a). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol* 62, 753-757.
344. Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Lopez, J., Launer, L.J., Petanceska, S., Browne, P., Wassar, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., Ziolkowski, C. (2005b). Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. *Curr Alzheimer Res* 2, 343-353.
345. Spasic, D., Annaert, W. (2008). Building gamma-secretase: the bits and pieces. *J Cell Sci* 121, 413-420.

346. Speck, C.E., Kukull, W.A., Brenner, D.E., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Ten, L., Pfanschmidt, M.L., Thompson, J.D., Larson, E. B. (1995). History of depression as a risk factor for Alzheimer's disease. *Epidemiology*, 6(4), 366-369.
347. Spiegel, S., Merrill, A.H., Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 10, 1388-1397.
348. Spillantini, M.G., Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 21, 428-433.
349. St George-Hyslop, P., Fraser, P.E. (2012). Assembly of the presenilin gamma-/epsilon-secretase complex. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 84-88.
350. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., Haass, C. (2002). PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 277, 39062-39065.
351. Stender, S., Astrup, A., Dyerberg, J. (2008). Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food Nutr Res* 52.
352. Stender, S., Dyerberg, J., Holmer, G., Ovesen, L., Sandstrom, B. (1995). The influence of trans fatty acids on health: a report from the Danish Nutrition Council. *Clin Sci (Lond)* 88, 375-392.
353. Strisovsky, K., Sharpe, H.J., Freeman, M. (2009). Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell* 36, 1048-1059.
354. Sugimoto, I., Futakawa, S., Oka, R., Ogawa, K., Marth, J.D., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Hashimoto, Y., Kitazume, S. (2007). Beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase I cleavage by BACE1 enhances the sialylation of soluble glycoproteins. A novel regulatory mechanism for alpha2,6-sialylation. *J Biol Chem* 282, 34896-34903.
355. Suliman, T.E., Jiang, J., Liu, Y. (2013). Zero trans fatty acids and other quality attributes during sunflower oil deodorizing compare between short path distillation and conventional method. *Int J Eng Sci* 5, 654-662.
356. Sunshine, I., Baeumler, J. (1963). A Fatal Case of Poisoning with Amitriptyline. *Nature* 199, 1103-1104.
357. Takahashi, T., Desnick, R.J., Takada, G., Schuchman, E.H. (1992a). Identification of a missense mutation (S436R) in the acid sphingomyelinase gene from a Japanese patient with type B Niemann-Pick disease. *Hum Mutat* 1, 70-71.
358. Takahashi, T., Suchi, M., Desnick, R.J., Takada, G., Schuchman, E.H. (1992b). Identification and expression of five mutations in the human acid sphingomyelinase gene causing types A and B Niemann-Pick disease. Molecular evidence for genetic heterogeneity in the neuronopathic and non-neuronopathic forms. *J Biol Chem* 267, 12552-12558.
359. Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Tomita, T., Iwatsubo, T. (2011). BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* 31, 6850-6857.
360. Tamagno, E., Guglielmotto, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., Muraca, G., Danni, O., Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., Jo, D.G., Mattson, M.P., Tabaton, M. (2008). Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 104, 683-695.
361. Tamaoka, A., Kondo, T., Odaka, A., Sahara, N., Sawamura, N., Ozawa, K., Suzuki, N., Shoji, S., Mori, H. (1994). Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 834-842.
362. Tan, J.L., Li, Q.X., Ciccotosto, G.D., Crouch, P.J., Culvenor, J.G., White, A.R., Evin, G. (2013). Mild Oxidative Stress Induces Redistribution of BACE1 in Non-Apoptotic

- Conditions and Promotes the Amyloidogenic Processing of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein. *PLoS One* 8, e61246.
363. Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R., Jing, N. (2003). Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *The European journal of neuroscience* 18, 102-108.
364. Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
365. Taragano, F.E., Lyketsos, C.G., Mangone, C.A., Allegri, R.F., Comesana-Diaz, E. (1997). A double-blind, randomized, fixed-dose trial of fluoxetine vs. amitriptyline in the treatment of major depression complicating Alzheimer's disease. *Psychosomatics* 38, 246-252.
366. Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmuller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kurthy, G., Schmid, K.W., Weller, M., Tümmeler, B., Lang, F., Grassme, H., Döring, G., Gulbins, E. (2008). Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 14, 382-391.
367. Terry, R.D. (1995). Biologic differences between early- and late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9 Suppl 1, S26-27.
368. Toman, R.E., Movsesyan, V., Murthy, S.K., Milstien, S., Spiegel, S., Faden, A.I. (2002). Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of ceramide levels during neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 68, 323-330.
369. 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.
370. Tuppo, E.E., Arias, H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 289-305.
371. Urano, Y., Hayashi, I., Isoo, N., Reid, P.C., Shibasaki, Y., Noguchi, N., Tomita, T., Iwatsubo, T., Hamakubo, T., Kodama, T. (2005). Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res* 46, 904-912.
372. Van Erp-Baart, M.A., Couet, C., Cuadrado, C., Kafatos, A., Stanley, J., Van Poppel, G. (1998). Trans Fatty Acids in Bakery Products from 14 European Countries: the TRANSFAIR Study. *J Food Compost Anal* 11, 161-169.
373. Vandel, S., Vandel, B., Sandoz, M., Allers, G., Bechtel, P., Volmat, R. (1978). Clinical response and plasma concentration of amitriptyline and its metabolite nortriptyline. *European journal of clinical pharmacology* 14, 185-190.
374. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
375. Vassar, R., Kovacs, D.M., Yan, R., Wong, P.C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29, 12787-12794.
376. Verdier, Y., Zarandi, M., Penke, B. (2004). Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci* 10, 229-248.
377. Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279, 44945-44954.
378. Vetrivel, K.S., Meckler, X., Chen, Y., Nguyen, P.D., Seidah, N.G., Vassar, R., Wong, P.C., Fukata, M., Kounnas, M.Z., Thinakaran, G. (2009). Alzheimer disease A β production in

- the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem* 284, 3793-3803.
379. Vetrivel, K.S., Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66, S69-73.
380. von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., 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.
381. Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M., Walter, J. (2005). GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Cell Neurosci* 29, 453-461.
382. Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Golde, T.E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9, 11-23.
383. Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276, 14634-14641.
384. Wang, D.S., Dickson, D.W., Malter, J.S. (2006). beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006, 58406.
385. Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Dominguez, B., Lee, K.F., Gan, W.B., Zheng, H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-1225.
386. Waschuk, S.A., Elton, E.A., Darabie, A.A., Fraser, P.E., McLaurin, J.A. (2001). Cellular membrane composition defines A beta-lipid interactions. *J Biol Chem* 276, 33561-33568.
387. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., 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.
388. Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
389. Weihofen, A., Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13, 71-78.
390. 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.
391. Wells, K., Farooqui, A.A., Liss, L., Horrocks, L.A. (1995). Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem Res* 20, 1329-1333.
392. Whitmer, R.A. (2007). Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Current neurology and neuroscience reports* 7, 373-380.
393. Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
394. Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
395. Wolozin, B. (2004). Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* 41, 7-10.
396. Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Cesesia, G.G., Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57, 1439-1443.
397. Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., Kazis, L.E. (2007). Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC medicine* 5, 20.

398. Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280, 23009-23017.
399. Wouters, K., Shiri-Sverdlov, R., van Gorp, P.J., van Bilsen, M., Hofker, M.H. (2005). Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and ldlr mice. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 43, 470-479.
400. Wyss-Coray, T., Mucke, L. (2000). Ibuprofen, inflammation and Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 973-974.
401. Yamada, T., Miyazaki, K., Koshikawa, N., Takahashi, M., Akatsu, H., Yamamoto, T. (1995). Selective localization of gelatinase A, an enzyme degrading beta-amyloid protein, in white matter microglia and in Schwann cells. *Acta Neuropathol* 89, 199-203.
402. Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., Xu, H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* 276, 36788-36796.
403. Yanagihara, T., Cumings, J.N. (1969). Alterations of phospholipids, particularly plasmalogens, in the demyelination of multiple sclerosis as compared with that of cerebral oedema. *Brain* 92, 59-70.
404. Yang, D.S., Tandon, A., Chen, F., Yu, G., Yu, H., Arawaka, S., Hasegawa, H., Duthie, M., Schmidt, S.D., Ramabhadran, T.V., Nixon, R.A., Mathews, P.M., Gandy, S.E., Mount, H.T., St George-Hyslop, P., Fraser, P.E. (2002). Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem* 277, 28135-28142.
405. Yang, H.C., Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (1996). Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14, 9-13.
406. Yang, L.B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., Shen, Y. (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9, 3-4.
407. Yang, X., Sheng, W., Sun, G.Y., Lee, J.C. (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58, 321-329.
408. Zavodnik, I.B., 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.
409. Zhang, Y.W., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F.F., 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.
410. Zhao, G., Cui, M.Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., Xu, X. (2005). gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280, 37689-37697.
411. Zhao, G., Liu, Z., Ilagan, M.X., Kopan, R. (2010). Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J Neurosci* 30, 1648-1656.
412. Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.Z., Kim, S.H., Xu, X. (2004). Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279, 50647-50650.
413. Zoeller, R.A., Lake, A.C., Nagan, N., Gaposchkin, D.P., Legner, M.A., Lieberthal, W. (1999). Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 338 (Pt 3), 769-776.
414. Zoeller, R.A., Morand, O.H., Raetz, C.R. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 263, 11590-11596.

7 Publikationen

Erstautorenschaften

Grimm M.O.*, **Rothhaar T.L.***, Grösgen S., Burg V.K., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Friess P., Kins S., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). *Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP)*. J Nutr Biochem, 23(10):1214-23. (*equally contributed)

Rothhaar T.L., Grösgen S., Hauptenthal V.J., Burg V.K., Hundsdörfer B., Mett J., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2012). *Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease*. ScientificWorldJournal 2012:141240.

Rothhaar T.L., Grimm H.S., Hauptenthal V.J., Mett J., Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.K., Stahlmann C.P., Zimmer V.C., Schwarz L.K., Hentschel L.M., Lehmann J., Schäfer K.H., Friedrich R.P., Wanker E.E., Hartmann T., Grimm M.O. (2013). *Amitriptyline and other antidepressants decrease amyloidogenic processing of the Alzheimer's amyloid precursor protein by affecting sphingolipid homeostasis via acid Sphingomyelinases*. (Manuskript in Vorbereitung)

Mitautorenschaften

Burg V.K., Grimm H.S., **Rothhaar T.L.**, Grösgen S., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Zimmer V.C., Mett J., Weingärtner O., Laufs U., Broersen L.M., Tanila H., Vanmierlo T., Lütjohann D., Hartmann T., Grimm M.O. (2013). *Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study*. J Neuroscience, akzeptiert im Aug 2013.

Grimm M.O., Hauptenthal V.J., **Rothhaar T.L.**, Zimmer V.C., Grösgen S., Hundsdörfer B., Lehmann J., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). *Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci. 14(3):5879-98.

Grimm M.O., Zinser E.G., Grösgen S., Hundsdörfer B., **Rothhaar T.L.**, Burg V.K., Kaestner L., Bayer T.A., Lipp P., Müller U., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). *Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism*. PLoS One. 2012;7(3):e34095.

Grimm M.O., **Rothhaar T.L.**, Hartmann T. (2012). *The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism*. Exp Brain Res. 217(3-4):365-75.

Keim A., Rössler O.G., **Rothhaar T.L.**, Thiel G. (2012). *Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun*. Neuroscience. 29;206:25-38.

Grimm M.O., Grösgen S., **Rothhaar T.L.**, Burg V.K., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Friess P., Müller U., Fassbender K., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T. (2011). *Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease*. Int J Alzheimers Dis. 2011:695413.

Grimm M.O., Kuchenbecker J., Grösgen S., Burg V.K., Hundsdörfer B., **Rothhaar T.L.**, Friess P., de Wilde M.C., Broersen L.M., Penke B., Péter M., Vigh L., Grimm H.S., Hartmann T. (2011). *Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms*. J Biol Chem. 286(16):14028-39.

Grimm M.O., Kuchenbecker J., **Rothhaar T.L.**, Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.K., Friess P., Müller U., Grimm H.S., Riemenschneider M., Hartmann T. (2011). *Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 116(5):916-25.

Koivisto H., Grimm M.O., **Rothhaar T.L.**, Berkecz R., Lütjohann D., Giniatullina R., Takalo M., Miettinen P.O., Lahtinen H.M., Giniatullin R., Penke B., Janáky T., Broersen L.M., Hartmann T., Tanila H. (2013). *Special lipid-based diets alleviate cognitive deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease independent of brain amyloid deposition*. (Manuskript im Reviewprozess bei J Nutr Biochem)

Grimm M.O., Hundsdörfer B., Grösgen S., Mett J., Zimmer V.C., Lehmann J., Haupenthal V.J., **Rothhaar T.L.**, Stahlmann C.P., Pätzold A., Zinser E.G., Bayer T.A., Shen J., Müller U., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). *Ganglioside synthesis in Alzheimer's disease: A disturbed regulatory feedback cycle*. (Manuskript in Vorbereitung)

Grösgen S., Grimm M.O., **Rothhaar T.L.**, Burg V.K., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). *Age-dependent shift in carnitine-carrier-system in human Alzheimer's disease brains*. (Manuskript in Vorbereitung)

Beiträge zu Konferenzen

Grimm M.O., **Rothhaar T.L.**, Grösgen S., Burg V.K., Hundsdörfer B., Haupenthal V.J., Kins S., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). *Trans Fatty Acids Increase the Amyloidogenic Processing of APP and the Aggregation of Aβ*. 11th International Conference AD/PD 2013, Florence, Italy.

Grösgen S., Grimm M.O., Zinser E.G., Hundsdörfer B., **Rothhaar T.L.**, Burg V., Schmidt T., Kuchenbecker J., Kästner L., Lipp P., Riemenschneider M., Fassbender K., Müller U., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). *Feedback regulation of ganglioside homeostasis and Amyloid Precursor Protein (APP) processing*. 1st International HIPS Symposium, Saarbrücken, Germany.

Grösgen S., **Rothhaar T.L.**, Burg V., Hundsdörfer B., Mett J., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2012). *Alzheimer's amyloid precursor protein intracellular domain (AICD): a transcription regulator in lipid homeostasis*. 1st International HIPS Symposium, Saarbrücken, Germany.

Burg V., Grösgen S., Kuchenbecker J., **Rothhaar T.L.**, Hundsdörfer B., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2012). *Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple, pleiotropic mechanisms*. 1st International HIPS Symposium, Saarbrücken, Germany.

Grimm M.O., Kuchenbecker J., **Rothhaar T.L.**, Grösgen S., Hundsdörfer B., Burg V.B., Friess P., Müller U., Grimm H.S., Riemenschneider M., Hartmann T. (2011). *Plasmalogen*

synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase (AGPS) by amyloid precursor protein (APP) processing and is affected in Alzheimer's disease. 10th International Conference AD/PD 2011, Barcelona, Spain.

Grösgen S., **Rothhaar T.L.**, Burg V.K., Hundsdörfer B., Hauptenthal V.J., Friess P., Fassbender K., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T., Grimm M.O. (2011). *Intracellular APP domain(AICD) regulates serine-palmitoyl-CoA transferase (SPT) expression and is affected in Alzheimer's disease.* 10th International Conference AD/PD 2011, Barcelona, Spain.

8 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, mich während der letzten Jahre unterstützt und begleitet haben.

Meinem Doktorvater Professor Tobias Hartmann gilt dabei mein ganz besonderer Dank. Er hat durch die Aufnahme in seine Gruppe, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und durch die Schaffung des finanziellen Rahmens diese Arbeit erst ermöglicht. Ich möchte ihm sehr herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken.

Dr. Marcus O.W. Grimm danke ich sehr herzlich für die Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir während der ganzen Zeit stets mit kompetentem Rat zur Seite, sowohl bei inhaltlichen, als auch bei methodischen Fragen und hat nicht zuletzt durch das kritische Lesen der Arbeit maßgeblich zu deren Gelingen beigetragen.

Dr. Heike Grimm möchte ich für die stets sehr herzliche und konstruktive Zusammenarbeit, vor allem beim Erstellen der Manuskripte und für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitdoktoranden, Praktikanten und Mitarbeitern der AG Hartmann: Verena Burg, Benjamin Hundsdörfer, Janine Mett, Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer, Johannes Lehmann, Inge Tomic, Lisa Hentschel, Lukas Schwarz, Dr. Johanna Kuchenbecker, Petra Fries, Dr. Tina Schmidt und Dr. Eva Zinser. Mein besonderer Dank gilt Viola Hauptenthal und Sven Grösgen für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der letzten Jahre und nicht zuletzt für das sorgfältige Lesen dieser Arbeit. Danke für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gebührt mein persönlicher Dank meiner Familie, die mich in allen Phasen dieser Arbeit mit jedweder Unterstützung bedacht hat. Meiner Schwester Amelie Rothhaar danke ich für die motivierenden Gespräche, ihr Interesse an meiner Arbeit und das Korrekturlesen. Bei Edelbert Schweitzer möchte ich mich für das Besorgen der nötigen "Hardware" bedanken. Ganz besonders danke ich meinen Eltern Raphaela Sefrin-Rothhaar und Werner Rothhaar für ihre Unterstützung, nicht nur in finanzieller Hinsicht und dafür, dass sie in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Eric Agne danke ich besonders herzlich für seine grenzenlose Geduld und Rücksicht während der letzten Jahre und dafür, dass er immer für mich da ist.