

Aus dem Bereich der Experimentellen Neurologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss des Vitamin K2 auf die Lipidhomöostase und potenzielle  
Implikationen für die Alzheimererkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Dr. med.**

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2024

vorgelegt von Konstantin Nicolas Kuppler  
geboren am 12.12.1997 in Völklingen

Tag der Promotion: 10.04.2025

Dekan: Prof. Dr. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Hartmann  
Prof. Dr. Jörn Schattenberg

„Man kann die Erkenntnisse der Medizin  
auf eine knappe Formel bringen:  
Wasser, mäßig genossen, ist unschädlich.“  
-Mark Twain-

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Zusammenfassung / Abstract.....	1
2 Einleitung .....	5
2.1 Alzheimer-Krankheit.....	5
2.1.1 Klinische Einordnung.....	5
2.1.1.1 Definition der Demenz und der Alzheimer-Krankheit.....	5
2.1.1.2 Epidemiologie der Demenz und der Alzheimer-Krankheit.....	5
2.1.1.3 Klinisches Bild der Alzheimer-Krankheit.....	6
2.1.1.4 Diagnostik des Alzheimer-Krankheit.....	7
2.1.2 Einordnung der Alzheimer-Krankheit in der Grundlagenforschung .....	8
2.1.2.1 Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit.....	8
2.1.2.1.1 Makroskopische Pathologie .....	8
2.1.2.1.2 Mikroskopische Pathologie .....	9
2.1.2.2 Molekularbiologische Mechanismen der Alzheimer-Krankheit.....	9
2.1.2.3 Ätiologie und Pathogenese .....	13
2.1.3 Einordnung der Therapiemöglichkeiten .....	15
2.1.3.1 Symptomatische Therapiestrategien .....	15
2.1.3.2 Kurative Therapiestrategien .....	15
2.1.3.3 Bedeutung der Früherkennung und Prävention.....	16
2.2 Lipide .....	17
2.2.1 Definition und Kategorisierung .....	17
2.2.2 Funktion .....	17
2.2.2.1 Membranbildung .....	17
2.2.2.2 Energiemetabolismus.....	18
2.2.3 Fettsäuren.....	19
2.2.3.1 Struktur .....	19
2.2.3.2 Fettsäuren im zentralen Nervensystem .....	19

2.3	Vitamin K.....	21
2.3.1	Entdeckung und Nomenklatur .....	21
2.3.2	Chemischer Aufbau und Vorkommen.....	21
2.3.3	Effekte des Vitamin K.....	22
2.3.3.1	Der Vitamin K-Zyklus .....	22
2.3.3.2	Proteinvermittelte Effekte des Vitamin K .....	23
2.3.3.3	Proteinunabhängige Effekte des Vitamin K .....	24
2.3.4	Bedarf und Organverteilung .....	24
2.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	25
3	Material und Methodik.....	27
3.1	Material .....	27
3.1.1	Verwendete Zellkultur.....	27
3.1.2	Verwendete Chemikalien .....	27
3.1.3	Verwendete Geräte .....	28
3.1.4	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.5	Verwendete Kits.....	30
3.2	Methodik .....	31
3.2.1	Zellbiologische Methodik.....	31
3.2.1.1	Kultivierung und Vervielfältigung einer Zellkultur .....	31
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen einer Zellkultur .....	32
3.2.1.3	Herstellung einer MK4-Stammlösung.....	32
3.2.1.4	Inkubation einer Zellkultur mit MK4 .....	33
3.2.2	Molekularbiologische Methodik .....	34
3.2.2.1	RNS-Isolierung mittels Trizol™ -Reagenz .....	34
3.2.2.1.1	Erläuterung der Methodik.....	34
3.2.2.1.2	Versuchsaufbau.....	34
3.2.2.2	Reinheitsgradbestimmung der RNS .....	35
3.2.2.3	Synthese von cDNS mittels reverser Transkription.....	35
3.2.2.3.1	Erläuterung der Methodik.....	35
3.2.2.3.2	Versuchsaufbau.....	36

3.2.2.4	Expressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR .....	37
3.2.2.4.1	Erläuterung der Methodik.....	37
3.2.2.4.2	Versuchsaufbau.....	38
3.2.2.4.3	Statistische Auswertung.....	39
3.2.3	Proteinbiochemische Methodik.....	40
3.2.3.1	Bestimmung der Zelltoxizität mittels Laktatdehydrogenase-Test .....	40
3.2.3.1.1	Erläuterung der Methodik.....	40
3.2.3.1.2	Versuchsaufbau.....	40
3.2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchonin-Tests .....	42
3.2.3.2.1	Erläuterung der Methodik.....	42
3.2.3.2.2	Versuchsaufbau.....	43
3.2.3.3	Enzymaktivitätsmessung APP-prozessierender Sekretasen .....	43
3.2.3.3.1	Erläuterung der Methodik.....	43
3.2.3.3.2	Versuchsdurchführung.....	44
3.2.4	Lipidanalytik mittels Massenspektrometrie .....	45
3.2.4.1	Aufbereitung einer Zellkultur für die Lipidanalytik .....	45
3.2.4.2	Extraktion der Lipidfraktion.....	46
3.2.4.2.1	Erläuterung der Methodik.....	46
3.2.4.2.2	Versuchsdurchführung.....	46
3.2.4.3	Massenspektrometrie .....	48
3.2.4.3.1	Erläuterung der Methodik.....	48
3.2.4.3.2	Versuchsdurchführung.....	50
3.2.4.3.3	Statistische Analyse.....	56
4	Ergebnisse .....	58
4.1	Einfluss des MK4 auf die Lipidkomposition.....	58
4.1.1	Zytotoxizitätsanalyse .....	59
4.1.2	Analyse der Diacyl-Phosphatidylcholone .....	59
4.1.3	Analyse der Phosphatidylcholin-Plasmalogene .....	64
4.1.4	Analyse der lysierten Phosphatidylcholone.....	68
4.1.5	Analyse der Sphingomyeline .....	72

4.1.6	Analyse der Carnitiner	76
4.1.7	Analyse der Triacylglyceride	80
4.2	Einfluss des MK4 auf die APP-Prozessierung	84
4.2.1	Etablierung eines Haushaltsgens	84
4.2.2	Einfluss des MK4 auf die $\alpha$ -Sekretase	85
4.2.3	Einfluss des MK4 auf die $\beta$ -Sekretase	87
5	Diskussion	90
5.1	MK4 im Kontext der Lipidhomöostase	90
5.1.1	MK4 und Lipide des Energiemetabolismus	91
5.1.2	MK4 und membranbildende Lipide	94
5.1.2.1	MK4 und Diacyl-Phosphatidylcholine	94
5.1.2.2	MK4 und Phosphatidylcholin-Plasmalogene	95
5.1.2.3	MK4 und lysierte Phosphatidylcholine	96
5.1.2.4	MK4 und Sphingomyeline	98
5.2	Die Lipidhomöostase im Kontext der Alzheimer-Demenz	100
5.2.1	Membranlipide und die Alzheimerpathologie	100
5.2.2	Der Energiemetabolismus und die Alzheimerpathologie	105
5.3	MK4 im Kontext der APP-Prozessierung	106
5.3.1	MK4 und die $\alpha$ -Sekretase	106
5.3.2	MK4 und die $\beta$ -Sekretase	106
5.4	Vitamin K im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen	108
5.5	Ausblick	111
6	Literaturverzeichnis	113
7	Anhang	168
8	Publikationen	182
9	Danksagung	183
10	Lebenslauf	184

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Englisch</b>	<b>Deutsch</b>
3-KDS	<i>3-ketodihydrosphingosine</i>	3-Ketosphinganin
AA	<i>arachidonic acid</i>	Arachidonsäure
ACHE-I	<i>acetylcholinesterase inhibitors</i>	Acetylcholinesterase-Inhibitoren
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>	Eine Disintegrin und Metalloproteinase
AICD	<i>amyloid precursor protein intracellular domain</i>	Intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins
APC	<i>activated protein c</i>	Aktives Protein C
APH-1	<i>anterior pharynx-defective 1)</i>	Vorderer-Pharynx-Fehlstück 1
APP	<i>amyloid precursor protein</i>	Amyloid-Vorläuferprotein
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	Adenosintriphosphat
A $\beta$	<i>beta-amyloid</i>	Amyloid-Beta
BACE	<i>beta-site of APP cleaving enzyme</i>	Betaschnittstelle des APP-schneidenden Enzyms
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>	Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	Bovines Serumalbumin
CACT	<i>carnitine-acylcarnitine translocase</i>	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
CDK5	<i>cyclin dependent kinase 5</i>	Cyclin-abhängigen-Kinase 5
CE	<i>collision energy</i>	Kollisionsenergie
CE	<i>acylcarnitine</i>	Carnitinerster
CID	<i>collision induced dissociation</i>	kollisions-induzierte Dissoziation
CPS	<i>counts per second</i>	Zählungen pro Sekunde
CPT-1	<i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>	Carnitin-Acyltransferase 1
CPT-2	<i>carnitine palmitoyltransferase 2</i>	Carnitin-Acyltransferase 2
CREB	<i>cAMP response element-Binding</i>	cAMP-Antwortbindungsprotein
DHA	<i>docosahexanoic acid</i>	Docosahexaensäure
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>	
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	Dimethylsulfoxid
DMT	<i>disease-modifying therapies</i>	Krankheitsmodifizierende Therapie
DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i>	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphates</i>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DP	<i>declustering potential</i>	
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Ethylendiamintetraessigsäure

EGR-1	<i>early growth response-1</i>	Frühes-Wachstumsantwort-Protein 1
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EPCR	<i>endothelial cell protein c receptor</i>	endothelialen Protein-C-
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>	extrazellulären signalregulierten Kinase
ESI	<i>electrospray ionization</i>	Elektrospray-Ionisation
FAD	<i>flavin adenine dinucleotide</i>	Flavin-Adenin-Dinukleotid,
FCS	<i>fetal calf serum</i>	Fetales Kälberserum
GGCX	<i>gamma-glutamyl carboxylase</i>	$\gamma$ -Glutamylcarboxylase
Gla	<i>gamma-carboxyglutamic acid</i>	Gamma-Carboxyglutamyl
GSK3b	<i>glycogen synthase kinase 3b</i>	Glykogen-Synthase-Kinase-3b
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IDE	<i>insulin-degrading enzyme</i>	Insulin-degradierendes Enzym
IL 6	<i>interleukin 6</i>	Interleukin 6
IL1b	<i>interleukin 1<math>\beta</math></i>	Interleukin 1 $\beta$
LCAT	<i>lecithin cholesterol acyltransferase</i>	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LCIS	<i>live cell imaging solution</i>	Lösung zur Darstellung lebender Zellen
LDH	<i>lactate dehydrogenase</i>	Laktatdehydrogenase
LIT	<i>linear ion trap</i>	lineare Ionenfalle
LPC	<i>lysophosphatidylcholines</i>	Lysophosphatidylcholin
LPCAT	<i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>	Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase 1
MAP	<i>microtubule associated proteins</i>	Mikrotubuli-assoziierte-Proteine
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>	Milde kognitive Beeinträchtigung
MK	<i>menaquinone</i>	Menachinon
MMST	<i>Mini Mental State Examination</i>	Mini-Mental-Status-Test
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry</i>	Tandem-Massenspektrometrie
MUFA	<i>monounsaturated fatty acid</i>	Einfach ungesättigte Fettsäuren
n-AChR	<i>nicotinic acetylcholine receptor</i>	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor

NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Navβ2	<i>voltage-gated sodium channel β2</i>	β2-Untereinheit der spannungsgesteuerten Natriumkanäle
NCT	<i>nicastrin</i>	Nicastrin
NDUFS3	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3</i>	Untereinheit S3 des NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktasekerns
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>	Nicht-essentielle Aminosäuren
NEP	<i>neprilysin</i>	Neprilysin
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>	Neurofibrilläre Bündel
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>	Nukleärer Faktor "Kappa-Leichtketten-Verstärker" aktivierter B-Zellen
NMDA-R	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NP	<i>neuritic plaques</i>	Neuritische Plaques
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>	Plasminogen-Aktivator-Inhibitors
PAR-1	<i>protease-activated receptor 1</i>	Protease-aktivierter Rezeptor
PCaa	<i>diacyl-phosphatidylcholine</i>	Diacyl-Phosphatidylcholine
PCae	<i>plasmenylcholines</i>	Phosphatidylcholin-Plasmalogene
PEN-2	<i>presenilin enhancer 2</i>	Presenillin-Verstärker-2
PHF	<i>paired helical filament</i>	Gepaarte helikale Filamente
PI3-K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA <sub>2</sub>	<i>phospholipase A<sub>2</sub></i>	Phospholipase A2
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>	Protein-Phosphatase 2A
PS1	<i>presenilin 1</i>	Präsenilin 1
PS2	<i>presenilin 2</i>	Präsenilin 2
PUFA	<i>polyunsaturated Fatty Acids</i>	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i>	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
RNS	<i>ribonucleic acid</i>	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktiver Sauerstoffspezies
sAPPα	<i>soluble amyloid precursor protein alpha</i>	lösliches APPα
sAPPβ	<i>soluble amyloid precursor protein beta</i>	lösliches APPβ
SFA	<i>saturated fatty acid</i>	Gesättigte Fettsäuren
SM	<i>sphingomyelin</i>	Sphingomyeline
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>	Einzelsträngige DNS

---

TAE	/	TRIS-Acetat-EDTA
TAG	<i>triglyceride</i>	Triacylglyceride
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UbiAD1	<i>ubiA prenyltransferase domain-containing protein-1</i>	UbiA-Prenyltransferase-Domäne-enthaltendes Protein 1
VKDP	<i>vitamin k-dependent proteins</i>	Vitamin K-abhängige Proteine
VKOR	<i>vitamin K epoxide reductase</i>	Vitamin K-Epoxidreduktase
WHO	<i>World Health Organization</i>	Weltgesundheitsorganisation
$\alpha$ CTF / C83	<i>alpha-C-terminal fragment</i>	C-terminale Fraktion (mit 83 Aminosäuren)
$\beta$ CTF / C99	<i>beta-C-terminal fragment</i>	C-terminale Fraktion (mit 99 Aminosäuren)
$\Delta\Delta C_t$		Delta-Delta-Ct

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Prozessierung des APP. ....	11
Abbildung 2: Heatmap der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa).....	61
Abbildung 3: Lipidalteration der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa).....	62
Abbildung 4: Sättigung und Kettenlänge der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa). ....	63
Abbildung 5: Heatmap der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).....	65
Abbildung 6: Lipidalterationen der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae). ....	66
Abbildung 7: Sättigung und Kettenlänge der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).....	67
Abbildung 8: Heatmap der lysierten Phosphatidylcholine (LPC). ....	69
Abbildung 9: Lipidalteration der lysierten Phosphatidylcholine (LPC).....	70
Abbildung 10: Sättigung und Kettenlänge der lysierten Phosphatidylcholine (LPC).....	71
Abbildung 11: Heatmap der Sphingomyeline (SM). ....	73
Abbildung 12: Lipidalteration der Sphingomyeline (SM).....	74
Abbildung 13: Sättigung und Kettenlänge der Sphingomyeline (SM). ....	75
Abbildung 14: Heatmap der Carnitiner (CE).....	77
Abbildung 15: Lipidalteration der Carnitiner (CE). ....	78
Abbildung 16: Sättigung und Kettenlänge der Carnitiner (CE). ....	79
Abbildung 17: Heatmap der Triacylglyceride (TAG).....	81
Abbildung 18: Lipidalterationen der Triacylglyceride (TAG). ....	82
Abbildung 19 Sättigung und Kettenlänge der Triacylglyceride (TAG).....	83
Abbildung 20: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der $\alpha$ -Sekretase.....	86
Abbildung 21: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der $\beta$ -Sekretase (Messung 1). ....	88
Abbildung 22: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der $\beta$ -Sekretase (Messung 2). ....	89

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Fettsäureverteilung im menschlichen frontalen Cortex.....	20
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien. ....	27
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	28
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	29
Tabelle 5: Verwendete Kits.....	30
Tabelle 6: Zeitschema der Zellkulturinkubation mit MK4.....	33
Tabelle 7: Reaktionsgemisch zur Synthese von cDNS mittels reverser Transkription.....	36
Tabelle 8: Einstellungen des PCR-Zykler für eine reverse Transkription.....	36
Tabelle 9: Verwendete Primer für die qPCR. ....	38
Tabelle 10: Reaktionsgemisches für eine Expressionsanalyse mittels qPCR. ....	38
Tabelle 11: Parameter des PCR-Zyklers für eine qPCR. ....	39
Tabelle 12: MK4-Verdünnung für den Laktatdehydrogenasetest. ....	41
Tabelle 13: Verdünnungsreihe für den Laktatdehydrogenase-Test.....	41
Tabelle 14: Zusammensetzung der Life-Cell-Imaging-Solution.....	44
Tabelle 15: Reaktionslösungen zur Enzymaktivitätsmessung.....	45
Tabelle 16: Parameter des Fluorometers.....	45
Tabelle 17: Pipettierschema der massenspektrometrischen Referenzstandards. ....	47
Tabelle 18: Pipettierschema Phenylisothioyanatlösung. ....	47
Tabelle 19: Einstellungen des Autosamplers.....	49
Tabelle 20: Einstellung der ESI-MS/MS.....	50
Tabelle 21: MRM-Parameter Phosphatidylcholine (PCaa, PCae und LPC). ....	51
Tabelle 22: MRM-Parameter Sphingomyeline (SM).....	53
Tabelle 23: MRM-Parameter Carnitinester (CE). ....	54
Tabelle 24: MRM-Parameter Triacylglyceride (TAG). ....	55
Tabelle 25: Auswertung der <i>Normfinder</i> -Software. ....	84
Tabelle 26: Vorkommen und Funktion der Gla-Proteine ..... 168	168
Tabelle 27: Auswertungstabelle Phosphatidylcholine (PCaa). ....	170
Tabelle 28: Auswertungstabelle Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).....	172
Tabelle 29: Auswertungstabelle Lysierte Phosphatidylcholine (LPC).....	174
Tabelle 30: Auswertungstabelle Sphingomyeline (SM).....	175
Tabelle 31: Auswertungstabelle Carnitinester (CE). ....	177
Tabelle 32: Auswertungstabelle Triacylglyceride (TAG).....	179

## 1 Zusammenfassung / Abstract

### **Einfluss des Vitamin K2 auf die Lipidhomöostase und potenzielle Implikationen für die Alzheimererkrankung**

Demenzen beschreiben einen Symptomkomplex mit dem Verlust höherer kortikaler Funktionen wie Gedankenbildung, Orientierung und Sprachfähigkeit. Mit 50-70 % bildet die Alzheimererkrankung die häufigste ätiologische Ursache einer Demenz. Charakteristisch für die Alzheimer-Krankheit ist der histopathologische Befund extrazellulärer Amyloid-Plaques und intrazellulärer neurofibrillärer Bündel. Amyloid-Plaques beschreiben Oligomere aus jeweils 38-43 Aminosäure langen Amyloid-Peptiden, die im Rahmen der amyloidalen Prozessierung des Transmembranproteins Amyloid Precursor Protein durch proteolytische Spaltung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase entstehen. Dem gegenüber steht die neuroprotektive nicht-amyloidalen Prozessierung durch die initiale enzymatische Spaltung des APP durch die  $\alpha$ -Sekretase und anschließender Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Bildung und Abbau des A $\beta$  oder der enzymatischen Aktivität der  $\alpha$ - zur  $\beta$ -Sekretase führt zur übermäßigen Oligomerisierung und Manifestation der neurotoxischen Amyloid-Plaques. Neben weiteren Einflussfaktoren wie Neuroinflammation, oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion gewinnt die Rolle der Lipide im Kontext der Alzheimerdemenz zunehmend an Bedeutung. Eine Alteration der Lipidhomöostase steht in einem bidirektionalen Zusammenhang mit der Pathogenese und Progression neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimererkrankung.

Ebenfalls an Bedeutung und zunehmendem Interesse gewinnen die vielfältigen Einflüsse des fettlöslichen Vitamin K2 auf neuronale Prozesse. Über die  $\gamma$ -Carboxylierung von aktuell 17 bekannten Gla-Proteinen moduliert Vitamin K2 unter anderem Signaltransduktion, Knochenhomöostase und vaskulären Kalzifizierungsprozesse. Sowohl epidemiologische als auch in vitro und in vivo Studien deuten zunehmend auf vielfältige neuroprotektive Effekte des Vitamin K2 hin. Im Kontext des zunehmenden Interesses am Zusammenhang zwischen Vitamin K2, der Lipidhomöostase und der Alzheimererkrankung sollte in dieser Arbeit drei Fragestellungen nachgegangen werden:

Zum einen sollte der direkte Einfluss des Vitamers MK4 auf Klasseneffekte, Sättigungsgrade und Kettenlänge typischer Membranlipide (Diacylphosphatidylcholine, Phosphatidylcholin-Plasmalogene, lysierte Phosphatidylcholine, Sphingomyeline) untersucht werden. Zusätzlich sollten mögliche Interaktionen des MK4 auf Lipide des Energiemetabolismus (Carnitinerester und Triacylglyceride) nachgegangen werden. Für beide Fragestellungen erfolgte eine massenspektrometrische Analyse des Lipidprofils der humanen SH-SY5Y-Zelllinie unter einer 72-stündigen Inkubation mit MK4. In der Analyse zeigte sich in der Gruppe der Diacyl-

Phosphatidylcholine und Phosphatidylcholin-Plasmalogene eine Zunahme der sechsfach ungesättigten und kurzkettig gesättigten Fettsäuren. In der Gruppe der lysierten Phosphatidylcholine zeigte sich eine Zunahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren Docosahexaensäure und Arachidonsäure. Die Analyse der Carnitiner als auch der Triacylglyceride -als Repräsentanten des mitochondrialen Energiemetabolismus- zeigte in beiden Fällen als gesamte Klasse eine signifikante Abnahme gegenüber den Kontrollen.

Neben dem Einfluss des Vitamin K2 auf das Lipidprofil sollte in dieser Arbeit der direkte Effekt des Vitamin K2 auf die Prozessierung des APP erforscht werden. Dafür erfolgte zum einen die Analyse des Expressionsniveaus mehrerer Gene der APP-Prozessierung und eine Echtzeitfluoreszenzanalyse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase, jeweils in SH-SY5Y-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit MK4. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von MK4 kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Expressionsniveau des  $\alpha$ -Sekretase kodierenden Gens *ADAM10* ausgeübt wurde. Gleichzeitig zeigte sich keine statistisch signifikante Änderung der Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase in der Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie. Jedoch konnte sich unter Inkubation mit MK4 eine signifikante Abnahme des Expressionsniveaus des  $\beta$ -Sekretase kodierenden Gens *BACE-1* nachweisen lassen. Korrespondierend zu diesem Befund zeigte sich eine Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase unter Inkubation mit MK4.

In der Gesamtschau deuten die in dieser Arbeit gefundenen Erkenntnisse in Konkordanz mit der aktuell bestehenden Datenlage auf komplexe mannigfaltige neuroprotektive Effekte des Vitamin K2, welche auf Entstehung und Verlauf der Alzheimer-Erkrankung Einfluss nehmen.

## **Influence of vitamin K2 on lipid homeostasis and potential implications for Alzheimer's disease**

Dementia describes a symptom complex with the loss of higher cortical functions such as thought formation, orientation and language skills. At 50-70 %, Alzheimer's disease is the most common etiologic cause of dementia. The histopathological finding of extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles is an obligatory diagnostic criterion. Amyloid plaques describe oligomers of 38-43 amino acid long amyloid peptides, which are formed during the amyloidogenic processing of the transmembrane protein amyloid precursor protein by proteolytic cleavage of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase. This contrasts with neuroprotective non-amyloidogenic processing through the initial enzymatic cleavage of APP by  $\alpha$ -secretase and subsequent processing by  $\gamma$ -secretase. A disturbance of the balance between formation and degradation of A $\beta$  or between the enzymatic activity of  $\alpha$ - to  $\beta$ -secretase leads to excessive oligomerization and manifestation of neurotoxic amyloid plaques. In addition to other influencing factors such as neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction, the role of lipids in the context of Alzheimer's disease is becoming increasingly important. Alteration of lipid homeostasis has a bidirectional relationship with the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's disease.

The role of fat-soluble vitamin K2 on neuronal processes are also gaining in importance and interest. Via the  $\gamma$ -carboxylation of currently 17 known Gla proteins, vitamin K2 modulates signal transduction, bone homeostasis and vascular calcification processes. Epidemiological as well as in vitro and in vivo studies increasingly point to diverse neuroprotective effects of vitamin K2. In the context of the increasing interest in the relationship between vitamin K2, lipid homeostasis and Alzheimer's disease, three questions should be investigated in this study:

Firstly, the direct influence of the vitamin MK4 on class effects, degrees of saturation and chain length of typical membrane lipids (diacylphosphatidylcholines, phosphatidylcholine plasmalogens, lysed phosphatidylcholines, sphingomyelins) was to be investigated. In addition, the possible influence of MK4 on lipids of energy metabolism (carnitine esters and triacylglycerides) should be explored. For both questions, a mass spectrometric analysis of the lipid profile of the human SH-SY5Y cell line was carried out under a 72-hour incubation with MK4. The analysis showed an increase in six-fold unsaturated and short-chain saturated fatty acids in the group of diacyl-phosphatidylcholines and phosphatidylcholine plasmalogens. There was also an increase in the polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the group of lysed phosphatidylcholines. The analysis of carnitine esters and triacylglycerides - as representatives of mitochondrial energy metabolism - showed a significant decrease in both cases as a whole class compared to the controls.

In addition to the influence of vitamin K2 on the lipid profile, the direct effect of vitamin K2 on the processing of APP was examined in this study. For this, the expression level of several APP processing genes was analyzed and a real-time fluorescence analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase was performed, both in SH-SY5Y cells after 72-hour incubation with MK4. This study showed that MK4 had no statistically significant effect on the expression level of the  $\alpha$ -secretase-encoding gene *ADAM10*. At the same time, there was no statistically significant change in the enzyme activity of  $\alpha$ -secretase in real-time fluorescence spectrometry. However, a significant decrease in the expression level of the gene encoding  $\beta$ -secretase *BACE-1* was detected when incubated with MK4. Corresponding to this, there was a decrease in the enzyme activity of  $\beta$ -secretase when incubated with MK4.

Overall, the findings in this study, in concordance with the current data, point to complex and diverse neuroprotective effects of vitamin K2, which influence the development and progression of Alzheimer's disease.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Alzheimer-Krankheit**

#### **2.1.1 Klinische Einordnung**

##### **2.1.1.1 Definition der Demenz und der Alzheimer-Krankheit**

Eine Demenz beschreibt ein klinisches Syndrom und ist nach der zehnten Version der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*, WHO) „Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache, Sprechen und Urteilsvermögen im Sinne der Fähigkeit zur Entscheidung“ (Dilling et al., 2015). Weiterhin unterteilt die ICD-10 Demenzen in ätiologisch bedingte Unterformen. Die Alzheimer-Krankheit als eine dieser Unterformen wird nach ICD-10 definiert als „eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam, aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren“ (Dilling et al., 2015). Die Alzheimer-Krankheit wird somit durch ihre zugrunde liegenden pathologischen Prozesse definiert, welche entweder durch die histopathologische Untersuchungen post mortem oder in vivo durch Biomarker und bildgebende Verfahren diagnostiziert werden können (Jack et al., 2018).

Ferner wird die Alzheimer-Krankheit zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen gezählt, deren gemeinsame Eigenschaft der schleichende progressive Verlust vulnerabler Neuronenpopulationen darstellt (Dugger & Dickson, 2017). Bereits 1906 beschrieb der deutsche Nervenarzt Alois Alzheimer während der Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte in Tübingen den neuropathologischen Befund und das dazugehörige klinische Erscheinungsbild der verstorbenen Patientin Auguste Deter (Alzheimer et al., 1995; Dahm, 2006).

##### **2.1.1.2 Epidemiologie der Demenz und der Alzheimer-Krankheit**

Nach Schätzungen der WHO litten 2019 ungefähr 55,2 Millionen Menschen an einer Demenz, davon die meisten in der Westpazifikregion und Europa. Im Rahmen des demographischen Wandels ist mit einer Zunahme der Prävalenz zu rechnen. Hochrechnungen ergeben bis 2050 139 Millionen erkrankte Menschen weltweit und eine Zunahme der globalen Demenz-assoziierten Gesamtkosten von 1,3 Billionen im Jahr 2019 auf 2,8 Billionen US-Dollar im Jahr 2030 (World Health Organization, 2021). In Deutschland wurde die Prävalenz der Demenzerkrankungen im Jahr 2007 auf ungefähr 1,07 Millionen Betroffene geschätzt (Ziegler & Doblhammer, 2009). In den entwickelten Ländern sind Demenzen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neoplasien und cerebrovaskulären Erkrankungen die vierthäufigste

Todesursache (Ziegler & Doblhammer, 2009). Die mediane Überlebenszeit einer Demenzerkrankung ab dem Diagnosezeitpunkt schwankt zwischen drei und zwölf Jahren (Todd et al., 2013).

Die häufigste Ursache einer Demenz bildet weltweit die Alzheimer-Erkrankung (Alzheimer's Association, 2023). In Deutschland sind etwa 50-70 % aller Demenzerkrankungen auf Alzheimer-, und 15-25 % auf vaskulär bedingte Demenzen zurückzuführen (C. Qiu et al., 2007). Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Scheyer et al., 2018). Darüber hinaus beeinflusst auch die Ethnie die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Misiura et al., 2023).

### **2.1.1.3 Klinisches Bild der Alzheimer-Krankheit**

Die klinische Präsentation und vorherrschende Symptomatik der Alzheimer-Krankheit verlaufen entlang eines Kontinuums. Es lassen sich entlang dieses Kontinuums drei Phasen unterscheiden: Präklinisches Stadium, milde kognitive Beeinträchtigung (englisch: *mild cognitiv impairment*, MCI) und manifeste Alzheimer-Demenz (Albert et al., 2011; Jack et al., 2011; McKhann et al., 2011). Letztere Phase wird weiterhin in ein leichtes, moderates und schweres Stadium unterteilt. Die Dauer der einzelnen Phasen ist dabei individuell heterogen und wird durch das Alter, Genetik, Geschlecht und Risikofaktoren beeinflusst (Vermunt et al., 2019).

Im präklinischen Stadium können bereits Alzheimer-typische Anomalien im Liquor und der Positronen-Emissions-Tomographie (siehe Kapitel 2.1.1.4) detektiert werden, ohne dass der Patient darunter die später auftretenden Symptome zeigt (Alzheimer's Association, 2022).

Im Stadium der leichten kognitiven Einschränkung weisen Patienten neben den bereits im präklinischen Stadium detektierbaren Biomarkern auch subtile Symptome wie Gedächtnis-, Sprach- und Denkbeeinträchtigungen auf. Die Bewältigung des Alltags ist weiterhin möglich (Alzheimer's Association, 2022). 15 % der Patienten in diesem Stadium entwickeln innerhalb von zwei Jahren eine manifeste Demenz (Petersen et al., 2018), innerhalb von fünf Jahren bereits über 60% (Ward et al., 2013).

Patienten mit einer manifesten Alzheimer-Demenz leiden unter deutlichen Gedächtnis-, Sprach- und Denkstörungen, welche die Aufgabenbewältigung des täglichen Lebens einschränken. Auf die Untergliederung in die 3 Schweregrade wird in Kapitel 2.1.1.4 gesondert eingegangen. Im leichten Stadium sind Patienten weiterhin mit Hilfe selbstständig. Im moderaten Stadium hingegen kommt es zu Persönlichkeits- und Verhaltensänderungen, gelegentlicher Inkontinenz und Orientierungsproblemen, das Ausführen mehrschrittiger Aufgaben ist deutlich erschwert. Patienten im terminalen Stadium der Alzheimer-Demenz sind bettlägerig und benötigen Vollzeitpflege (Alzheimer's Association, 2022). Die fehlende Mobilität geht mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse und Infektionen

einher. Oftmals kommt es zu zentral bedingter Dysphagie mit konsekutiver zum Tode führender Aspirationspneumonie (Alzheimer's Association, 2022).

In jedem Stadium der Alzheimer-Krankheit, bevorzugt jedoch in Frühstadien können sich neben den kognitiven Beeinträchtigungen auch psychiatrische Symptome entwickeln. Es dominieren dabei Depressionen, Apathie, Agitation und Störung der zirkadianen Rhythmik (Lyketsos et al., 2011).

#### **2.1.1.4 Diagnostik des Alzheimer-Krankheit**

Die Diagnose einer Demenz kann nach den im ICD-10 operationalisierten Kriterien erfolgen. Es handelt sich dabei jedoch ausschließlich um eine klinische Diagnose. Neben der Eigen-, Fremd-, Familien- und Sozialanamnese, sowie einer obligaten neurologischen und internistischen körperlichen Untersuchung, kommt der Überprüfung der kognitiven Leistungsfähigkeit mittels orientierender normierter Schnelltests eine besondere Bedeutung zu. Es existieren mehrere Testverfahren, unter anderem der Mentale-Statustest nach Folstein (engl. *Mini-Mental-Status-Test*, MMST) (A. J. Mitchell, 2009a), der Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung (Ihl et al., 2000) und der kognitive Zugangstest nach Montreal (engl. *Montreal Cognitive Assessment Test*) (Nasreddine et al., 2005). Das Zeichnen einer Uhr mit vorgegebener Uhrzeit (Uhrentest) kann ergänzend durchgeführt werden, hat aber für sich allein keine Aussagekraft. In Deutschland erfolgt die Untergliederung der Schweregrade einer manifesten Demenz auf Basis des MMST (siehe auch 2.1.1.3), wobei 20-26 Punkte als leichte Demenz, 10-19 Punkte als moderate/mittelschwere Demenz, und weniger als 10 Punkte als schwere Demenz kategorisiert werden (DGN e. V. & DGPPN e. V., 2023). Die weitere ätiologische Abklärung erfolgt schließlich auf Basis standardisierter neuropsychologischer Testverfahren und vorgefertigten Interviews (Hutchinson & Mathias, 2007).

Neben den genannten neuropsychologischen Untersuchungsmöglichkeiten sollte bei Verdacht auf eine Demenz laut aktuellen Leitlinien zum Ausschluss reversibler Ursachen eine Laboruntersuchung mit einem Blutbild, Elektrolyten, Blutzucker, Schilddrüsenhormonen, Entzündungs-, Leber- und Nierenretentionsparametern sowie Vitamin B12 erfolgen (British Psychological Society, 2007).

Zum Ausschluss nichtdegenerativer Demenzursachen und zur Untermauerung des Verdachts auf der Alzheimer-Krankheit sollte eine Liquorpunktion durchgeführt werden. Insbesondere besitzt die Kombination der im Liquor nachweisbaren Marker  $\beta$ -Amyloid-1-42, Gesamt-Tau und Phospho-Tau in Metaanalysen eine hohe Sensitivität und Spezifität. Die Marker eignen sich jedoch nicht zur Verlaufsdokumentation (Engelborghs et al., 2008; Frankfort et al., 2008; A. J. Mitchell, 2009b; Sunderland et al., 2003).

Neben den bereits genannten Untersuchungen sollte eine cerebrale Bildgebung zur ätiologischen Abklärung mittels cerebraler Computertomographie oder Magnetresonanztomographie erfolgen (British Psychological Society, 2007; Feldman et al., 2008). Insbesondere dient die Bildgebung der Differenzierung zwischen vaskulärer, degenerativer und sonstiger reversibler Ätiologie (Gifford et al., 2000; Hejl et al., 2002).

Es besteht die Möglichkeit der nuklearmedizinischen Darstellung eines verringerten Glukosemetabolismus mittels Positronen-Emissions-Tomographie und der zerebralen Perfusionsbildgebung. Die beiden Methoden ermöglichen eine in Metaanalysen bestätigte hohe diagnostische Aussagekraft (Bloudek et al., 2011; DGN e. V. & DGPPN e. V., 2023; Dougall et al., 2004; Herholz et al., 2007; Patwardhan et al., 2004). Durch hohe Kosten und Aufwand werden die genannten Verfahren nur bei Unsicherheit angewendet. Neuere Studien konnten außerdem das im Plasma nachweisbare Peptid p-tau181 (an Threonin 181 phosphoryliertes Tau, siehe auch 2.1.2.1.2) als klinisch spezifischen Biomarker für die Diagnose und Prognose der Alzheimer-Erkrankung nachweisen, dieser befindet sich jedoch noch nicht in der klinischen Routine (Bateman et al., 2020; Janelidze et al., 2020; E. H. Thijssen et al., 2020).

## **2.1.2 Einordnung der Alzheimer-Krankheit in der Grundlagenforschung**

### **2.1.2.1 Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit**

#### **2.1.2.1.1 Makroskopische Pathologie**

Im Falle einer Alzheimer-Krankheit können am Gehirn mehrere Befunde makroskopisch erhoben werden. Allerdings sind sowohl die Einzelbefunde als auch die Gesamtschau zu unspezifisch und erlauben keine makroskopische Diagnosesicherung der Erkrankung. Es findet sich nahezu immer ein Gesamtgewichtsverlust des Gehirns, sowie eine ubiquitäre symmetrische Atrophie (vergrößerte Sulci, verkleinerte Gyri) mit besonderer Dominanz in Assoziationscortices im Frontal-, und Temporallappen. Der primäre Motorcortex, sowie der primäre somatosensorische Cortex sind meistens nicht betroffen (Perl, 2010). Zusätzlich ist häufig eine corticale Atrophie im Praecuneus und dem hinteren Abschnitt des Gyrus cinguli zu finden, in dessen Folge das Vorder- und Unterhorn der Seitenventrikel in der Bildgebung dilatiert erscheinen (Rami et al., 2012). Ein ebenfalls typischer Befund in Alzheimer-Gehirnen ist die Atrophie der Strukturen des limbischen Systems, darunter vor allem der Amygdala und des Hippocampus im medialen Temporallappen (Apostolova et al., 2012; Perl, 2010), sowie der Verlust der Neuromelanin-Pigmentierung im Locus caeruleus (Calderon-Garcidueñas & Duyckaerts, 2017; Serrano-Pozo et al., 2011).

### 2.1.2.1.2 Mikroskopische Pathologie

Die Alzheimer-Krankheit unterscheidet sich von anderen neurodegenerativen Erkrankungen durch die charakteristischen histopathologischen Befunden (Montine et al., 2012). Kernkomponenten der histopathologischen Veränderungen sind die bereits durch Alzheimer selbst beschriebenen extrazellulären Amyloid-Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT). Neben diesen obligaten Komponenten finden sich häufig Tau-positives Neuropil, dystrophe Neuriten, eosinophile Einschlusskörperchen (Eponym: Hirano-Körperchen), granulovakuoläre Degenerationen, aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten (Perl, 2010; Serrano-Pozo et al., 2011). Je nach Morphologie lassen sich mehrere Unterformen der Amyloid-Plaques unterscheiden, wobei diffuse und kerndichte Plaques die häufigsten Vertreter darstellen (Dickson, 1997; Thal et al., 2006). Insbesondere kerndichte Amyloid-Plaques werden in Anwesenheit von neuritischen Elementen (Tau-positives Neuropil, dystrophe Neuriten, aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten) auch als neuritische Plaques (engl. *neuritic plaques*, NP) bezeichnet (DeTure & Dickson, 2019). Auf die molekularbiologische Zusammensetzung, Interaktion und pathogenetische Relevanz der Amyloid-Plaques und NFT wird im folgenden Kapitel gesondert eingegangen.

### 2.1.2.2 Molekularbiologische Mechanismen der Alzheimer-Krankheit

Amyloid-Plaques beschreiben extrazelluläre Akkumulationen von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden ( $A\beta_x$ ; x repräsentiert die Anzahl an Aminosäuren) mit einer Kettenlänge zwischen 38 und 43 Aminosäuren (Glennner & Wong, 1984; S. J. C. Lee et al., 2017), die aus der Prozessierung des Typ-1-Transmembranproteins Amyloid-Vorläuferprotein (engl. *amyloid precursor protein*, APP) entstehen (Dyrks et al., 1988). Den höchsten Anteil an den Amyloid-Plaques bilden dabei die Isoforme  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  (L. Zheng et al., 2012). Im Rahmen der Akkumulation mehrerer  $A\beta$ -Einzelpeptide (Monomere) entsteht ein mikroskopisch sichtbarer Amyloidplaque (Oligomer). Dabei ist die Anzahl an Monomeren entscheidend für die Pathogenität. Studien konnten die höchste Toxizität von löslichen  $A\beta$ -Oligomeren mit weniger als 50 Monomeren nachweisen (Kayed et al., 2003; G. M. Shankar et al., 2008).

Die  $A\beta$ -Prozessierung aus APP erfolgt durch die Interaktion der folgenden 3 Enzymgruppen:

#### $\alpha$ -Sekretase:

Die  $\alpha$ -Sekretase umfasst mehrere Proteine der ADAM-Familie. Dabei handelt es sich um integrale Typ-I Membranproteine, die durch ihren obligaten Bedarf von Zink als Cofaktor wiederum Mitglied der Metzidin-Superfamilie sind (Edwards et al., 2008; Roberts et al., 1994). Aktivität als  $\alpha$ -Sekretase zeigen dabei die Enzyme ADAM9, ADAM10 und ADAM17. Letztere ist ebenfalls proteolytisch für die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) verantwortlich (Black et al.,

1997; Moss et al., 1997). Von den drei genannten Vertretern ist ADAM10 für den größten Anteil der neuronalen APP-Prozessierung verantwortlich (Jorissen et al., 2010).

#### β-Sekretase:

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist die membrangebundene Aspartatprotease BACE-1 (Vassar et al., 1999). Das Homolog BACE-2 ist im Gegensatz zu BACE-1 in niedrigem Maße im Zentralnervensystem exprimiert (Bennett et al., 2000) und zeigt eine geringere Bindungsaffinität gegenüber APP (Farzan et al., 2000). BACE-1 findet sich außer an der Zelloberfläche auch in Endosomen und im Golgi-Apparat. Die enzymatische Aktivität ist im sauren Milieu am höchsten (Huse et al., 2000, 2002; Vassar et al., 2009; Walter et al., 2001). Neben ihrer Rolle in der APP-Prozessierung sind noch weitere Substrate der β-Sekretase bekannt, unter anderem die Aktionspotential modulierende β2-Untereinheit der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (engl. *voltage-gated sodium channel β2*, Navβ2) und Neuregulin-1, welches als Ligand der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen an der Myelinisierung von peripheren und zentralen Axonen, der Synapsenformierung und Neurotransmitterregulation beteiligt ist (Falls, 2003; Hu et al., 2006; D. Y. Kim et al., 2005; Michailov et al., 2004; Willem et al., 2006; Wong et al., 2005).

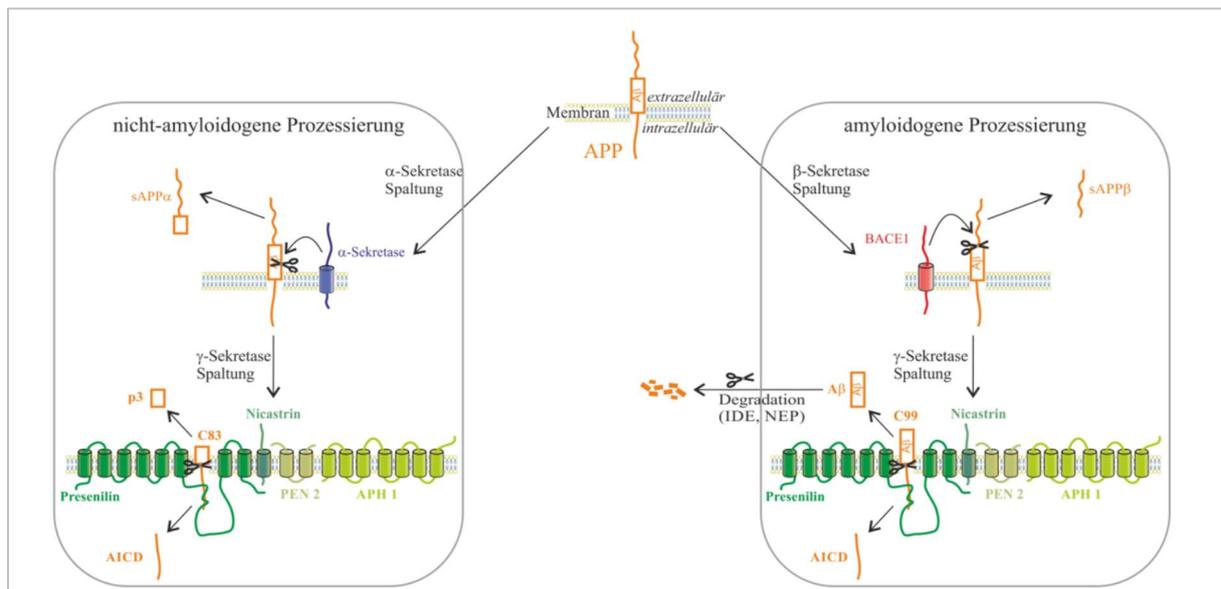
#### γ-Sekretase:

Die γ-Sekretase ist ein Heterotetramer. Der Komplex besteht aus den vier Monomeren Präsenilin 1 oder 2 (engl. *presenilin*, PS1 bzw. PS2), Vorderes-Pharynx-Fehlstück 1 (engl. *anterior pharynx defective 1*, APH-1), Presenillin-Verstärker-2 (engl. *presenilin enhancer 2*, PEN-2) und Nicastrin (NCT). Alle vier Monomere sind Transmembranproteine und für die enzymatische Aktivität notwendig (Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003). Nach Zusammensetzung des Komplexes kommt es zur Auto- und Endoproteolyse des Präsenilins. Die Aspartatreste der zwei entstehenden Fragmente sind das aktive Zentrum der katalytischen Reaktion (Ahn et al., 2010; Borchelt et al., 1996; Wolfe et al., 1999). Die proteolytische Aktivität des γ-Sekretasekomplexes findet innerhalb des hydrophoben Abschnittes der Zellmembran statt (Grziwa et al., 2003).

Die APP-Prozessierung durch die 3 beschriebenen Sekretasen lässt sich allgemein in einen amyloidogenen und einen nicht amyloidogenen Weg unterscheiden (siehe Abbildung 1). Beide Prozessierungswege unterscheiden sich in ihren Produkten und der Konsequenz für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. Es werden im Folgenden beide Prozessierungsmöglichkeiten des APP kurz skizziert:

### Nicht-amyloidogene Prozessierung:

Im Rahmen der nicht-amyloidogenen Prozessierung kommt es durch die initiale enzymatische Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase zur Hydrolyse des APP in eine N-terminale Fraktion, welche als lösliches APP- $\alpha$  (engl. *soluble APP $\alpha$* , sAPP $\alpha$ ) bezeichnet wird, und das sogenannte C-terminale Fragment ( $\alpha$ CTF, Synonym: C83). sAPP $\alpha$  ist nicht membrangebunden und wird in den Extrazellularraum sezerniert. Das weiterhin membrangebundene  $\alpha$ CTF kann im nächsten Schritt in Anwesenheit der  $\gamma$ -Sekretase in eine intrazelluläre Domäne des APP (AICD) und das p3-Peptid umgewandelt werden (Allinson et al., 2003; Guo et al., 2020; Haass et al., 1993). Es konnte in Studien ein neuroprotektiver und gedächtnisverbessernder Effekt des sAPP $\alpha$  nachgewiesen werden (Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998). Das gebildete p3-Peptid bildet keine Amyloid-Plaques aus (Dulin et al., 2008).



**Abbildung 1: Prozessierung des APP.** Grundsätzlich wird die amyloidogene von der nicht-amyloidogenen Prozessierung unterschieden. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung (linke Abbildung) wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der  $A\beta$ -Domäne in das extrazellulär gelöste sAPP $\alpha$  und das membranös gebundene  $\alpha$ CTF (Synonym: C83) gespalten. Im folgenden Schritt kommt es durch Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase zur Bildung des löslichen Peptids p3 und dem intrazellulär freigesetzten AICD. Im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung (rechte Abbildung) entstehen durch initiale Spaltung der  $\beta$ -Sekretase BACE-1 die Produkte sAPP $\beta$ , welches extrazellulär freigesetzt wird, und das membranös gebundene  $\beta$ CTF (Synonym: C99). Die Spaltung des  $\beta$ CTF in  $A\beta$  und AICD erfolgt innerhalb der Zellmembran durch die  $\gamma$ -Sekretase.  $A\beta$  wird unter physiologischen Bedingungen durch IDE und NEP degradiert. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Bildung und Abbau des  $A\beta$  führt zur Oligomerisierung und Manifestation der neurotoxischen Amyloid-Plaques. Abbildung modifiziert nach (M. O. W. Grimm, Zimmer, et al., 2013).

### Amyloidogene Prozessierung:

Bei der amyloidogenen Prozessierung entsteht durch die Hydrolyse der  $\beta$ -Sekretase das Produkt lösliches APP $\beta$  (engl. *soluble APP $\beta$* , sAPP $\beta$ ) an der N-terminalen Domäne des APP und das transmembranös verankerte C-terminale Fragment ( $\beta$ CTF, Synonym C99) (Guo et

al., 2020; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Kommt es nun zur Peptidfragmentierung des  $\beta$ CTF durch die  $\gamma$ -Sekretase, entstehen als Produkte das in den Intrazellularraum freigesetzte AICD und extrazellulär sekretierte A $\beta$ -Isoforme (insbesondere A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ ) (Tarasoff-Conway et al., 2015). A $\beta_{38}$  zeigt dabei von den drei Isoformen die geringste Tendenz zur Bildung von unlöslichen Aggregaten (Moro et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Dicke der Zellmembran die Schnittstelle der  $\gamma$ -Sekretase und damit das generierte A $\beta$ -Isoform beeinflusst (Grziwa et al., 2003; Winkler et al., 2012).

Das Gleichgewicht an A $\beta$  wird neben der de novo Synthese auch durch Abbaumechanismen reguliert. Die Degradierung von intrazellulärem A $\beta$  kann dabei durch Proteasomen (F. P. Perez et al., 2014) oder lysosomale Cathepsine (L. Zhang et al., 2009) erfolgen. Extrazelluläres A $\beta$  kann ebenfalls durch mehrere Proteasen wie Neprilysin (NEP), Insulin-degradierendes Enzym (IDE), Matrix-Metalloproteinasen und weitere degradiert werden (Iwata et al., 2001; Miners et al., 2008; W. Q. Qiu et al., 1998). Daneben ist eine Eliminierung des A $\beta$  durch gliale Phagozytose und Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke möglich (Tarasoff-Conway et al., 2015; Yoon & AhnJo, 2012).

Neben den Amyloid-Plaques sind das zweite charakteristische Merkmal der Alzheimer-Demenz die intrazellulären NFT (siehe Kapitel 2.1.2.1.2). Die unlöslichen neurofibrillären Bündel bestehen hauptsächlich aus dem hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, welches sich paarig zu helikalen Filamenten formiert (engl. *paired helical filaments*, PHF) (Goedert et al., 1992; Grundke-Iqbal, Iqbal, Quinlan, et al., 1986; Grundke-Iqbal, Iqbal, Tung, et al., 1986; Tarasoff-Conway et al., 2015). Sie befinden sich intrazellulär in Neuronen, hauptsächlich an Axonen und somatodendritischen Kompartimenten (L. I. Binder et al., 1985; Butner & Kirschner, 1991). Es konnten im Gehirn sechs Isoformen des Tau-Proteins identifiziert werden (Goedert et al., 1989). Als Mitglieder der Mikrotubuli-assoziierte-Protein-Familie (engl. *microtubule-associated proteins*, MAP) ermöglicht Tau durch seine Interaktion mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin die Generierung der Mikrotubuliheterodimere, die als Teil des Cytoskelettes eine kritische Funktion für den axonalen Transport und Zellstabilität erfüllen (Weingarten et al., 1975). Die Regulation von Tau erfolgt dabei über den Phosphorylierungsgrad (A. C. Alonso et al., 1994; Weingarten et al., 1975). Die Hyperphosphorylierung wird sowohl durch Überaktivierung von Proteinkinasen, beispielsweise der Glykogen-Synthase-Kinase-3b (GSK3b) (Cuchillo-Ibanez et al., 2008; S. J. Liu et al., 2004; J. Wang et al., 1998), als auch durch verminderte Aktivität der Phosphatasen bedingt. Bei letzterem Prozess scheint hauptsächlich die Protein-Phosphatase 2A (PP2A), welche neben einer verminderten Dephosphorylierungsaktivität auch die Aktivität Tau-affiner Proteinkinasen fördert, beteiligt zu sein (Gong et al., 1995; Kins et al., 2003; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001). Zuletzt sei der nukleäre Transkriptionsfaktor Frühes-Wachstumsantwort-Protein 1 (engl. *early*

*growth response protein 1*, EGR-1) erwähnt, welches im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung signifikant erhöht ist (Gómez Ravetti et al., 2010), und sowohl die Aktivität der Tau-phosphorylierenden Cyclin-abhängigen-Kinase 5 (engl. *cyclin dependent kinase 5*, CDK5) fördert und die Tau-dephosphorylierende Protein-Phosphatase 1 (PP1) hemmt (Lu et al., 2011). Die Hyperphosphorylierung des Taus reduziert den proteolytischen Abbau durch Capaine (Calcium abhängige neutrale Proteasen), und Proteasomen (Poppek et al., 2006; L. Yang & Ksiezak-Reding, 1995), wodurch die pathologische Akkumulation am ehesten durch verminderten Abbau bedingt ist.

### **2.1.2.3 Ätiologie und Pathogenese**

Die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung ist ein, mit mehreren Risikofaktoren assoziierter, multifaktorieller Prozess, wobei die Neurotoxizität der A $\beta$ -Oligomere und NFT eine zentrale Rolle einnimmt. Es konnten mehrere A $\beta$ -assoziierte Mechanismen identifiziert werden, die in ihrer Gesamtheit das klinische Bild der Alzheimer-Erkrankung bedingen. Es wird im Folgenden auf diese Prozesse eingegangen:

#### 1. Störung der Calcium-Homöostase

Calciumionen sind ubiquitäre second messenger im Organismus. Durch Pumpprozesse der Calcium-ATPase in das endoplasmatische Retikulum bzw. in den Extrazellularraum wird die cytosolische Konzentration niedrig gehalten. Eine erhöhte cytosolische Calciumkonzentration führt zur Aktivierung von Signalkaskaden mit Beeinflussung von Membranerregbarkeit, Neurotransmission, Genexpression, Zellwachstum, Differenzierung, Radikalbildung und Zelltod (Berridge, 1998). A $\beta$  interagiert unter anderem mit Calcium-permeablen Kanälen und den spannungsabhängigen Calciumkanälen vom L-, N- und P-Typ mit konsekutiv erhöhter cytosolischer Calciumkonzentration und erhöhter postsynaptischer Reaktion im Rahmen der synaptischen Übertragung (MacManus et al., 2000; Rovira et al., 2002). Zusätzlich beeinflusst A $\beta$  die Calciumhomöostase durch Bildung kationendurchlässiger Poren in der Zellmembran in vitro und in vivo (Arispe, 2004; Arispe et al., 1994; Arispe, Pollard, et al., 1993; Arispe, Rojas, et al., 1993; Kawahara et al., 1997; Lashuel et al., 2002; H. Lin et al., 2001; Quist et al., 2005; Rhee et al., 1998). Dieser Befund konnte elektronenmikroskopisch gesichert werden (Inoue, 2008). Eine Blockade dieser Poren mindert die A $\beta$ -vermittelte Toxizität auf Neurone in vitro (Diaz et al., 2009).

#### 2. Störung des cholinergen Systems

Im Rahmen einer Alzheimerdemenz kommt es durch Verlust cholinergere Neurone und Transmission zu kognitivem Funktionsverlust (Bartus et al., 1982). Es konnte die Bindung und Beeinflussung von A $\beta$  an nikotinergere Acetylcholin-Rezeptoren (engl. *nicotinic acetylcholine receptor*, n-AChR) nachgewiesen werden (Buckingham et al., 2009; H.-Y. Wang et al., 2000).

### 3. Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion

Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung konnte eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) mit vermehrter Oxidation von Lipiden und Proteinen nachgewiesen werden (Brustovetsky et al., 2005; Lovell et al., 2001). Zusätzlich konnte im Mausmodell eine Akkumulation von A $\beta$  in Mitochondrien mit erhöhter Produktion von Wasserstoffperoxid und verminderter Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase gezeigt werden. In letzter Konsequenz kommt es zu oxidativem Stress gegenüber den Mitochondrien mit assoziierter Dysfunktion, reduziertem Energiemetabolismus und schließlich dem Zelltod (Manczak et al., 2006). Zusätzlich ist der fördernde Effekt des oxidativen Stresses auf die Neubildung von A $\beta$  hinreichend bekannt (Apelt et al., 2004; Simpson et al., 2010; Tamagno et al., 2008; Tong et al., 2005).

### 4. Neuroinflammation

A $\beta$  besitzt einen aktivierenden Effekt auf immunkompetente Zellen des Zentralnervensystems (Mikroglia und Astrozyten) und proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Stickstoffmonoxid) (Akiyama, 2000; Sánchez-Sarasúa et al., 2020; W.-Y. Wang et al., 2015; White et al., 2005). Neuroinflammation fördert die Neubildung von A $\beta$  im Sinne eines Circulus vitiosus (Heneka et al., 2010; J. W. Lee et al., 2008; Sheng, 2003). Zusätzlich fördert der bereits erwähnte oxidative Stress die vermehrte Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Agostinho et al., 2010; Candore et al., 2010).

### 5. Lipidalterationen:

Es besteht eine komplexe Interaktion zwischen Lipiden des Zentralnervensystems und der APP-Prozessierung. Bereits seit längerem ist eine veränderte Zusammensetzung mehrerer Lipidklassen in Alzheimergehirnen bekannt (Ooi et al., 2021; Yin, 2023). A $\beta$  konnte dabei als Modulator mehrerer Lipidstoffwechselwege nachgewiesen werden (M. O. W. Grimm et al., 2007, 2012; Hartmann et al., 2007). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Lipidzusammensetzung ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf die A $\beta$ -Prozessierung ausübt (M. O. W. Grimm et al., 2017; Grösgen et al., 2010), weshalb von einem bidirektionalen Zusammenhang ausgegangen werden muss. Aufgrund der Bedeutung dieser Interaktionen für die Fragestellung dieser Arbeit werden Lipide in Kapitel 2.2 rekapituliert.

### 2.1.3 Einordnung der Therapiemöglichkeiten

#### 2.1.3.1 Symptomatische Therapiestrategien

Wie bereits in Kapitel 2.1.1.3 erläutert, verläuft die Alzheimererkrankung entlang eines Kontinuums. Eine wichtige Säule in der Therapie einer manifesten Alzheimer-Demenz stellt die symptomatische Behandlung dar. Neben unterstützenden psychosozialen Interventionen wie kognitive Verfahren, Ergotherapie und körperlicher Aktivität stehen aktuell zwei pharmakologische Substrate mit dem Ziel der Symptomkontrolle zur Verfügung (DGN e. V. & DGPPN e. V., 2023). Neben den drei in Deutschland zugelassenen Acetylcholinesterase-Inhibitoren (ACHE-I) Donezepil, Rivastigmin und Galantamin, welche bei leichten bis moderaten Formen ihre Anwendung finden, kann das Substrat Memantin aus der Gruppe der N-methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonisten (NMDA-Rezeptorantagonisten) -gegebenenfalls in Kombination mit Donezepil- bei moderaten bis schweren Formen verordnet werden (Müller et al., 2019).

Das Enzym Acetylcholinesterase befindet sich im synaptischen Spalt cholinergischer Neurone und katalysiert die hydrolytische Spaltung der Esterbindung zwischen der Hydroxygruppe des Cholins und der Carboxylgruppe der Ethansäure, in deren Konsequenz die Wirkung des Acetylcholins als Neurotransmitter verloren geht (Singh & Sadiq, 2024). Inhibition dieses Enzyms durch ACHE-I wirkt dem in Kapitel 2.1.2.3 bereits beschriebenen Mangel an Acetylcholin im synaptischen Spalt entgegen, die Kognition wird verbessert und der neuronale Zelluntergang vermindert (Eldufani & Blaise, 2019; Sharma, 2019; Singh & Sadiq, 2024). Dem gegenüber erfolgt die Wirkung der Memantine durch Modulation des NMDA-Rezeptorvermittelten intrazellulären Calciumeinstroms (Folch et al., 2018; Kuns et al., 2024).

#### 2.1.3.2 Kurative Therapiestrategien

Der sozioökonomischen Bedeutung der Alzheimer-Erkrankung geschuldet, besteht ein hohes Bestreben einer kurativen Therapie. Therapeutika, welche im Gegensatz zur rein symptomatischen Therapie durch Modulation verschiedener pathophysiologischer Mechanismen die Progression der Alzheimer-Krankheit beeinflussen, werden unter dem Begriff der Krankheits-modifizierenden Therapie (engl. disease-modifying treatment, DMT) zusammengefasst (Breijyeh & Karaman, 2020). Bereits mehrere DMT wurden entwickelt, versagten jedoch in der Markteinführung aufgrund gescheiterter klinischer Studien, darunter A $\beta$ -Antikörper (Solanzumab und Bapineuzumab),  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (Semagacestat 6, Avagacestat 7 und Tarenflurbil 8), BACE1-Inhibitoren (Lanabecestat 9, Verubecestat 10 und Atabecestat 11) oder eine aktive Immunisierung durch das synthetische A $\beta$ -Peptid AN-1792 (Breijyeh & Karaman, 2020; S. Khan et al., 2020). Den gescheiterten Studien zum Trotz befanden sich 20 weitere DMT-Substanzen im Jahr 2022 in klinischen Studien der Phase III (Hager, 2022).

Erst kürzlich zeigte BAN2401 (Lecanemab), ein humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper mit hoher Bindungsaffinität gegenüber gelöster A $\beta$ -Protofibrillen in der Phase III-Studie eine moderate Minderung des Kognitionsverlustes im Vergleich zur Placebogruppe in einer frühen Phase der Alzheimererkrankung und erhielt die Zulassung durch die amerikanische Arzneimittelagentur (Harris, 2023; Hoy, 2023; Qiao et al., 2023; van Dyck et al., 2023; Vitek et al., 2023). Ebenfalls in den vereinigten Staaten zugelassen ist Aducanumab, ein monoklonale Antikörper gegen aggregierte lösliche und unlösliche Formen des A $\beta$  (Cummings et al., 2022).

### **2.1.3.3 Bedeutung der Früherkennung und Prävention**

Neben den symptomatischen und kurativen Therapiestrategien gewinnt die Rolle der Früherkennung und Prävention der Alzheimererkrankung zunehmend an Bedeutung. Mehrere Studien konnten Risikofaktoren für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit identifizieren. Neben nicht beeinflussbaren Eigenschaften wie Alter und genetischer Prädisposition (Guerreiro & Bras, 2015; Karch & Goate, 2015), erhöhen Umweltfaktoren, insbesondere Luftverschmutzung (Croze & Zimmer, 2018; Moulton & Yang, 2012) und Metallexpositionen mit Aluminium, Blei und Cadmium das Risiko der Alzheimer-Erkrankung (Colomina & Peris-Sampedro, 2017; Huat et al., 2019). Weitere Risikofaktoren stellen neben sozialer Isolation durch Hörverlust (Armstrong et al., 2019; Griffiths et al., 2020; Hung et al., 2015) und traumatischen Hirnschäden (Fann et al., 2018; Mackay et al., 2019; Nordström & Nordström, 2018; Yaffe et al., 2019) Infektionen mit Herpes-simplex- und Cytomegalieviren, Chlamydia pneumoniae und Spirochäten dar (Muzambi et al., 2019; Sochocka et al., 2017). Zusätzlich besteht eine Assoziation zwischen der Alzheimer-Erkrankung und den Volkerkrankungen der Industrieländer. In zwei großen longitudinalen Studien konnte nachgewiesen werden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren (Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Adipositas und Rauchen) im mittleren Lebensalter ebenfalls das Auftreten einer Alzheimer-Krankheit im höheren Alter begünstigen. Rauchen ist dabei ein unabhängiger Risikofaktor. Durch Reduzierung der kardiovaskulären Risikofaktoren wird das Risiko für das spätere Auftreten einer Alzheimer-Demenz nachweislich gemindert (A. Alonso et al., 2009; Kivipelto & Solomon, 2008). Zuletzt erhöhen auch psychiatrische Erkrankungen, insbesondere Depressionen (Bartels et al., 2018; Diniz et al., 2013) und nichtorganische Schlafstörungen (Andrews et al., 2021; Chen et al., 2016; Shi et al., 2018; Westwood et al., 2017), sowie erhöhter Stress (Sindi et al., 2017; Song et al., 2020) das Risiko der Alzheimer-Erkrankung.

Neben den vermeidbaren Risikofaktoren konnten ebenfalls protektive Faktoren gegen die Alzheimer-Erkrankung identifiziert werden. Essenziell für eine Modulierung des Krankheitsverlaufes stellt in diesem Kontext der Zeitpunkt der Intervention dar. Wie bereits in Kapitel 2.1.1.3 erläutert, verläuft die Progression der Alzheimer-Erkrankungen entlang eines Kontinuums, mit den ersten pathologischen Veränderungen bereits Jahren vor den ersten

klinischen Symptomen. Aktuelle Erkenntnisse deuten auf eine Reduzierung der Krankheitsprogression im präklinischen und MCI-Stadium hin zur manifesten Alzheimer-Demenz durch Modifizierung der Lebensgewohnheiten (Livingston et al., 2017; World Health Organisation, 2019). Neben den präventiven Effekten von hohem Bildungsgrad, körperlicher, mentaler und sozialer Aktivität (Andel et al., 2008; Liu-Ambrose & Donaldson, 2008), stellt insbesondere die Ernährung einen begünstigenden Faktor dar (Anastasiou et al., 2018; Féart, 2009; Lehtisalo et al., 2017; Scarmeas, 2009). Sowohl die mediterrane Diät sowie der Konsum von Fisch und Meeresfrüchten zeigen einen modulierenden Effekt auf Kognition im Alter (Hoscheidt et al., 2022; Morris et al., 2015; Y. Zhang et al., 2016). Neben diesen Ernährungsgewohnheiten zeigte das aus mehreren Nährstoffen zusammengesetzte Nahrungsergänzungsmittel Fortasyn Connect (Souvenaid) in prospektiven klinischen Studien ebenfalls eine Besserung in Kognition, allgemeiner Funktionsfähigkeit und Krankheitsprogress (Scheltens et al., 2010, 2012; Shah et al., 2013; Soininen et al., 2021). Der Einfluss der Ernährung auf den Verlauf der Alzheimer-Erkrankung in frühen Stadien eröffnet somit die Frage nach weiteren -den Krankheitsverlauf modifizierenden- Nährstoffen.

## **2.2 Lipide**

### **2.2.1 Definition und Kategorisierung**

Lipide bilden einen fundamentalen Baustein der Biologie (Muro et al., 2014). Der Sammelbegriff der Lipide umfasst verschiedenste Molekülgruppen, deren Gemeinsamkeit die schlechte Löslichkeit in polaren Medien darstellt (Cammack et al., 2006). Die Spannweite der Lipidklassen reicht dabei von einfachsten Kohlenstoffketten zu komplexen chemischen Strukturen (Burdge & Calder, 2015). Aufgrund der enormen strukturellen und funktionellen Vielfalt stellt die Klassifikation der Lipide eine Herausforderung dar. Das LIPID MAPS Klassifikationssystem unterteilt Lipide auf Basis ihrer Genese in hydrophobe oder amphipathische niedermolekulare Verbindungen, die vollständig oder teilweise aus der Carbanion-basierten Kondensation von Ketoacylthioestern und/oder Carbokationen-basierten Kondensation von Isopreneinheiten entstehen. Auf Basis dieser Klassifikation werden acht Lipidklassen mit weiteren Unterklassen unterschieden: Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Saccharolipide, Polyketide, Sterole und Prenole (Fahy et al., 2005, 2009).

### **2.2.2 Funktion**

#### **2.2.2.1 Membranbildung**

Eine essenzielle Funktion der Lipide ist die Fähigkeit zur Membranbildung. Im polaren Lösungsmittel bilden amphiphile Lipide eine Doppelschicht, wobei der hydrophile Pol jeweils nach außen und die hydrophoben Pole nach innen gerichtet sind (Montesinos et al., 2020). Diese Form der Doppelmembran ist für polare Substanzen unpassierbar und grenzt sowohl

die Zelle von der Umwelt als auch die Zellkompartimente innerhalb voneinander ab (Epan, 2015). Die Biomembranen von Säugetieren besteht hauptsächlich aus den Lipidklassen der Glycerophospholipide, Sphingolipide und Sterole (insbesondere Cholesterin) (Watson, 2015). Membranproteine, welche vollständig oder teilweise die Doppelmembran durchdringen, ermöglichen unter anderem den Transport polarer Substanzen und großer Verbindungen Zellkommunikation und Strukturerkennung (Vénien-Bryan & Fernandes, 2023). Zellmembrane sind komplexe, hochdynamische Strukturen und an einem Großteil zellulärer Prozesse beteiligt. Neben Signaltransduktion und Erhaltung eines elektrochemischen Gradienten regulieren Zellmembrane Zell-Zell-Kommunikation, die Bildung von Adhäsionsbindungen sowie die Form und Polarität der Zelle (Montesinos et al., 2020). Maßgeblich verantwortlich für die hohe Dynamik und Anpassungsfähigkeit der Zellmembran ist die variable und heterogene Lipidkomposition. Sowohl die beiden Einzelschichten als auch Regionen innerhalb biologischer Membranen zeigen eine asymmetrische Lipidzusammensetzung, welche sich je nach spezifischer Anforderung durch die Enzyme des verzahnten Lipidmetabolismus angepasst werden können (Montesinos et al., 2020). Die Bedeutung dieser Mikrodomänen wird in Kapitel 5.2.1 vertiefend besprochen.

#### **2.2.2.2 Energiemetabolismus**

Neben der Rolle in der Membranbildung können Lipide im menschlichen Organismus in Form von Triacylglyceride (TAG) als Energiereservoir dienen (A. Yang & Mottillo, 2020). Es handelt es sich bei TAG um die Kombination aus drei Fettsäuren, welche kovalent an die drei Hydroxylfunktionen eines Glycerinmoleküls verestert sind (Han & Ye, 2021). TAG bilden die wichtigste Energiespeichermöglichkeit im menschlichen Organismus (Cerk et al., 2017). In einem Vorgang namens Lipolyse werden Fettsäuren mittels Hydrolyse entweder intra- oder extrazellulär durch die Enzymgruppe der Lipasen freigesetzt um im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation in Mitochondrien zur Energiegewinnung katabolisiert (Grabner et al., 2021; Olzmann & Carvalho, 2019; Sastry, 1985). Für die Energiegewinnung durch die  $\beta$ -Oxidation in Mitochondrien sind Carnitine und Carnitinester unverzichtbar (Sastry, 1985). Carnitin ist eine hydrophile quartäre Ammoniumverbindungen mit einer Schlüsselfunktion im Energiemetabolismus. Carnitin kann sowohl über die Nahrung gewonnen als auch endogen synthetisiert werden (Pekala et al., 2011). Die de novo-Synthese kann dabei ausschließlich in Leber, Niere und Gehirn erfolgen (Vaz & Wanders, 2002). Über die Nahrung aufgenommenes Carnitin findet sich insbesondere in rotem Fleisch und Milchprodukten (Jones et al., 2010). Carnitin dient als Transportform für langkettige Fettsäuren innerhalb der ansonsten nicht passierbaren inneren Mitochondrienmembran. Dafür werden aktivierte Fettsäuren (Acyl-CoA) durch die Translokase Carnitin-Acyltransferase 1 (CPT-1) auf Carnitin übertragen. Das entstandene Acylcarnitin kann nun mithilfe des in der inneren Mitochondrienmembran gelegenen Transmembranproteins Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) in Form eines

aktiven Transportes in die Mitochondrienmatrix gelangen. Dort wird Acylcarnitin durch die Carnitin-Acyltransferase 2 (CPT-2) unter Austausch von Carnitin gegen Coenzym A erneut in Acyl-CoA überführt (Ferreira & McKenna, 2017) und kann nun der  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden. Der beschriebene Carnitin-vermittelte Transportprozess in Mitochondrien gilt für Fettsäuren mit einer Kettenlänge über zehn Kohlenstoffatomen, kürzere Kettenlängen sind vom Carnitinsystem unabhängig. Die  $\beta$ -Oxidation findet neben den Mitochondrien ferner in Peroxisomen statt (Schrader et al., 2015; Violante et al., 2013).

## **2.2.3 Fettsäuren**

### **2.2.3.1 Struktur**

Fettsäuren beschreiben einen Sammelbegriff für Kohlenstoffketten, deren zwei Pole durch eine endständige Carboxylgruppe (dessen Kohlenstoffatom auch als  $\alpha$ -Atom bezeichnet wird) und eine Methylgruppe (das Kohlenstoffatom wird auch  $\omega$ -Atom bzw.  $n$ -Atom bezeichnet) gebildet werden. Ist jedes Kohlenstoffglied der Kette vollständig an Wasserstoffatomen gebunden handelt es sich um gesättigte Fettsäuren (SFA). Im Falle einer einzigen Kohlenstoffdoppelbindung liegt eine einfach-ungesättigte Fettsäure (MUFA) vor. Liegen mindestens zwei Kohlenstoffdoppelbindungen vor, handelt es sich um eine mehrfach ungesättigte Fettsäure (PUFA). Die Lokalisation der Position der Doppelbindung wird vom Abstand zum  $\omega$ -Atom angegeben (befinden sich beispielsweise zwischen dem endständigen Kohlenstoffatom und der Doppelbindung sechs Kohlenstoffe, handelt es sich um eine  $\omega$ -6 Fettsäure) (Rustan & Drevon, 2005). Die Position der Doppelbindung und die cis/trans-Konfiguration sind variabel (die cis-Konfiguration findet sich jedoch häufiger) (Sastry, 1985). Die meisten Fettsäuren bestehen aus einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen (Sastry, 1985). Anzahl, Lokalisation und Orientierung an Doppelbindungen beeinflusst den räumlichen Aufbau der Fettsäure und dessen physikochemischen Eigenschaften wie beispielsweise den Schmelzpunkt (Burdge & Calder, 2015). Fettsäuren bilden die Basis komplexer Lipide. Auf den speziellen Aufbau der Glycerophospholipide und Sphingolipide wird in Kapitel 5.1.2 gesondert eingegangen.

### **2.2.3.2 Fettsäuren im zentralen Nervensystem**

Ungefähr 50 % des Trockengewichts des Gehirns wird durch Lipide gebildet. Für die Funktionalität des ZNS sind Lipide durch Modulierung physiologischer Prozesse wie Signaltransduktion, Transmembrangradienten und Vesikelbildung substanziell (Aureli et al., 2015; Behl, 1999; Borroni et al., 2016; Sonnino et al., 2015). Trotz hoher Variabilität in der chemischen Struktur, bilden nur wenige bestimmte Fettsäuren den größten Anteil im Zentralnervensystem. Tabelle 1 gibt diesbezüglich einen Überblick (aus Fraser et al., 2010). Es zeigt sich eine Dominanz in absteigender Reihenfolge der Fettsäuren Stearinsäure (C18:0), Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (C18:1  $\omega$ -9), Docosahexaensäure (DHA, C22:6  $\omega$ -3) und

Arachidonsäure (AA; C20:4  $\omega$ -6), welche zusammen ungefähr 83% aller Fettsäuren des frontalen Cortex bilden.

**Tabelle 1: Fettsäureverteilung im menschlichen frontalen Cortex. Modifiziert nach (Fraser et al., 2010).**

<b>Anteil (in Molprozent <math>\pm</math> Standardabweichung)</b>	<b>Trivialname</b>	<b>Systemischer Lipidname</b>
21,19 $\pm$ 1,51	Stearinsäure	18:0
20,95 $\pm$ 1,03	Palmitinsäure	16:0
16,97 $\pm$ 1,6	Ölsäure	18:1 ( $\omega$ -9)
15,42 $\pm$ 1,51	Docosahexaensäure (DHA)	22:6 ( $\omega$ -3)
8,67 $\pm$ 0,72	Arachidonsäure (AA)	20:4 ( $\omega$ -6)

Von besonderer Bedeutung für die Funktionalität des Zentralnervensystems zeichnen sich insbesondere die  $\omega$ -3 Fettsäure DHA und  $\omega$ -6-Fettsäure AA aus (Duncan & Bazinet, 2010).

Als Acylseitenkette der Phospholipide bildet DHA einen Hauptbestandteil neuronaler Membranen. Dabei kann DHA mittels Synthese aus der Vorläuferfettsäure  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3  $\omega$ -3) synthetisiert (Sprecher & Chen, 1999; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015), oder über die Nahrungsaufnahme angeeignet werden, wobei letztere Möglichkeit den größeren Anteil ausmacht (Pawlosky et al., 2001). In besonders hohen Konzentrationen finden sich DHA in Fisch und anderen maritimen Nahrungsmitteln (Mann et al., 2010). Ein erhöhter Anteil von DHA innerhalb der membranbildenden Lipide erhöht die Membranfluidität (Horrocks & Farooqui, 2004). Über Modulation der Differenzierung und Zelltod spielt DHA in Neuronen des Zentralnervensystems eine bedeutsame Rolle (Calon et al., 2004; Dagai et al., 2009). Insbesondere muss der Einfluss des DHA auf die Progression der Alzheimerpathologie hervorgehoben werden. Die genauen Mechanismen und Konsequenzen dieser Interaktion werden in Kapitel 5.2.1 tiefergehend beleuchtet.

Arachidonsäure ist neben DHA die mengenmäßig dominanteste mehrfach ungesättigte Fettsäure im Zentralnervensystem (Calon et al., 2004). Arachidonsäure wird über die Nahrungsaufnahme und Synthese aus dem Vorläuferlipid Linolsäure (C18:2) dem Zentralnervensystem zur Verfügung gestellt. Die Haupteinnahmequelle von Arachidonsäure stellen dabei Fleisch (vor allem Geflügel) und Eier dar (Friesen & Innis, 2009; D. Li et al., 1998; Sioen et al., 2007). Wie auch DHA findet sich AA zum größten Anteil in membranbildenden Lipiden und beeinflusst dadurch deren Zusammensetzung und Eigenschaften (Saini & Keum, 2018). Durch die enzymatische Aktivität der Gruppe der cytosolischen Phospholipase A2 kann das zellmembrangebundene AA intrazellulär freigesetzt werden (Shoieb et al., 2020). Die freie Arachidonsäure spielt eine maßgebliche Rolle im Kontext neuroinflammatorischer Prozesse. AA bildet das Ausgangssubstrat mehrerer proinflammatorischer Enzyme, welche AA in die

biologisch aktive Lipidmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene, und Endocannabinoide umwandeln (Y. Zhang et al., 2023).

## 2.3 Vitamin K

### 2.3.1 Entdeckung und Nomenklatur

Die Entdeckung des Vitamin K geht auf den dänischen Biochemiker Henrik Dam zurück, der 1929 die Entwicklung subkutaner und muskulärer Blutungen bei Hühnern unter einer fett- und cholesterinfreien Ernährung feststellte (H. Dam, 1929; Ferland, 2012a). Der beobachtete Effekt auf die Koagulation etablierte den Namen Vitamin K für die chemisch noch unbekannte Substanz (H. Dam, 1935; Ferland, 2012a). Schon früh wurde erkannt, dass sich Vitamin K in hohem Maße in grüner pflanzlicher Nahrung und fermentierten Tierprodukten befand. Auf Basis dieser Erkenntnis erfolgte schließlich die Unterscheidung zwischen pflanzlich generiertem Vitamin K1 und bakteriell produziertem Vitamin K2 (Almquist, 1935; Ferland, 2012a). Die Isolation und chemische Darstellung des Vitamin K1 aus der Luzerne und des Vitamin K2 aus verfaultem Fisch gelang schließlich der Arbeitsgruppe um den Biochemiker Edward Doisy in den 1930er Jahren (Binkley et al., 1940; Ferland, 2012a; MacCorquodale et al., 1939).

### 2.3.2 Chemischer Aufbau und Vorkommen

Vitamin K bildet zusammen mit Vitamin A, D und E die Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Wie auch die anderen fettlöslichen Vitamine verbirgt sich hinter dem Begriff Vitamin K eine Gruppe mehrerer Substanzen mit identischer Wirkweise. Gemeinsamkeit aller Vitamin-K-Substanzen ist ein hydrophiler 2-Methyl-1,4-Naphthochinonring mit einer lipophilen isoprenoiden Seitenkette variabler Länge und Sättigung am C3-Atom. 2-Methyl-1,4-Napthochinon ohne Substituenten wird als Vitamin K3 bezeichnet, welches nicht über die Nahrung aufgenommen wird, sich allerdings als Intermediat im menschlichen Urin finden lässt (Shearer & Newman, 2014; H. H. W. Thijssen et al., 2006).

Der historisch bedingte Begriff „Vitamin K1“ beschreibt das Molekül Phyllochinon. Es findet sich ubiquitär in der Pflanzenwelt und besitzt wie auch das Pflanzenpigment Chlorophyll eine einfach ungesättigte Phytyl- (Hexahydrotetraprenyl) Seitenkette (Halder et al., 2019). Mit der Nahrung als einzige Einnahmequelle findet sich Vitamin K1 in hohen Mengen in grünblättrigem Gemüse wie Spinat, Mangold, Grünkohl und in bestimmten Ölen, darunter betont in Raps-, Soja- und Olivenöl (L. Booth, 2012).

Vitamin K2 beschreibt die Gruppe der Menachinone (engl. *menaquinone*, MK), deren Gemeinsamkeit ein ungesättigter Polyisoprensubstituent variabler Kettenlänge am C3-Atom des Naphthochinonrings ist. Die Benennung der Einzelsubstanzen erfolgt anhand der Anzahl der Isopreneinheiten der Seitenkette. Somit werden die Einzelsubstanzen in der gängigen

Nomenklatur nach dem englischen Kürzel für Menachinon MK und der Anzahl der Isopreneinheiten als angehängte Ziffer benannt (beispielsweise MK7 für Menachinon 7, dessen Seitenkette aus 7 Isopreneinheiten besteht). Die Synthese der Menachinone erfolgt durch obligat und fakultativ anaerobe Bakterien, wovon auch einige den menschlichen Dickdarm besiedeln. Untersuchungen konnten vor allem langkettige Menachinone im Dickdarm nachweisen, davon am häufigsten MK10 und MK11 (Collins & Jones, 1981; Conly & Stein, 1992; Fernandez & Collins, 1987). Das kurzkettige Menachinon 4 (MK4) bildet in diesem Kontext eine Ausnahme. Es wird gewebespezifisch aus Phyllochinon mit Menadion (Vitamin K3) als Zwischenprodukt synthetisiert. Es konnte das Enzym UbiA-Prenyltransferase-Domäne-enthaltendes Protein 1 (engl. *UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1*, UbiAD1) als verantwortliches Enzym für diesen Überförungsprozess identifiziert werden, welches sowohl die Trennung der Phytyl-Seitenkette von Vitamin K1 als auch die Prenylierung des Menadions katalysiert (Nakagawa et al., 2010). Eine weitere Studie konnte einen Konzentrationsanstieg des im Urin messbares Menadions nach oraler Gabe, nicht aber nach subkutaner Applikation von Vitamin K1 aufzeigen. Zusammen mit der Erkenntnis der Unabhängigkeit der Interkonversion von Bakterien im Mausmodell (Davidson et al., 1998) wurde die Hypothese der gewebespezifischen Umwandlung von Phyllochinon in MK4 innerhalb der Enterozyten postuliert.

Ungefähr 10-25 % des über die Nahrung aufgenommen Vitamin K in der westlichen Welt sind Menachinone, davon 30-40 % MK4, danach in absteigender Häufigkeit MK9, MK8 und MK7. Menachinone finden sich hauptsächlich in Leber und fermentierten Produkten wie Käse oder der besonders an MK7 reichen japanischen Beilage „Natto“ (Nimptsch et al., 2008; Schurgers & Vermeer, 2000).

### **2.3.3 Effekte des Vitamin K**

#### **2.3.3.1 Der Vitamin K-Zyklus**

Vitamin K entfaltet seine vielfältigen Funktionen hauptsächlich über die posttranslationale Modifikation bestimmter Proteine während ihrer Sekretion aus dem endoplasmatischen Retikulum (Danziger, 2008). Durch Carboxylierung am  $\gamma$ -C-Atom mehrerer Glutamylreste wird bestimmten Proteinen die Interaktion mit Calciumionen ermöglicht. Für diese Carboxylierungsreaktion ist Vitamin K ein essenzieller Cofaktor. Die carboxylierten Proteine werden als Vitamin K-abhängige Proteine (engl. *vitamin K-dependent proteins*, VKDP) oder alternativ als  $\gamma$ -Glutamylproteine (engl. *gamma-carboxyglutamic acid*, Gla-Proteine) bezeichnet. Auf die Effekte der carboxylierten Proteine wird in Kapitel 2.3.3.2 gesondert eingegangen (Ferland, 2009; Stafford, 2005). Die Reaktionskopplung von Redoxreaktionen für die Synthese der VKDP wird als Vitamin K-Zyklus bezeichnet. Der Cofaktor Vitamin K wird dabei nicht verbraucht, sondern in einem Kreislauf regeneriert. Der Zyklus wird durch die zwei

Enzyme  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase (GGCX) und Vitamin K-Oxidoreduktase (VKOR) unterhalten (Oldenburg et al., 2008; Stafford, 2005; Turck et al., 2017).

### 2.3.3.2 Proteinvermittelte Effekte des Vitamin K

Seit der Entdeckung der ersten Vitamin-K-abhängigen Proteine in der Gerinnungskaskade wurden insgesamt 17 Gla-Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen und Wirkungsorten identifiziert (Xiao et al., 2020). Über die Gewebeverteilung und bekannten Funktionen der Gla-Proteine liefert Tabelle 26 im Anhang eine vertiefende Einsicht. Es soll im Folgenden ausschließlich auf die drei im Zentralnervensystem wirkenden Gla-Proteine Gas6, Protein C und Protein S vertiefend eingegangen werden:

#### Gas6:

Gas6 ist ein im zentralen Nervensystem in hohen Mengen exprimiertes Protein, welches in seiner Aminosäuresequenz Protein S ähnelt (Manfioletti et al., 1993; Prieto et al., 1999). Seine Wirkung als Signalmolekül entfaltet Gas6 als Ligand der Rezeptorfamilie TAM (Akronym für die Tyrosinkinase Tyro3, Axl und Mer). Die durch Gas6 initiierten Signale wirken sowohl an Neuronen als auch an Gliazellen. In Neuronen konnte ein antiapoptotischer Effekt über den Phosphoinositid-3-Kinase- (engl. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3-K) und mitogen-aktivierte Proteinkinase- (engl. *mitogen activated protein kinase*, MAPK) Signalweg nachgewiesen werden (Allen et al., 1999). Der neurotrophe Effekt konnte in einer weiteren Studie für hippocampale Neuronen bestätigt werden (Funakoshi et al., 2002). Im Rahmen des PI3-K-Signalweges kommt es zur Aktivierung der extrazellulären signalregulierten Kinase (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) und der Proteinkinase B (Allen et al., 1999). Der MAPK-Signalweg aktiviert ebenfalls ERK und das cAMP-Antwortbindungsprotein (engl.: *cAMP-response-element-binding protein*, CREB) (Prieto et al., 2007). Zusätzlich konnte eine weitere Studie einen neuroprotektiven Effekt des Gas6 gegen A $\beta$ -induzierte Apoptose in vitro nachweisen (Yagami, 2002). In Oligodendrozyten wirkt Gas6 ebenfalls antiapoptotisch über den Axl-Rezeptor und PI3-K/Akt-Signalweg durch Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose (S. L. Shankar et al., 2003, 2006). In einem Mausmodell, in welchem Demyelinisierung durch Toxine induziert wurde, konnte unter Gas6 ein erhöhtes Überleben von Oligodendrozyten und geringere Aktivierung von Mikroglia beobachtet werden (M. D. Binder et al., 2008). Der Effekt auf die Modulation der Myelinisierung konnte in zwei weiteren Mausmodellen untermauert werden (M. D. Binder et al., 2011; Tshiperson et al., 2010). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass endogenes Gas6 die Proliferation von neuronalen Stammzellen fördert (Gely-Pernot et al., 2012).

### Protein C:

Protein C ist ein zweikettiges Glykoprotein, welches zusammen mit seinem Cofaktor Protein S als Inhibitor der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa antikoagulatorisch wirkt (Stenflo, 1984). Protein C wird durch Bindung des Thrombins an den Transmembranrezeptor Thrombomodulin in Anwesenheit von Calciumionen in aktives Protein C (APC) überführt. Neben der Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa wirkt APC auch durch Inhibierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI) fibrinolytisch (Esmon & Esmon, 1984). Neben seiner Funktion als Antikoagulans in der plasmatischen Gerinnung konnte in mehreren Studien ein neuronaler zytoprotektiver und anti-inflammatorischer Effekt in vitro und in vivo nachgewiesen werden (Cheng et al., 2003; Hirose et al., 2000; Thiyagarajan et al., 2008; Yamauchi et al., 2006; Yesilirmak et al., 2008; Zlokovic et al., 2005). APC vermittelt seine Wirkung dabei über den endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) und folgende Aktivierung des Protease-aktivierter Rezeptor-Signalweges (PAR-1). Im Rahmen dieses Signalweges kommt es unter anderem zur Hemmung des Inflammation vermittelnden Transkriptionsfaktors NFκB (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) (Gorbacheva et al., 2010; Zlokovic et al., 2005).

### Protein S

Protein S ist ein einkettiges Glykoprotein, welches frei zirkulierend oder an das C4b-bindende Protein gebunden vorgefunden werden kann (Di Scipio et al., 1977; Walker, 1984). Es ermöglicht als Cofaktor des Protein C die Inaktivierung des Faktor VIIIa und die gesteigerte Fibrinolyse (de Fouw et al., 1986; Walker, 1984). Protein S wirkt ebenfalls im Zentralnervensystem, es findet sich in Neuronen, Schwann-Zellen, Astrozyten und neuronalen Tumorzellen (Phillips et al., 1993; Stitt et al., 1995). In Analogie zu Gas6 ist Protein S ein Ligand der TAM-Tyrosinkinase-Rezeptoren (Stitt et al., 1995). Es konnte ein protektiver Effekt des Protein S auf Neuronen gegen NMDA-induzierte Toxizität und Apoptose durch Aktivierung des Tyro3-PI3-K-Akt-Signalweges (siehe auch Gas6) nachgewiesen werden (Zhong et al., 2010).

#### **2.3.3.3 Proteinunabhängige Effekte des Vitamin K**

Neben den Proteinvermittelten Effekten des Vitamin K verdichtet sich die Datenlage über VKDP-unabhängige Effekte. Auf die verschiedenen Wirkmechanismen und deren potenziell neuroprotektiven Eigenschaften wird in Kapitel 5.1 vertieft eingegangen.

#### **2.3.4 Bedarf und Organverteilung**

Die Bestimmung des menschlichen Bedarfs an Vitamin K gestaltet sich schwierig. Die Etablierung eines Referenzwertes bedarf eines passenden Biomarkers beziehungsweise klinischen Endpunktes, der die adäquate Menge objektivieren kann. Global betrachtet

schwanken die Empfehlungsmengen an Vitamin K um den Faktor 2, was den fehlenden Konsensus über mögliche Biomarker und Endpunkte aufzeigt (Shearer et al., 2012). Die Messung der Koagulationsparameter ist nicht sensitiv für den Vitamin K-Status und eignet sich folglich nicht für Referenzempfehlungen (Booth & Rajabi, 2008; Turck et al., 2017).

Die Verteilung des Vitamin K in Geweben zeigt eine asymmetrische Distribution. Der größte Anteil der langkettigen Menachinone befindet sich ausschließlich in der Leber (H. H. W. Thijssen & Drittij-Reijnders-, 1996). Die Gesamtstoffmenge an Vitamin K1 und K2 der Leber wird auf ungefähr 200-300 nmol geschätzt (Shearer & Newman, 2008). In humanen und murinem extrahepatischen Geweben dominiert hingegen Vitamin K1 und MK4 (H. H. W. Thijssen et al., 1996; H. H. W. Thijssen & Drittij-Reijnders, 1994). Die höchsten Konzentrationen an Vitamin K1 (abgesehen von der Leber) wurden in der Bauchspeicheldrüse und im Herz, die niedrigsten Konzentrationen hingegen in Lunge, Niere und Gehirn gefunden. MK4 zeigte die höchste Konzentration in Gehirn (6 pmol/g), Bauchspeicheldrüse und Niere, geringe Konzentrationen hingegen in Lunge und Herz. Anteilsmäßig findet sich mehr MK4 als Phyllochinon im Gehirn und in der Niere (H. H. W. Thijssen & Drittij-Reijnders-, 1996).

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das statistische Bundesamt beziffert die Gesamtkosten aller Demenzen in Deutschland im Jahr 2015 auf 15 Milliarden Euro. Dies entspricht einem relativen Kostenzuwachs von 89 % seit 2002 und insgesamt 9 % der Gesamtgesundheitsausgaben aller Patienten über 65 Jahre. Somit stellen Demenzen und insbesondere die Alzheimer-Krankheit ein zunehmendes sozioökonomisches Problem dar, welches im Rahmen des demographischen Wandels zunehmend an Relevanz gewinnt (Michalowsky et al., 2019).

Eine wichtige Komponente in der Pathogenese der Alzheimerdemenz stellt dabei neben dem -durch reaktive Sauerstoffspezies bedingten- mitochondrialen Funktionsverlust die Dysbalance der APP-Prozessierung dar (Mattson, 2004). Es handelt sich bei APP und den prozessierenden Sekretasen um Transmembranproteine. Mehrere Studien konnten einen Einfluss der APP-Prozessierung durch veränderte Zusammensetzung und physikochemischen Eigenschaften der neuronalen Lipidmembran nachweisen (Burg et al., 2013; Ghribi et al., 2006; M. O. W. Grimm et al., 2008; M. O. W. Grimm, Grösgen, Riemenschneider, et al., 2011a; Morris et al., 2018; Presse et al., 2013; Tanprasertsuk et al., 2020). Der Zusammenhang zwischen Lipiden und der APP-Prozessierung stellt sich dabei zunehmend komplex dar. Neben dem Einfluss der Lipidkomposition auf die APP-Prozessierung zeigt sowohl A $\beta$  als auch AICD regulatorische Eigenschaften auf den Lipidstoffwechsel sowohl über direkte Effekte als auch Beeinflussung der Genexpression und

Stabilität von Enzymen der de novo Synthese mehrerer Lipidklassen, weshalb von einem bidirektionalen Zusammenhang ausgegangen werden muss (M. O. W. Grimm et al., 2017).

Neben den ersten zugelassenen DMT rückt die Rolle der Prävention zunehmend in den Fokus der Forschung (X.-X. Zhang et al., 2021). Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, kann die Ernährungsgewohnheit die Auftretenswahrscheinlichkeit und Progression der Alzheimer-Krankheit beeinflussen.

Das fettlösliche Vitamin K ist ein lebensnotwendiger Nahrungsbestandteil und wird in der westlichen Diät hauptsächlich über grünes Gemüse aufgenommen. Neben seiner Rolle in der menschlichen Blutgerinnung verübt Vitamin K als Substrat selbst oder über VKDP in mehreren in vitro und in vivo-Studien vielfältige neuroprotektive Effekte (J. Li et al., 2003). Insbesondere MK4 findet sich in hoher Anreicherung im Zentralnervensystem (siehe Kapitel 2.3.4). Mehrere epidemiologische Studien konnten einen verminderten Konsum an Vitamin K bei Patienten in Frühstadien der Alzheimerdemenz nachweisen und die Faktenlage über einen protektiven Effekt eines ausreichenden Vitamin K-Spiegels und altersbezogenen Kognitionsabbau verhärtet sich zunehmend (Alisi et al., 2019; Allison, 2001; Booth et al., 2022; Presse et al., 2008; Shatenstein et al., 2007). Auf Basis dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage über den modulierenden Einfluss des Vitamin K auf die molekularpathologischen Prozesse der Alzheimererkrankung, insbesondere über Modulation der Lipidkomposition der Zellmembran und des mitochondrialen Energiemetabolismus. Zusätzlich stellt sich in diesem Kontext die Frage, inwiefern Vitamin K2 neben diesen möglichen indirekten Effekten auch direkte Effekte auf die APP-Prozessierung ausüben könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende drei Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss übt MK4 auf die Lipidzusammensetzung, insbesondere die Kettenlänge und Sättigungsgrade in neuronalen Membranen aus und welche Konsequenzen ergeben sich daraus auf die bekannte Pathogenese der Alzheimererkrankung?
2. Welchen Einfluss übt MK4 auf den mitochondrialen Energiemetabolismus neuronaler Zellen aus und welche Bedeutung kann daraus auf die Pathogenese der Alzheimerdemenz geschlossen werden?
3. Welchen direkten Einfluss übt MK4 auf die APP-Prozessierung durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase in neuronalen Zellen aus und welche Konsequenzen ergibt sich daraus auf die Pathogenese der Alzheimerdemenz?

Zielsetzung dieser Arbeit ist den Einfluss des Vitamin K2 auf die Pathogenese der Alzheimerdemenz besser zu verstehen und die Bedeutung des präventiven Nutzens eines ausreichenden Vitamin K2-Haushaltes durch eine ausgewogene Ernährung zu untermauern.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurde der Wildtyp der Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Die Zellen leiten sich aus der Knochenmetastase eines Neuroblastoms eines 4-jährigen Kindes ab. Im Rahmen einer dreifachen Klonierung entstand aus der initialen Linie SK-N-SH die Tochterlinie SH-SY5Y. Die Zelllinie wird seit ihrer Generierung im Jahr 1978 für in vitro Modelle der Neurogenese und Neurodegeneration verwendet (Feles et al., 2022; Lopes et al., 2010; Xie et al., 2010).

##### 3.1.2 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und der jeweilige Bezug sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie (Markenname)	Summen- / Verhältnisformel	Produzent
Agarose	$[C_{12}H_{18}O_9]_n$	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumacetat	$C_2H_7NO_2$	Merck KGaA
BSA	/	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid	$C_2H_6OS$	Carl Roth GmbH & Co. KG
DMEM	/	Merck KGaA
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Carl Roth GmbH & Co. KG
FCS	/	PAN-Biotech GmbH
Guanidiniumthiocyanat (TRIzol™)	$C_2H_6N_4S$	Thermo Fisher Scientific Inc. (ehemals Life Technologies)
HPLC-Chloroform	$CHCl_3$	Merck KGaA
HPLC-Ethanol	$C_2H_6O$	Merck KGaA
HPLC-Isopropanol	$C_3H_8O$	VWR International, LLC
HPLC-Methanol	$CH_4O$	VWR International, LLC
HPLC-Wasser	$H_2O$	VWR International, LLC
Kaliumchlorid	$KCl$	Merck KGaA
NEAA	/	Merck KGaA
Natriumchlorid	$NaCl$	APPLICHEM GmbH
Octoxinol 9 (Triton® X 100)	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Merck KGaA
Octanoyl-L-Carnitin D3 und Palmitoyl-L-Carnitin D3	$C_{15}D_3H_{26}NO_4$ und $C_{23}D_3H_{45}NO_4$	Supelco Analytical
Pyridin	$C_5H_5N$	Merck KGaA
Phenylisothiozyanat	$C_7H_5NS$	Merck KGaA
Trypsin/EDTA-Lösung	/	Merck KGaA
$\alpha$ -Sekretase-Substrat	/	Merck KGaA

<b>Chemikalie (Markenname)</b>	<b>Summen- / Verhältnisformel</b>	<b>Produzent</b>
β-Sekretase-Substrat	/	Merck KGaA
γ-Sekretase-Substrat	/	Merck KGaA
06:0 PC (DHPC)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>8</sub> P	Avanti Polar Lipids (Bezug über Merck)
06:0 SM (d18:1/6:0)	C <sub>29</sub> H <sub>59</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	Avanti Polar Lipids (Bezug über Merck)
19:0 Lyso PC	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> NO <sub>7</sub> P	Avanti Polar Lipids (Bezug über Merck)

### 3.1.3 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte und der jeweilige Bezug sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Verwendete Geräte.**

<b>Geräteart</b>	<b>Typ</b>	<b>Produzent</b>
Autoklav	V-150	Systec GmbH & Co. KG
Autosampler	1200 Serie	Agilent Technologies, Inc.
Einkanalpipette	Transferpette S	Brand GmbH & CO. KG
	Eppendorf Research	Eppendorf SE
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetboy Comfort	Integra Biosciences AG
	accu-jet pro	Brand GmbH & CO. KG
	accu-jet S	
Fluorometer und Luminometer	Infinite M1000 Pro	Tecan Group AG
	Premium NoFrost	Liebherr AG
Gefrierschrank	GastroLine	
		Herafreeze HFU 586 Basic
Gel-Bildgebungssystem	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Heizblock	Thermoshaker	Universal Labortechnik
Homogenisator	Minilys	Bertin Technologies SAS
Inkubator	Heraeus HeraCell 150	Kendro Laboratory Products (Heute Teil von Thermo Fisher Scientific Inc.)
	HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ionenquelle	Turbo-V	AB Sciex Germany GmbH
Kapillare	Hamilton Kapillare	Hamilton Bonaduz AG
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Massenspektrometer	ESI-MS 4000 QTRAP	AB Sciex Germany GmbH
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus G, 12-Kanalpipette	Eppendorf SE
Mikrowelle	MW7020G	Continent
Netzteil	Model 200/2.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.

<b>Geräteart</b>	<b>Typ</b>	<b>Produzent</b>
	Power Supply	
PCR-Zykler	Primus 25 advanced® Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Photometer	Microplate Reader	LAB4You GmbH
	NanoDrop 8000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Plattenschüttler	MTS4	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Probenschüttler	Vortex Genie2	Bender & Hobein GmbH
Real-Time PCR System	PikoReal Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Stickstoffbegaser	EC1	VLM Korrosions-Prüftechnik, Labortechnik & Dienstleistungen GmbH
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS18	Thermo Fisher Scientific Inc.
Waage	ALS I20-4 EW 420	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad	/	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wärmeschrank	Heraeus Function Line T12	Kern & Sohn GmbH Kendro Laboratory Products (Heute Teil von Thermo Fisher Scientific Inc.)
	SORVALL Biofuge primo	Kendro Laboratory Products (Heute Teil von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0RS	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 3.1.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsgegenstände und der jeweilige Bezug sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

**Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Typ</b>	<b>Produzent</b>
Einfrier-Röhrchen	CryoPure Gefäß 1,6 ml rot	SARSTEDT AG & Co. KG
Einmalhandschuhe	VWR-Latex powder free gloves Nitril	VWR International, LLC
Filterpapier	Whatman 3 mm CHR 46x57 cm	General Electric Company (Geschäftszweig GE HealthCare)

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Typ</b>	<b>Produzent</b>
Keramik-Kügelchen	Bulk Bead for 500 preps	Bertin Technologies SAS
Pasteurpipetten		VWR International, LLC
Pipettenspitzen		Brand GmbH & CO. KG
Reaktionsgefäß (PCR)	ThermoTube PCR Tubes 0,2 ml	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Reaktionsgefäß	Reagiergefäß 1,5 ml Reagiergefäß 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Schraubröhrchen	15 ml Centrifuge Tube Falcon 50 ml Conical Tube	Corning Inc.
Serologische Pipetten		neoLab Migge GmbH
Schwarzes Reaktionsröhrchen	Reaktionsgefäße, Lichtschutz	A. Hartenstein GmbH
Silikonmatte (96-Sammelplatte)	Pre-Slit Well Cap for 96 Well PP Plate	Thermo Fisher Scientific Inc.
Verschlussfolie für 96-Vertiefungsplatte		PEQLAB Biotechnologie GmbH
Zellschaber	Cell Scraper	SPL Life Sciences Co., Ltd.
6-Vertiefungsplatten	Falcon Multiwell 6 Well	Corning Inc.
10 cm Schalen	VWR Tissue Culture Dish	VWR International, LLC
96-Filterplatte	Multi Screen Filter Plates	Merck KGaA
96-Sammelplatte	96 DeepWell PP Plate Natural	Thermo Fisher Scientific Inc.
96-Vertiefungsplatten (Zellkultur)	Falcon 96 Well	Corning Inc.
96-Vertiefungsplatten (BCA/LDH)	Microplate 96-Well	Greiner Bio-One GmbH
96-Vertiefungsplatten (q-PCR)	96-Well Piko PCR Plate	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 3.1.5 Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits können Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 5: Verwendete Kits.**

<b>Kit</b>	<b>Produzent</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Holding AG	Messung der enzymatischen Aktivität der Laktatdehydrogenase
Fast SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.	Echtzeit-PCR
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Generierung einer komplementären DNS aus isolierter RNS

Kit	Produzent	Verwendungszweck
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Ehemals PromoKine	Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination einer Zellkultur
Venor®GeM Advance	Minerva Biolabs GmbH	
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Messung des Proteingehaltes
Splash II Lipidomix Mass Spec	Croda International Plc (über Avanti Polar)	Lipidanalyse mittels Massenspektrometrie

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Zellbiologische Methodik

#### 3.2.1.1 Kultivierung und Vervielfältigung einer Zellkultur

Nach (Freshney, 2010; Geraghty et al., 2014; Grösgen, 2013; Lauer, 2022).

Die Zellkulturen wurden je nach Verwendungszweck in 10 cm-Schalen, 6-Vertiefungsplatten oder 96-Vertiefungsplatten in Zellinkubatoren kultiviert. Die Einhaltung einer konstanten Temperatur (37 °C), CO<sub>2</sub>-Gasfraktion (5 %) und Luftfeuchtigkeit (95 %) wurde alarmüberwacht.

Durch regelmäßige optische Kontrolle mittels Lichtmikroskop konnte das Wachstum der Zellkulturen überwacht werden. Zusätzlich wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit regelmäßig das Nährmedium der Zellkulturen gewechselt. Nach Absaugen des alten Mediums erfolgte die Zugabe von *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA).

Ab einer Konfluenz über 80 % wurden die Zellkulturen der 10 cm-Schalen passagiert. Dafür wurde nach Erwärmung von DMEM, Trypsin/EDTA-Lösung und Nährmedium auf 37 °C im Wasserbad das bestehende Medium abgesaugt und die Schale mit 3 ml DMEM gewaschen. Es folgte die Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung und sofortige Überführung in den Inkubator für 5 min. Nach dieser Wartezeit erfolgte die Addition von 8,5 ml Nährmedium und das mechanische Lösen des Zellrasens durch An- und Absaugen der Lösung mittels elektrischer Pipettierhilfe. Darauffolgend wurde die Spitze der Glaspipette senkrecht mit moderater Kraft auf mindestens zehn Lokalisationen des Schalenbodens gedrückt und die aufgezogene Flüssigkeit in die Schalen gepresst. Die dabei auftretenden Scherkräfte bewirken eine Vereinzelung von noch zusammenhängenden Zellen. Daraufhin wurde das Zell-Flüssigkeitsgemisch auf die gewünschte Anzahl neuer Schalen verteilt. Die größte angewandte Verdünnung betrug 1 : 6. Die Schalen wurden im letzten Schritt mit Nährmedium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Adhäsions- und Wachstumskontrolle erfolgte am nächsten Tag durch mikroskopische Begutachtung.

### 3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen einer Zellkultur

Nach (Freshney, 2010; Lauer, 2022).

Um jederzeit genügend Zellkulturen zur Verfügung zu haben, wurden Gefrierkulturen aus 10 cm Schalen angelegt und bei Bedarf aufgetaut. Als Einfriermedium fungierte eine Lösung aus DMEM mit 10 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO).

Zur Kryokonservierung der Proben wurde das bestehende Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 ml DMEM gewaschen und anschließend für 5 min im Inkubator mit 1,5 ml Trypsin inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3,5 ml Nährmedium und das Lösen des Zellteppichs mittels Auf- und Abziehens der Lösung durch eine elektrische Pipettierhilfe. Das Zell-Flüssigkeitsgemisch wurde nun in einen 15 ml Falcon überführt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation bildeten sich eine oberhalb liegende flüssige Phase und ein am Falconboden angeheftetes Zellkonglomerat. Die flüssige Phase wurde abgesaugt und die am Boden abzentrifugierten Zellen in 4,5 ml Einfriermedium resuspendiert, welches gleichmäßig auf drei Kryokulturröhrchen zu je 1,5 ml aufgeteilt wurde. Die Kryokulturröhrchen wurden bis zur weiteren Verwendung im  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank eingelagert. Um eine kontinuierliche Abkühlung der Probe um  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  zu gewährleisten, wurden die Proben in einer Styroporbox für mindestens 48 h bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Anschließend wurden die Proben für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Aufzutauende Kryokulturen wurden nach Aufwärmung auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aus den Kryokulturröhrchen in ein 15 ml Falcon mit 5 ml Nährmedium überführt und anschließend bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich erneut ein auf dem Boden abgesetztes Zellkonglomerat. Auch hier wurde die darüber befindliche flüssige Phase abgesaugt und die verbliebenen Zellen in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Nach der Bildung einer Suspension konnte der Inhalt aus dem 15 ml Falcon in eine neue 10 cm Schale pipettiert werden. Das Schalenvolumen wurde je nach überführter Suspensionsmenge mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Adhärenz und des Wachstums am nächsten Tag.

Zum Ausschluss einer Kontamination durch Mykoplasmen wurde in regelmäßigen Intervallen die Zellkultur mittels den in Tabelle 5 aufgelisteten Kits nach Herstellerangaben überprüft.

### 3.2.1.3 Herstellung einer MK4-Stammlösung

Für die Inkubation einer Zellkultur (siehe Kapitel 3.2.1.4) bedurfte es einer Stammlösung an MK4. Die Konzentration der Stammlösung wurde auf 100 mmol/l festgelegt. Dafür erfolgte die Zugabe von 44,465 mg pulverförmigem MK4, dessen Masse mittels Feinwaage ermittelt wurde, in 1 ml HPLC-Ethanol. Aus der damit erreichten Stoffmengenkonzentration von 100 mmol/l konnten alle weiteren Konzentrationen mittels Verdünnung gewonnen werden.

### 3.2.1.4 Inkubation einer Zellkultur mit MK4

Nach (Lauer, 2022).

Die Inkubation von Zellkulturen erfolgte im Rahmen der Lipid- und Genanalytik (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.4.1). Alle Inkubationen mit MK4 erfolgten nach dem in Tabelle 6 hinterlegten Zeitschema.

**Tabelle 6: Zeitschema der Zellkulturinkubation mit MK4.**

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>
Vorbehandlung	-12h
1te Inkubation	0h – 24h
2te Inkubation	24h – 48h
3te Inkubation	48h – 72h
Aufbereitung	72h

Um den möglichen Einfluss des FCS auf die Lipidhomöostase so gering wie möglich zu halten, wurde 12 h vor der ersten Inkubation der Anteil des FCS innerhalb des Nährmediums bei unverändertem Anteil an NEAA (siehe Kapitel 3.2.1.1) von 10 % auf 2,5 % reduziert.

Vor Beginn einer Inkubation wurden das in Ethanol gelöste MK4 (siehe Kapitel 3.2.1.3) sowie das Inkubationsnährmedium im Wärmebad auf 37 °C erwärmt und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Dabei entsprach der Volumenanteil des in Ethanol gelösten MK4 jeweils 1 ‰ des Volumens des Inkubationsnährmediums. Nach Absaugen des bestehenden Inkubationsnährmediums der zu inkubierenden Proben, wurden 10 ml der in Reaktionsgefäßen angemischten Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Kulturen 24 h im Inkubator inkubiert. Dieser Prozess wurde sowohl 48 h als auch 72 h nach Inkubationsbeginn wiederholt. Vor jeder einzelnen Inkubation und der Vorbehandlung wurden die verwendeten Zellkulturschalen mikroskopisch auf Anomalien begutachtet.

### **3.2.2 Molekularbiologische Methodik**

#### **3.2.2.1 RNS-Isolierung mittels Trizol™ -Reagenz**

##### **3.2.2.1.1 Erläuterung der Methodik**

Nach (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006).

Für eine Expressionsanalyse der mit MK4 inkubierten Zellen bedurfte es initial einer Extraktion der gesamten Ribonukleinsäure (RNS). Die Inkubationen für diese Expressionsanalyse erfolgten in 6-Vertiefungsplatten. Als Trennverfahren wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels saurer Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Methode durchgeführt. Chemisch handelt es sich bei dem als TRIZOL™ bezeichneten Gemisch um eine monophasische Lösung aus dem Salz Guanidiniumthiocyanat und Phenol. Durch Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen (chaotroper Effekt) des Guanidiniumthiocyanat kommt es zu Störungen der Sekundärstruktur von Proteinen. Es resultiert eine gewünschte Zellyse und Inaktivierung der ubiquitären RNAsen, wodurch die vorzeitige RNS-Destruktion verhindert werden kann. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation kommt es zur Auftrennung der wässrigen Phase (oberhalb) und der Chloroformphase (unterhalb). Dabei löst sich RNS in der wässrigen und Desoxyribonukleinsäure (DNS) in der unteren Chloroformphase. Die Proteinfraction bildet eine Interphase. Löst die isolierte wässrige Phase nun in dem Fällungsmittel Isopropanol, kommt es durch Änderung der Umgebungsbedingungen zur Präzipitation der gelösten RNS. Um die bestmögliche Reinheit der RNS zu erhalten, wird dieser Prozess mehrfach wiederholt und das Isopropanol in jedem Zyklus ausgetauscht. Zuletzt kann die RNS erneut in Lösung gebracht und bei -80 °C eingelagert werden.

##### **3.2.2.1.2 Versuchsaufbau**

Versuchsdurchführung nach der Gebrauchsanweisung des TRIZOL™ Reagent / Life Technologies AG / Version Dezember 2012.

Nach Absaugen des Inkubationsnährmediums wurden zügig 500 µl TRIZOL-Reagenz in jede Kammer pipettiert. Nach kurzer Einwirkzeit und mechanischer Lösung wurde das visköse Gemisch in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und Durchmischen durch kräftiges Schütteln der Reaktionsgefäße für 15 s. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm für 15 min. Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen: Untere Phase (DNS), mittlere Phase (gelöste Proteine) und obere Phase (RNS). Es erfolgte eine Überführung der oberen Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Anschließend wurden 250 µl Isopropanol der getrennten Phase hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm für 10 min kommt es erneut zu einer Phasenbildung: Eine feste untere und eine flüssige obere Phase. Nach Absaugen der oberen Phase wurde das Pellet mit einem Ethanol-Wassergemisch (75 % HPLC-Ethanol / 25 % HPLC-Wasser) unter Zuhilfenahme

eines Probenschüttlers resuspendiert und erneut bei 4 °C und 12000 rpm für 5 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweifach wiederholt. Danach wurde die flüssige Phase abgesaugt und das Reaktionsgefäß kopfüber auf einem keimfreien Tuch für 2 min getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 100 µl HPLC-Wasser resuspendiert und auf dem Heizblock für 10 min bei 60 °C erwärmt. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingelagert.

### **3.2.2.2 Reinheitsgradbestimmung der RNS**

Nach (Desjardins & Conklin, 2010; Mayerhöfer et al., 2020)

Zur Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der in Kapitel 3.2.2.1 extrahierten RNS wurde ein *NanoDrop 8000* Spektralphotometer verwendet. Hierbei wird die Absorptionseigenschaften gelöster RNS und DNS genutzt. Gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz kommt es bei Transmission von Licht durch ein absorbierendes Medium zu einer Abschwächung der Intensität (entspricht der Energie auf eine Fläche bezogen, Abschwächungseffekt wird auch Extinktion genannt). Die Extinktion ist neben der Schichtdicke des durchwanderten Mediums von dem wellenlängenspezifischen Extinktionskoeffizienten und der Konzentration des absorbierenden Stoffes abhängig. Somit lässt sich durch das bekannte Absorptionsmaximum (Wellenlänge von 260 nm) die RNS photometrisch eindeutig identifizieren. In Kombination mit einer gegebenen Schichtdicke ist außerdem eine rechnerische Bestimmung der absoluten Konzentration möglich. Die Bestimmung des Reinheitsgrades erfolgt über einen relativen Vergleich der Extinktion von 260 nm (Absorptionsmaximum der RNS) und 230 nm (geringer Absorptionsanteil der RNS, somit hoher Anteil der Absorption von verunreinigenden Substanzen wie Zucker oder Salze) sowie 280 nm (Geringer Anteil der Absorption von RNS, hoher Anteil der Absorption von Proteinen). Im Falle einer Absolutkonzentration unter 200 ng/ml, sowie einem Extinktionsquotient der Wellenlängen  $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} < 1,8$  und  $260 \text{ nm} / 230 \text{ nm} < 2$  wurden die Proben für weitere Experimente ausgeschlossen.

### **3.2.2.3 Synthese von cDNS mittels reverser Transkription**

#### **3.2.2.3.1 Erläuterung der Methodik**

Nach (Mahanama & Wilson-Davies, 2021).

Die in Kapitel 3.2.2.1 isolierte RNS wurde im nächsten Schritt durch die Methodik der reversen Transkription in komplementäre DNS (cDNS) überführt. Durch die Synthese aus der isolierten RNS besitzt die cDNS keine Introns. Die Synthese von DNS aus RNS erfolgte dabei durch eine RNS-abhängige-DNS-Polymerase (Synonym: Reverse Transkriptase) unter Anwesenheit mehrerer Primer mit randomisierter Sequenz. Es handelt sich bei Primern um Oligonukleotide (RNS oder DNS), die an einen komplementären Abschnitt des zu replizierenden

Einzelstranges mittels Wasserstoffbrücken binden, und durch ihre freie Hydroxyfunktion die Startreaktion der DNS-Polymerase ermöglichen. Nach Bindung der Primer synthetisiert die RNS-abhängigen-DNS-Polymerase in Anwesenheit von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) ab der Bindungsstelle der zufälligen Primer entlang der RNS einen komplementären DNS-Strang.

### 3.2.2.3.2 Versuchsaufbau

Nach dem Herstellerprotokoll des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* / Thermo Fisher Scientific Inc. / Version März 2016.

Die nach Qualitätskriterien verbliebenen RNA-Proben (siehe Kapitel 3.2.2.2) wurden auf eine Stoffmengenkonzentration von 0,2 ng/µl in PCR-Reaktionsgefäßen eingestellt. Als Verdünnungsmittel wurde HPLC-Wasser verwendet. Das Endvolumen aller Proben betrug jeweils 10 µl. Anschließend wurde ein Reaktionsgemisch mit den in Tabelle 7 aufgelisteten Bestandteilen für je ein Reaktionsgefäß pipettiert:

**Tabelle 7: Reaktionsgemisch zur Synthese von cDNS mittels reverser Transkription.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Reverse Transkriptase-Puffer	2 µl
dNTP-Mix	0,8 µl
Reverse Transkriptase-Zufallsprimer	2 µl
HPLC-Wasser	4,2 µl
Reverse Transkriptase	1µl

Alle Proben wurden unverzüglich dem PCR-Zykler (Primus 25 advanced® Thermocycler) zugeführt. Dieser wurde bereits auf die in Tabelle 8 zusammengefassten Parameter eingestellt und direkt nach Probenzugabe gestartet.

**Tabelle 8: Einstellungen des PCR-Zykler für eine reverse Transkription.**

<b>Reihenfolge</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zylenanzahl</b>
1	25 °C	10 min	1
2	37 °C	120 min	1
3	85 °C	5 min	1
4	4 °C	Unbegrenzt	/

Zuletzt wurden die Proben mit 180 µl HPLC-Wasser verdünnt und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingelagert.

### 3.2.2.4 Expressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR

#### 3.2.2.4.1 Erläuterung der Methodik

Nach (Dabrowski & Kur, 1998; Gibson et al., 1996; Mahanama & Wilson-Davies, 2021; Nolan et al., 2006; Zipper, 2004).

Die quantitative Analyse, der in Kapitel 3.2.2.3 synthetisierten cDNS erfolgte über eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *real time polymerase chain reaction*, qPCR). Grundprinzipien dieser Methodik sind die Polymerase-Kettenreaktion und das Prinzip der Fluoreszenz (das Grundprinzip der Fluoreszenz wird in Kapitel 3.2.3.3 vertiefend besprochen). Bei dem biochemischen Verfahren der PCR erfolgt die Replikation (Vervielfältigung) eines Genabschnittes oder des gesamten Genoms durch die enzymatische Aktivität einer DNS-Polymerase, welche entlang des zu kopierenden Einzelstranges (engl. *single stranded DNA*, ssDNA) mithilfe von dNTPs einen komplementären Strang bildet. Eine PCR besteht aus drei distinkten sich wiederholenden Abschnitten:

1. Denaturierung: Im ersten Schritt einer PCR erfolgt die Trennung der doppelsträngigen DNS in einzelsträngige DNS durch Temperaturerhöhung auf mindestens 95 °C. Infolgedessen kommt es zur Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Basenpaare innerhalb der doppelsträngigen DNS. Somit wurde aus einem Doppelstrang zwei Einzelstränge generiert.

2. Primerhybridisierung (engl. *annealing*): Im nächsten Schritt erfolgte die Temperatursenkung (üblicherweise zwischen 45-70 °C für 20-60 s) um eine Bindung eines Primers zu ermöglichen. Primer, welche eine Amplifizierung vom 5' zum 3' Ende bedingen werden als Vorwärts-Primer (engl. *forward primer*) bezeichnet. Erfolgt durch den Primer eine Amplifizierung von 3' zum 5' Ende handelt es sich um einen Rückwärts-Primer (engl. *reverse primer*).

3. Elongation: Im letzten Schritt einer PCR erfolgt eine Temperaturerhöhung auf ungefähr 72-80 °C. Die DNS-Polymerase bindet bei diesen Temperaturen an die 3'-Enden der Primer und repliziert dem zu replizierenden Einzelstrang folgend mithilfe der freien dNTP einen komplementären DNS-Strang.

In jedem Zyklus verdoppelt sich der replizierte DNS-Abschnitt (exponentielles Wachstum). Durch eine Kopplung mit einem Fluorochrom ist eine in Echtzeit ablaufende quantitative Messung der DNS möglich. Als Fluorochrom wurde in dieser Arbeit SYBR-Green in einem kommerziell erhältlichen Kit verwendet (siehe Kapitel 3.1.5). SYBR-Green interkaliert in die Doppelhelixstruktur der DNS zu einem Komplex, welcher bei einer Wellenlänge von 494 nm Licht absorbiert und bei 521 nm emittiert. Ferner befinden sich in dem Kit monomere dNTPs und eine rekombinant synthetisierte AmpliTaq-DNS-Polymerase. Die Taq-Polymerase ist eine DNS-abhängige DNS-Polymerase der thermophilen Bakterienspezies *Thermus aquaticus* und

zeichnet sich durch ihre hohe Hitzebeständigkeit von über 90°C aus. Dadurch muss sie nicht nach jedem Erwärmungsschritt des PCR-Zyklus erneut hinzugegeben werden. Unter Zugabe eines beliebig wählbaren Primers für beide Leserichtungen ermöglicht die Echtzeit-PCR eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau der initial isolierten RNS. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer können in Tabelle 9 eingesehen werden. Die detektierte Emission des Fluorochroms ist direkt proportional zu der Anzahl an amplifizierter DNS. Die Anzahl an PCR-Zyklen, ab der die Fluoreszenz eindeutig vom Hintergrundrauschen differenziert werden kann, wird als C<sub>t</sub>-Wert bezeichnet.

Tabelle 9: Verwendete Primer für die qPCR.

Genname	Vorwärts-Primer (5'→3')	Rückwärts-Primer (3'→5')
ACTB	CTTCCTGGGCATGGAGTC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
ADAM 10	GCAAACCTGAAACCTGGGAAA	TTCCTTCCCTTGCACAGTCT
BACE-1	GCCTATGCTGAGATTGCCAGG	GGAGAAGAGGTTGGGAACGTG
HPRT	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
POLR2F	CCCGAAAGATCCCCATCAT	CACCCCCCAGTCTTCATAGC
RN18S1	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT
RPL13A	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA

#### 3.2.2.4.2 Versuchsaufbau

Nach dem Herstellerprotokoll des *Fast SYBR Green Master Mix Kit*, Thermo Fisher Scientific Inc.; (Grösgen, 2013; Lauer, 2022).

Zuerst wurden jeweils 2,5 µl cDNS pipettiert. Anschließend wurde für jedes zu analysierende Gen ein Reaktionsgemisch angemischt und vollständig an den Vertiefungsoberrand einer pPCR-Platte pipettiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches kann in Tabelle 10 eingesehen werden.

Tabelle 10: Reaktionsgemisches für eine Expressionsanalyse mittels qPCR.

Komponente	Volumen
HPLC-Wasser	2 µl
<i>Fast SYBR-Green Mastermix</i>	5 µl
Forward Primer	0,25 µl
Reverse Primer	0,25 µl

Anschließend wurde die qPCR-Platte dem PCR-Zykler (PikoReal™ Real-Time PCR System) zugeführt und das Programm mit den in Tabelle 11 aufgelisteten Parametern durchlaufen:

Tabelle 11: Parameter des PCR-Zyklus für eine qPCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1 (Aktivierung Polymerase)	95 °C	20 s	1
2 (Denaturierung)	95 °C	3 s	40
3 (Annealing / Elongation)	60 °C	30 s	
4 (Schmelzkurvenanalyse)	60-95 °C	Unbegrenzt	1

### 3.2.2.4.3 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden anschließend durch die Software *PikoReal* analysiert und im Anschluss statistisch ausgewertet. Nach Überprüfung des Schmelzkurvenverlaufes auf Anomalien wurde auf Basis des  $C_t$ -Wertes mithilfe der Delta-Delta- $C_t$ -Methode ( $\Delta\Delta C_t$ ) ein quantitativer Vergleich zwischen Probe und Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Im Folgenden wird die Funktionsweise der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode kurz erläutert:

Die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode erlaubt den relativen Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens zwischen zwei Proben (im Falle dieser Arbeit die mit MK4 inkubierten gegenüber der mit Ethanol inkubierten Zellkulturen). Da die nicht bekannte Startmenge der DNS einen Einfluss auf das Erreichen des  $C_t$ -Wertes besitzt, kann eine faktorielle Änderung nur durch Normierung auf ein Referenzgen, dessen Expressionsniveau durch externe Faktoren unverändert verbleibt, getroffen werden. Solche Referenzgene werden auch als Haushaltsgen (engl. *housekeeping-gene*, HKG) bezeichnet. Unter der Annahme, dass alle Proben mit derselben und maximalen Effizienz die PCR durchlaufen, ist in jedem Zyklus eine Verdopplung der amplifizierten DNS anzunehmen (exponentielles Wachstum zur Basis 2 mit der PCR-Zykluszahl als Exponent). Somit entspricht rechnerisch die potenzierte Differenz des  $C_t$ -Wertes zwischen Probe bzw. Kontrolle und dem  $C_t$ -Wertes des Referenzwertes ( $\Delta C_t$ ) zur Basis 2 dem faktoriellen Unterschied des Mengenniveaus beider Komponenten. Die erneut potenzierte Differenz zwischen dem normierten  $\Delta C_t$  der Probe und dem der Kontrolle ( $\Delta\Delta C_t$ ) zur Basis 2 entspricht dem faktoriellen Unterschied des Expressionsniveaus eines Gens in der Probe zur Kontrolle, ohne die unbekannte Startmenge (und deren Einfluss auf den  $C_t$ -Wert) berücksichtigen zu müssen.

Durch die *Normfinder*-Software konnten die unter dem experimentellen Setting stabilsten Referenzgene ermittelt werden. Dabei gelten Referenzgene mit einem Stabilitätswert  $<0,37$  als stabil. Dieser Vorgang erfolgte in Kooperation mit Daniel Janitschke (siehe Kapitel 9). Es wurden die drei stabilsten Gene als Referenz determiniert (in Tabelle 9 fett hervorgehoben) und die zu vergleichenden Gene mittels oben erläuteter Methodik analysiert. Im Anschluss wurde die faktorielle Änderung graphisch dargestellt.

### 3.2.3 Proteinbiochemische Methodik

#### 3.2.3.1 Bestimmung der Zelltoxizität mittels Laktatdehydrogenase-Test

##### 3.2.3.1.1 Erläuterung der Methodik

Nach (A. A. Khan et al., 2020; Lauer, 2022)

Mithilfe des Laktatdehydrogenase-Test wurde vor Beginn der Inkubationsexperimente (siehe Kapitel 3.2.1.4) der zytotoxische Effekt des MK4 auf SH-SY5Y-Zellen überprüft. Somit konnte im Vorhinein eine Alteration des Lipidprofils durch Zytotoxizität des MK4 ausgeschlossen werden. Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitäres zytosolisches Enzym. Es gehört der Klasse der Oxidoreduktasen an und katalysiert im anaeroben Stoffwechsel reversibel die Reduktion des Pyruvats zu Laktat. Dabei wird der Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) oxidiert ( $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$ ) und kann erneut als Cofaktor in der Glykolyse einfließen. Bei Störungen der Integrität der Zellmembran (dies beinhaltet insbesondere die Zelllyse durch Noxen) gelangt das zytosolische LDH in den Extrazellularraum. Folglich erlaubt die enzymatische Aktivität der LDH im Nährmedium einen direkten Rückschluss auf die Toxizität eines inkubierten Substrates. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte photometrisch über den Cofaktor  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{NAD}^+$ . Das im Test enthaltene Enzym Diaphorase katalysiert die Reduktion des ebenfalls im Test enthaltenen Tetrazolium-Salzes INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu einem Formazansalz, welches mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch detektiert werden kann. Bei dieser Reaktion wird der Cofaktor  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Es stellt sich im Reaktionsverlauf ein chemisches Gleichgewicht ein, wodurch die LDH-Enzymaktivität und die Extinktion des Formazansalzes direkt proportional zueinander stehen. Als Referenz, um Aussagen über die extrazelluläre LDH-Aktivität treffen zu können wurde eine nur mit Lösungsmittel inkubierte Totkontrolle angefertigt. Durch die vollständige Lyse der Zellmembran mit dem Detergens Octoxinol 9 (Handelsname Triton X-100) befindet sich die gesamte Menge an LDH im Inkubationsmedium. Eine Verdünnungsreihe, wobei keine Verdünnung 100 %, und eine vollständige Verdünnung (nur Verdünnungsmittel, kein Inkubationsmedium) 0 % Enzymaktivität abbildet, kann nun den relativen Anteil der LDH-Aktivität als Maß der Zytotoxizität angeben.

##### 3.2.3.1.2 Versuchsaufbau

Nach dem Herstellerprotokoll des *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche, Version März 2012.

Aus der MK4-Stammlösung (siehe 3.2.1.3) wurde eine Verdünnungsreihe mit den in Tabelle 12 aufgelisteten Konzentrationen an MK4 angesetzt und in 6-Vertiefungsplatten nach dem in Kapitel 3.2.1.4 erläuterten Verfahren inkubiert.

Tabelle 12: MK4-Verdünnung für den Laktatdehydrogenasetest.

Beschreibung	Inkubationszusatz	Inkubationskonzentration
Konzentration 1	MK4 in Ethanol	5 µmol/l
Konzentration 2	MK4 in Ethanol	25 µmol/l
Konzentration 3	MK4 in Ethanol	50 µmol/l
Konzentration 4	MK4 in Ethanol	100 µmol/l
Totkontrolle	Ethanol	/
Ethanolkontrolle	Ethanol	/

Das Gesamtvolumen pro Vertiefungskammer betrug jeweils 1,5 ml und das Volumen des gelösten Ethanols 1,5 µl (entspricht Volumenanteil von 1 ‰). Um die ermittelte Toxizität auf MK4 zurückführen zu können, wurde eine Reaktionskammer ausschließlich mit Ethanol inkubiert (Ethanolkontrolle).

Nach abgeschlossener Inkubation wurden die 6-Vertiefungsplatten mikroskopisch auf bestehende Konfluenz überprüft. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 10%ig verdünntem Triton X-100 (Verdünnung entsprach folglich nach Zugabe 1 ‰) in die als Totkontrolle gewählte Kammer. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min. Die Vertiefungsplatten wurden ab diesem Zeitpunkt auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde das Inkubationsmedium aller Proben in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Um nicht-adhäsive Zellen aus dem Inkubationsmedium zu entfernen, wurden die Reaktionsgefäße für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, und anschließend die flüssige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der Totkontrolle nach dem in Tabelle 13 aufgelisteten Schema pipettiert.

Tabelle 13: Verdünnungsreihe für den Laktatdehydrogenase-Test.

Verdünnung	Volumen Totkontrolle	Volumen DMEM
0 %	0 µl	60 µl
2 %	4 µl	196 µl
4 %	8 µl	192 µl
6 %	6 µl	54 µl
8 %	22 µl	253 µl
10 %	6 µl	54 µl
20 %	30 µl	120 µl

Im nächsten Schritt wurden jeweils 50 µl der Kontrollproben bzw. der Verdünnungsreihe zusammen mit 50 µl DMEM auf eine 96-Vertiefungsplatte pipettiert.

Der *catalyst* und die *dye-Solution* des verwendeten Kits (siehe Kapitel 3.1.5) wurden im Verhältnis 1 : 45 zur fertigen Reaktionslösung angesetzt.

Nach Zugabe von je 100 µl der Reaktionslösung wurde die Vertiefungsplatte mit einem Lichtschutzdeckel abgedeckt und für 15 min mit dem Laborschüttler durchmischt. Zuletzt wurde die 96-Vertiefungsplatte dem Photometer zugeführt und die Extinktion bei  $\lambda = 491$  nm gemessen. Aus den gewonnenen Daten der Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade angefertigt, deren Korrelationskoeffizient zur weiteren Auswertung  $> 0,98$  betragen musste. Auf Basis der Eichgerade konnte im letzten Schritt die relative prozentuale LDH-Aktivität der vier verschiedenen MK4-Konzentrationen und der Ethanolkontrolle abgelesen und interpretiert werden.

### **3.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchonin-Tests**

#### **3.2.3.2.1 Erläuterung der Methodik**

Nach (Smith et al., 1985).

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer gegebenen Zellkultur wurde für zwei verschiedene Methodiken benötigt.

Zum einen ist die in Kapitel 3.2.3.1 beschriebene Toxizitätsmessung einer Zellkulturprobe mittels extrazellulärer LDH-Aktivitätsmessung ohne Normierung auf die gegebene Zellanzahl nicht aussagekräftig. Zur Repräsentierung des Zellgehaltes einer Probe wurde zeitgleich mit der LDH-Messung eine Proteingehaltsbestimmung durchgeführt.

Zum anderen wurden die massenspektrometrisch untersuchten Zellkulturproben ebenfalls vor der Lipidextraktion (siehe Kapitel 3.2.4.2) auf ihren Proteingehalt untersucht und durch Verdünnung einander angeglichen. Dadurch konnte sich ein massenspektrometrisch detektierter Effekt, der durch eine unterschiedliche Zellzahl erklärbar gewesen wäre, ausschließen lassen.

Es existieren mehrere Methoden der quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes einer Zellkulturprobe. In dieser Arbeit wurde die Bicinchonin-Methode (BCA-Methode) verwendet. Die Methodik fußt funktionell auf einer Kombination zwischen Biuret-Reaktion und Bicinchoninsäure. Die Biuret-Reaktion beschreibt die Komplexbildung aus zwei benachbarten Peptidbindungen mit  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu. Es kommt dabei zu einer Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Das reduzierte Kupferion geht daraufhin einen farbigen Komplex mit Bicinchoninsäure ein, der durch sein Absorptionsmaximum bei 562 nm photometrisch erfasst werden kann. Unter Zuhilfenahme einer Verdünnungsreihe aus BSA mit bekannter Proteinkonzentration kann der Proteingehalt einer Probe somit berechnet werden. Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit (siehe Kapitel 3.1.5) verwendet. Dieses setzt sich aus einem Reagenz A (Natriumbicinchoninat, Natriumcarbonat, Natriumtartat, Natriumhydroxid und Natriumhydrogencarbonat) und Reagenz B (Kupfersulfat-Pentahydrat) zusammen.

### 3.2.3.2 Versuchsaufbau

Nach (Grösgen, 2013; Lauer, 2022; Smith et al., 1985).

Die Zellkulturproben (siehe Kapitel 3.2.4.1) wurden im Falle der Kryokonservierung auf Eis aufgetaut, bzw. direkt nach der Ernte im Homogenisator für 30 s auf höchster Stufe mechanisch lysiert. Anschließend erfolgte eine Pulszentrifugation bei 10000 rpm. Danach wurden 5 µl der Probe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 45 µl HPLC-Wasser 1:10 verdünnt. Im Anschluss wurden 20 µl einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) in eine 96-Vertiefungsplatte pipettiert. Die Standardreihe setzte sich aus den Massenkonzentrationen 0 / 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,6 / 0,7 / 0,8 / 0,9 / 1,0 / 1,1 mg/ml zusammen. Im nächsten Schritt wurden die verdünnten Proben nach kurzem Durchmischen am Schüttler in Triplikate zu je 5 µl auf die Vertiefungsplatte gegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl der kombinierten Reagenzlösung (Verhältnis Reagenz A / B = 1 / 20) in die Vertiefungen der 96-Vertiefungsplatte mittels Mehrkanalpipette. Folgend wurde die Platte für 15 min im Inkubator bei den üblichen Parametern (siehe Kapitel 3.2.1.1) und danach auf dem Laborschüttler für ebenfalls 15 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Vertiefungsplatte dem Photometer zugeführt und die Extinktion bei 562 nm bestimmt. Durch Aufstellung der Eichgerade mit einem geforderten Korrelationskoeffizienten von mind. 0,98 konnte im letzten Schritt der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

Für die Toxizitätsbestimmung der Zellkulturen konnte nun das Verhältnis aus LDH-Toxizitätsprozent und Proteingehalt gebildet werden (siehe Kapitel 3.2.3.1). Im Falle einer Lipidextraktion konnten die Proben auf einen festen Proteingehalt eingestellt werden (siehe Kapitel 3.2.4.1).

### 3.2.3.3 Enzymaktivitätsmessung APP-prozessierender Sekretasen

#### 3.2.3.3.1 Erläuterung der Methodik

Nach (Stahlmann, 2018).

Um den Effekt des MK4 auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase an lebenden Zellen zu ermitteln, wurde die Enzymaktivität von mit MK4 inkubierten Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt. Die Funktionsweise und Bedeutung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase wurde in Kapitel 2.1.2.2 bereits besprochen. Die Enzymaktivität wurde in Echtzeit mittels Fluoreszenzspektrometrie gemessen. Fluoreszenz beschreibt die Eigenschaft bestimmter Substanzen, nach Anregung (Exzitation) mit Licht, selbst Licht abzustrahlen (Emission). Somit kann gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes (siehe dazu auch Kapitel 3.2.3.1) bei gleichbleibender bestrahlender Intensität und Wellenlänge die Konzentration einer fluoreszierenden Substanz im zeitlichen Verlauf durch die detektierte abgestrahlte Intensität dargestellt werden. Da weder die Substrate noch die Produkte der zu analysierenden Sekretasen die Fähigkeit zur

Biolumineszenz besitzen, muss als Substrat ein rekombinant synthetisiertes Peptid mit einem sogenannten *Quencher* verwendet werden. Es handelt sich dabei allgemein um eine Substanz, welche die Fluoreszenz eines Fluorophors hemmen kann. Bei den in dieser Arbeit als Substrate verwendeten Polypeptiden mit einer Bindungsaffinität an die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Sekretase, ist der Quencher kovalent an der Peptidkette befestigt. In der Konsequenz ist durch die räumliche Nähe die Substratform nicht lumineszent. Kommt es jedoch durch die jeweilige Sekretase zu einer enzymatischen Spaltung des Substrates, bei dem sich der Quencher räumlich vom fluoreszierenden Produkt trennt, kann die Fluoreszenz und folglich die Enzymkinetik in Form des relativen Substratumsatzes nachgewiesen werden.

### 3.2.3.3.2 Versuchsdurchführung

Nach (M. Grimm et al., 2013; Lauer, 2022; Mett, 2017).

Eine Zelllinie wurde wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben für 72 h in einer 96-Vertiefungsplatte inkubiert. Der Erfolg der Inkubation wurde vor der Fluoreszenz mittels mikroskopischer Begutachtung kontrolliert. Im Falle von Auffälligkeiten (atypische Zellmorphologie, Konfluenzschwankungen, fehlender Wachstumsnachweis) wurden die jeweiligen Probe aus der Analyse exkludiert. Anschließend wurde eine Stammlösung für die bildliche Darstellung lebender Zellen (engl. *Life-Cell-Imaging-Solution*, LCIS) aus den in Tabelle 14 aufgelisteten Substraten gerichtet:

Tabelle 14: Zusammensetzung der Life-Cell-Imaging-Solution.

Komponente	Volumen	Masse
HPLC-Wasser	100 ml	/
NaCl	/	818,0 mg
KCl	/	18,6 mg
CaCl <sub>2</sub>	/	26,4 mg

LCIS ist ein farbloses Medium, welche für die Echtzeitanalyse von lebenden Zellen verwendet wird. Die Komposition der Lösung ermöglicht das Überleben von Zellen bei atmosphärischen Bedingungen und Raumtemperatur für ungefähr 4 h. Die Lösung wurde im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellen wurden je Vertiefung mit 100  $\mu$ l LCIS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der in Tabelle 15 hinterlegten Reaktionslösungen.

Tabelle 15: Reaktionslösungen zur Enzymaktivitätsmessung.

Sekretase	Komponente	Volumen	Verdünnung
α-Sekretase	LCIS	50 µl / Kammer	/
	MK4-Stammlösung	/	1 : 1000
	α-Substrat	/	1 : 300
β-Sekretase	LCIS	50 µl / Kammer	/
	MK4-Stammlösung	/	1 : 1000
	β-Substrat	/	1 : 100

Im letzten Schritt erfolgte die Messung der Reaktionslösungen im Fluorometer (Tecan Infinite M1000 Pro). Die verwendeten Parameter können in Tabelle 16 eingesehen werden.

Tabelle 16: Parameter des Fluorometers.

Parameter	α-Sekretase	β-Sekretase
Zyklenanzahl	120	120
Intervallzeit	Minimal	Minimal
Exzitationswellenlänge	340 nm	345 nm
Exzitationsbandbreite	10 nm	5 nm
Emissionswellenlänge	490 nm	500 nm
Emissionsbandbreite	10 nm	5 nm
Anzahl Blitze	50	50
Blitzfrequenz	400 Hz	400 Hz
Integrationszeit	20 µs	20 µs
Ruhezeit	10 ms	10 ms

Um lediglich den linearen Anteil der Kinetik darzustellen, wurde nur der Messbereich mit einer Korrelation  $>0,95$  in die Auswertung einbezogen. Proben mit irregulärem Kurvenverlauf oder deutlicher Abweichung vom Gesamtprobenmittelwert wurden exkludiert.

### 3.2.4 Lipidanalytik mittels Massenspektrometrie

#### 3.2.4.1 Aufbereitung einer Zellkultur für die Lipidanalytik

Nach (M. O. W. Grimm, Grösgen, Riemenschneider, et al., 2011; Lauer, 2022; Stahlmann, 2018).

Für die Extraktion der Lipidfraktion und die anschließende massenspektrometrische Analyse bedurfte es einer Aufbereitung der mit MK4 inkubierten Zellkulturen (siehe Kapitel 3.2.1.4). Die Zellernte erfolgte nach lichtmikroskopischer Kontrolle. Der gesamte Ernteprozess wurde schnellstmöglich und auf Eis ausgeführt. Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Schalen zweifach mit 2 ml HPLC-Wasser von verbleibendem Inkubationsmedium befreit. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Schalen vertikal aufgereiht und für 1 min stehen gelassen. Die gesammelte Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Schalen mit 180 µl HPLC-

Wasser benetzt. Die auf dem Schalenboden adhärent gewachsene Zellkultur wurde nun mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für 30 s auf höchster Stufe homogenisiert, pulszentrifugiert und kurz durchmischt. Danach wurden die Proben in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen im Verhältnis 1 : 10 mit HPLC-Wasser verdünnt. Anschließend wurde eine Proteinmengenbestimmung mittels Bicinchoninsäure -Test nach der in Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Methodik durchgeführt. Proben mit einer Proteinkonzentration unter 8 mg/ml wurden exkludiert. Die verbleibenden Proben wurden im Anschluss mit HPLC-Wasser als Verdünnungsmittel auf 8 mg/ml in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingestellt.

### **3.2.4.2 Extraktion der Lipidfraktion**

#### **3.2.4.2.1 Erläuterung der Methodik**

Nach (M. O. W. Grimm, Grösgen, Riemenschneider, et al., 2011).

Für die Analyse des Lipidprofils der mit MK4 inkubierten Zellen musste die Lipidfraktion der proteinnormierten Zellysate (siehe Kapitel 3.2.4.1) isoliert werden. Dafür wurde eine Fest-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Bei diesem chemischen Trennverfahren wird ein Extraktionsgut (in diesem Falle die Lipidfraktion), welches sich in einer festen Trägerphase befindet, mithilfe eines Lösungsmittels aus der Trägerphase gelöst. In Kombination mit einem Filtersystem kann schließlich das Lösungsmittel mit dem Extraktionsgut von der verbleibenden festen Trägerphase getrennt werden. Die Trennung der einzelnen Fraktionen erfolgte auf einem Filterpapier, welches sich in einer 96-Filterplatte befindet. Die Filterplatte wurde auf einer 96-Tiefvertiefungsplatte (auch Sammelplatte genannt) befestigt. Durch Belüftung des Filterpapiers mit Stickstoff kann das Filterpapier vollständig von Flüssigkeit befreit werden. In dieser Arbeit wurde als Lösungsmittel für die Lipidfraktion Methanol in Kombination mit Ammoniumacetat verwendet. Durch Zentrifugation kann die in Methanol gelöste Lipidfraktion schließlich in die Tiefvertiefungsplatte abgetrennt werden, während die verbleibende Fraktion des Zellysates im Filtersystem verbleiben.

#### **3.2.4.2.2 Versuchsdurchführung**

Nach (M. O. W. Grimm, Grösgen, Riemenschneider, et al., 2011; Lauer, 2022; Stahlmann, 2018).

Nach Befestigen der Filterplatte auf der Tiefvertiefungsplatte wurden die Filterpapiere zurechtgeschnitten und in der Filterkammer platziert. Anschließend wurde in einem Reaktionsgefäß die bereits vorher gerichteten Referenzstandards und das Zellhomogenat (Kapitel 3.2.4.1) nach dem in Tabelle 17 aufgetragenen Mischverhältnis pipettiert. Der Bezug der jeweiligen Standards kann in Kapitel Tabelle 2 eingesehen werden. Bei Lipidstandard 2 handelt es sich um Komponenten des Splash II Lipidomix Mass Spec Kits (siehe Tabelle 5).

Tabelle 17: Pipettierschema der massenspektrometrischen Referenzstandards.

Komponente	Lipidklasse	Standard	Volumen
Lipidstandard 1	Phosphatidylcholine	06:0 PC (DHPC)	1 µl
	Lysophosphatidylcholine	19:0 Lyso PC	
	Sphingomyeline	06:0 SM (d18:1/6:0)	
Lipidstandard 2	Triacylglyceride	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	5 µl
	Carnitinester	Octanoyl-L-Carnitin D3 und Palmitoyl-L-Carnitin D3	
	Phosphatidylcholin- Plasmalogene	C18(Plasm)-18:1(d9) PC	
Proteinnormierte Probe	/	/	10 µl

Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß durchmischt und das Stoffgemisch vollständig auf das Filterpapier überführt. Daraufhin erfolgte die Trocknung des Filterpapiers durch Stickstoffstrom (1 bar) für 45 min. In der Zwischenzeit wurde die Phenylisothiozyanat-Pyridin-Lösung nach dem im Tabelle 18 zusammengefassten Pipettierschema gerichtet.

Tabelle 18: Pipettierschema Phenylisothiozyanatlösung.

Komponente	Volumen
HPLC-Ethanol	950 µl
HPLC-Wasser	950 µl
Pyridin	950 µl
Phenylisothiozyanat	150 µl

Nach Abschluss der Gasexposition erfolgte die Zugabe von 20 µl der Phenylisothiozyanatlösung zu allen Proben. Anschließend wurden die Gemische für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Kammern erneut mittels Stickstoffstrom für 45 min bei 1 bar getrocknet. Im nächsten Schritt wurden 300 µl Ammoniumacetat-Methanol-Lösung zu den Proben pipettiert und die Platte für 30 min auf dem Laborrüttler bei 450 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Platte bei 500 g für 2 min zentrifugiert. Nach Entfernung der Filterplatte erfolgte die Zugabe von 600 µl eines Laufpuffers, welcher sich aus in HPLC-Methanol gelöstem Ammoniumacetat (Laufpuffer) mit einer Stoffmengenkonzentration von 161,5 mmol/l zusammensetzt. Im letzten Schritt wurde die 96-Tiefvertiefungsplatte mit einer Silikonmatte abgedichtet und bei -20 °C bis zur Zuführung der Massenspektrometrie eingelagert.

### 3.2.4.3 Massenspektrometrie

#### 3.2.4.3.1 Erläuterung der Methodik

Nach (Grösgen, 2013; Lauer, 2022; Stahlmann, 2018; Tycova et al., 2021; Vogeser & Parhofer, 2007; Züllig et al., 2020).

Für die Analyse der extrahierten Lipidfraktion der mit MK4 inkubierten Zellen wurde ein ESI-LC-MS/MS-System verwendet. Es handelt sich dabei um eine Elektrosprayinterface (ESI) und vier nacheinander geschaltete Massenspektrometereinheiten (MS/MS, Synonym Tandem-MS). Die Funktionsweise dieser zwei Systeme wird im Folgenden kurz erläutert:

##### 1. Elektrosprayionisation:

Die zwei grundlegenden Funktionen der ESI ist die Ionisierung der zu analysierenden Substanz und die Überführung der Substanz aus der flüssigen in die gasförmige Phase. Die Probe wird in eine Metallkapillare geleitet. Durch das Anlegen einer Spannung zwischen der Spitze der Metallkapillare und einer Auffangelektrode entsteht im Zwischenraum ein elektrisches Feld. Es kommt zur Elektrophorese der bereits geladenen Teilchen durch den Zwischenraum zur Auffangelektrode. Es bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss positiv geladener Teilchen, die sich in Form eines sogenannten Taylor-Tropfens von der Kapillare ablösen und zur Auffangelektrode wandern. Durch Zugabe eines neutralen Gases (Stickstoff) wird das Aerosol zunehmend verkleinert. Da Flüssigkeit als disperse Phase in einer Dispersion nur eine bestimmte Menge an geladenen Teilchen tragen kann (Rayleigh-Limit), kommt es im Rahmen der zunehmenden Oberflächenverkleinerung durch den Gaseinstrom im Rahmen einer Coulomb-Explosion zum vollständigen Kollaps der flüssigen Phase. In der Auffangelektrode befindet sich eine Öffnung, durch welche die nun ionisierten Substanzen in einer Gasphase in das Massenspektrometer geleitet werden. Es handelt sich bei dem ionisierten Molekül um ein nicht kovalentes Addukt zwischen dem zu analysierenden Substrat und den Kationen. Durch die ESI-Methode können auch für andere Ionisationsmethoden unzugängliche Substrate analysiert werden.

##### 2. Tandem-Massenspektrometrie mit gekoppelter linearer Ionisationsfalle:

Das Tandem-Massenspektrometer ermöglicht eine Auftrennung der bereits ionisierten zu analysierenden Substrate in einer Gasphase nach ihrer Ladung und Masse. Dadurch wird eine qualitative und quantitative Aussage der zu analysierenden Probe ermöglicht.

Der Grundbaustein einer Massenspektrometereinheit ist ein Quadrupol. Es handelt sich dabei um vier parallel zueinander stehende zylindrische Stäbe, welche um eine gemeinsame Achse im Zentrum angeordnet sind. Durch die Stäbe fließt -durch eine angelegte Gleich- und Wechselspannung bedingt- Strom. Die dadurch resultierende Potentialänderung verleiht den Stäben eine wechselnde positive und negative Polarität. Zu jedem Zeitpunkt besitzen jeweils

die zwei Stäbe, die gegenüber von der gemeinsamen mittigen Achse liegen, dasselbe elektrische Potential. Das Gegenpaar besitzt zu jedem Zeitpunkt das genau inverse Potential. Zwischen inversen Ladungen entsteht gemäß dem Coulombschen Gesetz ein elektrisches Feld. Durch die Wechsellspannung bedingt, ist das elektrische Feld nicht statisch, sondern oszilliert zwischen den Stäben. Ein entlang der mittigen Achse durchlaufendes Ion wird durch die Feldstärke des elektrischen Feldes somit ebenfalls oszillierend in seiner Flugrichtung ausgelenkt. Dabei bestimmt das Verhältnis von Ladung zu Masse des Ions die Auslenkung. Nur Ionen, deren Ladungs-Masse-Verhältnis mit der vorliegenden Spannung und dem daraus resultierendem Feld kompatibel ist, können den Quadrupol durchlaufen und vom Detektor registriert werden, alle sonstigen Ionen werden in die Stäbe ausgelenkt und können nicht erkannt werden.

Ein automatischer Probengeber (engl. *autosampler*) ermöglicht eine vollautomatische Zuführung der Proben unter überwachten Bedingungen. Als Laufpuffer wurde in Methanol gelöstes Ammoniumacetat mit einer Konzentration von 5 mmol/l verwendet. Nach Platzieren der auf Raumtemperatur aufgewärmten 96-Tiefvertiefungsplatte in den automatischen Probengeber durchlief der Probengeber den in Tabelle 19 aufgelisteten Zyklus für jede Probe.

**Tabelle 19: Einstellungen des Autosamplers.**

<b>Zyklusphase</b>	<b>Dauer</b>	<b>Laufgeschwindigkeit</b>
1	0 – 2,4 min	30 µl/min
2	2,4 – 3 min	200 µl/min

Pro Probe wurde ein Volumen von 20 µl untersucht.

In dieser Arbeit wurde ein Tandem-Massenspektrometer in Kombination mit einer linearen Ionenfalle verwendet. Ein solches System besteht aus vier in Reihe geschalteten Quadrupolen (genannt Q0-Q3). Durch die Kopplung von vier Quadrupolen kann die Detektion optimiert werden: Der erste Quadrupol Q0 fungiert als Stabilisator der durchlaufenden Ionen, es findet keine Trennung statt. Die Öffnung zur ersten Kammer steht unter einer Spannung (*declustering potential*), wodurch die Ionen nicht verklumpen. In der zweiten Einheit Q1 werden die ersten Ionen spezifisch nach oben erläuteter Methodik selektioniert, sodass nur eine Ionenklasse in die nächste Kammer gelangen kann. In der Kammer Q2, welche auch Kollisionskammer genannt wird, werden die Ionen fragmentiert. Durch Anlegen einer Spannung kommt es zur Zunahme der kinetischen Energie der beschleunigten Teilchen. Durch Zugabe eines inerten Gases (im Falle dieser Arbeit Stickstoff) kommt es zu Kollisionsereignissen, deren Energie zum Aufbrechen von kovalenten Bindungen führt. Die benötigte Energie für diesen Prozess bezeichnet man als Kollisionsenergie (engl. *collision energy*). Den Fragmentierungsprozess wird auch als kollisions-induzierte Dissoziation

(englisch: *collisinally induced dissociation*, CID) bezeichnet, die Moleküle vor Fragmentierung als Vorläuferionen (engl. *precursor ion*) und nach der Fragmentierung als Fragmentionen (engl. *fragment ions*). Der in Kammer Q4 befindliche Quadrupol operiert nach dem Prinzip der linearen Ionenfalle (englisch: *linear ion trap*, LIT). Dieses Funktionsprinzip unterscheidet sich von den Quadrupolen Q0-Q2. Hierbei erfolgt die Ionenauslenkung ausschließlich mittels Wechselspannung. Die durchwandernden Ionen werden am Anfang und Ende des Quadrupols durch eine Gleichstrombarriere, eine Ringelektrode, an der Passage gehindert. Somit ist eine Anreicherung eines bestimmten Ions in der Kammermitte möglich, was die Nachweisbarkeit erhöhen kann. Nach einer festlegbaren Sammelzeit werden die angereicherten Fragmente schließlich in den Detektor entlassen.

Durch die MRM-Methodik ist eine genauere Differenzierung der Lipide möglich. Jedes Lipid besitzt eine eindeutige Kombination aus Q1- und Q3-Masse-Ladungsverhältnis. Das in Q3 detektierte Fragment repräsentiert dabei die polare Kopfgruppe des Lipides.

Die Limitierung der Methodik liegt in der fehlenden Aussagekraft der Molekülkonfiguration. Es lässt sich lediglich die Lipidklasse, die Anzahl an Kohlenstoffatomen der Acylseitenketten und die Summe an Doppelbindungen bestimmen. Somit kommen aus der Kombination aus Q1- und Q3-Masse-Ladungsverhältnis mehrere mögliche Konfigurationsisomere in Betracht.

### 3.2.4.3.2 Versuchsdurchführung

Nach (Grösgen, 2013; Lauer, 2022; Stahlmann, 2018).

Tabelle 20 fasst die Einstellungsoptionen der ESI-MS/MS, die während allen Messungen verwendet wurden, zusammen. Tabelle 21 - Tabelle 24 listet die untersuchten Lipide, sortiert nach Lipidspezies und ihre spezifischen Q1- und Q3 Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse, sowie deren Declustering-Potential (Akronym: DP) und Kollisionsenergie (englisches Akronym: CE), auf.

**Tabelle 20: Einstellung der ESI-MS/MS**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Messdauer	3 min
Scan-Typ	MRM
Vorhang-Gas Druck (Curtain-Gas-Pressure)	20 psi (= 137,9 kPa)
CAD	Mittel
ESI-Spannung	5,5 kV
Temperatur	200 °C
Ionenquelle Gas 1	40 psi (= 275,8 kPa)
Ionenquelle Gas 2	50 psi (= 344,74 kPa)
Interfaceheizer	Eingeschaltet
Eingangspotential	10 V

Parameter	Einstellung
Kollisionszellenausgangspotential	15 V
Injektionsvolumen	20 µl
Zuggeschwindigkeit (Draw Speed)	200 µl/min
Auswurfgeschwindigkeit (Eject Speed)	200 µl/min
Nadelreinigungsintervall	10s

Tabelle 21: MRM-Parameter Phosphatidylcholine (PCaa, PCae und LPC).

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
PCaa C20:0	566,2	184	94	31
PCaa C24:0	622,4	184	98	33
PCaa C26:0	650,5	184	103	35
PCaa C28:0	678,5	184	106	35
PCaa C28:1	676,5	184	106	35
PCaa C30:0	706,5	184	114	37
PCaa C30:2	702,5	184	111	37
PCaa C32:0	734,6	184	119	39
PCaa C32:1	732,6	184	118	39
PCaa C32:2	730,5	184	117	38
PCaa C32:3	728,5	184	117	38
PCaa C34:1	760,6	184	125	41
PCaa C34:2	758,6	184	123	40
PCaa C34:3	756,6	184	123	40
PCaa C34:4	754,5	184	122	40
PCaa C36:0	790,6	184	131	43
PCaa C36:1	788,6	184	131	43
PCaa C36:2	786,6	184	130	42
PCaa C36:3	784,6	184	130	42
PCaa C36:4	782,6	184	129	42
PCaa C36:5	780,6	184	128	42
PCaa C36:6	778,5	184	128	42
PCaa C38:0	818,7	184	138	45
PCaa C38:1	816,7	184	138	45
PCaa C38:3	812,6	184	136	44
PCaa C38:4	810,6	184	136	44
PCaa C38:5	808,6	184	136	44
PCaa C38:6	806,6	184	135	44
PCaa C40:0	846,7	184	145	47
PCaa C40:1	844,7	184	145	47
PCaa C40:2	842,7	184	144	47
PCaa C40:3	840,7	184	144	47
PCaa C40:4	838,6	184	144	47

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
PCaa C40:5	836,6	184	143	47
PCaa C40:6	834,6	184	143	46
PCaa C42:0	874,7	184	154	50
PCaa C42:1	872,7	184	153	50
PCaa C42:2	870,7	184	153	50
PCaa C42:4	866,7	184	152	50
PCaa C42:5	864,7	184	151	49
PCaa C42:6	862,6	184	150	49
PCaa C44:0	902,7	184	163	50
PCaa C48:0	958,8	184	170	50
PCae C30:1	690,5	184	109	36
PCae C30:2	688,5	184	108	36
PCae C32:1	718,6	184	115	38
PCae C32:2	716,6	184	114	37
PCae C34:0	748,6	184	122	40
PCae C34:1	746,6	184	121	39
PCae C34:2	744,6	184	120	39
PCae C34:3	742,6	184	120	39
PCae C36:0	776,7	184	128	42
PCae C36:1	774,6	184	127	41
PCae C36:2	772,6	184	127	41
PCae C36:3	770,6	184	126	41
PCae C36:4	768,6	184	126	41
PCae C36:5	766,6	184	125	41
PCae C38:0	804,7	184	135	44
PCae C38:1	802,7	184	134	44
PCae C38:2	800,7	184	133	43
PCae C38:3	798,6	184	133	43
PCae C38:4	796,6	184	133	43
PCae C38:5	794,6	184	132	43
PCae C38:6	792,6	184	132	43
PCae C40:0	832,7	184	142	46
PCae C40:1 / PCaa C40:8	830,7	184	141	46
PCae C40:2	828,7	184	141	46
PCae C40:3 / PCaa C40:10	826,7	184	140	46
PCae C40:4	824,7	184	140	45
PCae C40:5	822,6	184	139	45
PCae C40:6	820,6	184	139	45
PCae C42:0	860,8	184	150	49
PCae C42:1	858,7	184	141	46

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
PCae C42:2	856,7	184	149	48
PCae C42:3	854,7	184	148	48
PCae C42:4	852,7	184	148	48
PCae C42:5	850,7	184	147	48
PCae C44:3	882,7	184	156	51
PCae C44:4	880,7	184	156	51
PCae C44:5 / PCaa C44:12	878,7	184	155	51
PCae C44:6	876,7	184	154	50
LPC 06:0	356,2	184	72	31
LPC 10:0	412,3	184	76	30
LPC 12:0	440,4	184	78	30
LPC 14:0	468,3	184	79	30
LPC 16:0	496,3	184	81	31
LPC 16:1	494,3	184	79	30
LPC 17:0	510,3	184	82	31
LPC 18:0	524,3	184	85	31
LPC 18:1	522,3	184	82	31
LPC18:2	520,3	184	82	31
LPC 18:3	518,4	184	82	31
LPC 20:0	552,4	184	89	31
LPC 20:3	546,3	184	87	31
LPC 20:4	544,3	184	85	31
LPC 20:5	542,4	184	84	31
LPC 22:0	580,5	184	93	32
LPC 22:6	568,4	184	90	32
LPC 24:0	608,4	184	96	33
LPC 26:0	636,5	184	101	34
LPC 26:1	634,4	184	98	33
LPC 28:0	664,5	184	105	35
LPC 28:1	662,5	184	103	35

Tabelle 22: MRM-Parameter Sphingomyeline (SM).

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
SM C32:2 OH	689,6	184	108	36
SM C34:1	703,6	184	112	37
SM C34:2	701,6	184	111	37
SM C34:2 OH	717,6	184	114	38
SM C36:1	731,6	184	117	38

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
SM C36:2	729,6	184	117	38
SM C38:3	755,6	184	123	40
SM C40:2 OH	801,7	184	134	43
SM C40:3 OH	799,7	184	133	43
SM C40:4	781,6	184	129	42
SM C42:1	815,7	184	137	45
SM C42:2	813,7	184	137	45
SM C42:2 OH	829,7	184	141	46
SM C44:1	843,7	184	145	47
SM C44:2	841,7	184	144	47

Tabelle 23: MRM-Parameter Carnitinerester (CE).

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
CE00	162,1	85,1	61	27
CE02	204,1	85,1	41	27
CE03	218,1	85,1	46	29
CE03 OH	234,1	85,1	53	30
CE03:1	216,1	85,1	49	27
CE04	232,2	85,1	46	29
CE04 OH	248,1	85,1	55	32
CE04:1	230,1	85,1	52	29
CE05	246,2	85,1	46	29
CE05 M DC	290,2	85,1	63	37
CE05 OH	262,2	85,1	58	33
CE05:1	244,2	85,1	55	31
CE05:1 DC	274,1	85,1	60	35
CE06	260,2	85,1	56	27
CE06 OH	276,2	85,1	61	35
CE06:1	258,2	85,1	57	33
CE07 DC	304,2	85,1	66	39
CE08	288,2	85,1	66	33
CE08:1	286,2	85,1	63	37
CE09	302,2	85,1	66	39
CE10	316,2	85,1	56	37
CE10:1	314,2	85,1	68	40
CE10:2	312,2	85,1	67	40
CE12	344,3	85,1	73	44
CE12 DC	374,3	85,1	86	45
CE12:1	342,3	85,1	73	44
CE14	372,3	85,1	86	45

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
CE14:1	370,3	85,1	78	47
CE14:1 OH	386,3	85,1	81	50
CE14:2	368,3	85,1	78	47
CE14:2 OH	384,3	85,1	81	49
CE16	400,3	85,1	84	51
CE16 OH	416,3	85,1	87	53
CE16:1	398,3	85,1	84	51
CE16:1 OH	414,3	85,1	87	53
CE16:2	396,3	85,1	83	51
CE16:2 OH	412,3	85,1	86	53
CE18:0	428,4	85,1	96	63
CE18:1	426,4	85,1	89	55
CE18:1 OH	442,4	85,1	92	57
CE18:2	424,3	85,1	89	54

Tabelle 24: MRM-Parameter Triacylglyceride (TAG).

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
TAG C48:0	824,8	551,8	100	25
TAG C50:3	846,8	573,8	100	25
TAG C50:2	848,8	575,8	100	25
TAG C50:1	850,8	577,8	100	25
TAG C50:0	852,8	579,8	100	25
TAG C52:6	868,7	595,7	100	25
TAG C52:5	870,8	597,8	100	25
TAG C52:4	872,8	599,8	100	25
TAG C52:3	874,8	601,8	100	25
TAG C52:2	876,8	603,8	100	25
TAG C52:1	878,8	605,8	100	25
TAG C52:0	880,8	607,8	100	25
TAG C54:9	890,7	595,7	100	25
TAG C54:8	892,7	597,7	100	25
TAG C54:7	894,8	599,8	100	25
TAG C54:6	896,8	601,8	100	25
TAG C54:5	898,8	625,8	100	25
TAG C54:4	900,8	627,8	100	25
TAG C54:3	902,8	629,8	100	25
TAG C54:2	904,8	631,8	100	25
TAG C54:1	906,9	633,9	100	25
TAG C56:8	920,8	625,8	100	25
TAG C56:7	922,8	627,8	100	25
TAG C56:6	924,8	629,8	100	25

Lipid	Q1 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	Q3 - m/z (M+H) <sup>+</sup>	DP [V]	CE [eV]
TAG C56:5	926,8	631,8	100	25
TAG C56:4	928,8	633,8	100	25
TAG C56:3	930,9	635,9	100	25
TAG C56:2	932,9	659,9	100	25
TAG C56:1	934,9	661,9	100	25
TAG C58:7	950,8	655,8	100	25
TAG C58:6	952,8	657,8	100	25
TAG C58:5	954,8	659,8	100	25
TAG C58:4	956,9	661,9	100	25
TAG C58:3	958,9	663,9	100	25
TAG C58:2	960,9	659,9	100	25
TAG C60:6	980,9	685,9	100	25
TAG C60:5	982,9	687,9	100	25
TAG C60:4	984,9	689,9	100	25
TAG C60:3	986,9	687,9	100	25

Jede Probe wurde in drei unabhängigen Messungen analysiert.

### 3.2.4.3.3 Statistische Analyse

Es wurde die Software *Analyst 1.4.2* für die Darstellung und Abspeicherung der gewonnenen Daten verwendet. Die vom Teilchendetektor gemessenen Zählungen pro Sekunde (engl. *counts per seconds*, CPS) erlauben keine quantitative Aussage. Die Zugabe des normierten Standards (siehe Kapitel 3.2.4.2.2) während der Lipidextraktion ermöglichte in der anschließenden Auswertung die Beurteilung in der Extraktionseffizienz. In der weiteren Analyse wurden die cps einer Substanzprobe (MK4) relativ zur Kontrolle (Ethanol) ausgewertet. Die verwendeten Standards für die zu analysierenden Lipide können in Tabelle 17 eingesehen werden.

Vor weiteren Analysen wurde das registrierte Spektrum jeder Probe überprüft. Die restliche statistische Analyse wurde mit der Software *Microsoft Excel* durchgeführt.

Initial wurde jedes detektierte Einzellipid auf den Standard der Lipidklasse (siehe Tabelle 17) normiert. Durch die dreifache Messung der Probe im Massenspektrometer ergaben sich auch drei normierte cps für jedes Einzellipid. Aus diesem Triplikat wurde der Mittelwert gebildet. Im nächsten Schritt erfolgte der Vergleich der normierten cps zwischen den einzelnen Proben. Proben mit einer deutlichen Abweichung wurden von der weiteren Analyse exkludiert.

Um die Messergebnisse mehrerer zeitlich getrennter Inkubationen und Vermessungen gemeinsam auswerten zu können, erfolgte eine Normierung auf die Lösungsmittelkontrollgruppe der ersten Inkubation.

Die Daten der drei Durchläufe wurden nun zusammengeführt und untereinander analysiert. Für Untersuchung auf statistische Signifikanz wurde der zweiseitige t-Test verwendet.

Zur graphischen Darstellung der Lipidveränderung der inkubierten Proben im Vergleich zu den nicht mit MK4 inkubierten Kontrollen, wurde ein Volcano Plot erstellt. Bei einem Volcano Plot handelt es sich um eine graphische Darstellung von Datenpunkten in einem kartesischen Koordinatensystem. Dabei bildete die Abszisse, die zur Basis zwei logarithmierte relative Änderung des Mittelwertes eines inkubierten Einzellipides zum Mittel der Negativkontrollen und die Ordinate die Signifikanz als negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes ab. Die vertikalen Linien repräsentieren dabei den jeweils den größeren (von Probe oder Kontrolle) mittleren (ebenfalls zur Basis zwei logarithmierten) Standardfehler des Mittelwertes aller Einzellipide. Die horizontale Linie repräsentiert das dekadisch logarithmierte Signifikanzniveau von 5 %. Somit sind Lipide, die sich oberhalb der horizontalen und außerhalb der vertikalen Linie befinden, im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant verändert und ihre relative Änderung liegt außerhalb des durchschnittlichen Standardfehlers des Mittelwertes. Um die Gewichtung eines Lipides untereinander zur Darstellung zu bringen, wurden die Lipide als Blasen dargestellt, deren Flächeninhalt dem relativen Anteil der cps dieses Lipides an der Gesamt-cps der Lipidklasse in der MK4-Gruppe darstellt. Alterationen der gesamten Klasse, Sättigung und Kettenlänge gegenüber der Kontrolle wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Darstellung der MK4-bedingten Lipidalterationen gegenüber der Kontrolle, sowie der relative Anteil einzelner Lipidspezies an der gesamten Klasse in Form einer Wärmekarte (engl. *heatmap*, es wird ab jetzt der englische Begriff verwendet).

## 4 Ergebnisse

Der neuroprotektive Einfluss des Vitamin K2 gewinnt in der Literatur zunehmend an Bedeutung. Inzwischen konnten *in vitro* und *in vivo*-Studien eine Vielzahl protektiver Wirkmechanismen des Vitamin K2 und seiner assoziierten VKDP auf das Zentralnervensystem nachweisen (Ferland, 2012b, 2013). Diese Beobachtungen werden durch mehrere epidemiologischen Studien gestützt, welche eine Korrelation zwischen dem Vitamin K-Spiegel und kognitiver Leistung im Alter nachweisen konnten (Alisi et al., 2019). Neben diesem Zusammenhang ist die Bedeutung der Lipide im Kontext der Pathogenese der Alzheimerdemenz im Laufe der letzten Jahre zunehmend bewusst geworden, wobei von einem komplexen und verzahnten Zusammenspiel zwischen Lipidstoffwechsel und APP-Prozessierung ausgegangen werden muss (M. O. W. Grimm et al., 2017; Zimmer et al., 2024). Es besteht folglich ein berechtigtes Interesse an den noch unbekanntem Wirkzusammenhängen zwischen MK4 und Lipidhomöostase. Um diesem Interesse nachzukommen, sollte im ersten und zweiten Abschnitt dieser Arbeit der Frage nach dem Einfluss des MK4 auf die Lipidhomöostase mittels massenspektrometrischer Analyseverfahren nachgegangen werden. Dabei bestand das Interesse der Fragestellung nach dem Einfluss des MK4 auf membranbildenden Lipiden und Lipiden des mitochondrialen Energiemetabolismus. Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte die Analyse eines direkten Einflusses des MK4 auf die APP-prozessierende Sekretase in vitalen Zellen mittels Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie und Genexpressionsanalysen.

### 4.1 Einfluss des MK4 auf die Lipidkomposition

Um der gesetzten Fragestellung nach dem Einfluss des MK4 auf die Lipidhomöostase in dieser Arbeit nachzukommen, wurde ein massenspektrometrischer Ansatz gewählt. Die in Kapitel 3.2.4.3.1 näher beschriebene Methodik eignet sich, um semi-quantitative Veränderungen des Lipidprofils zu detektieren. Es wurden als Zelllinie SH-SY5Y-Zellen vom Wildtyp gewählt, die als *in vitro*-Modell für Untersuchungen neurodegenerativer Pathomechanismen regelhaft verwendet werden (Agholme et al., 2010). Nach einer 72 h andauernden Inkubation mit 100  $\mu$ M MK4 wurden die generierten massenspektrometrischen Daten ausgewertet und werden im Folgenden vorgestellt:

Es wurden insgesamt 199 Lipidspezies aus den Lipidklassen der Phospholipide (Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa), Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae), Lysophosphatidylcholine (LPC)), Sphingomyeline (SM) sowie Repräsentanten des mitochondrialen Energiestoffwechsels in Form der Carnitinester (CE) und Triacylglyceride (TAG) untersucht. Nach Inkubation und Extraktion der proteinnormierten Lipidfraktion wurden die Proben massenspektrometrisch mittels ESI-MS/MS untersucht. Es wurden insgesamt drei unabhängige Messdurchgänge durchgeführt und ausgewertet. Die Analyse fokussierte sich auf die vergleichende Auswertung der Sättigungsgrade und der Fettsäurekettenlängen. Dafür

wurden separiert die Sättigungsgrade in Form der drei Klassen der SFA, MUFA und PUFA eingeteilt und analysiert. Es erfolgte zusätzlich eine vertiefende Analyse der einzelnen Sättigungsgrade und Verteilungen innerhalb der PUFA. Die Kettenlängen wurden unabhängig von der Sättigung in Gruppen und einzeln betrachtet. Die gewählte Notation dieser Arbeit beinhaltet dabei die Lipidklasse, die Acylseitenkettenlänge und Acylseitenkettensättigung (X-CY: Z; X=Lipidklasse, C=Kohlenstoff, Y=Acylseitenkettenlänge, Z=Acylseitenkettensättigung / PCaa-C36:0 entspricht somit einem Diacyl-Phosphatidylcholin mit der summierten Kettenlänge von 36 Kohlenstoffatomen ohne Sättigung). Über Aufbau und Bedeutung der analysierten Klassen wird in Kapitel 5.1 tiefergehend eingegangen.

#### 4.1.1 Zytotoxizitätsanalyse

Zu Beginn der Arbeit sollte die mögliche Zytotoxizität des MK4 auf die untersuchten Wildtyp-SH-SY5Y-Zellen untersucht werden. Die untersuchte Konzentrationsspannweite wurde zwischen 5µM und 100µM auf Zytotoxizität untersucht. Die Toxizitätsmessung erfolgte über Messung der Aktivität der Laktatdehydrogenase (siehe Kapitel 3.2.3.1). Die ermittelte Toxizität wurde anschließend zum Verhältnis der korrespondierenden Proteinkonzentration gesetzt. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte dabei mittel BCA-Testung (siehe Kapitel 3.2.3.2). Insgesamt wurden drei unabhängige Toxizitätsbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Inkubationskonzentrationen auf einen signifikanten Unterschied gegenüber der Ethanolkontrolle mittels zweiseitigem Student-t-Test überprüft. Es konnte in der gesamten Konzentrationsreihe keine signifikant von der Kontrolle abweichende proteinnormierte Zytotoxizität nachgewiesen werden. Dieser Befund deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen gleichartigen Untersuchungen (Shandilya et al., 2021; Y. Yu et al., 2016).

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde für die folgende Lipidanalytik und Expressionsanalyse die supraphysiologische Konzentration von 100 µM gewählt.

#### 4.1.2 Analyse der Diacyl-Phosphatidylcholone

Phosphatidylcholone gehören zur Gruppe der Phosphoglycerolipide (Synonym: Phosphoglyceride) und setzen sich aus 3-Phosphoglycerin, der quartären Ammoniumverbindung Cholin und zwei Fettsäuren mit variabler Sättigung und Kettenlänge zusammen. Es bildet durch seine amphiphilen Eigenschaften einen essenziellen Bestandteil doppelschichtiger Zellmembranen (Burdge & Calder, 2015). Auf den chemischen Aufbau, das Vorkommen und die Funktion in Zellmembranen wird in Kapitel 5.1.1 vertieft eingegangen.

Von 43 Lipidspezies der Phosphatidylcholone zeigten 14 der mit MK4 inkubierten Spezies eine signifikante Zu-, und zwei eine signifikante Abnahme.

Der Mittelwert aller prozentualen Veränderungen der Einzelipide ergab einen statistisch signifikanten Zuwachs im Vergleich zur Kontrolle auf 110,4 % ( $\pm 1,8$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung

3C) im Sinne eines Klasseneffektes, welcher jedoch nach Gewichtung nach Masseanteilen der Einzellipide mit 103,8 % ( $\pm 5,7$  %;  $p = 0,561$ ; Abbildung 3D) keine Signifikanz mehr zeigen konnte. Der Verlust eines signifikanten Klasseneffektes lässt sich durch die Stabilität der anteilmäßig dominierenden Spezies PCaa-C34:1 (Anteil an Gesamtdetektion entspricht 26,5 %, siehe Abbildung 2B) mit einer Veränderung von lediglich 103 % ( $\pm 5,3$  %;  $p = 0,628$ ; Abbildung 2A) gegenüber der Kontrolle erklären.

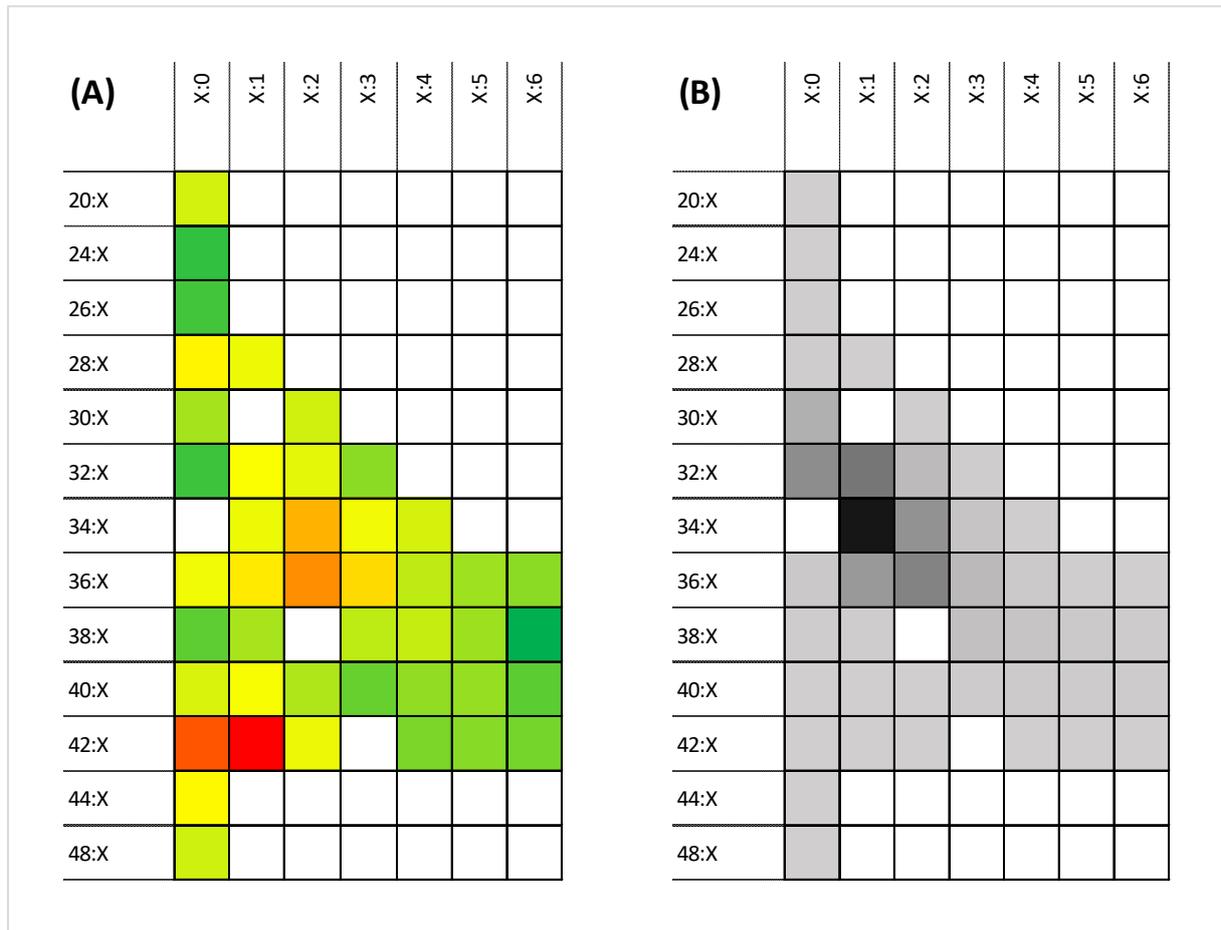
Die höchste Zunahme innerhalb der Diacyl-Phosphatidylcholone verzeichnete die Spezies PCaa-38:6 mit 139,5 % ( $\pm 6,6$  %,  $p < 0,001$ ; Abbildung 2A), die höchste Abnahme zeigte PCaa-42:1 mit 83,4 % ( $\pm 4,0$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 2A).

Die Analyse der Sättigungsklassen zeigte eine statistisch signifikante Zunahme der SFA auf 122,1 % ( $\pm 5,1$  %;  $p = 0,003$ ; Abbildung 4A), während bei den MUFA und PUFA keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden konnten (Abbildung 4A). Innerhalb der Gruppe der PUFA zeigten die sechsfach ungesättigten Fettsäuren eine relative Zunahme auf 130,5 % ( $\pm 6,6$  %;  $p = 0,003$ ; Abbildung 4B). Das Verhältnis zwischen gesättigt zu sechsfach ungesättigten Fettsäuren (CX:0/CX:6) zeigte unter Inkubation mit MK4 gegenüber der Kontrolle keine signifikante Abnahme. Das Verhältnis der mehrfach ungesättigten Fettsäuren untereinander zeigte signifikante Umverteilung hin zu mehr fünf- und sechsfach ungesättigten Fettsäuren auf Kosten von vierfach ungesättigten Fettsäuren (siehe Abbildung 4E). So zeigte das Verhältnis CX:4/(CX:5+CX:6) eine Abnahme auf 91,4 % ( $\pm 1,4$  %;  $p < 0,001$ ) und CX:4/CX:6 auf 85,2 % ( $\pm 1,7$  %;  $p < 0,001$ ). Die Analyse der Verteilung der Sättigung innerhalb einer Klasse zeigte eine Zunahme der gesättigten (108 %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 4F) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren X:4 (106 %;  $p = 0,004$ ; ), X:5 (110,5 %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 4F) und X:6 (124,6 %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 4F) auf Kosten der einfach (98,1 %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 4F) und zweifach ungesättigten Fettsäuren (91,5 %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 4F). Dreifach ungesättigte Fettsäuren zeigten mit 99,9 % keine Veränderung (Abbildung 4F).

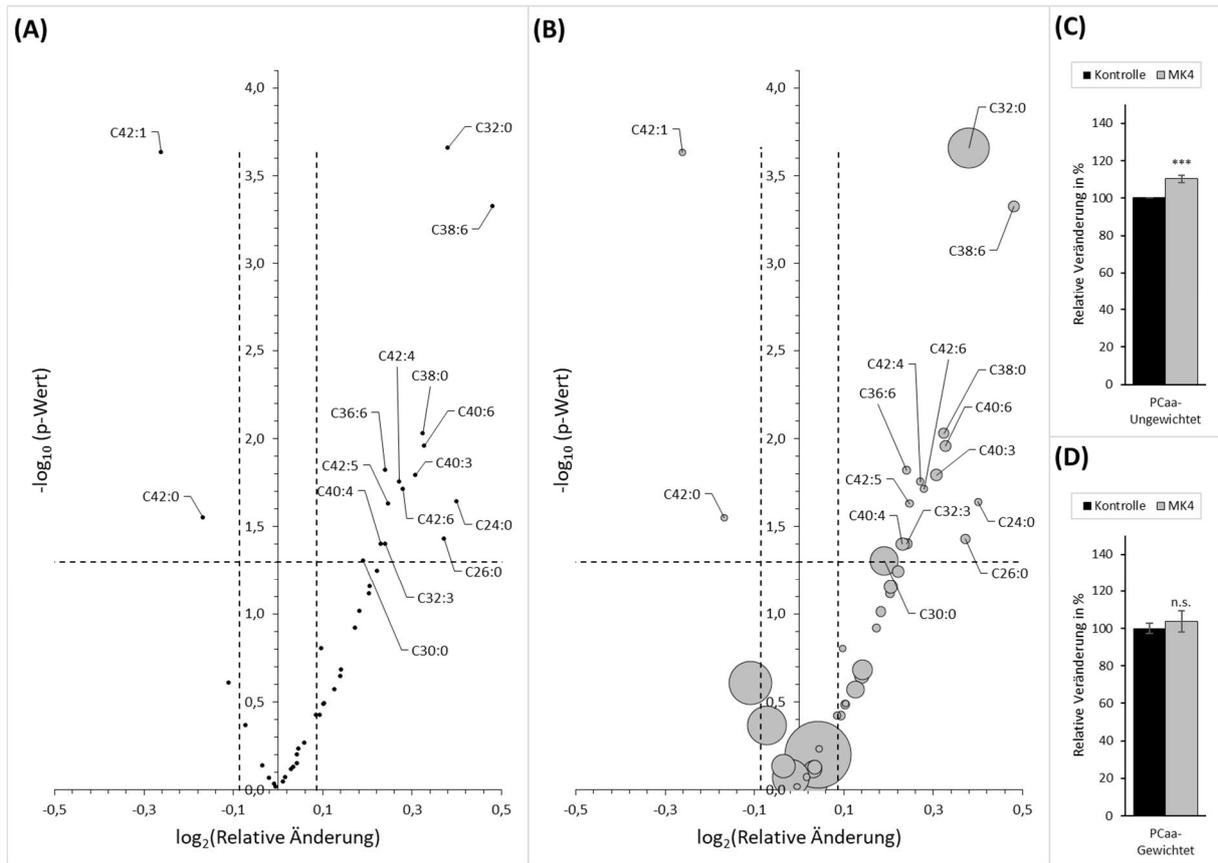
Neben den beschriebenen Effekten einer MK4-Inkubation auf die Sättigung zeigte sich zusätzlich eine Alteration der Kettenlängen der Diacyl-Phosphatidylcholone. Eine Einteilung aller untersuchten Lipide in kurzkettige (unter 32 Kohlenstoffatome), mittelkettige (zwischen 32 und 36 Kohlenstoffatomen) und langkettige (über 36 Kohlenstoffatome) Seitenketten der Phosphatidylcholine zeigte keine Gruppeneffekte (Siehe Abbildung 4C). Eine Betrachtung der einzelnen Kettenlängen hingegen zeigte eine signifikante Zunahme der Einzellipide C24:X auf 132,0 % ( $\pm 8,9$  %;  $p = 0,023$ ; Abbildung 4D), C26:X auf 129,4 % ( $\pm 9,0$  %;  $p = 0,037$ ; Abbildung 4D) und C40:X auf 119,0 % ( $\pm 6,6$  %;  $p = 0,030$ ; Abbildung 4D).

Zusammenfassend konnten mehrere - teilweise hochsignifikante - Alterationen der Zusammensetzung und Verteilung der Phosphatidylcholone unter Anwesenheit von MK4 in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere kam es zu einem Zuwachs der

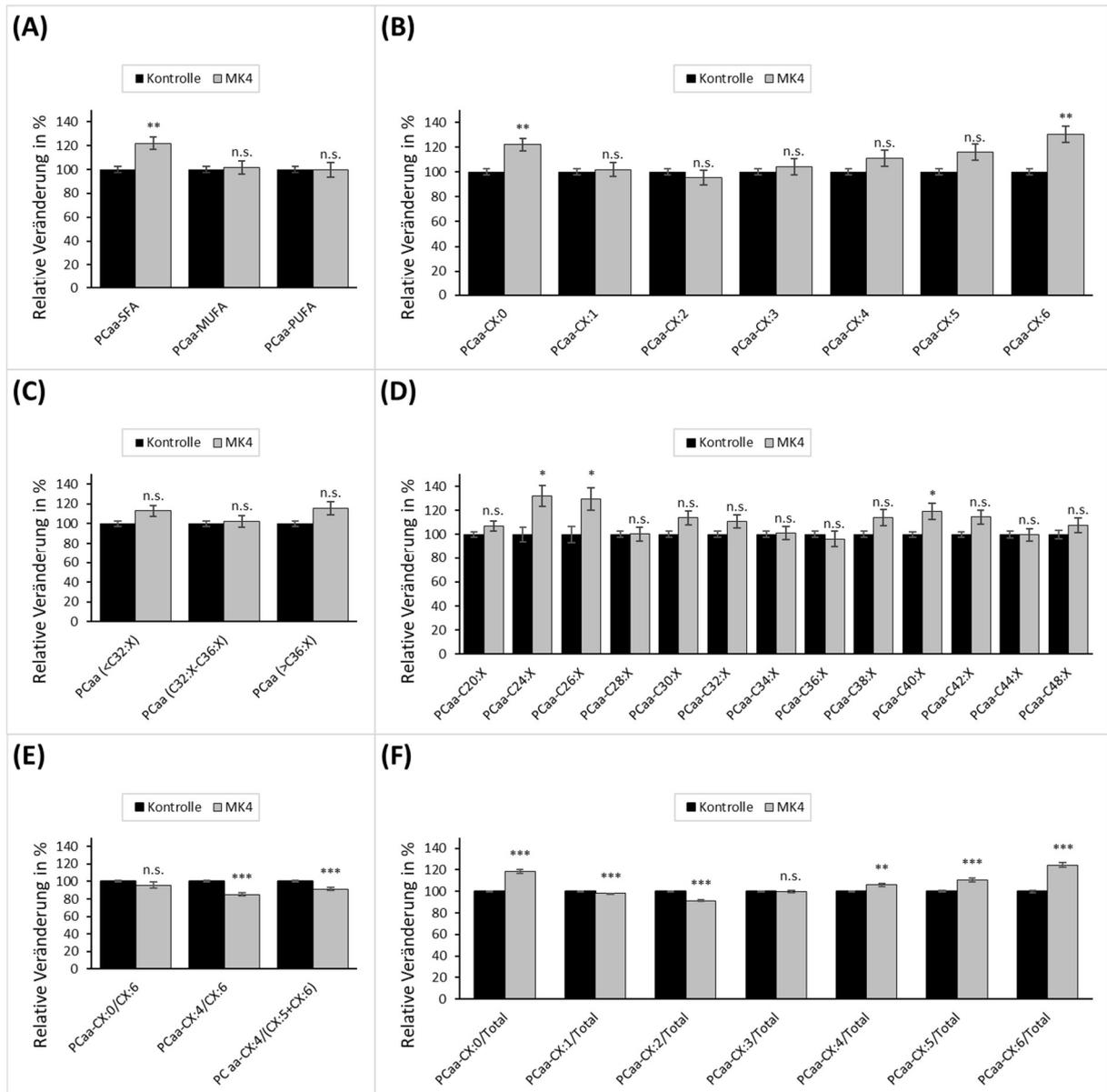
kurzkettig-gesättigten und der sechsfach ungesättigten, auf Kosten der einfach und zweifach ungesättigten Fettsäuren. Eine detaillierte Aufarbeitung der Daten ist in Tabelle 27 im Anhang einzusehen.



**Abbildung 2: Heatmap der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der PCaa unter Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies PCaa-C34:1.



**Abbildung 3: Lipidalteration der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa).** (A) und (B): Massenspektrometrisch detektierte Veränderung einzelner Lipidspezies der Diacyl-Phosphatidylcholine nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100 µM MK4 im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Veränderung der mit MK4 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repräsentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils höheren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschließlich signifikant veränderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Veränderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fläche der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der Phosphatidylcholin-Gesamtmenge angibt. (C): Mittlere Veränderung aller analysierten Lipide. (D): Veränderung der Phosphatidylcholin-Gesamtmenge. Schwarze Säulen zeigen MK4, graue Säulen die Kontrolle. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 4: Sättigung und Kettenlänge der Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu$ M MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*, keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der einzelnen Sättigungsgrade. (C): Analyse der Kettenlängensklassen. (D): Analyse der einzelnen Kettenlängen. (E): Analyse der Sättigungsklassenverteilung untereinander. (F): Analyse der Sättigungsklassenanteile.

### 4.1.3 Analyse der Phosphatidylcholin-Plasmalogene

Phosphatidylcholin-Plasmalogene leiten sich aus Phosphatidylcholinen ab und gehörten zur Gruppe der Etherlipide. Dabei handelt es sich um Phosphoglyceride, bei denen eine Acylseitenkette durch einen langkettigen Alkohol ausgetauscht wird. Der langkettige Alkohol bindet dabei an das Glycerin über eine Etherbindung. Sowohl der Alkohol als auch die verbleibenden Acylseitenketten besitzen unterschiedliche Sättigungsgrade und Kettenlängen (Braverman & Moser, 2012). Die Lipidklasse wird in Kapitel 5.1.2.2 vertieft beleuchtet.

Von den insgesamt 39 analysierten Plasmalogen-Spezies zeigten sieben Spezies eine signifikante Zu-, und zwölf eine Abnahme, die verbleibenden 20 Spezies zeigten gegenüber der Kontrolle keine signifikante Änderung.

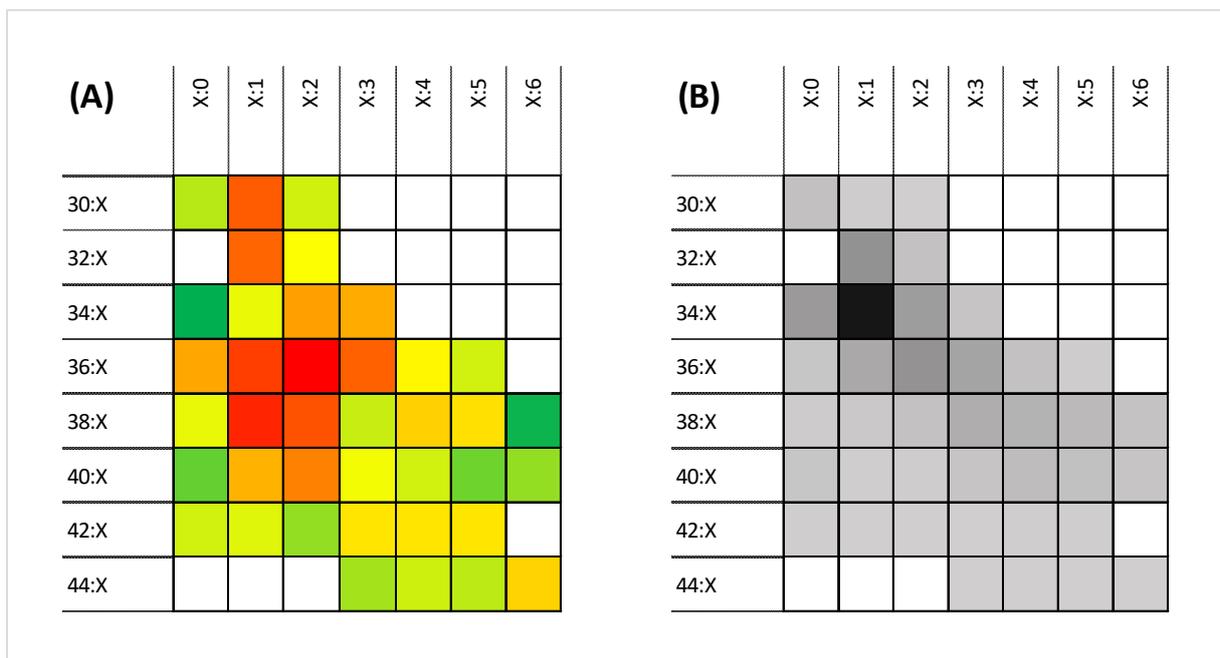
Da sowohl Zu- als auch Abnahmen innerhalb der Plasmalogene verzeichnet werden konnten, zeigte sich sowohl gewichtet mit 96,8 % ( $\pm 2,3$  %;  $p = 0,217$ ; Abbildung 6D) als auch ungewichtet mit 99,1 % ( $\pm 1,2$  %;  $p = 0,454$ ; Abbildung 6C) kein Klasseneffekt.

Die größte Abnahme mit 82,4 % ( $\pm 2,5$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 5) zeigte das Lipid PCae-C36:2, die größte Zunahme verzeichnete PCae-C34:0 mit 115,7 % ( $\pm 2,8$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 5). Eine Analyse der Verteilung der Phosphatidylcholin-Plasmalogene untereinander wird in Abbildung 6B in Form der Blasengröße, und in Abbildung 5B in Form der Farbintensität dargestellt. Es zeigte sich dabei PCae-C34:1 mit 24,5 % als die Lipidspezies mit dem höchsten Anteil, welche jedoch mit 101,3 % ( $\pm 2,5$  %;  $p = 0,644$ ; Abbildung 5A) keine signifikante Änderung verzeichnete.

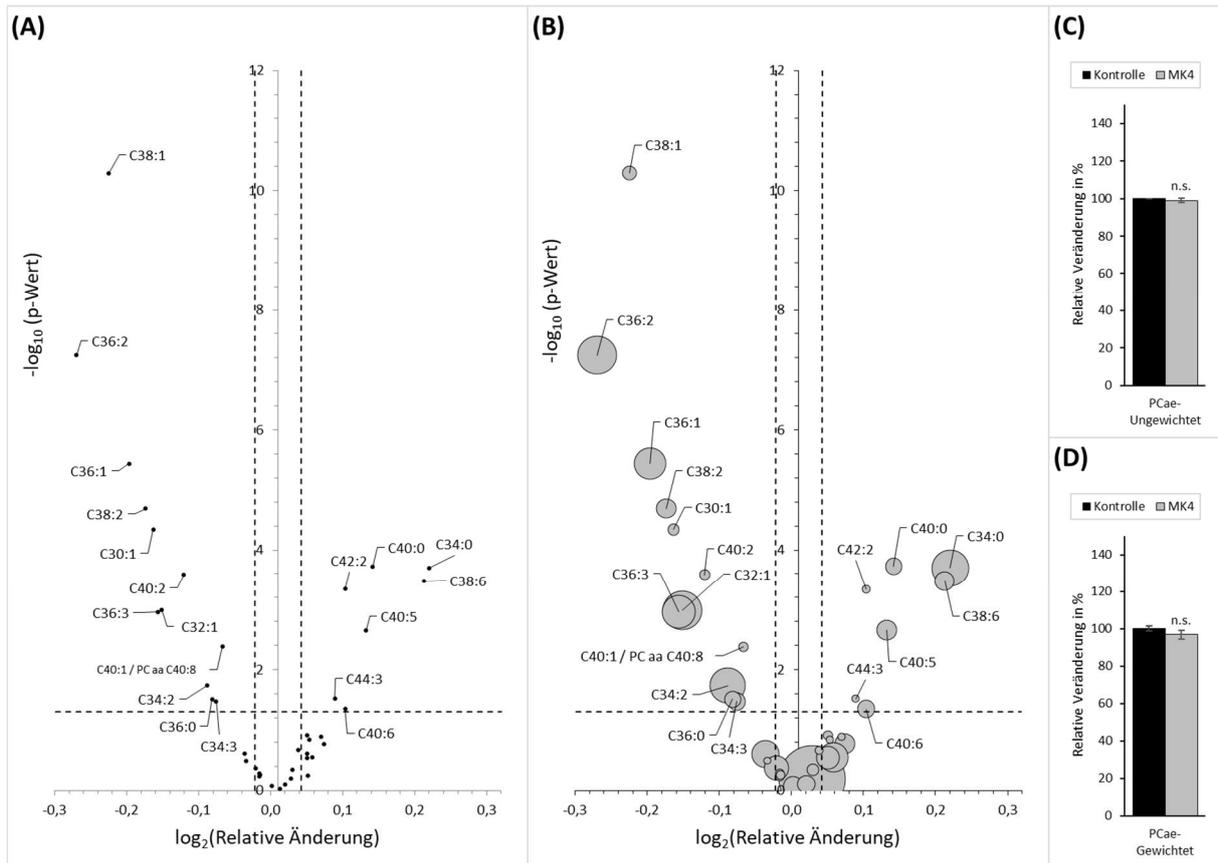
In Analogie zur Gruppe der Diacyl-Phosphatidylcholone (siehe Kapitel 4.1.2) zeigte sich eine signifikante Zunahme der gesättigten Fettsäuren auf 109,8 % ( $\pm 2,3$  %;  $p = 0,002$ ; Abbildung 7A). Außerdem konnte eine Abnahme der Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zur Kontrolle auf 94,7 % ( $\pm 2,3$  %;  $p = 0,042$ ; Abbildung 7A) beobachtet werden. Auch die Analyse der Sättigungsverteilung innerhalb der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigte in Analogie zu den Diacyl-Phosphatidylcholinen mit einer Abnahme von 89,8 % ( $\pm 2,0$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 7E) eine relativ höhere Zunahme der sechsfach ungesättigten gegenüber den vierfach ungesättigten Fettsäuren (CX:4/CX:6). Das Verhältnis zwischen gesättigt zu sechsfach ungesättigt (CX:0/CX:6) hingegen zeigte mit 99,3 % ( $\pm 2,3$  %;  $p = 0,0764$ ; Abbildung 7E) eine gleichmäßige Zunahme beider Sättigungsgruppen innerhalb der Phosphatidylcholin-Plasmalogene. Im Rahmen der Analyse der Sättigungsanteile zeigte sich die Zunahme der gesättigten, sowie der vier- bis sechsfach ungesättigten hauptsächlich auf Kosten der zweifach ungesättigten Fettsäuren, welche mit 91,4 % ( $\pm 0,4$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 7F) zur Kontrolle einen geringen Anteil an der Gesamtlipidmenge bildeten.

Die Einteilung der PCae in kurzkettige ( $C < 32$ ), mittelkettige ( $32 \geq C \leq 36$ ) und langkettige Kettenlängengruppen ( $C > 36$ ) zeigte keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 7C). Die Betrachtung der einzelnen Kettenlängen zeigte jedoch eine signifikante Abnahme von PCae C32:X auf 91,2 % ( $\pm 2,7$  %;  $p < 0,005$ ; Abbildung 7D) und C36:X auf 87,2 % ( $\pm 2,4$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 7D).

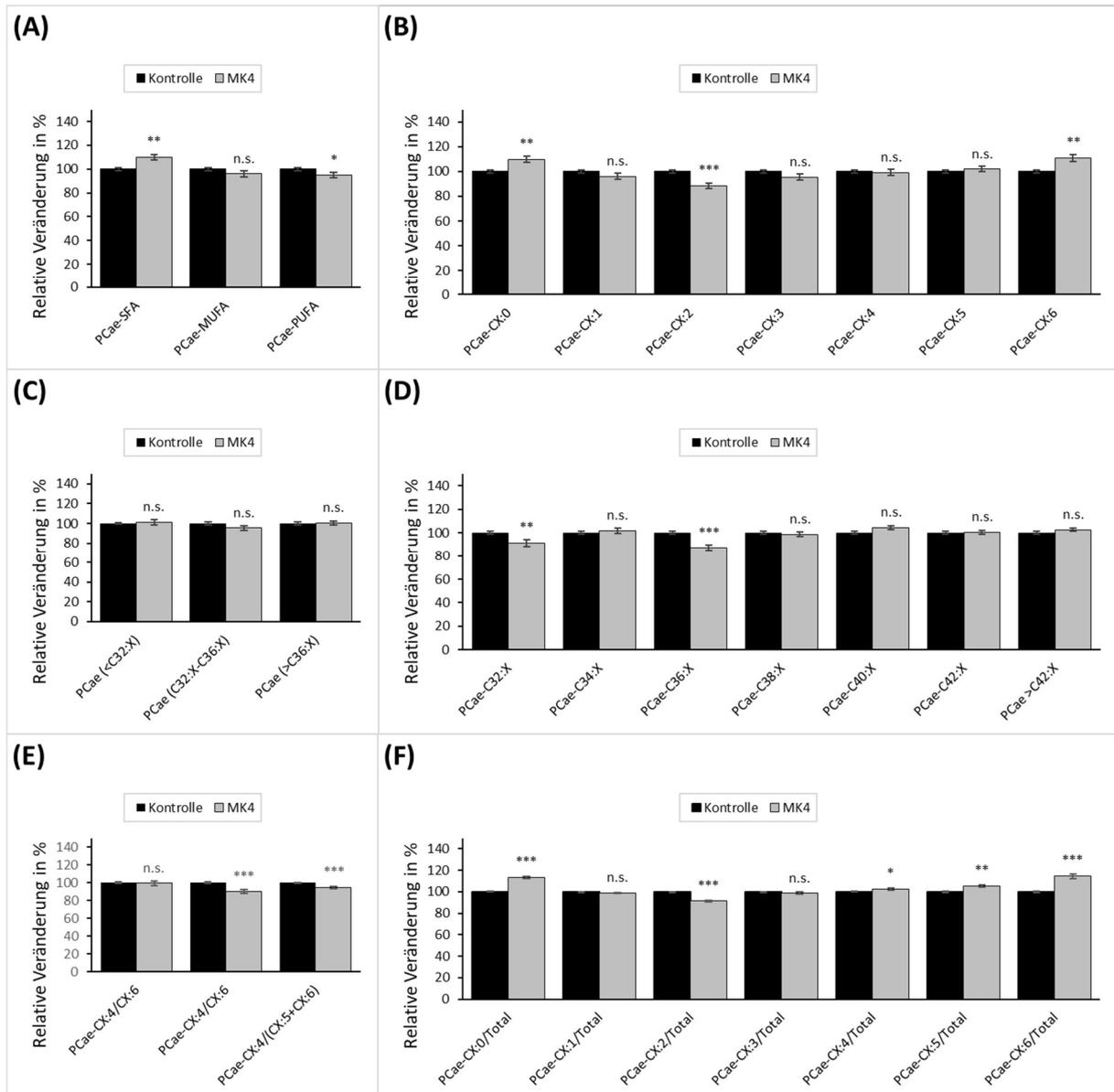
Zusammenfassend zeigte sich unter 72h andauernder Inkubation mit MK4 in SH-SY5Y-Zellen eine relative Zunahme der kurzkettig-gesättigten und sechsfach ungesättigten Fettsäuren bei gleichzeitiger Abnahme der zweifach ungesättigten Fettsäuren. Eine vertiefende Einsicht der Datenauswertung wurde im Anhang hinterlegt und kann dort in Tabelle 28 eingesehen werden.



**Abbildung 5: Heatmap der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der PCae unter Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies PCae-C34:1.



**Abbildung 6: Lipidalterationen der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).** (A) und (B): Massenspektrometrisch detektierte Veränderung einzelner Lipidspezies der Phosphatidylcholin-Plasmalogene nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Veränderung der mit MK4 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repräsentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils höheren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschließlich signifikant veränderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Veränderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fläche der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der Phosphatidylcholin-Gesamtmenge angibt. (C): Mittlere Veränderung aller analysierten Lipide. (D): Veränderung der Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Gesamtmenge. Schwarze Säulen zeigen MK4, graue Säulen die Kontrolle. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 7: Sättigung und Kettenlänge der Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu$ M MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*, keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der einzelnen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. (C): Analyse der Kettenlängensklassen. (D): Analyse der einzelnen Kettenlängen. (E): Analyse der Sättigungsklassenverteilung untereinander. (F): Analyse der Sättigungsklassenanteile.

#### 4.1.4 Analyse der lysierten Phosphatidylcholine

Lysierte Phosphatidylcholine sind ein Abbauprodukt von Phosphatidylcholinen. Sie entstehen entweder durch hydrolytische Spaltung der mittelständigen Esterbindung durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) oder durch Transfer einer Acylseitenkette auf ein freies Cholesterin mittels Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Die verbleibende Acylseitenkette ist im Sättigungsgrad und in der Kettenlänge variabel (Law et al., 2019). Die Lipidklasse wird in 5.1.2.3 vertiefend besprochen.

Von 22 analysierten lysierten Phosphatidylcholinen zeigten fünf Spezies eine signifikante Ab- und zwei eine signifikante Zunahme. Die verbleibenden 15 Spezies (entspricht 68 % aller Spezies) zeigten keine signifikante Änderung, jedoch tendiert die gesamte Gruppe unter Einbeziehung nicht signifikanter Spezies mit insgesamt 16 Lipiden (ca. 72,7 %) hin zur Abnahme.

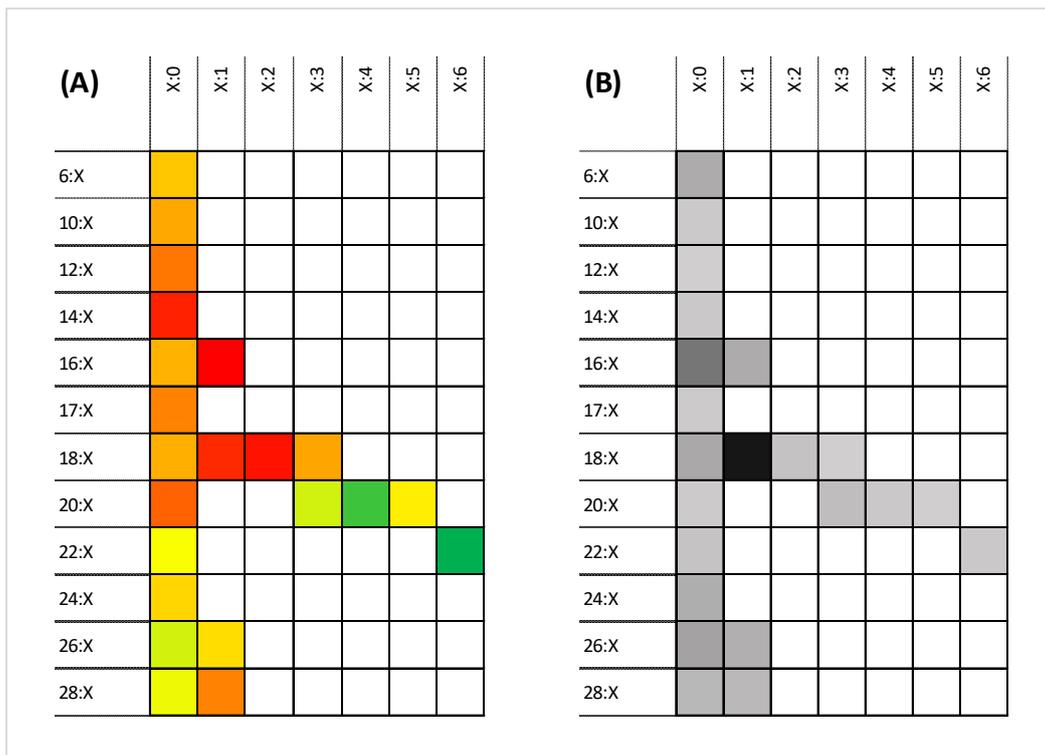
Sowohl ungewichtet mit 96,6 % ( $\pm 2,9$  %;  $p = 0,245$ ; Abbildung 9C), als auch gewichtet mit 91,4 % ( $\pm 4,5$  %;  $p = 0,095$ ; Abbildung 9D) zeigte die Klasse der LPC keine signifikante Änderung. Die größte Zunahme mit 135,7 % ( $\pm 6,3$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 9A) wurde bei LPC-C22:6 und die größte Abnahme mit 79,8 % ( $\pm 6,0$  %;  $p < 0,004$  Abbildung 9A) bei LPC-C16:1 detektiert. Die Untersuchung der Lipidanteile innerhalb der Klasse wurde in Abbildung 9B in Form der Blasenfläche und Abbildung 8B farbcodiert dargestellt. Mit einem relativen Anteil von 29,2 % zeigte sich LPC-C18:1 als dominierendes lysiertes Phosphatidylcholin in inkubierten SH-SY5Y-Zellen vom Wildtyp, welches mit einer relativen Abnahme von 83,1 % ( $\pm 5$  %;  $p < 0,006$ ; Abbildung 9B, Abbildung 8) eine deutliche Änderung gegenüber der Kontrolle verzeichnete.

Die Analyse der Sättigungsgrade zeigte keine signifikante Änderung der ungesättigten Fettsäuren (Abbildung 10A). Die Abnahme der einfach ungesättigten mit 84,7 % ( $\pm 4,2$  %;  $p = 0,004$ ; Abbildung 10A) und zweifach ungesättigten Fettsäuren mit 81,3 % ( $\pm 4,5$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10B) zeigte hingegen Signifikanz. Zusätzlich zeigte sich eine Zunahme der vierfach ungesättigten auf 127,1 % ( $\pm 4,6$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10B) und sechsfach ungesättigten auf 135,7 % ( $\pm 6,3$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10B). Eine Zunahme der fünffach ungesättigten Fettsäuren konnte nicht beobachtet werden. Auch die Analyse der Verteilung innerhalb der Klasse zeigte eine Umverteilung durch Zunahme der drei- ( $117,3$  %  $\pm 3,7$  %;  $p = 0,001$ ; Abbildung 10D), vier- ( $140,5$  %  $\pm 3,9$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10D) und sechsfach ( $148$  %  $\pm 3,8$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10D) ungesättigten Fettsäuren auf Kosten der ein- ( $91,8$  %  $\pm 3,2$  %;  $p = 0,038$ ; Abbildung 10D) und zweifachen Fettsäuren ( $90,2$  %  $\pm 3,6$  %;  $p = 0,013$ ; Abbildung 10D).

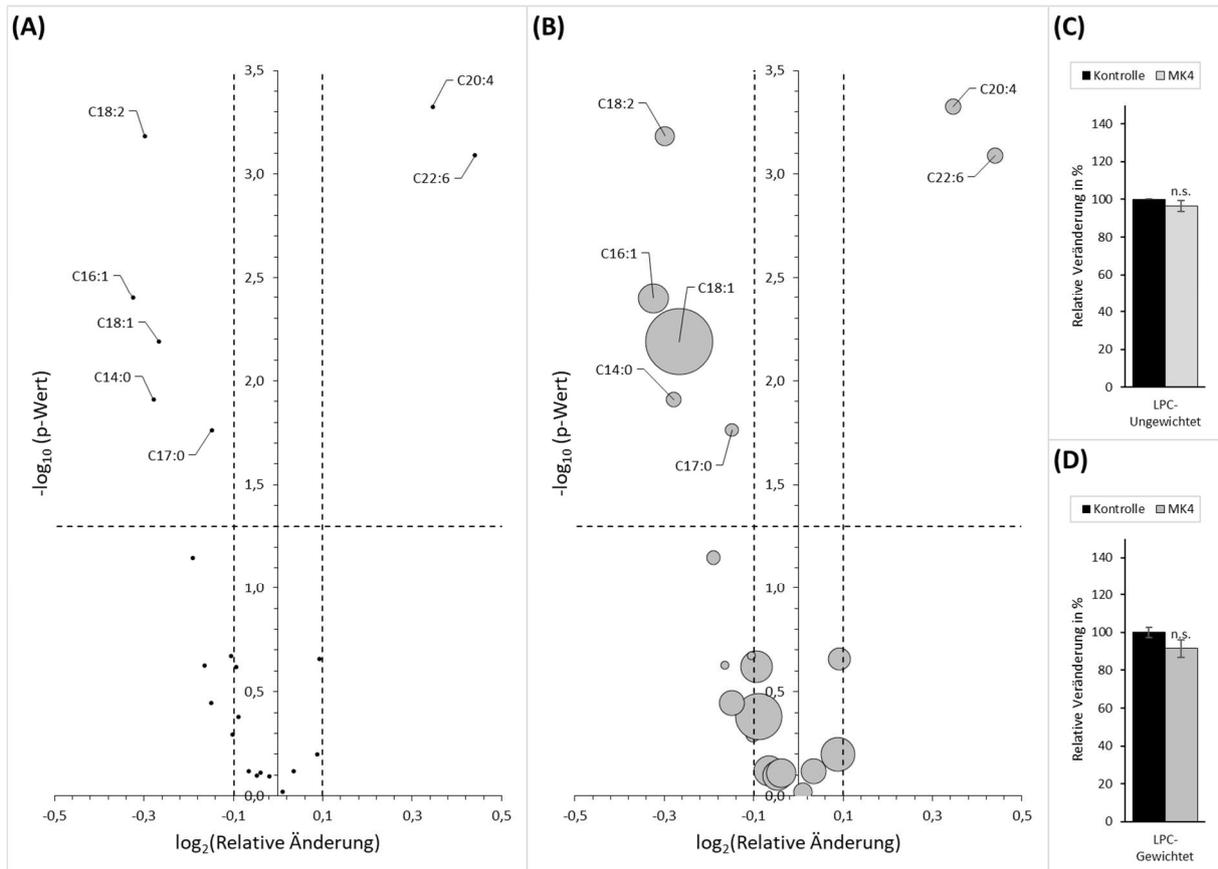
Die Kettenlängen wurden initial in die Gruppe der kurzkettigen ( $C < 16$ ), mittelkettigen ( $16 \geq C \leq 20$ ) und langkettigen LPC untergliedert und analysiert. Es zeigte sich eine signifikante

Reduzierung der Spezies mit einer mittleren Kettenlänge auf 87,7% ( $\pm 4,9$  %;  $p = 0,032$ ; Abbildung 10C). Diese Abnahme ist insbesondere durch die gemeinsame Abnahme von LPC-C17:X mit 90,2 % ( $\pm 3,4$  %;  $p = 0,017$ ; Abbildung 10E) und LPC-C18:X mit 84,6 % ( $\pm 4,7$  %;  $p < 0,007$ ; Abbildung 10E) bedingt. In diesem Kontext zeigte aus der Gruppe der kurzkettigen LPC auch die Spezies LPC-C14:X mit 82,5 % ( $\pm 7,0$  %;  $p = 0,012$ ; Abbildung 10E) eine Abnahme.

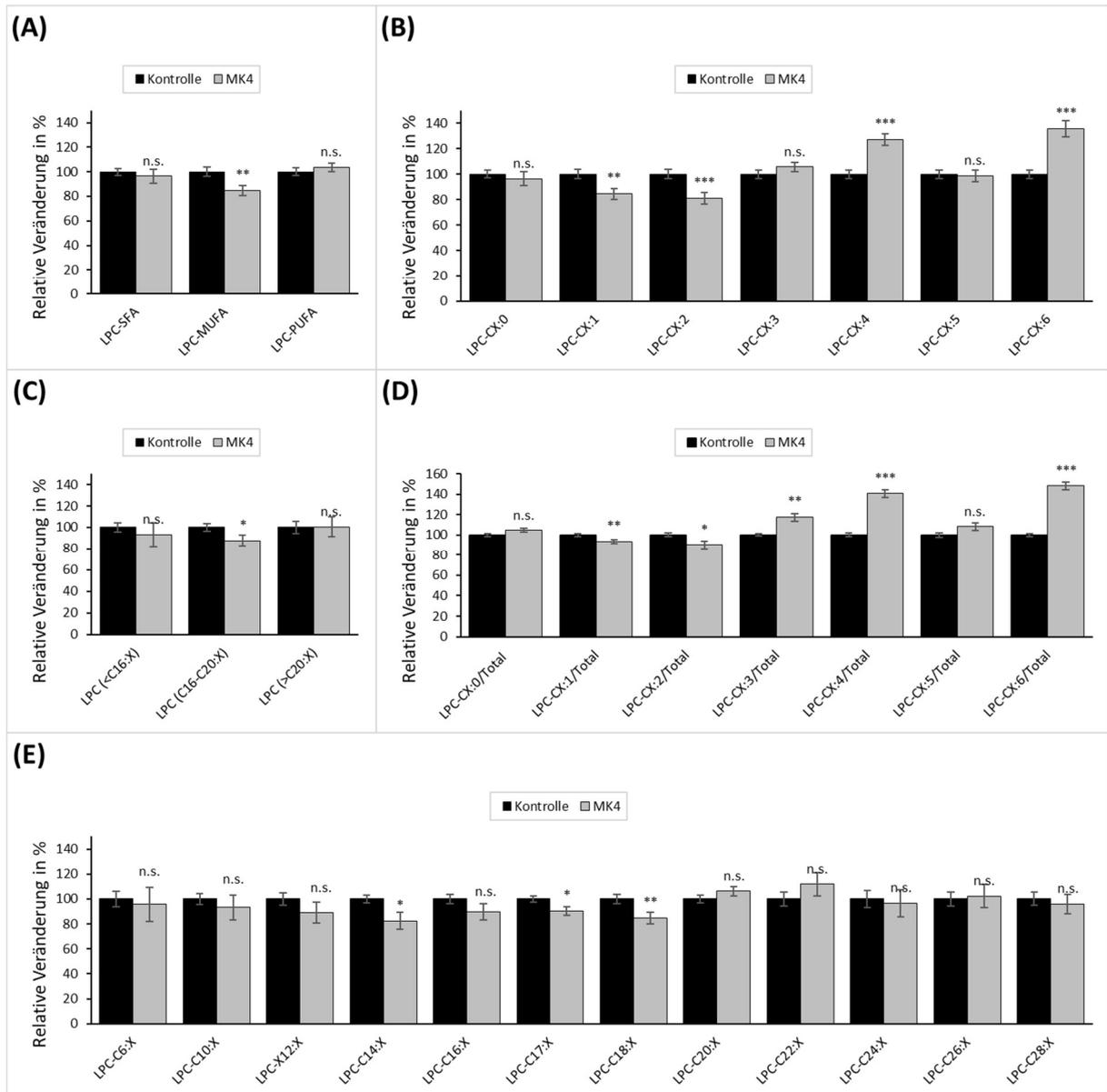
Zusammenfassend zeigte die Analyse der lysierten Phosphatidylcholone keinen Klasseneffekt, jedoch unter Einfluss von MK4 gegenüber der Kontrolle eine Abnahme der einfach und zweifach ungesättigten Fettsäuren bei gleichzeitiger Zunahme der vier- und sechsfachen Sättigung. Außerdem zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme der mittelkettigen Fettsäuren, insbesondere der Kettenlängen LysoPC-C14:X, LysoPC-C17:X, LysoPC-C18:X. Eine vertiefende Einsicht der Datenauswertung wurde im Anhang hinterlegt und kann dort in Tabelle 29 eingesehen werden.



**Abbildung 8: Heatmap der lysierten Phosphatidylcholone (LPC).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der LPC unter Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies LPC-C18:1.



**Abbildung 9: Lipidalteration der lysierten Phosphatidylcholine (LPC).** (A) und (B): Massenspektrometrisch detektierte Veränderung einzelner Lipidspezies der lysierten Phosphatidylcholine nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100 µM MK4 im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Veränderung der mit MK4 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repräsentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils höheren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschließlich signifikant veränderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Veränderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fläche der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der lysierten Phosphatidylcholin-Gesamtmenge angibt. (C): Mittlere Veränderung aller analysierten Lipide. (D): Veränderung der Phosphatidylcholin-Gesamtmenge. Schwarze Säulen zeigen MK4, graue Säulen die Kontrolle. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 10: Sättigung und Kettenlänge der lysierten Phosphatidylcholone (LPC).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*), keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der einzelnen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. (C): Analyse der Kettenlängenklassen. (D): Analyse der Sättigungsanteile. (E): Analyse der einzelnen Kettenlängen.

#### 4.1.5 Analyse der Sphingomyeline

Sphingomyeline finden sich hochkonzentriert in den Myelinscheiden des Zentralnervensystems. Sie gehören zur Gruppe der Sphingolipide, deren Gemeinsamkeit der einfach ungesättigte Aminodialkohol Sphingosin darstellt. An die Aminogruppe des Sphingosins ist eine Fettsäure variabler Kettenlänge und Sättigung angehängt, an der Hydroxygruppe bindet eine über Phosphatidylcholin transferierte Phosphatgruppe mit Ethanolamin bzw. Cholin (Gault et al., 2010). Auf chemischen Aufbau, Vorkommen und Bedeutung der Funktion im Zentralnervensystem wird in Kapitel 5.1.2.4 detailliert eingegangen.

Insgesamt wurden 15 Lipidspezies analysiert, davon zeigten acht Spezies eine Zunahme und sieben Spezies eine Abnahme. Lediglich drei der 15 untersuchten Sphingomyeline erreichten in der Analyse eine signifikante Änderung. Die Spezies SM-C26:1 zeigte dabei mit 114,9 % ( $\pm 4,9$  %;  $p = 0,023$ ; Abbildung 12A) als einziges Lipid dieser Klasse eine signifikante Zunahme, eine Abnahme mit Signifikanz zeigte ausschließlich SM-C16:0 mit 87 % ( $\pm 3,9$  %;  $p = 0,003$ ; Abbildung 12A) sowie SM-C21:1-OH mit 89,6 % ( $\pm 4,2$  %;  $p = 0,025$ ; Abbildung 12A).

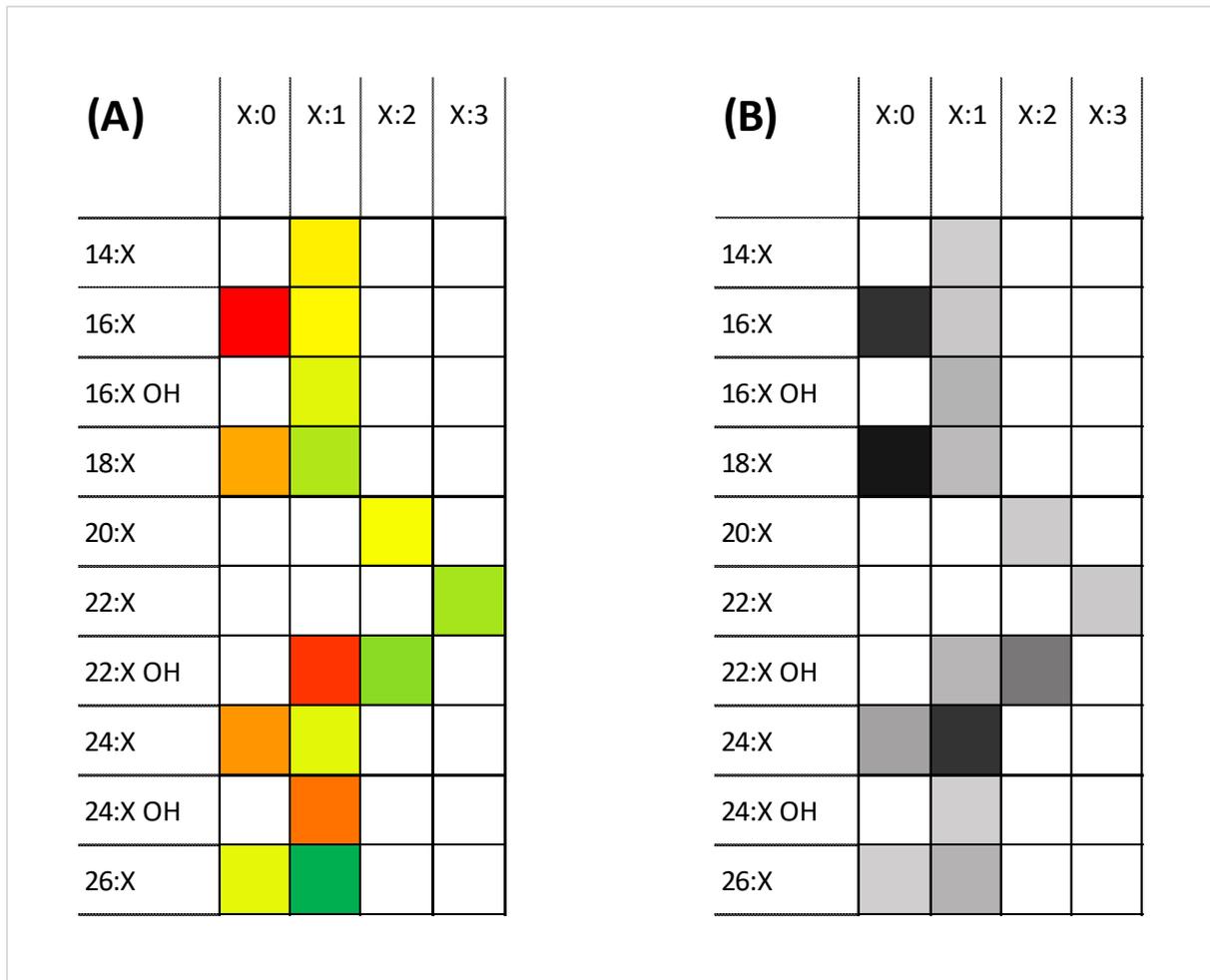
Sowohl in der Sphingomyelin-Gesamtmenge als auch im mittleren Effekt der Sphingomyelin-Spezies schlägt sich diese Mischung aus hoch- und runterregulierten Spezies gegenüber der Ethanolkontrolle ausgleichend nieder mit gewichtet 97,1 % ( $\pm 4,2$  %;  $p = 0,55$ ; Abbildung 12D) und ungewichtet 99,7 % ( $\pm 1,8$  %;  $p = 0,87$ ; Abbildung 12C).

Eine Betrachtung der Lipidanteile zeigte, dass 60 % der Sphingomyelin-Gesamtmenge von lediglich 3 Spezies (SM-C16:0, SM-C18:0 und SM-C24:1) ausgemacht werden (siehe Abbildung 11B). Es lässt sich daraus eine relative Dominanz dieser Spezies in den untersuchten Proben ableiten.

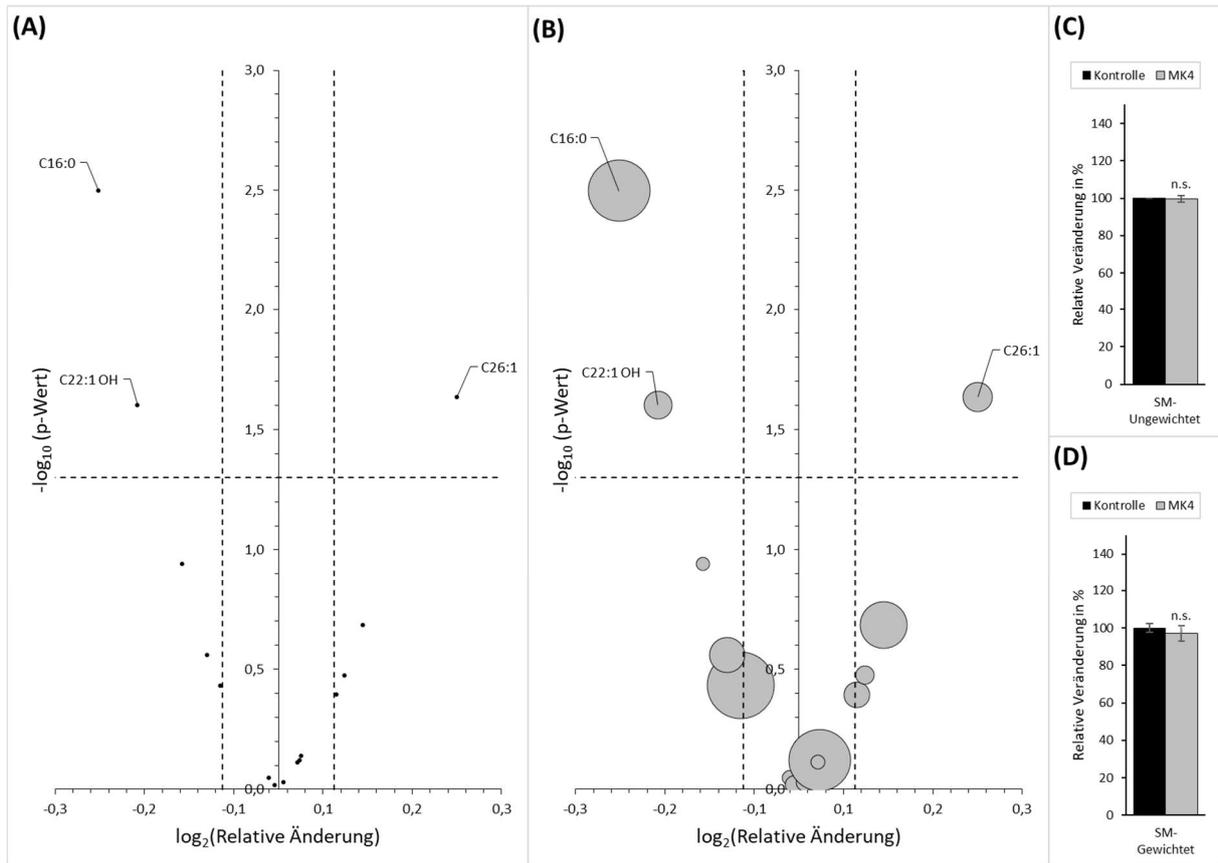
Die Analyse der Sättigungsklassen zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Alteration im Sättigungsgrad (siehe Abbildung 13A). Ebenso zeigte die Betrachtung der einzelnen Sättigungsgrade keine Änderung unter Einfluss des MK4 (siehe Abbildung 13B).

Die Analyse der Kettenlängengruppen zeigte keine signifikanten Ergebnisse (Dabei wurden die Kettenlängengruppe wie in 4.1.4 definiert).

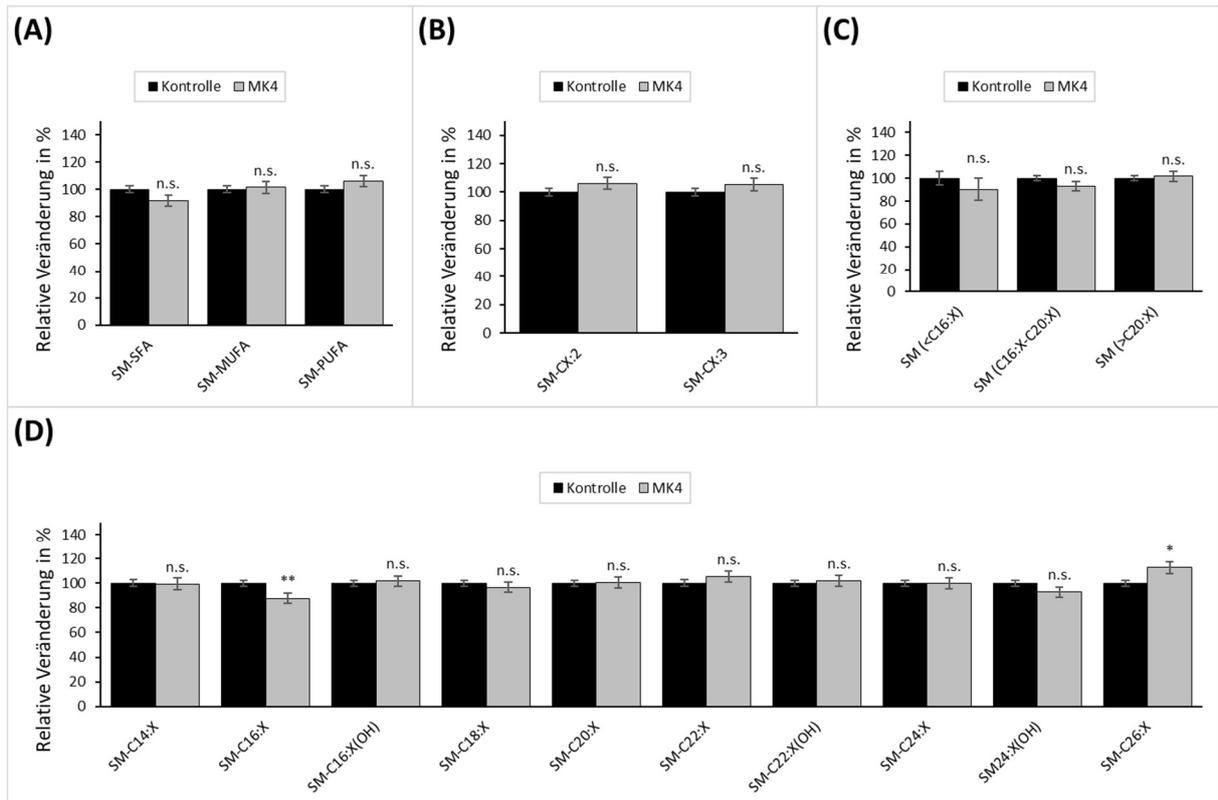
Die massenspektrometrische Analyse der betrachteten Sphingomyeline zeigte zusammenfassend keinen Klasseneffekt. Bis auf die Lipide SM-16:0, SM-22:1OH und SM-26:1 zeigte sich innerhalb der Gruppe der Sphingomyeline keine signifikante Änderung. Eine vertiefende Einsicht der Datenauswertung wurde im Anhang hinterlegt und kann dort in Tabelle 30 eingesehen werden.



**Abbildung 11: Heatmap der Sphingomyeline (SM).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der SM unter Inkubation mit 100  $\mu$ M MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies SM-C16:0, SM-C18:0 und SM-C24:1.



**Abbildung 12: Lipidalteration der Sphingomyeline (SM).** (A) und (B): Massenspektrometrisch detektierte Veränderung einzelner Lipidspezies der Sphingomyeline nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100 µM MK4 im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse, die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Veränderung der mit MK4 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repräsentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils höheren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschließlich signifikant veränderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Veränderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fläche der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der Sphingomyelin-Gesamtmenge angibt. (C): Mittlere Veränderung aller analysierten Lipide. (D): Veränderung der Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Gesamtmenge. Schwarze Säulen zeigen MK4, graue Säulen die Kontrolle. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 13: Sättigung und Kettenlänge der Spingomyeline (SM).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu$ M MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung (p < 0,05 entspricht \* / p < 0,01 entspricht \*\* / p < 0,001 entspricht \*\*\*), keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der einzelnen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. (C): Analyse der Kettenlängensklassen. (D): Analyse der einzelnen Kettenlängen.

#### 4.1.6 Analyse der Carnitiner

Carnitiner dienen als Transportmedium aktivierter Fettsäuren (Acyl-CoA) aus dem Zytosol durch die innere Mitochondrienmembran. Nach Übertragung aktivierter Fettsäuren (Acyl-CoA) mittels Esterbindung an die 3-Hydroxygruppe des L-Carnitin durch das Enzym Carnitin-Acyl-Transferase können die Carnitiner durch den Symporter Carnitin-Acylcarnitintransporter die innere Mitochondrienmembran durchwandern. Die transportierten Fettsäuren können nun im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation für die Energiegewinnung metabolisiert werden. Somit dienen Carnitiner als indirektes Maß des mitochondrialen Energiemetabolismus (Houten & Wanders, 2010). Eine detaillierte Erläuterung des chemischen Aufbaus und der Funktion findet sich in Kapitel 2.2.2.2.

Von den insgesamt 41 untersuchten Carnitiner zeigten sechs Spezies eine Zunahme und 35 eine Abnahme (entspricht 85 % der untersuchten Einzellipide). 26 Spezies der mit MK4 inkubierte Proben zeigten eine zur Kontrolle signifikante Veränderung. Interessanterweise zeigten ausschließlich die drei untersuchten Carnitiner mit der Kettenlänge 18 (CE-18:0, CE-18:1, CE-18:2, Abbildung 15A-C und Abbildung 14A) eine signifikante Zunahme. Im Gegensatz dazu zeigten 56 % der Spezies (entspricht 23 Lipiden) eine signifikante Abnahme (siehe Abbildung 15A-C).

Die Dominanz der abnehmenden Spezies gegenüber der Zunahme bedingte einen Klasseneffekt mit einem mittleren Effekt von 89,6 % ( $\pm 3$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 15D) und einer Abnahme der Carnitinergesamtmenge auf 87,0 % ( $\pm 3,7$  %;  $p = 0,002$ ; Abbildung 15E) gegenüber der Kontrolle.

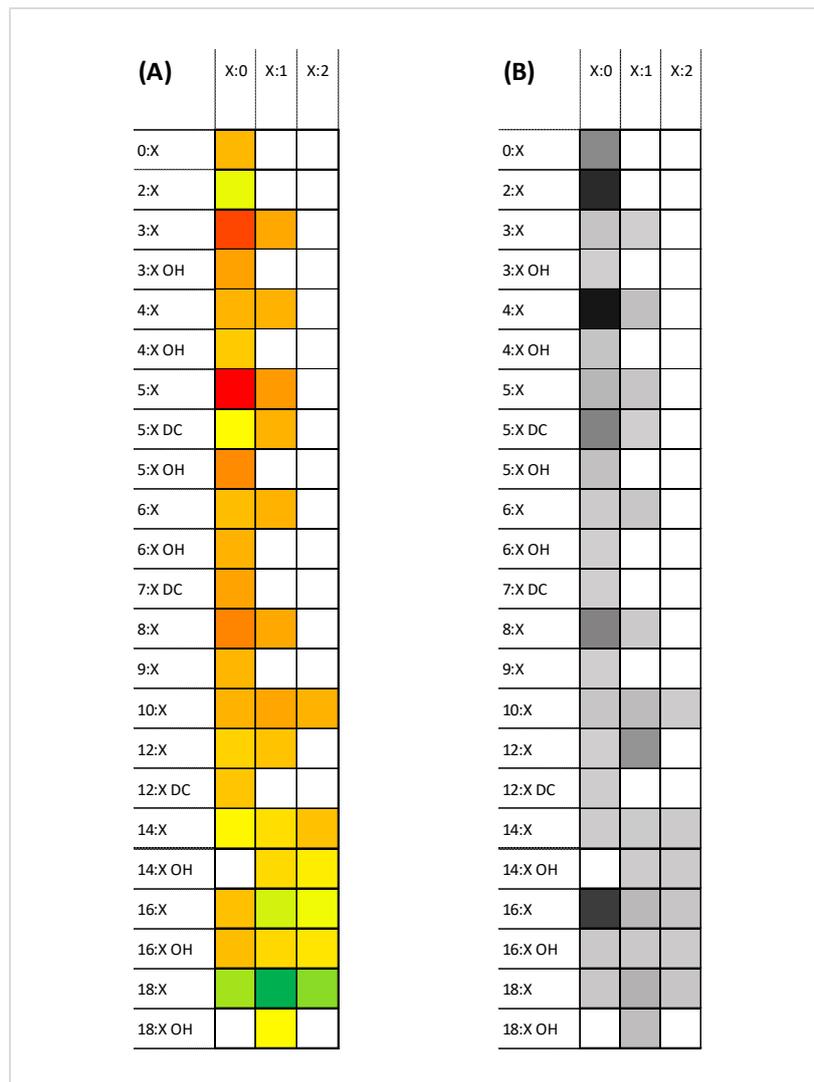
Die stärksten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zeigten dabei die Carnitiner CE-03:0 mit 58,6 % ( $\pm 3,9$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 15C) und CE-05:0 mit 42,8 % ( $\pm 5,7$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 15C). Mit 15,3% (Anteil entspricht der Blasengröße in Abbildung 15B und der Farbcodierung in Abbildung 14B) zeigte die Spezies CE-04:0 den größten Anteil innerhalb der Carnitiner. Mit 83,4 % ( $\pm 5,2$  %;  $p = 0,002$ ; Abbildung 14) zeigte auch die Hauptspezies eine signifikante Abnahme.

Die Untersuchung der Sättigungsgrade zeigte eine signifikante Abnahme der Carnitiner mit ungesättigten Fettsäuren auf 81,2 % ( $\pm 4,9$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 16A), einfach und zweifach ungesättigte Fettsäuren zeigten hingegen keine Alteration gegenüber der Kontrolle. Da im Kontext der Carnitiner Sättigungsgrade bis einschließlich zweifach ungesättigt analysiert wurden, kann im Gegensatz zu den Membranlipiden keine Unterteilung innerhalb der PUFA erfolgen.

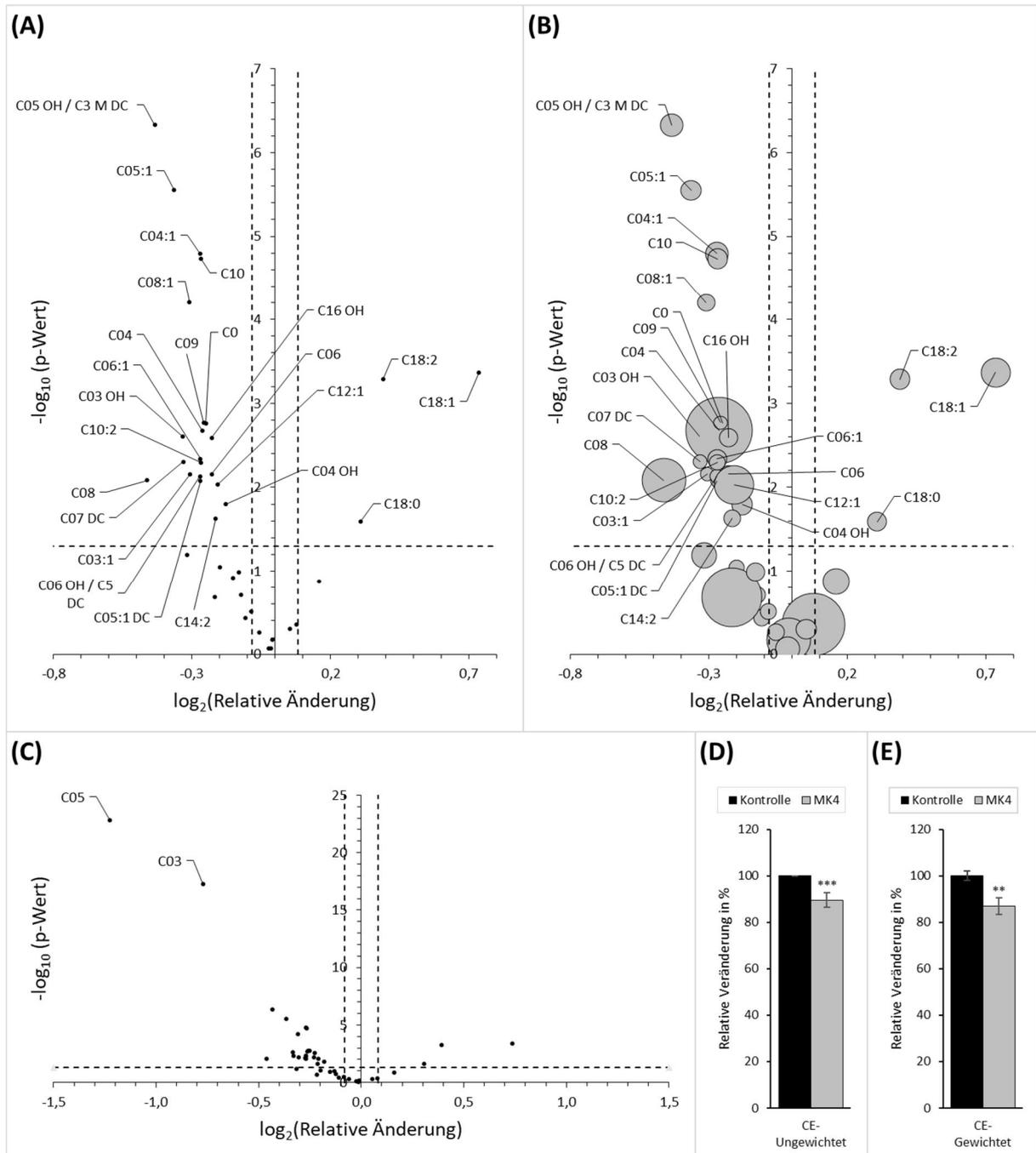
Die Aufteilung der Kettenlängen der Carnitiner erfolgt in eine kurz- ( $C < 16$ ) und eine mittelkettige Gruppe ( $C \geq 16$ ). Es zeigte sich bei nicht signifikanter Änderung der mittelkettigen

eine signifikante Abnahme der kurzkettigen Carnitinester auf 80,5 % ( $\pm 3,3$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 16B). Die Veränderungen der einzelnen Kettenlängen können in Abbildung 16C eingesehen werden.

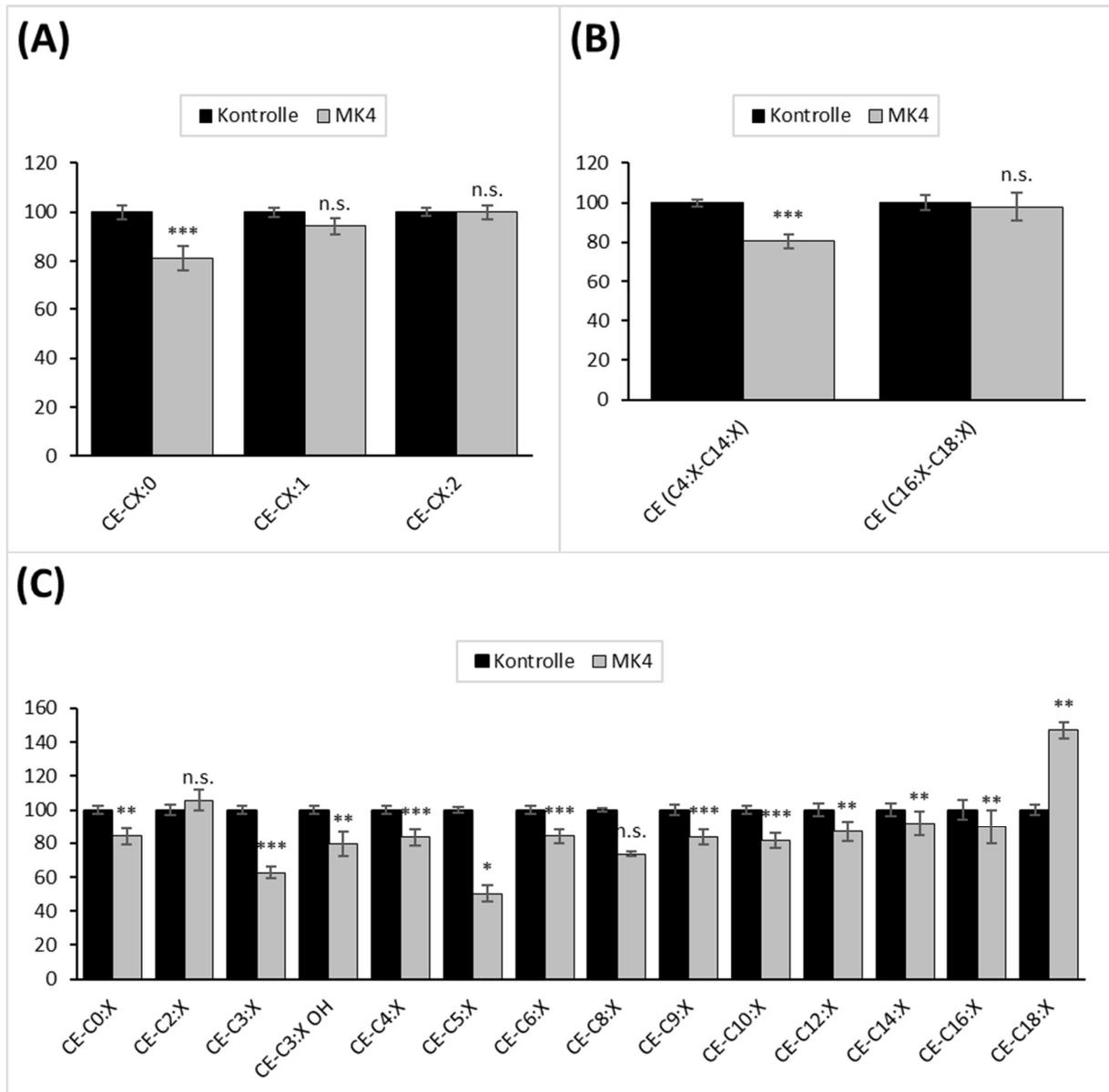
Zusammenfassend zeigte die Gruppe der Carnitinester eine Dominanz der Abnahme gegenüber der Kontrolle im Sinne eines Klasseneffektes. Es zeigte sich eine Abnahme insbesondere der ungesättigten und kurzkettigen Carnitinester. Eine vertiefende Einsicht der Datenauswertung wurde im Anhang hinterlegt und kann dort in Tabelle 31 eingesehen werden.



**Abbildung 14: Heatmap der Carnitinester (CE).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der CE unter Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies CE-C4:0.



**Abbildung 15: Lipidalteration der Carnitinerester (CE).** (A), (B), (C): Massenspektrometrisch detektierte Ver\u00e4nderung einzelner Lipidspezies der Carnitinerester nach einer 72-st\u00fcndigen Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 im Vergleich zu einer L\u00f6sungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse, die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Ver\u00e4nderung der mit MK4 inkubierten Proben gegen\u00fcber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repr\u00e4sentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils h\u00f6heren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschlie\u00dflich signifikant ver\u00e4nderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Ver\u00e4nderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fl\u00e4che der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der Carnitinerester-Gesamtmenge angibt. (C) zeigt dabei die in (A) und (B) nicht dargestellten Spezies. (D): Mittlere Ver\u00e4nderung aller analysierten Lipide. (E): Ver\u00e4nderung der Carnitinerester-Gesamtmenge. Schwarze S\u00e4ulen zeigen die Kontrolle, graue S\u00e4ulen die MK4. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert (p < 0,05 entspricht \* / p < 0,01 entspricht \*\* / p < 0,001 entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repr\u00e4sentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 16: Sättigung und Kettenlänge der Carnitiner (CE).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu$ M MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*, keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der Kettenlängsklassen (C): Analyse der einzelnen Kettenlängen.

#### 4.1.7 Analyse der Triacylglyceride

Triacylglyceride bilden eine Hauptspeicherform von Energie im menschlichen Organismus. Es handelt sich dabei um den dreiwertigen Alkohol Glycerin, welcher an allen drei Hydroxyfunktionen mit einer Fettsäure variabler Kettenlänge und Sättigung verestert ist. Im Falle des Energiebedarfs können freie Fettsäuren zur Energiegewinnung aus Triacylglyceriden gewonnen werden (Burdge & Calder, 2015). Eine ausführliche Analyse von chemischem Aufbau, Vorkommen und Funktion im Zentralnervensystem erfolgt in Kapitel 5.1.1.

Insgesamt wurden 39 Triacylglyceride analysiert, wovon acht Spezies eine Zunahme und 31 Spezies eine Abnahme zeigten. Signifikanz erreichten 20 Proben (entspricht 51 % aller analysierten Lipidspezies der Klasse). Bei allen signifikanten Effekten handelte es sich um Abnahmen gegenüber der Kontrolle.

Somit zeigte die Auswertung sowohl im mittleren Effekt mit 76,3 % ( $\pm 3,3$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 18C) als auch in der Triacylglyceridgesamtmenge mit 61,3 % ( $\pm 8,8$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 18D) einen Klasseneffekt. Ein höherer Gesamtmengeneffekt ist durch die deutliche Abnahme derjenigen Lipide bedingt, welche anteilmäßig in höherer Konzentration vorliegen.

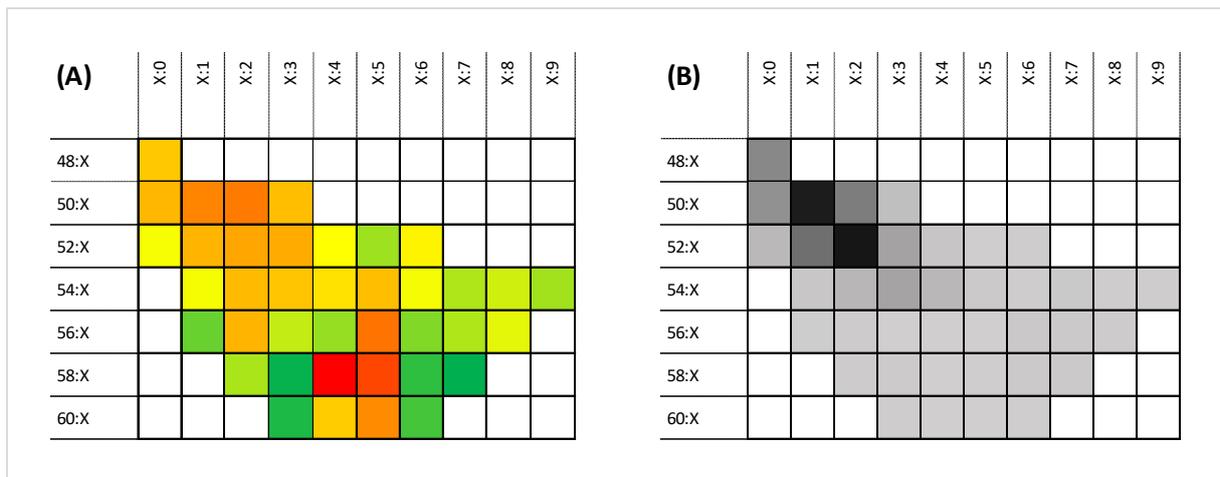
Die Lipidspezies TAG-C58:4 zeigte dabei mit 34,5 % bei sehr hoher Streuung ( $\pm 38,7$  %;  $p = 0,002$ ; Abbildung 18A-B) die höchste Abnahme. Eine signifikante Zunahme konnte hingegen nicht detektiert werden. Den höchsten Anteil (entspricht der Blasengröße in Abbildung 18B und höchsten Grünintensität in Abbildung 17B) verzeichneten dabei die Spezies TAG-C50:1 (18,8 %) und TAG-C52:2 (19,4 %).

Die Analyse der Sättigungsklassen zeigte signifikante Abnahmen sowohl der Gruppe der gesättigten (65,0 %;  $\pm 7,6$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19A), als auch der Gruppe der einfach (56,8 %;  $\pm 6,1$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19A) und mehrfach ungesättigten Triacylglyceride (77,6 %;  $\pm 7,7$  %;  $p = 0,008$  Abbildung 19A). Die vertiefende Analyse innerhalb der einzelnen Sättigungsgrade innerhalb der PUFA zeigte eine signifikante Abnahme der zwei- (58,3 %;  $\pm 9,4$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19B), drei- (64,7 %;  $\pm 10,4$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19B), vier- (69,5 %;  $\pm 10,5$  %;  $p = 0,002$ ; Abbildung 19B) und fünffach (62,3 %;  $\pm 6,6$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19B) ungesättigten Fettsäuren. Sechs- bis neunfach ungesättigte Spezies zeigten hingegen keine signifikante Änderung. Auf die begrenzte Aussagekraft der Sättigungsgrade in der Gruppe der TAG wird in 5.1.2 gesondert eingegangen.

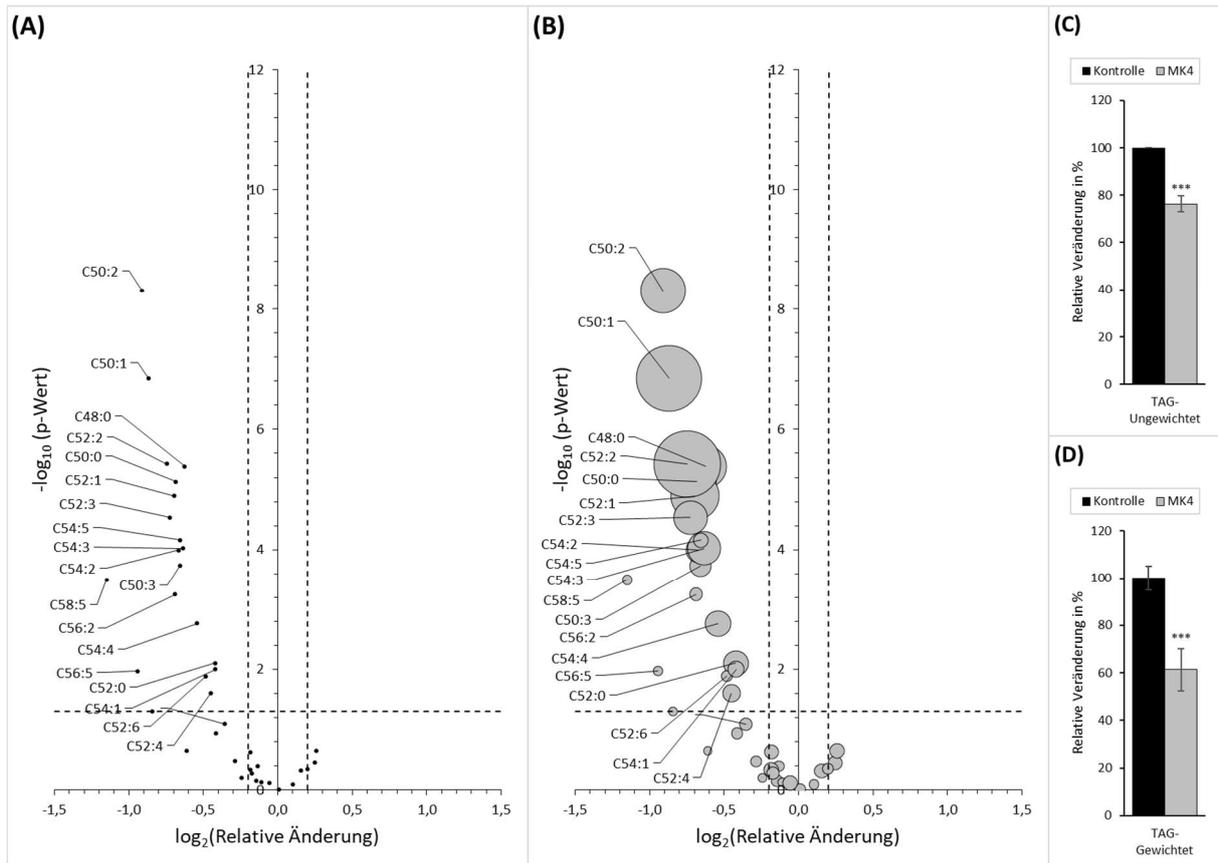
Eine Betrachtung der Kettenlängen erfolgte zum einen mittels Aufteilung in Kettenlängengruppen und zum anderen in einzelne Lipidlängen. Kurzkettige TAG wurden dabei als Acylseitenketten mit weniger als 48, mittelkettige zwischen 48 und 56 und langkettige mit mehr als 56 Kohlenstoffeinheiten definiert. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der mittelkettigen Triacylglyceride auf 60,2 % ( $\pm 9,0$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 19C), wohingegen die

Gruppe der langkettigen trotz Tendenz zur Abnahme keine Signifikanz erreichen konnte (Abbildung 19C). Innerhalb der mittelkettigen Triacylglyceride verzeichnete jede einzelne Kettenlänge eine signifikante Abnahme (siehe Abbildung 19D).

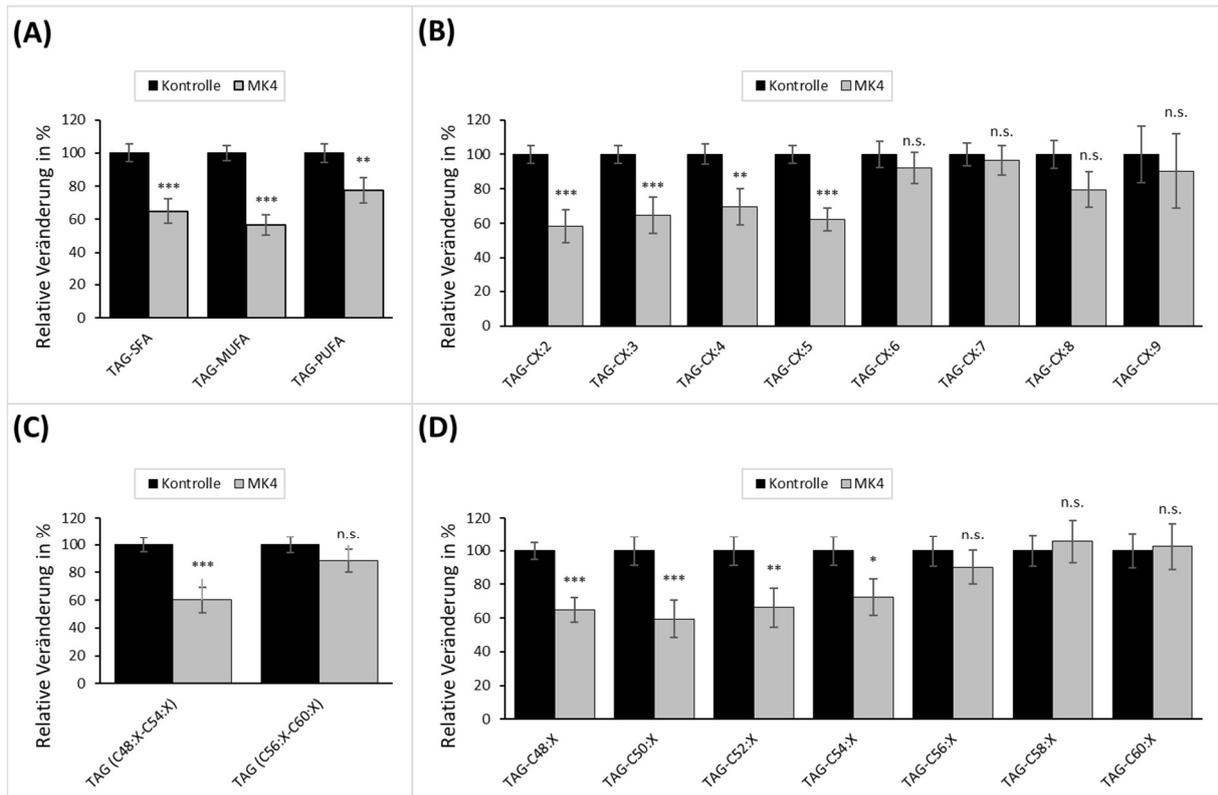
Zusammenfassend konnte in der Untersuchung der Gruppe der Triacylglyceride eine signifikante Abnahme in Form eines Klasseneffektes beobachtet werden. Insbesondere kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Abnahme der ungesättigten, sowie der ein- bis fünffach ungesättigten Fettsäuren und einer Abnahme aller mittelkettigen Triacylglyceride.



**Abbildung 17: Heatmap der Triacylglyceride (TAG).** Farbliche Darstellung der relativen Veränderung und der Lipidgewichtung aller analysierten Lipidspezies der TAG unter Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  MK4 für 72h in SH-SY5Y-Zellen. Eine Spalte beinhaltet jeweils alle Lipide mit der gleichen Sättigung (X:0, X:1, ...), eine Zeile mit jeweils der gleichen Kettenlänge (20:X, 24:X, ...). Lipide mit einem weißen Feld wurden nicht untersucht. (A): Relative Änderung der MK4-Proben gegenüber der Ethanolkontrolle. Die Zunahme einer Lipidspezies ist grün, die Abnahme rot, und keine Änderung gegenüber der Kontrolle gelb codiert. Die Farbintensität korreliert dabei positiv (rot und grün) bzw. negativ (gelb) mit der relativen Abweichung. (B): Relativer Anteil der Lipidspezies unter Inkubation mit MK4. Der relative Anteil einer Lipidspezies wird in Form einer Grau-Schwarz-Farbskala dargestellt. Der Anteil einer Spezies korreliert dabei mit der Intensität der Schwarzfärbung. Den höchsten Anteil besitzt die Spezies TAG-C50:1 und TAG-C52:1.



**Abbildung 18: Lipidalterationen der Triacylglyceride (TAG).** (A) und (B): Massenspektrometrisch detektierte Veränderung einzelner Lipidspezies der Triacylglyceride nach einer 72-stündigen Inkubation mit 100 µM MK4 im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle in einem Volcano-Plot. Dabei bildet die Abszisse, die zur Basis 2 logarithmierte prozentuale Veränderung der mit MK4 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle. Die Ordinate zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des - mittels Student-t-Test ermittelten - p-Wertes zwischen Inkubations- und Kontrollproben. Die horizontal gepunktete Linie repräsentiert die Signifikanzgrenze von 0,05 und die 2 vertikal gepunkteten Linien den jeweils höheren Mittelwert aller relativen Standardfehler des Mittelwertes von Probe oder Kontrolle. Es sind ausschließlich signifikant veränderte Lipide beschriftet. Auf der linken Seite (A) sind die Veränderungen als reine Datenpunkte, auf der rechten Seite (B) als Blasen dargestellt, wobei die Fläche der Blase den Anteil des jeweiligen Lipids an der Triacylglycerid-Gesamtmenge angibt. (C): Mittlere Veränderung aller analysierten Lipide. (D): Veränderung der Triacylglycerid-Gesamtmenge. Schwarze Säulen zeigen MK4, graue Säulen die Kontrolle. Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*). Die Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes.



**Abbildung 19 Sättigung und Kettenlänge der Triacylglyceride (TAG).** Darstellung der massenspektrometrisch detektierten relativen Veränderung der für 72 h mit 100  $\mu$ M MK4 inkubierten Proben (graue Säulen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säulen) in Säulendiagrammen. Die Analyse bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome der Acylseitenketten sowie die Anzahl der Doppelbindungen und sind den Diagrammen zu entnehmen, ein variabler Zahlenwert wird mit „X“ gekennzeichnet. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, Sterne über einer Säule bezeichnen eine im Student-t-Test signifikante Veränderung ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*, keine Signifikanz entspricht „n.s.“). (A): Analyse der Sättigungsklassen. (B): Analyse der einzelnen Sättigungsgrade innerhalb der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (C): Analyse der Kettenlängenklassen. (D): Analyse der einzelnen Kettenlängen.

Eine vertiefende Einsicht findet sich neben den hier erläuterten Ergebnissen in Tabelle 32 im Anhang.

## 4.2 Einfluss des MK4 auf die APP-Prozessierung

Neben der Analyse des Einflusses auf das neuronale Lipidprofil der Membran- und Energielipide stellte die Modulierung der APP-Prozessierung durch Vitamin K2 die dritte zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar. Es erfolgte dafür Untersuchungen der Enzymkinetik APP-prozessierender Proteine mittels Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie und Genexpressionsanalyse durch PCR. Der Fokus der Untersuchung wurde dabei im Kontext der nicht-amyloidogenen Prozessierung auf die der  $\alpha$ -Sekretase und im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung auf die  $\beta$ -Sekretase gelegt. Alle Experimente erfolgten unter einer Inkubation mit 100  $\mu$ M MK4 für 72 h in SH-SY5Y-Zellen vom Wildtyp.

### 4.2.1 Etablierung eines Haushaltsgens

Die Rolle der fettlöslichen Vitamine als Transkriptionsfaktoren beziehungsweise Regulatoren der Genexpression ist in der Literatur hinreichend bekannt (Azzi et al., 2004; Carlberg, 1999). Auch Vitamin K wurde als Transkriptionsfaktor diskutiert (Hirota & Suhara, 2019). Auf Basis dieser Erkenntnis erfolgte in dieser Arbeit eine Analyse des Expressionsniveaus der APP prozessierenden Sekretasen. Zur Überprüfung des Expressionsniveaus mittels  $\Delta\Delta$ CT-Methode bedurfte es initial der Ermittlung eines MK4-unabhängigen Referenzgens (*housekeeping-gene*). Es wurden dafür die Stabilität der Gene *POLR2F*, *HPRT*, *RPL13A*, *ACTB* und *RN18S1* in der Probe gegen die Kontrolle untersucht und verglichen (Methodik siehe Kapitel 3.2.2.1.) Die Stabilitätsanalyse erfolgte durch Überprüfung der Varianz der HKG sowohl innerhalb (genannt Intravarianz) als auch zwischen Probe und Kontrolle (auch genannt Intervarianz) mittels *Normfinder*-Software in Microsoft Excel. Die Stabilität des Genes wurde in Form des Stabilitätswertes (englisch: *stability value*) angegeben, welcher in Tabelle 25 eingesehen werden kann. Es wurde im Vorhinein ein Stabilitätswert  $<0,37$  als robust definiert. Es zeigten vier der fünf untersuchten Gene eine Stabilität unterhalb des geforderten Grenzwertes. Als robustestes Gen zeigte sich dabei *HPRT1* (Stabilitätswert 0,041), welches in der folgenden Expressionsanalyse folglich als Referenzgen verwendet wurde.

**Tabelle 25: Auswertung der *Normfinder*-Software.** Alle Referenzgene bis auf *POLR2F* zeigen einen Stabilitätswert unterhalb der Ausschlussgrenze von 0,37 und eignen sich folglich als Referenzgene für die semiquantitative Analyse des Expressionsniveaus mittels  $\Delta\Delta$ CT-Methode.

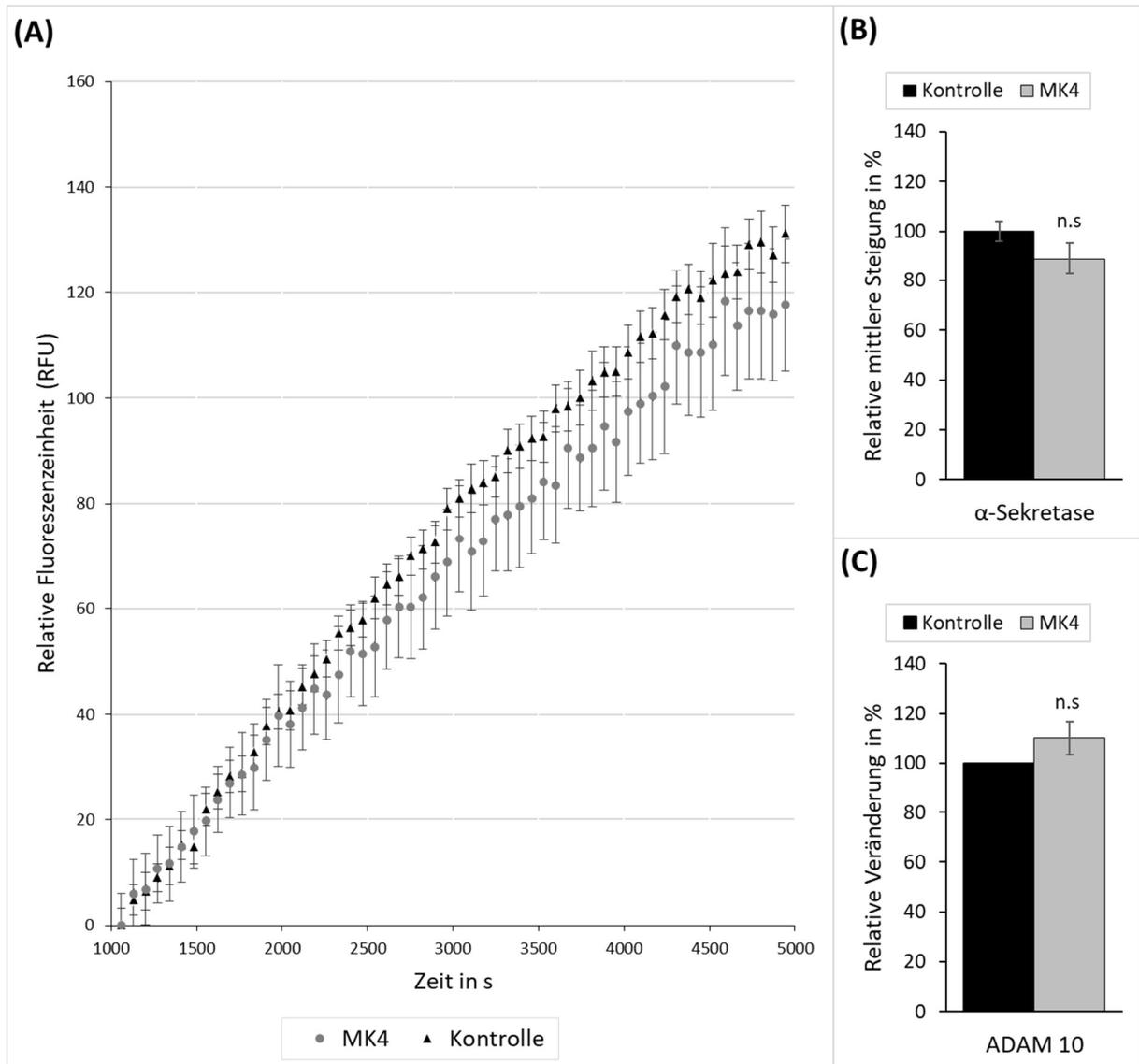
Gen	Stabilitätswert
<i>HPRT</i>	0,041
<i>RPL13A</i>	0,044
<i>ACTB</i>	0,05
<i>RN18S1</i>	0,091
<i>POLR2F</i>	0,564

#### 4.2.2 Einfluss des MK4 auf die $\alpha$ -Sekretase

Im Rahmen der nicht-amyloidogenen Prozessierung katalysiert die  $\alpha$ -Sekretase die Hydrolyse des APP in sAPP $\alpha$  und  $\alpha$ CTF (siehe Kapitel 2.1.2.2). Es sollte die Frage beantwortet werden, welchen direkten Einfluss MK4 auf die Enzymaktivität dieser Sekretase ausübt. Es erfolgte dafür initial eine Analyse der Enzymkinetik im linearen Bereich mittels Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie (Methodik siehe Kapitel 3.2.3.3). Es erfolgte eine Messung mit insgesamt sieben Proben und zwölf Kontrollen. Der gemittelte Kurvenverlauf der Probe und Lösungsmittelkontrolle kann in Abbildung 20A eingesehen werden. Die Ermittlung des linearen Bereiches der Enzymkinetik wurde mittels Korrelationskoeffizient zwischen dem Mittelwert aller mit MK4 inkubierten Proben beziehungsweise der Kontrollen gegen die Zeit gebildet. Mit einer Korrelation von 0,996 für MK4 und 0,994 für die Ethanolkontrollen kann Linearität angenommen werden. Es zeigte sich eine gemittelte absolute Steigung der MK4-Proben von 0,0303 RFU/s ( $\pm 0,005$  RFU/s) im Vergleich zu 0,034 RFU/s ( $\pm 0,001$  RFU/s) der Ethanolkontrolle. In Analogie dazu zeigte nach Normierung der Kontrolle auf 100% die unter MK4-inkubierten Proben eine statistisch nicht signifikante gemittelte Abnahme der Steigung auf 89,0 % ( $\pm 6,2$  %;  $p = 0,135$ ; Abbildung 20B) gegenüber der Kontrolle.

Im Anschluss daran wurde eine Expressionsanalyse des Gens *ADAM10* mittels PCR durchgeführt. Das von *ADAM10* kodierte Protein bildet den Hauptteil der enzymatischen Aktivität als  $\alpha$ -Sekretase im Zentralnervensystem (siehe auch Kapitel 2.1.2.2). Die Expression wurde in sechs Inkubationsproben gegen sechs Lösungsmittelkontrollen analysiert. Als housekeeping-gene fungierte *HPRT1* (siehe Kapitel 4.2.1). Im Rahmen der Kontrolle der Schmelzkurven wurden keine Probenanomalie entdeckt und somit alle Daten in der anschließenden Analyse miteinbezogen. Es zeigte sich auf Basis der  $\Delta\Delta$ CT-Methode ein statistisch nicht signifikanter Anstieg von *ADAM10* auf 110,2 % ( $\pm 6,7$  %;  $p = 0,158$ ; Abbildung 20C) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Zusammenfassend zeigte sowohl die Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase als auch das Expressionsniveau von *ADAM10* in SH-SY5Y-Zellen (Wildtyp) nach Inkubation mit MK4 für 72 h keine signifikanten Änderungen gegenüber der Kontrolle.



**Abbildung 20: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase.** (A): Graphische Darstellung der mittleren relativen Fluoreszenz aller mit MK4 inkubierten Proben (graue Punkte) gegenüber der Kontrolle (schwarze Dreiecke) im Zeitverlauf. Die Fehlerindikatoren der einzelnen Datenpunkte repräsentieren den Standardfehler des gemittelten Messpunktes. Es wird ausschließlich der lineare Abschnitt der Enzymkinetik dargestellt und die Fluoreszenz zum Darstellungsbeginn genullt. (B): Graphische Darstellung der gemittelten Steigung der mit MK4 inkubierten Proben (graue Säule) in Prozent der Kontrolle (schwarze Säule). Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes, „n.s.“ symbolisiert fehlende Signifikanz im Student-t-Test. (C): Graphische Darstellung der relativen Zunahme des Expressionslevel von *ADAM10* nach Inkubation mit MK4 (graue Säule) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säule). Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler dar, Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\* / Keine Signifikanz entspricht „n.s.“).

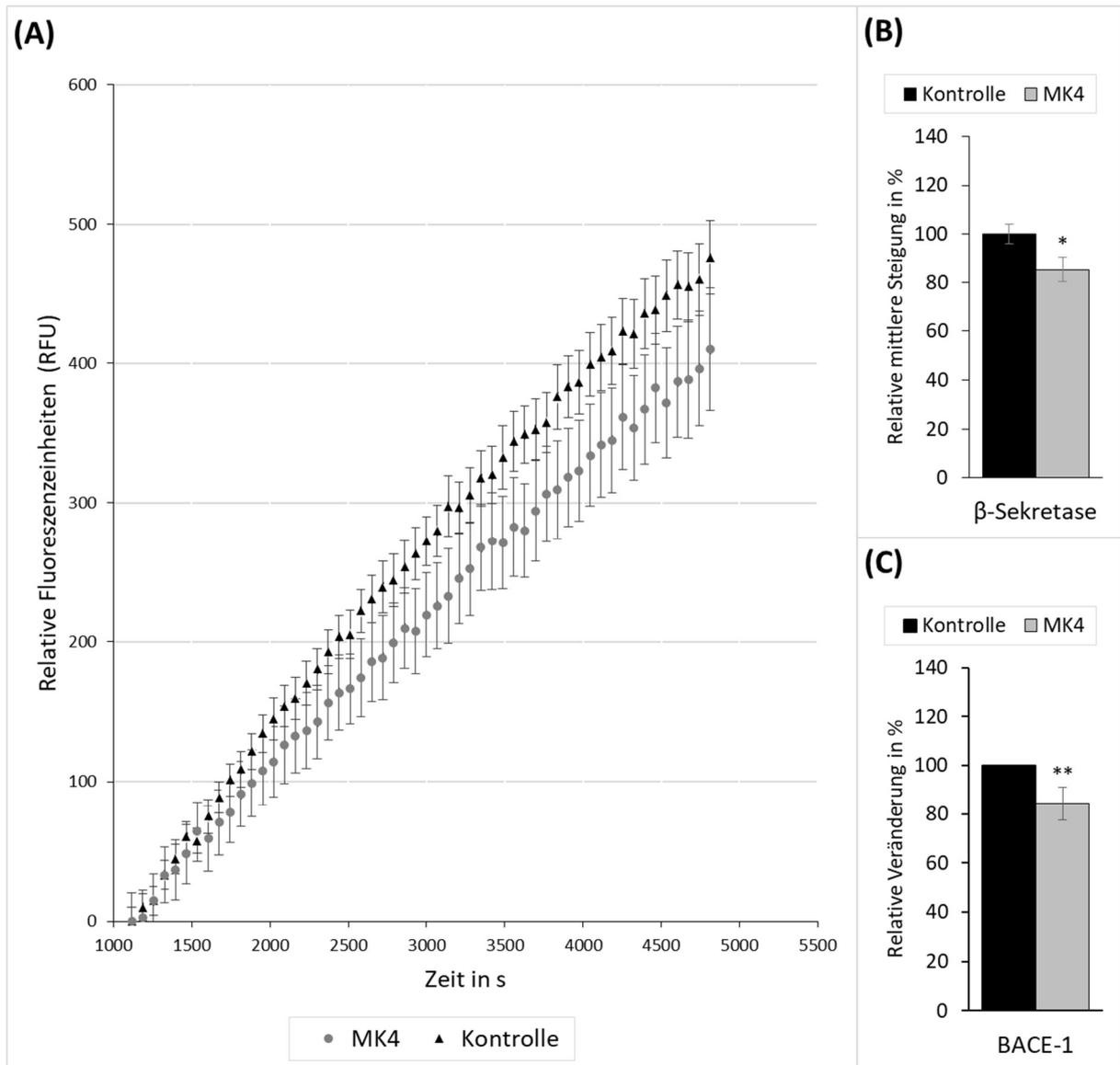
### 4.2.3 Einfluss des MK4 auf die $\beta$ -Sekretase

Die  $\beta$ -Sekretase ist ein Enzym, welches in Kombination mit der  $\gamma$ -Sekretase für die Generierung von A $\beta$  im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung des APP im Zentralnervensystem verantwortlich ist. Dabei katalysiert die  $\beta$ -Sekretase die Hydrolyse des APP in sAPP $\beta$  und  $\beta$ CTF (siehe dazu auch Kapitel 2.1.2.2). In Analogie zur  $\alpha$ -Sekretase sollte der Einfluss des MK4 auf die  $\beta$ -Sekretase analysiert werden. Dafür wurde initial eine Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie zur Beurteilung der Enzymkinetik im linearen Bereich durchgeführt. Es erfolgten insgesamt zwei unabhängige Messdurchläufe. Die Analyse der Messungen wurde in Abbildung 21 und 22 grafisch aufgearbeitet. Im ersten Durchlauf wurden sieben Proben gegen elf Kontrollen dem Fluoreszenzspektrometer zugeführt. Nach Ausschluss einer Probe (überhalb des 1,5fachen Standardabweichung) und einer Lösungsmittelkontrolle erfolgte die Bestimmung des linearen Bereiches über die Berechnung des Korrelationskoeffizienten. Mit einer Korrelation  $> 0,95$  sowohl für MK4- ( $r = 0,999$ ) als auch Ethanolproben ( $r = 0,997$ ) kann ein lineares Verhältnis angenommen werden. Es zeigte sich für die mit MK4 inkubierten Proben mit einer absoluten Steigung von  $0,109$  RFU/s ( $\pm 0,005$  RFU/s) eine geringere mittlere Steigung im Vergleich zur Kontrolle mit  $0,128$  RFU/s ( $\pm 0,007$  RFU/s). Unter einer Normierung der Ethanolkontrolle auf 100 % zeigte sich eine signifikante relative Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase auf  $85,3$  % ( $\pm 5,1$  %;  $p = 0,045$ ; Abbildung 21B). Im Rahmen der zweiten Untersuchung konnte dieser Effekt reproduziert werden. Es erfolgte die Auswertung von sechs Proben gegen elf Ethanolkontrollen. Auch hier zeigte im linearen Bereich der Enzymkinetik die mit MK4 inkubierten Proben mit einer mittleren absoluten Steigung von  $0,081$  RFU/s ( $\pm 0,001$  RFU/s) gegenüber der Ethanolkontrolle mit  $0,146$  RFU/s ( $\pm 0,003$  RFU/s) eine statistisch signifikante Abnahme der Enzymaktivität ( $p < 0,001$ ). Unter Normierung der Ethanolkontrolle auf 100% entsprach die Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase gegenüber der Kontrolle im zweiten unabhängigen Durchlauf  $54,8$  % ( $\pm 12,22$  %;  $p < 0,001$ ; Abbildung 22B).

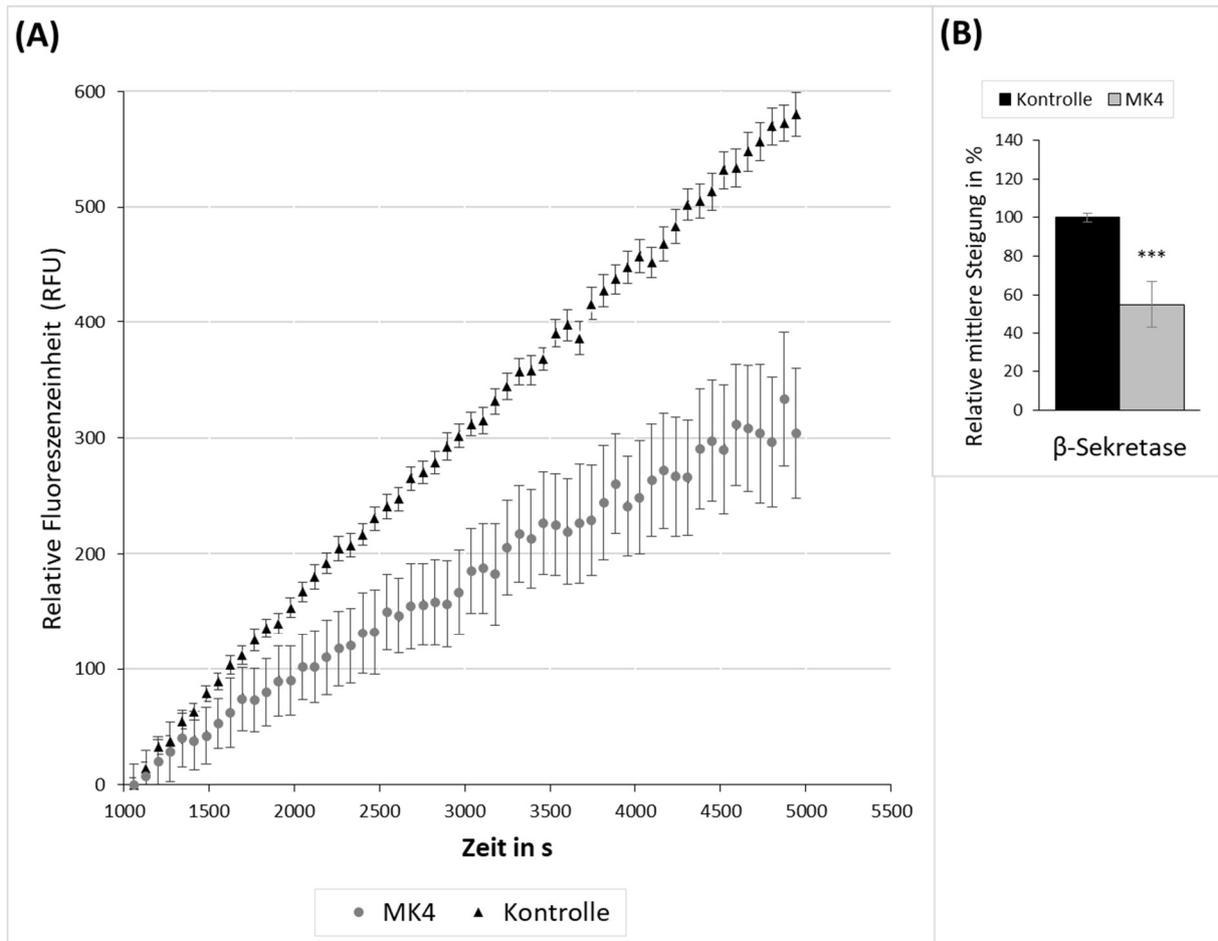
Zur Abklärung dieser signifikanten Minderung der Enzymaktivität erfolgte im Anschluss eine Expressionsanalyse des Gens *BACE-1*. Das durch dieses Gen kodierte Protein bildet den Hauptteil der amyloidogenen Prozessierung in Form der  $\beta$ -Sekretase (siehe Kapitel 2.1.2.2). Als *housekeeping-gene* wurde *HPRT1* (siehe Kapitel 4.2.1) verwendet. Es wurden insgesamt das Expressionslevel in zwölf Inkubationsproben gegen zwölf Lösungsmittelkontrollen verglichen. Nach Auswertung mittels  $\Delta\Delta$ CT-Methode zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme des Expressionsniveaus von *BACE-1* auf  $84,3$  % ( $\pm 5,3$  %;  $p = 0,008$ ; Abbildung 21C).

Zusammenfassend zeigt die durchgeführte Untersuchung einer 72h andauernden Inkubation mit MK4 eine starke Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase in der Echtzeit-

Fluoreszenzspektrometrie in vitalen SH-SY5Y-Zellen (Wildtyp). Außerdem zeigte sich eine signifikante Abnahme des Expressionsniveaus von *BACE-1* unter identischen Bedingungen.



**Abbildung 21: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase (Messung 1).** (A): Graphische Darstellung der mittleren relativen Fluoreszenz aller mit MK4 inkubierten Proben (graue Punkte) gegenüber der Kontrolle (schwarze Dreiecke) im Zeitverlauf. Die Fehlerindikatoren der einzelnen Datenpunkte repräsentieren den Standardfehler des gemittelten Messpunktes. Es wird ausschließlich der lineare Abschnitt der Enzymkinetik dargestellt und die Fluoreszenz zum Darstellungsbeginn genullt. (B): Graphische Darstellung der gemittelten Steigung der mit MK4 inkubierten Proben (graue Säule) in Prozent der Kontrolle (schwarze Säule). Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (C): Graphische Darstellung der relativen Zunahme des Expressionslevel von *BACE-1* nach Inkubation mit MK4 (graue Säule) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Säule). Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler dar, Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\* / Keine Signifikanz entspricht „n.s.“).



**Abbildung 22: Einfluss des MK4 auf die Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase (Messung 2).** (A): Graphische Darstellung der mittleren relativen Fluoreszenz aller mit MK4 inkubierten Proben (graue Punkte) gegenüber der Kontrolle (schwarze Dreiecke) im Zeitverlauf. Die Fehlerindikatoren der einzelnen Datenpunkte repräsentieren den Standardfehler des gemittelten Messpunktes. Es wird ausschließlich der lineare Abschnitt der Enzymkinetik dargestellt und die Fluoreszenz zum Darstellungsbeginn genullt. (B): Graphische Darstellung der gemittelten Steigung der mit MK4 inkubierten Proben (graue Säule) in Prozent der Kontrolle (schwarze Säule). Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler dar, Statistische Signifikanz wird in Form eines Sterns symbolisiert ( $p < 0,05$  entspricht \* /  $p < 0,01$  entspricht \*\* /  $p < 0,001$  entspricht \*\*\* / Keine Signifikanz entspricht „n.s.“).

## 5 Diskussion

Die Rolle des Vitamin K und insbesondere des Vitamers MK4 geht weit über die Funktion in der Blutgerinnung hinaus. Seit seiner initialen Entdeckung im letzten Jahrhundert erweiterte sich das Verständnis über die vielfältige Funktionsweise des Vitamin K. Insbesondere die Relevanz des MK4 in physiologischen Prozessen des Zentralnervensystems gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb folgende drei Fragen beantwortet werden: Zum ersten sollte der mögliche Einfluss des MK4 auf die Lipidhomöostase der Zellmembran und des Energiemetabolismus in humanen neuronalen Zellen analysiert werden. Dafür erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung der SH-SY5Y-Zelllinie unter 72-stündiger Inkubation mit MK4. Zum anderen sollte der Frage einer möglichen Beeinflussung des MK4 auf die A $\beta$ -Prozessierung nachgegangen werden. Neben Genexpressionsanalysen mittels qPCR erfolgte eine Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie A $\beta$ -prozessierender Sekretasen unter Inkubation mit MK4 in SH-SY5Y-Zellen. Bezüglich der ersten zwei Zielsetzung zeigte die systematische Auswertung dieser Arbeit statistisch signifikante Alterationen mehrerer Lipidspezies innerhalb der Phospholipide (insbesondere eine Zunahme der PUFA und der kürzeren gesättigten Fettsäuren) und Klasseneffekte innerhalb der Lipide des Energiemetabolismus. Bezüglich der dritten Fragestellung konnten die durchgeführten Untersuchungen eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase und des Expressionsniveaus von BACE-1 nachweisen, während eine Inkubation mit MK4 keinen signifikanten Effekt auf die enzymatische Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase ausüben konnte.

Es sollen im Folgenden die gesammelten Ergebnisse in den bereits bestehenden Wissenskontext eingebettet und ihre Bedeutung und Plausibilität kritisch diskutiert werden. In Kapitel 5.1 werden bekannten Zusammenhänge zwischen MK4 und dem Lipidmetabolismus besprochen. Im Anschluss werden in Kapitel 5.2 die nachgewiesenen Lipidalterationen im Kontext der Alzheimerdemenz beleuchtet und deren möglicher Einfluss auf die Pathogenese kritisch diskutiert. Daraufhin wird in Kapitel 5.3 die beobachteten direkten Effekte des MK4 auf die A $\beta$ -Prozessierung im Kontext der aktuellen Studienlage eingeordnet. Zuletzt erfolgt in Kapitel 5.4 ein allgemeiner Ausblick auf bereits bekannte Zusammenhänge zwischen Vitamin K2 und neurodegenerativen Erkrankungen am Beispiel des Morbus Parkinson, sowie der präventive Nutzen eines ausreichenden Vitamin K2-Spiegels auf Kognition und weitere Pathologien.

### 5.1 MK4 im Kontext der Lipidhomöostase

Die große funktionelle Vielfalt der Lipide ist neben dem strukturellen Unterschied der Lipidklassen untereinander auch durch die Konfiguration der Fettsäuren, regionale Polarisierung oder Glykosylierung bedingt (Burdge & Calder, 2015). Zwei wichtige Funktionen

der Lipide umfassen die Bildung von biologischen Doppelmembranen und die Energiespeicherung in Form der TAG (Fahy et al., 2011). Beide Aspekte wurden bereits in Kapitel 2.2.2 einführend beleuchtet. Eine Alteration der Fettsäureverteilung innerhalb der Zellmembran beeinflusst durch veränderte physikochemische Eigenschaften und dadurch in letzter Konsequenz die allgemeine Zellphysiologie (Brenner, 1984; Calder et al., 1994; D. C. Mitchell et al., 2003; Murphy & Byczko, 1990; Stubbs & Smith, 1984).

Auch Vitamin K2 beeinflusst über vielfältige Mechanismen physiologische und biochemische Prozesse (diese wurden ebenfalls einleitend in Kapitel 2.3.3 besprochen). Inzwischen sind 17 VKDP bekannt, die vielfältigen Funktionen in Signaltransduktion, Knochenhomöostase und vaskulären Kalzifizierungsprozessen ausüben (Xiao et al., 2020). Neben den Gla-Proteinen verdichtet sich die Datenlage über direkte, VKDP-unabhängige Funktionen des Vitamin K2. (J. Li et al., 2003; Nakajima et al., 1993; Shandilya et al., 2021).

Diese Vielfältigkeit der VKDP-unabhängigen Wirkmechanismen des MK4 eröffnen die Frage nach weiteren unbekanntem Effekten, insbesondere auf den Lipidstoffwechsel. Da neuronale Zellen (und somit auch SH-SY5Y-Zellen) keine Aktivität der GGCX und VKOR zeigen (J. Li et al., 2003), können die beobachteten Effekte dieser Arbeit als VKDP-unabhängig interpretiert werden. Im Folgenden werden mögliche Zusammenhänge des Vitamin K2 auf die beobachteten Lipidalterationen auf Basis aktueller Erkenntnisse aufgezeigt und mögliche Interaktionsmechanismen diskutiert. Es erfolgt dabei eine getrennte Betrachtung zwischen Lipiden des Energiemetabolismus (Carnitinester und Triacylglyceride) und membranbildenden Lipiden (Phospholipide, Sphingolipide).

### **5.1.1 MK4 und Lipide des Energiemetabolismus**

Bereits seit längerem wird ein Einfluss des Vitamin K auf den Energiemetabolismus, insbesondere im klinischen Kontext des Diabetes mellitus Typ II und Übergewicht diskutiert (Dash & Al Bataineh, 2021; Popa et al., 2021; Ravera et al., 2021). Erst kürzlich untersuchte eine in vivo Studie den Einfluss des Vitamin K2 auf Lebensspanne und Fettsäuremetabolismus des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Kurz: *C. elegans*). Die Färbung der Würmer mit dem Farbstoff Ölrot-O zeigte eine verminderte Konzentration an Triacylglyceriden in den mit Vitamin K2 behandelten Würmer. Die Untersuchung der Würmer mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (engl. *RNA sequencing*, RNA-Seq) deutete auf eine Einflussnahme des Vitamin K2 auf Peroxisomen und den Fettsäuremetabolismus hin (Qu et al., 2022). Unter Anwesenheit von Vitamin K2 wurde die erhöhte Expression von 18 Peroxisomen-assoziierten Genen nachgewiesen, welche unter anderem eine Rolle in oxidativer Stressresistenz und peroxisomaler  $\beta$ -Oxidation einnehmen. Es handelt sich bei Peroxisomen um Organellen in nahezu allen eukaryontischen Zellen (Honsho et al., 2020). Innerhalb der umgebenden Zellmembran der Peroxisomen befinden sich mehrere Oxidasen, die über ihre

enzymatische Aktivität in Kombination mit molekularem Sauerstoff das zytotoxische Wasserstoffperoxid generieren. Das schädliche Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase zu unschädlichem Wasser und Sauerstoff abgebaut (Okumoto et al., 2020). Somit schützen Peroxisomen vor oxidativen Stress. Darüber hinaus ermöglichen die Enzyme innerhalb der Peroxisomen die Teilnahme an den zellulären Prozessen, unter anderem der  $\beta$ -Oxidation, Synthese der Ether-Phospholipid-Plasmalogene und Synthese von DHA (Antonenkov et al., 2010; De Duve & Baudhuin, 1966; Schrader & Fahimi, 2006; Waterham et al., 2016). Im Speziellen werden langkettige Fettsäuren durch die  $\beta$ -Oxidation in Peroxisomen gekürzt und anschließend den Mitochondrien zum weiteren Abbau zugeführt (Okumoto et al., 2020; Van Veldhoven, 2010).

Neben der erhöhten Expression von Peroxisomen-assoziierten Genen zeigte sich im Rahmen der Arbeit ein Effekt des Vitamin K2 auf den Fettsäuremetabolismus. Es konnten 17 Vitamin K2-vermittelte Genexpressionserhöhungen mit Assoziation zum Fettsäureabbau und der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren nachgewiesen werden, insbesondere in der Fettsäure-Elongation, Desaturierung und Synthese von Acyl-CoA, welche in letzter Konsequenz mittels  $\beta$ -Oxidation abgebaut wird (Qu et al., 2022). In Analogie zeigte eine Studie in lebenden Zebrafischlarven (*Danio rerio*, *D. rerio*) unter Einfluss von Vitamin K2 eine Reduktion intrazellulärer neutraler Lipide nach Anfärbung mit dem Vitalfarbstoff Nilrot und anschließender Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie (N. G. Silva et al., 2024). Nach 48-stündiger Exposition von 21,1  $\mu$ M MK4 konnte dieser Befund ebenfalls in der massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine zur Kontrolle signifikante Abnahme insbesondere der Triacylglyceride (N. G. Silva et al., 2024). Auch im Rattenmodell (Sprague-Dawley-Ratten, *Rattus norvegicus*) zeigte die Fütterung mit einer MK4-Diät (600 mg/kg) gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der visceralen und subkutanen Fettgewebsmasse (analysiert mittels Kleintier-CT) sowie Reduktion der Triacylglyceride und des Cholesterins im Serum (Sogabe et al., 2011). Da Fettgewebe hauptsächlich aus Adipozyten besteht, welche Lipide in Form von TAG einlagern (Arner, 2018), deutete die Abnahme der Fettgewebsmasse in Analogie zum Serum auf eine generelle Abnahme der TAG in vivo hin. Trotz des phylogenetischen Abstand der untersuchten Organismen (*C. elegans*, *D. rerio* und *R. norvegicus*) und unterschiedlicher Methodik deuten die aktuellen Erkenntnisse in der Gesamtschau auf eine Reduktion der Triacylglyceride durch MK4 hin. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in menschlich abgeleiteten neuronalen Zellen in vitro repliziert werden, wodurch der Verdacht auf einen hoch konservierten TAG-senkenden Effekt des MK4 untermauert wird. Auch eine epidemiologische Studie, welche den Zusammenhang zwischen Vitamin K-Einnahme und metabolischem Syndrom untersuchte, deutet auf einen TAG-senkenden Effekt des MK4 hin. Sowohl im Längs- (Folgeuntersuchung nach 10 Jahren) als auch Querschnitt zeigte sich eine Assoziation zwischen hoher MK-

Einnahme in der Ernährung und erniedrigten Serum-TAG (V. Dam et al., 2015). Im Gegensatz zu den Erkenntnissen dieser Studie zeigte sich in HepG2-Zellen unter Inkubation von 30  $\mu\text{M}$  MK4 jedoch keine signifikante Änderung der mittels Dünnschichtchromatographie analysierten TAG (Kołakowski et al., 2021). Auf den Aufbau und die Deutung, sowie bedingte Vergleichbarkeit dieser Studie wird aufgrund der Relevanz im Kontext der Membranlipide in Kapitel 5.1.2.3 gesondert eingegangen.

Die in dieser Arbeit angewendete Methodik erlaubt keine Aussage über mechanistische Zusammenhänge. Im Kontext der beobachteten Effekte sollen insbesondere folgende Hypothese diskutiert werden: In Analogie zu *C. elegans* führt Vitamin K2 auf Transkriptionsebene in Neuronen zur Abnahme der Triacylglyceride. Die generierten Fettsäuren werden nach Elongation und Desaturierung den Peroxisomen zugeführt, in denen sie mittels  $\beta$ -Oxidation verstoffwechselt werden. Eine erhöhte Prozessierung der Fettsäuren über Peroxisomen bedingt eine verminderte Zuführung und Umsatz der aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrien mit konsekutiver Abnahme der transportierten Carnitinester. Im Rahmen des mitochondrialen Metabolismus entstehen -im Gegensatz zu Peroxisomen- reaktive Sauerstoffspezies (Angelova & Abramov, 2018). Eine verminderte metabolische Aktivität der Mitochondrien würde mit verringertem ROS-bedingtem Stress einhergehen. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten kann diese Hypothese nicht bewiesen werden, jedoch deutet die beobachtete Abnahme der Triacylglyceride auf eine vermehrte Energiegewinnung im Rahmen einer erhöhten  $\beta$ -Oxidation. Durch den Abfall der Carnitinester findet folglich ein verminderter Transport in die Mitochondrienmatrix statt. Durch eine vermehrte  $\beta$ -Oxidation innerhalb der Peroxisome ist die Abnahme der TAG bei gleichzeitig verminderten Carnitineestern ein denkbare -in der Literatur bereits in vivo beschriebenes- Szenario.

Dieser antioxidativ-wirkende Effekte des MK4 zeigte sich auch in einer weiteren Studie. In einem Model primärer Kulturen von Oligodendrozyten und unreifer kortikaler Neurone der Ratte, die durch Entzug von Glutathion mittels cysteinefreiem Medium gegen oxidativen Stress sensibilisiert wurden, zeigte die Zugabe von MK4 Schutz vor oxidativem Stress (J. Li et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die antioxidativen Effekte des MK4 nicht durch Wiederherstellung des Glutathions, sondern durch Verhinderung der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies vermittelt wurde (J. Li et al., 2003). In Analogie zu (Nakajima et al., 1993) zeigte die Zugabe von Warfarin keine Änderung des Vitamin K2-vermittelten Effektes, wodurch auf eine VKDP-unabhängige Wirkweise geschlossen werden kann. In einer weiteren Studie zeigte sich eine Streptozotocin- und Menadion-bedingte Abschwächung der ROS-Produktion und Erhaltung des mitochondrialen Membranpotentials nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Vitamin K2 in SH-SY5Y-Zellen (Shandilya et al., 2021). Die verminderte Detektion von ROS und der Erhalt des mitochondrialen Membranpotentials könnten ebenfalls im Rahmen einer erhöhten

Stressresistenz durch Peroxisome mit konsekutiver Entlastung der Mitochondrien erklärt werden. Auch in Tiermodellen wurde die Wechselwirkung zwischen Vitamin K2 und Mitochondrien bereits adressiert. In einer Studie mit einem transgenen Drosophila-Modell zeigten die Fliegen unter Gabe Vitamin K2 eine erhöhte Bildung von ATP, sowie eine vermehrte Expression der Hauptuntereinheit des mitochondrialen Komplex I (NDUFS3) (X. Lin et al., 2021). Die vermehrte ATP-Synthese in diesem Modell korrespondiert mit dem erhöhten Abbau der Fettsäuren aus den TAG in dieser Arbeit. Auch im Mausmodell zeigte eine Gabe von Vitamin K2 nach Anästhesie mittels Isofluran bei Mäusen eine Zunahme der ATP-Konzentration im Hypothalamus (Miao et al., 2018).

Zuletzt sei die Funktion des Vitamin K2 als möglicher Elektronentransporter in der Mitochondrienmembran genannt. Vitamin K2 ähnelt in seiner chemischen Struktur Coenzym Q10, einem Elektronentransporter in der Mitochondrienmembran. Die Funktion des Vitamin K2 als möglicher Elektronentransporter in Mitochondrien wird in der Literatur kontrovers diskutiert und ist nicht abschließend geklärt (Bernardini et al., 2021; Cerqua et al., 2019; Colpa-Boonstra & Slater, 1958; Vos et al., 2012). Das Modelldesign dieser Arbeit ermöglicht keine Aussagen über die Rolle des Vitamin K2 als Elektronentransporter.

## **5.1.2 MK4 und membranbildende Lipide**

### **5.1.2.1 MK4 und Diacyl-Phosphatidylcholine**

Diacyl-Phosphatidylcholinen (PCaa) werden der Gruppe der Phosphoglycerolipide zugeordnet, einem Sammelbegriff mehrerer Substratklassen, deren Gemeinsamkeit das Grundgerüst aus dem dreiwertigem Alkohol Glycerin und einer endständig veresterten Phosphorsäure darstellt. Im Falle der Diacyl-Phosphatidylcholine sind die beiden freien Hydroxylgruppen des Glycerins mit jeweils einer Fettsäure variabler Kettenlänge und Sättigung verestert, und die Phosphorsäure steht über eine zweite Esterbindung (in diesem Kontext auch *Diesterbindung* genannt) mit dem Aminoalkohol Cholin in Verbindung (Lordan et al., 2017). Die Kombination aus Phosphorsäure und polarem Verbindungspartner (Kopfgruppe), sind für die jeweiligen Untergruppen der Phosphoglycerolipide namensgebend. So existiert neben Phosphatidylcholinen die Klassen der Phosphatidylethanolamine (Kopfgruppe: Ethanolamin), Phosphatidylserine (Kopfgruppe: Serin), Phosphatidylinositole (Kopfgruppe: Inositol) und Phosphatidylglycerole (Kopfgruppe: Glycerin) (Burdge & Calder, 2015). Diacyl-Phosphatidylcholine bilden zusammen mit Phosphatidylethanolamin die Hauptkomponenten neuronaler Membranen. Im Gesunden beträgt ihr Anteil an den Gesamtlipiden in der grauen Substanz 25,1 % und in der weißen Substanz 11,8 % (Olsson et al., 1996).

Die Klasse der PCaa zeigte in der massenspektrometrischen Analyse nach 72stündiger Inkubation mit MK4 in SH-SY5Y-Zellen sowohl signifikante Zu- als auch Abnahmen mehrerer

Einzelpezies (siehe Kapitel 4.1.2). Insbesondere kam es unter Anwesenheit von MK4 zu einer Zunahme der kurzkettig gesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Der Gesamtgehalt gegenüber der Kontrolle bleibt hingegen unverändert, wodurch der Anteil an PCaa an der Zellmembran unter Inkubation mit MK4 keine Veränderung zeigt. Zum jetzigen Zeitpunkt wurde in der Literatur kein direkter Zusammenhang zwischen Vitamin K und dem Metabolismus der Diacyl-Phosphatidylcholine adressiert. Die Erkenntnisse dieser Arbeit ermöglicht somit erste Aussagen und Deutungen über den Einfluss des Vitamin K2 auf den Metabolismus der PCaa und den assoziierten Fettsäuren. Insbesondere soll in diesem Kontext die mögliche Alteration der DHA besprochen werden. Wie in Tabelle 1 besprochen bilden in absteigender Reihenfolge die Fettsäuren Stearin- (C18:0), Palmitin- (C16:0), Öl- (C18:1  $\omega$ -9), Docosahexaen- (C22:6  $\omega$ -3) und Arachidonsäure (C20:4  $\omega$ -6) den größten Anteil an Fettsäuren im Zentralnervensystem. Im Rahmen der Auswertung zeigte sich eine Zunahme aller sechsfach ungesättigten Fettsäuren (PCaa 36:6 / 38:6 / 40:6 / 42:6, Abbildung 2A). Ein Diacyl-Phosphatidylcholin mit Palmitinsäure als erste und DHA als zweite Fettsäure ergäbe neben weiteren Kombinationsmöglichkeiten die Spezies PCaa-C38:6. In Analogie dazu kann es sich bei der Spezies PCaa-C40:6 um die Kombination aus Stearinsäure und DHA handeln, womit die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Zunahme von DHA in den PCaa deuten. Es sei in diesem Kontext zusätzlich die Biosynthese der DHA erwähnt, die unter anderem in Peroxisomen stattfindet (Okumoto et al., 2020). Wie bereits in Kapitel 5.1.1 erwähnt, steigert Vitamin K2 in *C. elegans* die Aktivität der Peroxisome auf der Ebene der Transkription (Qu et al., 2022). Dieser Zusammenhang könnte die relative Zunahme von DHA erklären und den Zusammenhang zwischen Vitamin K2 und Peroxisomen weiter festigen.

### 5.1.2.2 MK4 und Phosphatidylcholin-Plasmalogene

Phosphatidyl-Plasmalogene (PCae) gehören der Gruppe der Ether-Phospholipide, einer Untergruppe der Phosphoglycerolipide, an. Der chemische Aufbau entspricht grundsätzlich den den der Phosphatidylcholine (siehe Kapitel 5.1.2.1), jedoch befindet sich an der sn-1 Position eine Alkylseitenkette (statt Acylseitenkette), welche über eine Vinyletherbindung (statt Esterbindung) mit dem Glycerin in Verbindung steht (Bozelli & Epan, 2021). Neben Cholin können Vinylether-Phospholipide mit Ethanolamin als Kopfgruppe vorgefunden werden (Phosphatidylethanolamin-Plasmalogene). Häufig handelt es sich bei den bindenden Acylseitenketten an der sn-2 Position um mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Nagan & Zoeller, 2001; Udagawa & Hino, 2022). Mit bis zu 20 % aller Phospholipide bilden Plasmalogene einen wichtigen Bestandteil membranbildender Lipide (Gu et al., 2022). Besonders hohe Anreicherung findet sich innerhalb des Herzens, Gehirns und Immunzellen (Braverman & Moser, 2012; Leßig & Fuchs, 2009). Insbesondere finden sich Plasmalogene in spezialisierten Membranen wie dem Sarkolemm der Muskelzellen, der Myelinmembran und synaptischen Vesikeln (Poitelon et al., 2020; Post et al., 1988; Takamori et al., 2006).

In Analogie zu den Diacyl-Phosphatidylcholinen wird in dieser Arbeit erstmals der Zusammenhang zwischen MK4 und der Homöostase der Phosphatidylcholin-Plasmalogene im Zellkulturmodell beschrieben. Nach Inkubation mit MK4 konnte keine Alteration der PCae im Sinne eines Klasseneffektes beobachtet werden, wodurch der relative Anteil in der Neuronenmembran nicht beeinflusst wird (siehe Kapitel 4.1.3). Dies zeigt sich insbesondere an der Hauptspezies PCae-C34:1, welche keine signifikante Änderung aufwies. Die Abnahme der Spezies PCae-C36:2 deutet auf eine Verminderung der Ölsäure (C18:1) hin. In Analogie zur Klasse der PCaa zeigen sich auch in der Gruppe der Plasmalogene eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren, hauptsächlich durch die signifikante Zunahme der anteilmäßig dominierenden Spezies PCae-C32:0, wobei es sich empirisch um zwei Palmitinsäuren handelt, sowie der kurzkettigen Fettsäuren (siehe Kapitel 4.1.3). Auch Mitglieder der Gruppe der sechsfach-ungesättigten Fettsäuren zeigten, wie bereits bei Diacyl-Phosphatidylcholinen, eine signifikante Zunahme, insbesondere die Spezies PCae-C38:6 und PCae-C40:6, bei welchen es sich um basierend auf der neuronalen Fettsäureverteilung empirisch um DHA in Kombination mit Palmitin und Stearinsäure handelt (siehe Kapitel 5.1.2.1). Schritte der Biosynthese der Plasmalogene erfolgen in Peroxisomen (Okumoto et al., 2020). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich keine Zunahme der Gesamt-Plasmalogene im Sinne einer erhöhten Synthese, jedoch lässt die deutliche Zunahme der sechsfach ungesättigten Fettsäuren als herausstechender Effekt eine Vermehrung von DHA vermuten. Ein fehlender Klasseneffekte deutet auf eine von Vitamin K2-unabhängige Biosynthese und Metabolismus der Phosphatidylcholin-Plasmalogene hin.

### 5.1.2.3 MK4 und lysierte Phosphatidylcholine

Lysierte Phosphatidylcholine (LPC) sind Produkte aus korrespondierenden Phosphatidylcholinen, deren mittelständige Acylseitenkette durch enzymatische Hydrolyse der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) abgespalten wurde (Gauster et al., 2005). Alternativ werden lysierte Phosphatidylcholine wie bereits besprochen durch den Transfer einer Acylseitenkette eines Phosphatidylcholins auf ein freies Cholesterinmolekül (das Produkt wird als Cholesterinester bezeichnet) durch das LCAT generiert (siehe Kapitel 4.1.4). Eine Überführung zurück in Diacyl-Phosphatidylcholine ist durch die enzymatische Aktivität der Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) in Anwesenheit eines Acyl-CoA-Moleküls möglich (L. Wang et al., 2012), wodurch sich die enge Verknüpfung zum Stoffwechsel der Diacyl-Phosphatidylcholine erklären lässt. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es in der Literatur keine Hinweise auf einen modulierenden Einfluss des Vitamin K auf den Metabolismus der lysierten Phosphatidylcholine, wodurch die Erkenntnisse dieser Arbeit erste Implikationen des Vitamin K2 auf lysierte Phosphatidylcholine in der Zellkultur erlauben. Wie auch bei Diacyl-Phosphatidylcholinen und Phosphatidylcholin-Plasmalogenen konnte kein Klasseneffekt, jedoch signifikante Alterationen einzelner Lipidspezies nachgewiesen werden (siehe Kapitel

4.1.4). Beachtenswert ist die signifikante Abnahme der Ölsäure (entspricht LysoPC-C18:1), eine Beobachtung, die sich mit den Erkenntnissen der PCae, jedoch nicht mit PCaa (dort wurde eine nicht signifikante Abnahme von 92,7% beobachtet), deckt und auf die allgemeine Abnahme der Ölsäure innerhalb der mit MK4-inkubierten Proben deutet. Es zeigte sich ferner eine Zunahme der Lipidspezies LPC-C22:6 und LPC-C20:4. Da in lysierten Phosphatidylcholinen lediglich eine Acylseitenkette vorhanden ist, muss es sich bei den Fettsäuren der detektierten Spezies um Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6) handeln. Diese Erkenntnisse verhärteten zusätzlich den Verdacht der Zunahme von DHA innerhalb der Klasse der Diacyl-Phosphatidylcholine und Phosphatidylcholin-Plasmalogenen in der gesamten Zelle. Wie bereits in xxx erwähnt stellt AA eine Vorläufersubstanz mehrerer proinflammatorischer Mediatoren dar. In einem in-vitro Experiment konnte eine verminderte Synthese an Prostaglandinen als einen dieser Mediatoren in humanen osteoblastenartige periostalen Zellen (engl. *osteoblast-like periosteal cells*) durch Vitamin K2 beobachtet werden (Koshihara et al., 1993). Eine verminderte Synthese an Prostaglandinen würde sich indirekt durch erhöhte AA in der Zellmembran äußern. Somit bestärkt diese Arbeit -wenn auch nur indirekt- einen möglich inflammationsmodulierenden Effekt des MK4 durch eine verminderte Synthese von Derivaten der Arachidonsäure. Als möglichen Mechanismus deutet die Literatur auf eine Inhibition der 12-Lipoxygenase durch Vitamin K2, welche durch Oxidation AA an der Synthese proinflammatorischer Mediatoren beteiligt ist (J. Li et al., 2009; Z. Zheng et al., 2020). Es bedarf weiterer Studien, um den definitiven Wirkmechanismus zu bestätigen und besser zu verstehen.

Eine bereits in 5.1.1 erwähnte Studie untersuchte in Analogie zu dieser Arbeit die Verteilung von AA und DHA unter Einfluss von MK4 in komplexen Lipiden (Kolakowski et al., 2021). Dort zeigte eine 16-stündige Inkubation mit 30  $\mu$ M MK4 in HepG2-Zellen in Übereinstimmung mit dieser Arbeit keine signifikante Zunahme der Gesamtkonzentration der Phospholipide. Die Messung erfolgte dabei mittels Dünnschichtchromatographie. Die Analyse verschiedener Fettsäuren innerhalb der Gruppe der Phospholipide (in der Studie wurde die genaue Subklasse an Phospholipiden nicht näher charakterisiert), Diacylglyceride (im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht) und Triacylglyceride zeigte bei Kolakowski eine Zunahme von Arachidonsäure gegenüber der Kontrolle in der Fraktion der Triacylglyceride. Auch DHA zeigte unter Inkubation mit MK4 eine Zunahme innerhalb der drei untersuchten Lipidfraktionen, Signifikanz wurde jedoch nur für Diacylglyceride und Triacylglyceride gezeigt. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden somit keine signifikante Zunahme an AA und DHA in der Gruppe der Phospholipide beobachtet. Diese Diskrepanz könnte durch methodische Unterschiede bedingt sein. Zum einen wurde die Klasse der untersuchten Phospholipide in genannter Studie nicht präzisiert, darüber hinaus wurde mit einer geringeren Konzentration (30  $\mu$ M) über einen

kürzeren Zeitraum (16 h gegenüber 72 h) mit einer anderen Zelllinie (HepG2 statt SH-SY5Y) inkubiert. Auch kann über die in der Studie beobachtete Zunahme von Arachidonsäure und Docosahexaensäure in der Fraktion der TAG in dem Modell dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden (Auf Basis von drei unabhängigen Fettsäuren ist eine sichere Aussage über die Komposition in den TAG mit hoher Unsicherheit verbunden).

#### 5.1.2.4 MK4 und Sphingomyeline

Es handelt sich bei Sphingomyelinen um eine Untergruppe der Sphingolipide (Hannun & Obeid, 2018). In Analogie zu den Phospholipiden sind Sphingolipide amphiphile Moleküle mit einer hydrophoben und hydrophilen Komponente. Allen Sphingolipiden gemeinsam ist der einfach ungesättigte Aminoalkohol Sphingosin, welcher über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verbunden ist. Diese Kombination aus Sphingosin und einer variablen Fettsäure bildet die zentrale Untergruppe der Ceramide. Alle weiteren Untergruppen der Sphingolipide werden im Rahmen ihrer Synthese aus Ceramiden gebildet. Die Ceramidstruktur bildet dabei die hydrophobe Komponente des Moleküls, verankert dieses in der Zellmembran und beeinflusst die physikalischen Eigenschaften wie Fluidität und Permeabilität (Denisova & Booth, 2005). Die Unterscheidung der verschiedenen Sphingolipid-Untergruppen erfolgt auf Basis der hydrophilen Kopfgruppe, welche über die Hydroxylfunktion des Sphingosins angebunden ist. Beinhaltet die Kopfgruppe eine Phosphocholin wird von Sphingomyelinen gesprochen, bei einem Zucker von Glykosphingolipide. Letztere lassen auf Basis der Zuckerstruktur weiterhin unterteilen in Ganglioside (Oligosaccharide), Cerebroside (Monohexosen) und Sulfatide (Sulfatgruppe am C3-Atom der Monohexose Glucose oder Galactose) (Shayman, 2000).

Das Gehirn ist besonders reich an Sphingolipiden, wobei die Zusammensetzung der Untergruppen sich auf anatomischer Ebene unterscheidet (Carrié et al., 2004; Giusto et al., 1992; Gornati et al., 2002). Auf zellulärer Ebene finden sich Sphingolipide insbesondere in der Myelin- und Neuronenmembran (Denisova, 1990; Denisova et al., 1991).

Bereits seit längerem ist ein modulierender Effekt des Vitamin K auf den Sphingolipidmetabolismus beschrieben. Schon 1958 wurde Vitamin K als zwingende Notwendigkeit für das bakterielle Wachstum des Bakterienstammes *Bacteroides melaninogenicus* (Synonym: *Fusiformis nigrescens*) identifiziert (Lev, 1958). Im Rahmen weiterer Untersuchungen zeigte sich ein obligater Bedarf an Vitamin K für die bakterielle Sphingolipidbiosynthese und folglich der Membranintegrität (Lev, 1968; Lev & Milford, 1971, 1972). Als zugrunde liegende Ursache dieser Beobachtung wurde im Rahmen weiterer Untersuchungen durch dieselbe Arbeitsgruppe die Induktion des Enzyms 3-Ketodihydrosphingosin-Synthase (3-KDS-Synthase, Synonym: Serin-Palmitoyl-Transferase) durch Vitamin K identifiziert, welches den ersten Schritt in der de novo-Synthese der

Sphingolipide darstellt (Lev & Milford, 1973). Diese Beobachtungen konnten im Mausmodell repliziert werden (Sundaram & Lev, 1988). Zusätzlich modulierte Vitamin K im Mausmodell den Metabolismus der Sulfatide (Sundaram & Lev, 1990). Diese werden aus Cerebrosiden durch das Enzym Sulfotransferase (Synonym: GalCer-Sulfotransferase) generiert und durch die Arylsulfatase wieder in Cerebroside überführt. Unter Gabe von Vitamin K konnte in den Mäusen die Stimulierung sowohl der Sulfotransferase als auch der Arylsulfatase festgestellt werden (Sundaram & Lev, 1990). Unter Applikation eines Vitamin K-Antagonisten zeigte sich hingegen eine Reduktion der Sulfatidkonzentration im Mäusegehirn (Sundaram et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Gruppe der Sphingomyeline als Vertreter der Sphingolipide untersucht. Es zeigte sich bis auf die Veränderung von drei Lipidspezies keine signifikanten Alterationen oder ein Klasseneffekt unter Inkubation mit MK4 gegenüber der Kontrolle (siehe Kapitel 4.1.5). Eine zu erwartende relative Vermehrung der Sphingomyeline im Rahmen einer erhöhten Sphingolipidbiosynthese durch induzierte 3-KDS-Synthase konnte nicht beobachtet werden. Es sei in diesem Kontext jedoch auf die sich unterscheidenden Grundannahmen hingewiesen. So wurden die Untersuchungen der Syntheseleistung der 3-KDS ausschließlich in Bakterien und Mäusen untersucht. Als Vitamer wurde ferner Phyllochinon statt Menachinon verwendet (Lev & Milford, 1973). Durch diese Limitationen bedingt kann nicht unmittelbar auf die Enzymaktivität innerhalb humaner Zellen geschlossen werden. Darüber hinaus unterscheidet sich die Expressionsmenge der 3-KDS-Synthase innerhalb der verschiedenen Zelltypen innerhalb des Zentralnervensystems (Batheja et al., 2003). Eine besonders hohe Dichte findet sich dabei in Pyramidenzellen der Hirnrinde und in moderater Ausprägung in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. In Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten konnte die 3-KDS immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden (Batheja et al., 2003). Auch in SH-SY5Y-Zellen konnte die Existenz und Aktivität der 3-KDS bereits nachgewiesen werden (Kang et al., 2010; J. R. Lim et al., 2023). In letzter Konsequenz deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf keine Induktion der 3-KDS-Synthase in SH-SY5Y-Zellen durch MK4 hin. Der in dieser Arbeit verwendete experimentelle Aufbau ermöglicht ferner keine Aussage über den Sulfatidmetabolismus. Wie bereits besprochen finden sich Sphingolipide, insbesondere Sulfatide in der Myelinmembran (Baba & Ishibashi, 2019). Die in dieser Arbeit verwendeten SH-SY5Y-Zellen dienen als Modell für Neurone (Shiple et al., 2016) und erlauben daher keine Aussage über mögliche Alterationen im Sulfatidmetabolismus der Myelinmembran in vivo. Somit widersprechen sich die Erkenntnisse dieser Arbeit nicht mit der bestehenden Wissensstand, deuten jedoch auf keinen Effekt des MK4 auf den Sphingomyelinhaushalt in SH-SY5Y-Zellen.

## 5.2 Die Lipidhomöostase im Kontext der Alzheimer-Demenz

Wie in Kapitel 5.1 ersichtlich wurde, stellen Lipide eine bedeutende Komponente im menschlichen Organismus dar und erfüllen vielfältige Funktionen, unter anderem als Energiereservoir, Element der zellulären Signaltransduktion und als Hauptbestandteil aller zellulären Membrane (Fahy et al., 2011). Bei letzterem spielt die chemische Konstitution, Konformation und Verteilung der Fettsäuren eine entscheidende Rolle für die vielfältigen Funktionen der Membrane (de Carvalho & Caramujo, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Alterationen der Kettenlängenverteilung und des Sättigungsgrades aller untersuchten Lipidspezies nachgewiesen, und die Rolle des Vitamin K2 in diesen Alterationsprozessen diskutiert. Diese Erkenntnis erweckt die Frage nach dem Einfluss der Lipidhomöostase im Kontext zerebraler und insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen. Schon Alois Alzheimer erwähnte in seiner Erstbeschreibung Fetteinschlüsse in Gliazellen innerhalb der von ihm analysierten Hirnrinden (Foley, 2010). Eine veränderte Lipidhomöostase steht in Zusammenhang mit der Pathogenese und Progression neurodegenerativer Erkrankungen (Estes et al., 2021; M. O. W. Grimm et al., 2017). Es soll deshalb im Folgenden Abschnitt der beobachtete Lipideffekt durch MK4 in den Kontext der Alzheimerpathologie eingebettet und denkbare präventive und prognostische Konsequenzen daraus abgeleitet werden.

### 5.2.1 Membranlipide und die Alzheimerpathologie

Lipide bilden einen essenziellen Bestandteil des menschlichen Gehirns (Hussain et al., 2020). Aufbau und generelle Funktionsweise der Zellmembran wurden in Kapitel 2.2.2.1 bereits erläutert. Der größte Anteil der Lipide im Gehirn besteht aus Cholesterin, Phosphoglycerolipiden und Sphingolipide (Yoon et al., 2022). Eine Vielzahl an post mortem Analysen konnte eine veränderte Zusammensetzung des Membranlipidprofils in Alzheimergehirnen nachweisen (M. O. W. Grimm, Grösgen, Riemenschneider, et al., 2011; Nitsch et al., 1992; Prasad et al., 1998; Wells et al., 1995). Im Fokus dieser Arbeit lag die Analyse der PCaa und Derivate (PCae und LPC), dessen Stoffwechsel zusammen mit der Gruppe der Phosphatidylethanolamine im Rahmen der Alzheimerdemenz Alterationen aufzeigt (Batra et al., 2023; Blusztajn & Slack, 2023). Im Kontext der in dieser Arbeit analysierten Membranlipide konnte unter Einwirkung von MK4 eine Alteration des Sättigungsgrades beobachtet werden, insbesondere kurz-kettige gesättigte und sechsfach ungesättigte Fettsäuren verzeichneten eine signifikante Zunahme (siehe Abbildung 4B; Abbildung 7B; Abbildung 10B). Der Sättigungsgrad der Zellmembran-bildenden Lipide spielt eine essenzielle Rolle für physikalisch-chemischen Eigenschaften (Haefner & Privett, 1975). Eine Zunahme hochgradig ungesättigter Fettsäuren erhöht wie bereits erwähnt die Membranfluidität, welche in zelluläre Funktionen wie Signaltransmission, Proteinfunktion transmembraner Proteine, Laterale Diffusion, Protein-Lipid-Interaktionen und Vesikelbildung involviert ist (Escribá et al., 2008). Diese Beobachtung spielt insbesondere im Kontext der

sogenannten Lipidflöße (engl. *lipid rafts*) eine entscheidende Rolle. Dabei handelt es sich um kleine (10 – 200 nm), heterogene, hochdynamische Domänen innerhalb der Zellmembran mit besonders hohem Anteil an Sphingolipiden und Cholesterin, welche ein intramembranöses Kompartiment für zelluläre Prozesse bilden (Pike, 2006). Die in der Regel langen und gesättigten Acylseitenkette der Sphingolipide ermöglichen eine enge Aneinanderreihung in Membranabschnitte und führen in Nachbarschaftszonen zu den ungesättigten (und dadurch geknickten) Acylseitenketten der Phospholipide zur Phasentrennung (Brown & London, 2000). Lücken innerhalb der dichten Sphingolipid-Aneinanderreihung werden durch Cholesterin gefüllt (Simons & Ikonen, 1997). Lipidflöße finden sich in den meisten Zelltypen, spielen jedoch insbesondere im Zentralnervensystem eine besondere Rolle. Lipidflöße entfalten ihre Funktion hauptsächlich als Plattform für das Stattfinden physiologischer Prozesse wie Signaltransduktion, dendritischer und axonaler Proteintransport, Regulierung der Neurotransmitter und deren exozytotische Freisetzung sowie für Zell-Zell-Kommunikation (Tsui-Pierchala et al., 2002). Bereits seit längerem wird der pathophysiologische Einfluss der Lipidflöße im Kontext der Alzheimererkrankung diskutiert (Hicks et al., 2012). Bereiche, in denen eine Dominanz an Phospholipiden und ungesättigten Fettsäuren mit erhöhter Fluidität vorherrscht, werden als Non-Raft-Domänen bezeichnet (Wassall & Stillwell, 2008). Es konnte innerhalb von Lipid-Raft-Domänen ein erhöhter Gehalt der  $\beta$ -Sekretase BACE-1 und PS1, dem aktiven Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase nachgewiesen werden, während die  $\alpha$ -Sekretase ADAM-10 ausschließlich in Non-Raft-Domänen vorliegt (Eehalt et al., 2003; Kojro et al., 2001; Parkin et al., 1999; Parr-Sturgess et al., 2010; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004; Yuan et al., 2017). Somit hängt die Menge an amyloidogener Prozessierung auch von der Menge an vorliegenden Lipid-Rafts ab. Eine Zunahme an hochgradig gesättigten Phosphoglyceride in dieser Arbeit deutet auf vermehrte Non-Raft-Domänen. Zwar wurde auch eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren in dieser Arbeit beobachtet, jedoch bestehen Raft-Domänen wie bereits erwähnt hauptsächlich aus Sphingolipiden (in diese Arbeit nicht untersucht) mit langen Fettsäuren (in dieser Arbeit dominierende Zunahme der kurzkettig-gesättigter Fettsäuren), wodurch nicht direkt auf Alterationen dieser geschlossen werden kann.

Eine besonderer Bedeutung im Kontext der Alzheimererkrankung besitzt neben Lipidflößen DHA, welches in dieser Arbeit in allen drei analysierten Phosphoglycerolipiden eine Zunahme verzeichnete. Wie bereits ausführlich in Kapitel 2.2.3.2 erläutert, handelt es sich bei DHA um eine sechsfach ungesättigte Fettsäure mit einer herausragenden Rolle im Zentralnervensystem (Lauritzen et al., 2016). Die Bedeutung der DHA im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimerdemenz und der mögliche präventive Nutzen durch die Ernährung ist bereits seit längerem bekannt. So zeigte sich in postmortalen Hirngewebsproben und Serum von Alzheimerpatienten verminderte Konzentrationen von DHA und erhöhte Level an Oxidationsprodukten der vulnerablen

mehrfach ungesättigten Fettsäuren, ein Befund, der auf erhöhte oxidative Vorgänge im Rahmen der Alzheimerpathologie deutet (Conquer et al., 2000; M. O. W. Grimm, Hauptenthal, et al., 2016; Markesbery et al., 2005; Söderberg et al., 1991; Tully et al., 2003). Eine verminderte Amyloid-Ablagerung sowie ein vermindertes Risiko für das Auftreten der Alzheimerdemenz durch parenterale Einnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DHA konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Barberger-Gateau, 2002; Kalmijn et al., 1997; Morris et al., 2003; Morris & Tangney, 2014). Jedoch existieren auch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen PUFAs und der Alzheimerdemenz beobachteten (Engelhart et al., 2002; Jicha, 2010; Kröger et al., 2009). Auf die APP-Prozessierung wirkt DHA über mehrere unabhängige Mechanismen. So vermindert DHA die amyloidogene Prozessierung über eine Senkung der Enzymaktivität der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase (Green et al., 2007; M. O. W. Grimm, Kuchenbecker, et al., 2011). Neben dieser Hemmung fördert DHA die nicht-amyloidogene Prozessierung über Steigerung der Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase (M. O. W. Grimm, Hauptenthal, et al., 2013) und über erhöhte Genexpression und Degradierungshemmung von ADAM17 mit konsekutiv nachgewiesener Akkumulation von sAPP $\alpha$  (M. O. W. Grimm, Kuchenbecker, et al., 2011). Außerdem fördert DHA über eine Verschiebung von Cholesterol aus Lipid-Raft- in Nicht-Lipid-Raft-Domänen die Aktivität der nicht-amyloidogenen Prozessierung (M. O. W. Grimm, Kuchenbecker, et al., 2011; Hashimoto et al., 2005; Stillwell et al., 2005). Dieser Effekt ist vermutlich durch die Anreicherung DHA-reicher Phospholipide in Lipid-Raft-Domänen zu erklären. Zusätzlich wird die Enzymaktivität der  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterinbiosynthese, durch DHA inhibiert, wodurch ebenfalls einer verringerte amyloidogene Prozessierung erreicht wird (Ehehalt et al., 2003; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004). Zusätzlich moduliert DHA die A $\beta$ -Aggregation, den Abbau und die A $\beta$ -vermittelte Toxizität in vitro (M. O. W. Grimm, Mett, et al., 2016; Hossain et al., 2009). Auch in Tiermodellen zeigte DHA verbesserte kognitive Leistung und verringerte Level an Amyloid-Plaques (Calon et al., 2004; Hashimoto et al., 2002, 2005; G. P. Lim et al., 2005; S. E. Perez et al., 2010). Die Zunahme von DHA in dieser Arbeit führt folglich über mehrere Mechanismen zu einer Verschiebung der amyloidogenen hin zur nicht-amyloidogenen Prozessierung.

Eine weitere Fettsäure im Kontext der Alzheimererkrankung stellt die Arachidonsäure dar. Auch ihre Funktion und allgemeine Bedeutung wurde in Kapitel 2.2.3.2 bereits besprochen. Auch der Einfluss von Arachidonsäure auf die Alzheimerpathologie ist Gegenstand der aktuellen Literatur (Thomas et al., 2016). Die Bewertung über die Rolle der Arachidonsäure wird jedoch im Gegensatz zu DHA kontrovers betrachtet. So konnte in Alzheimergehirnen post mortem erhöhte Konzentrationen an Arachidonsäure und Enzymaktivität der PLA<sub>2</sub> nachgewiesen werden (Sanchez-Mejia et al., 2008). Während sich im Tiermodell ein positiver Einfluss der Arachidonsäure auf Langzeitpotentierung zeigte, berichten andere Arbeiten über

einen fördernden Einfluss der Arachidonsäure auf pathologische Prozesse (McGahon et al., 1997; Yagami et al., 2014). Nicht zuletzt wird die Membranfluidität (und die damit verbundenen Konsequenzen) neben DHA auch durch Arachidonsäure beeinflusst (Fukaya et al., 2007; X. Yang et al., 2011).

Neben mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigte sich in dieser Arbeit ebenfalls eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren in der Gruppe der PCaa und PCae (siehe Abbildung 4A und Abbildung 7A), während innerhalb der LPC keine signifikante Änderung detektiert wurde (siehe Abbildung 10A). Die Analyse der Kettenlänge offenbarte dabei, dass diese Zunahme insbesondere durch den Zuwachs kurzkettiger Spezies bedingt ist (in der Gruppe der PCaa fünf Spezies, in der Gruppe der PCae zwei Spezies, siehe Abbildung 4D und Abbildung 7D), während die Zunahme der langkettigen gesättigten Fettsäuren in der Gruppe der PCaa und PCae keine signifikante Änderung zeigten (Spezies PCaa-C42:0 zeigte sogar mit 89% signifikante Abnahmetendenz, Abbildung 3). Wie bereits erläutert interagieren gesättigte Fettsäuren auf die APP-Prozessierung im Kontext von Lipid Rafts. Die APP-Prozessierung wird neben Lipidflöße auch durch die Kettenlänge der gesättigten Fettsäuren über mehrere Mechanismen reguliert.

In einem ex vivo und in vitro Model zeigte eine Inkubation von Phospholipiden mit gesättigten kurzkettigen Fettsäuren gegenüber langkettigen gesättigten Fettsäuren eine erhöhte Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase in extrahierten Zellmembranen sowie lebenden SH-SY5Y-Zellen vom Wildtyp (M. Grimm et al., 2013). Weitere Analysen derselben Arbeitsgruppe zeigten zusätzlich eine signifikante Abnahme von nicht-degradiertem A $\beta$  (detektiert mittels Western-Blot und ELISA) in murinen Neuro2a-Zellen unter Inkubation mit kurzkettigen Fettsäuren (PCaa-C10/12/14:0) sowohl gegenüber mittel- und langkettigen Fettsäuren (PCaa-C16/18:0 bzw. PCaa-20/22/24:0) als auch gegenüber der Ethanolkontrolle (Mett et al., 2021). Langkettige zeigten gegenüber mittelkettig-gesättigten Fettsäuren eine Zunahme des detektierbaren A $\beta$ . Vertiefende Analysen zeigten eine erhöhte Degradierung des A $\beta$  durch IDE (siehe Kapitel 2.1.2.2) als ursächlich.

Eine weitere Studie konnte obig beschriebene Ergebnisse replizieren (J.-J. Liu et al., 2019). Unter Inkubation mit 10  $\mu$ M C16:0, C20:0 und C26:0 für 24 h in SH-SY5Y-Zellen zeigte sich in Analogie eine Beeinflussung der APP-Prozessierung durch die Kettenlänge. Dabei zeigten sich signifikante Zunahmen amyloidogen-prozessierender Proteine (APP, BACE-1 und PS1) und des A $\beta$  im Western-Blot bzw. ELISA (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*) unter Inkubation mit den langkettigen Fettsäuren C20:0 und C26:0. Die Fettsäure C16:0 zeigte wie auch bei Mett keine signifikante Änderungen gegenüber der Kontrolle. Im Gegensatz zu diesen beiden Studien zeigte eine Inkubation mit 50  $\mu$ M C16:0-BSA in SK-N-MC-Zellen einen erhöhte Konzentration an APP, BACE-1 und A $\beta$  im Western Blot und ELISA (J. Y. Kim et al., 2017).

Diese Diskrepanz ist möglicherweise durch methodische Unterschiede zu erklären (unterschiedliche Zelllinien, variierende Inkubationszeiträume und -konzentrationen). Der obig beschriebene fördernde Effekt langkettiger Fettsäuren auf die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase konnte in einer weiteren Studie ebenfalls nachgewiesen werden (Holmes et al., 2012).

Zusammenfassend bedingen kurzkettige gesättigte Fettsäuren über mehrere Mechanismen (vermehrte Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase, vermehrte Degradierung von A $\beta$  mittels IDE) A $\beta$ -reduzierende Effekte, während langkettig-gesättigte Fettsäuren über Modulation der amyloidogenen-Prozessierung die A $\beta$ -Generation fördernd. Die Zunahme der kurzkettig-gesättigten Fettsäuren in dieser Arbeit ist somit im Kontext der APP-Prozessierung als protektiv zu werten.

Im Gegensatz zu obig genannten in vitro-Studien ist der Einfluss gesättigter Fettsäuren auf die Alzheimererkrankung unter epidemiologischen Gesichtspunkten uneinheitlich. Entgegen den bekannten nachteiligen Gesundheitseffekten von übermäßigem Konsum gesättigter Fettsäuren in der Ernährung (Calder, 2015; Tvzicka et al., 2011) konnte in einer neueren Metaanalyse aus 14 Studien und 54177 Teilnehmern keine Assoziation zwischen der Einnahme von SFA und dem Risiko der Alzheimererkrankung nachgewiesen werden (Zhu et al., 2021). Ein potenziell nachteilhafter Effekt durch die Zunahme der gesättigten Fettsäuren in der Gruppe der PC in dieser Arbeit ist in der Gesamtschau kritisch zu betrachten.

Ein weiteres Phospholipid innerhalb der Zellmembran stellt die Gruppe der Sphingomyeline dar. Wie bereits erläutert bilden Sphingolipide zusammen mit Cholesterol die Hauptbestandteile von Lipidflößen (Posse de Chaves & Sipione, 2010). Im Rahmen der Alzheimererkrankung konnte eine Dysregulation des Sphingolipidmetabolismus beobachtet werden (He et al., 2010). Einen möglichen Erklärungsansatz dieser Beobachtung bietet dabei eine verringerte Synthese oder verstärkten Abbau der Sphingomyeline. Im Kontext einer verringerten Syntheseleistung konnte die Inhibierung der Serin-Palmitoyltransferase, dem ersten Enzym der Sphingolipidbiosynthese (siehe Kapitel 5.1.2.4) durch AICD auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (M. O. W. Grimm, Grösgen, Rothhaar, et al., 2011). Zusätzlich konnte ein modulierender Einfluss von A $\beta$ 42 auf die neutrale Sphingomyelinase, in dessen Folge der Abbau der Sphingomyeline gefördert wird, beobachtet werden (M. O. W. Grimm et al., 2005).

Die Untersuchung der Sphingomyeline zeigte unter Inkubation mit MK4 nur wenig Alterationen gegenüber der Kontrolle. Es lassen sich auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Daten kein abschließendes Fazit über den Sphingomyelin-medierten Effekt zwischen Vitamin K2 und der Alzheimerdemenz ableiten.

### 5.2.2 Der Energiemetabolismus und die Alzheimerpathologie

Obwohl das ausgewachsene Gehirn lediglich 2-2,3 % des Körpergewichtes ausmacht, werden 20-23 % des bestehenden Energieangebots diesem permanent zugeführt (Holliday, 1971; Sokoloff, 1999). Da bis zu 90 % der zugeführten Glucose innerhalb der Mitochondrien zu CO<sub>2</sub> zwecks Energiegewinnung oxidiert werden, stellen diese eine wichtige Komponente in der Funktionalität von Neuronen dar. Die generierte Energie wird für die Aufrechterhaltung der Neurotransmission und des elektrochemischen Potentials, sowie der Verhinderung der Excitotoxizität benötigt (D. Pfaff, 2013) . Im Rahmen der Alzheimererkrankung wird ein Hypometabolismus des Glucosestoffwechsels in bestimmten Hirnarealen beobachtet (Benson et al., 1983; Chawluk et al., 1987; Rapoport, 1986). In post mortem Gehirnen von Alzheimerpatienten ließ sich eine veränderte Morphologie der Mitochondrien, ein dysfunktionaler Zitratzyklus, sowie Störungen innerhalb des Elektronentransportes und der oxidativen Phosphorylierung nachweisen (Blass et al., 2000). Wie bereits in Kapitel 2.1.2.3 besprochen, bilden somit mitochondriale Dysfunktion und damit einhergehende reaktive Sauerstoffspezies, sowie eine Störung im Energiemetabolismus eine Säule in der Pathogenese der Alzheimererkrankung (Swerdlow et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten auf einen Einfluss des MK4 auf den Energiestoffwechsel hin. So zeigte sich ein Abbau der Energiereserven in Form der Triacylglyceride. Die Faktenlage über den möglichen Einfluss des Vitamin K2 auf Peroxisomen verdichtet sich zunehmend (Qu et al., 2022). Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme aller Carnitinerester kann als indirektes Zeichen einer Verschiebung der  $\beta$ -Oxidation hin zu Peroxisomen gedeutet werden, welche im Gegensatz zu Mitochondrien die Fähigkeit zur Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies besitzen. Im Kontext der Alzheimerpathologie würde ein Vitamin K2 vermittelte verbesserte Energienutzung und mitochondriale Entlastung einen positiven Einfluss auf die Alzheimerprogression entfalten.

### 5.3 MK4 im Kontext der APP-Prozessierung

Die APP-Prozessierung durch die enzymatische Aktivität der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase stellt einen essenziellen Mechanismus in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz dar (S. Khan et al., 2020). Es sollte im Rahmen dieser Arbeit der Frage nach dem Einfluss des MK4 auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase nachgegangen werden. Die Analyse erfolgte mittels Echtzeit-Fluorometrie sowie Genexpressionsanalysen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sollen im Folgenden in den bekannten literarischen Kontext eingeordnet und diskutiert werden.

#### 5.3.1 MK4 und die $\alpha$ -Sekretase

Die  $\alpha$ -Sekretase bezeichnet eine Gruppe von Transmembranproteinen, welche die erste enzymatische Spaltung des APP in sAPP $\alpha$  und CTF im Rahmen der nicht-amyloidogenen Prozessierung katalysieren (Barage & Sonawane, 2015). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zeigte sich keine signifikante Änderung der Genexpression von *ADAM10* bei ebenfalls nicht signifikanter Alteration der Enzymkinetik in SH-SY5Y-Zellen (siehe Kapitel 4.2.2).

Diese Beobachtung korrespondieren mit einer kürzlich publizierten Studie, bei der ebenfalls eine nicht signifikante Zunahme von sAPP $\alpha$  unter Inkubation mit Vitamin K2 nachgewiesen wurde. Auch bezüglich *ADAM10* vermerkte die Studie keine signifikante Alteration gegenüber der Kontrolle im Western Blot (C.-H. Lee et al., 2022). Es muss jedoch auf die methodischen Unterschiede hingewiesen werden. Neben einer geringeren Inkubationskonzentration um den Faktor 1000 und einer anderen Zelllinie (APP-exprimierende Ovarialzellen chinesischer Hamster) unterscheidet sich auch die Inkubationsdauer von 24h von dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Ansatz (Inkubation für 72h). Darüber hinaus erfolgte die Inkubation mit MK7 statt MK4, und die Messung wurde nicht mittels Echtzeit-Fluorometrie, sondern über ELISA durchgeführt (C.-H. Lee et al., 2022). Weitere Daten über den direkten Einfluss des Vitamin K2 auf die Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase liegen aktuell nicht vor. Somit deutet die derzeitige Datenlage in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen dieser Arbeit auf keinen Effekt des Vitamin K auf die nicht-amyloidogene Prozessierung über Modulierung der  $\alpha$ -Sekretase hin. Insbesondere im Kontext der Lipide und Membranfluidität wäre gemäß der bestehenden Literatur eine Regulation der  $\alpha$ -Sekretaseaktivität über die in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Effekte zu erwarten. Es bedarf hier weiterer Untersuchungen zur definitiven Klärung.

#### 5.3.2 MK4 und die $\beta$ -Sekretase

Die  $\beta$ -Sekretase ist ein Enzym, welches in Kombination mit der  $\gamma$ -Sekretase für die Generierung von A $\beta$  im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung im Zentralnervensystem verantwortlich ist (M. O. W. Grimm et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich unter Einfluss des Vitamin K2 in zwei unabhängigen Messdurchgängen eine Verringerung der

Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase, sowie eine verminderte Genexpression von *BACE-1*. Die daraus resultierende Konsequenz einer verringerten sAPP $\beta$  Produktion deckt sich mit den Befunden der bereits in Kapitel 5.3.1 erwähnten Studie, in der eine dosisabhängige verminderte Produktion von sAPP $\beta$  und A $\beta$  unter Inkubation mit MK7 per Western Blot in vitro nachgewiesen werden konnte (C.-H. Lee et al., 2022). Trotz der bereits diskutierten Limitationen decken sich auch in diesem Aspekt die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Studienergebnissen. Im Kontext der in Kapitel 5.2.1 besprochenen Effekte des Vitamin K2 auf die Lipidhomöostase kann die beobachtete Senkung der amyloidogenen Prozessierung sowohl über die DHA-vermittelte Umverteilung des Membranmyleus als auch die verminderte Expression auf Transkriptionsebene erklärt werden. Erste Möglichkeit kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Ein Einfluss der APP-Prozessierung durch Vitamin K2-vermittelte Modulation der Genexpression wurde erst kürzlich durch eine weitere Studie untermauert (Orticello et al., 2023). Nach Inkubation von 50  $\mu$ M MK4 und chemisch reduziertem MK7 in SK-N-BE-Zellen erfolgte eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR. Zeitgleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich in der Analyse dieser unabhängigen Arbeitsgruppe eine Modulierung der APP-prozessierenden Sekretasen. So zeigte sich eine Expressionsminderung von *BACE1* und *PSEN1*. Bei unveränderter Expression von APP konnte ein signifikanter Anstieg von *ADAM17* und *ADAM10* in der Studie nachgewiesen werden. Der Anstieg von ADAM10 deckt sich grundsätzlich mit der Genexpressionsanalyse in dieser Arbeit (Anstieg von ADAM10 auf 110,2 %). Jedoch erreichte in dieser Arbeit der Expressionsanstieg keine statistische Signifikanz. Darüber hinaus erfolgte durch die Autoren der Studie eine Analyse der inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL6) mittels Expressionsanalyse und Western Blot. Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich unter Einfluss von MK4 eine signifikante Abnahme beider Entzündungsmediatoren sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene (Orticello et al., 2023). Zuletzt zeigte sich unter Anwesenheit von MK4 eine epigenetische Hypermethylierung im 5'-flankierenden Bereich der Gene *PSEN1*, *IL1 $\beta$*  und *IL-6*. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Wirkweise des MK4 auf die epigenetische Modulation noch unzureichend bekannt, weshalb keine wirkmechanistischen Aussagen getroffen werden können.

Neben der Hemmung der amyloidogenen Prozessierung besteht ein bekannter Zusammenhang zwischen Vitamin K2 und der A $\beta$ -Aggregation (Alam et al., 2016). Im Rahmen einer Studie konnte eine Modulation der Oligomerisierung der A $\beta$ -Monomere durch Vitamin K3 nachgewiesen werden. Die A $\beta$ -42-Aggregation zeigte unter Anwesenheit von Vitamin K3 weniger  $\beta$ -Faltblattstrukturen und eine veränderte Morphologie. Die Interaktion scheint dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen des 1,4-Naphtochinonrings bedingt zu sein, welcher ebenfalls eine strukturelle Komponente von MK4 bildet (Alam et al., 2016). Die Verminderung der Zytotoxizität durch eine verminderte

Aggregation von A $\beta$  in Anwesenheit von Vitamin K3 konnte in weiteren Studien in vitro und in silico bestätigt werden (Huy et al., 2013). Daneben moduliert Vitamin K den A $\beta$ -induzierten Zelltod in vitro. So zeigte sich wie bereits erwähnt eine Abnahme der A $\beta$ -medierten Apoptose durch MK4 über die Regulierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges und Hemmung des proapoptischen Proteins Caspase-3 (Huang et al., 2021). Es lässt sich zusammenfassend pleiotrope Effekt des Vitamin K2 auf die Prozessierung und Wirkung des A $\beta$  ableiten, deren komplexes Zusammenspiel noch nicht abschließend verstanden ist.

#### **5.4 Vitamin K im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen**

Es konnte bereits die Rolle des Vitamin K2 im Lipidmetabolismus und der Pathogenese der Alzheimerdemenz aufgezeigt und die Erkenntnisse dieser Arbeit in den bestehen Kontext eingeordnet werden. Wie bereits in Kapitel 2.1.1.1 erwähnt, handelt es sich bei der Alzheimerdemenz um eine Entität aus dem Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit ein progressiver Neuronenverlust darstellt (Lamprey et al., 2022). Neben der Alzheimerdemenz wird neben weiteren Entitäten das Parkinson-Syndrom, Chorea Huntington, frontotemporale Demenzen, amyotrophe Lateralsklerose und die spinocerebelläre Ataxie als neurodegenerative Erkrankungen klassifiziert (Dugger & Dickson, 2017). Die höchste Prävalenz innerhalb der neurodegenerativen Erkrankungen verzeichnen die Alzheimerkrankheit (siehe auch Kapitel 2.1.1.2) und Morbus Parkinson (Dugger & Dickson, 2017).

In diesem Abschnitt wird die Rolle des Vitamin K2 im weitergreifenden Kontext neurodegenerativer Erkrankungen am Beispiel des Morbus Parkinson besprochen. Zudem soll die Rolle als potenzieller Biomarker und der präventiver Nutzen in der Ernährung diskutiert werden.

Nach der Alzheimerdemenz stellt das Parkinson-Syndrom die weltweit zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar (Dugger & Dickson, 2017). Es handelt sich dabei um einen Sammelbegriff mehrerer Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine Bewegungsstörung aus dem spezifischen Symptomkomplex aus Tremor, Rigor, Bradykinese bzw. Akinese und posturale Instabilität zugrunde liegt. Klinisch wird zwischen einem idiopathischen Parkinson-Syndrom, einem genetisch bedingten familiären Parkinson-Syndroms, einem Parkinson-Syndrom im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen und einem durch eine Krankheit bedingten sekundären Parkinson-Syndrom unterschieden (Höglinger & Trenkwalder, 2023). Der idiopathischen und familiären Form der Parkinsonerkrankung gemeinsam ist der funktionelle Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta und das histopathologische Korrelat der intrazellulären Lewy-Körperchen, welche eine Fehlfaltung mit konsekutiver Akkumulation des Proteins  $\alpha$ -Synuclein bedingt (Balestrino & Schapira, 2020). Das Zusammenspiel mehrerer Ursachen (u.a. mitochondriale Dysfunktion,

oxidativer Stress und Inflammation) führt zum progressiven Neuronenverlust, welche neben den motorischen Kardinalssymptomen noch weitere nicht motorische Störungen hervorrufen kann. Zum jetzigen Zeitpunkt existierten keine kausalen Therapien und das Zusammenspiel der multifaktoriellen Ursachen sowie der Risikofaktoren wie Altern, Geschlecht und Umweltfaktoren ist nicht abschließend verstanden (Dexter & Jenner, 2013). Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion werden als treibende Kraft in der Pathogenese des Morbus Parkinson diskutiert (Abou-Sleiman et al., 2006; Behl, 1999). Gehirne von Patienten mit Parkinsonerkrankung enthalten erhöhte Level an Eisen, Dopaminoxidation und verringerte Mengen an endogenen Antioxidantien (Götz et al., 2000; Lan & Jiang, 1997; Sutachan et al., 2012). Der oxidative Metabolismus des Dopamins bedingt die Bildung von Peroxiden, welche mit zweiwertigen Eisenionen als Katalysator zu stark zytotoxischem Hydroxylradikalen reagieren. Darüber hinaus bilden Genevariationen einen Risikofaktor des Morbus Parkinson (Nuytemans et al., 2010; Wüst et al., 2016). Insbesondere Abnormalitäten der Gene *PINK1* und *PARK2* (kodiert für die Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin) sind mit mitochondrialer Dysfunktion im Kontext des familiären Parkinson-Syndroms assoziiert (Icer et al., 2021). Vitamin K<sub>2</sub> wirkt in Bakterien als membrangebundener Elektronenüberträger. Unter Ausschaltung des *Pink1*- und *PARK2*-Gens wirkte Vitamin K<sub>2</sub> als Elektronentransporter in Mitochondrien von Fruchtfliegen und konnte lokomotorische Defizite verbessern (Vos et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Studie stellen Vitamin K<sub>2</sub> als potenzielle Therapie für Parkinsonerkrankte mit einer nachgewiesenen *Pink1*- oder *Parkin*-Mutation in den Raum. Diese Erkenntnisse werden durch eine klinische Studie unterstützt, in welcher der ATP-Gehalt vor und nach oraler Substitution mit MK7 in Gehirnen von Patienten mit Mutationen im *Parkin*- und *PINK1*-Gen, sporadischer Parkinsonerkrankung und gesunden Individuen mittels <sup>31</sup>P-Magnetresonanzspektroskopie untersucht wurden. Die Autoren berichten von einer signifikanten Erhöhung des ATP-Levels bei zwei Patienten mit einer homozygoten *PINK1*-Mutation (Prasuhn et al., 2021). Jedoch wird, wie bereits in Kapitel 5.1.1 erwähnt, die Rolle des Vitamin K<sub>2</sub> als mitochondrialer Elektronentransporter in der Literatur bei uneinheitlicher Datenlage kontrovers diskutiert. Ein weiterer möglicher Ansatz stellt die Betrachtung der Interaktion zwischen  $\alpha$ -Synuclein und Vitamin K<sub>2</sub> dar. Es handelt sich bei ersterem um ein präsynaptisches Protein, welches im Rahmen der Parkinsonerkrankung als lösliches Oligomer (sogenannte Protofibrillen) über mehrere Wirkmechanismen neurotoxische Effekte ausübt (Stefanis, 2012). Eine Studie konnte durch Vitamin K bedingte Abbremsung der Oligomerisierung des  $\alpha$ -Synuclein beobachten. Die Autoren dieser Studie vermuten die Vermittlung dieses Effektes über den 1,4-Naphtochinonring (siehe dafür Kapitel 2.3.2) des Vitamin K<sub>2</sub> (F. L. da Silva et al., 2013). Neben dem Einfluss als Elektronentransporter in der mitochondrialen Atmungskette konnte eine weitere Untersuchung erniedrigte Serumkonzentrationen von Vitamin K<sub>2</sub> innerhalb der an Parkinson erkrankten Individuen im

Vergleich zu einer Kontrollgruppe verzeichnen. Die abnehmende Serumkonzentration korrelierte dabei mit dem Progress der Parkinsonerkrankung (Y.-X. Yu et al., 2020). Diese Relation öffnet den Raum für Vitamin K2 als möglichen Biomarker der Parkinsonerkrankung. Die Autoren dieser Studie zeigten außerdem bei Parkinsonerkrankten eine vermehrte Hochregulierung von Genen, welche für Proteine der Koagulationskaskade kodieren. Diese Regulierung erfolgte vermutlich über DNA-Methylierung. Gemäß den Autoren könnte Vitamin K2 über Regulierung der Koagulationskaskade einen Einfluss auf die Pathogenese der Parkinsonerkrankung haben (Y.-X. Yu et al., 2020). Diese Beobachtung erhärtet den potenziellen Nutzen des Vitamin K2 als substituierendes Therapeutikum im Rahmen der Parkinsonerkrankung. Die vorgestellten Studienergebnisse bilden dabei eine argumentative Grundlage für weitere Untersuchungen zur Festigung der Hypothese eines therapeutischen Nutzens einer Vitamin K2-Substitution bei manifester bzw. drohender Parkinsonerkrankung.

Über Zusammenhänge zwischen Vitamin K und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen existieren hingegen keine ausreichenden Daten. Es bedarf hier weiterer Untersuchungen, um den Einfluss des Vitamin K auf weitere neurodegenerative Erkrankungen besser zu verstehen. Es lässt sich zusammenfassend ein übergreifender komplexer Zusammenhang zwischen Vitamin K2 und modulierenden Einflüssen auf Neurodegeneration aus der Literatur ableiten.

Vitamin K kann ausschließlich über die Nahrung aufgenommen werden (Simes et al., 2020). Somit gewinnt der präventive Nutzen einer ausreichenden Versorgung dieses Vitamins durch Ernährungsgewohnheiten zunehmend an Bedeutung. Mehrere Studien untersuchten auf Basis dieser Fragestellung einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen dem Vitamin K-Spiegel und kognitiver Leistung. Wie bereits in Kapitel 2.3.4 besprochen, existieren mehrere Bestimmungsmöglichkeiten des Vitamin K-Spiegels. Darüber hinaus ist die Messung der kognitiven Leistung ebenfalls uneinheitlich und kann über mehrere Testverfahren evaluiert werden (Harvey, 2019). Daraus resultierten heterogene Studiendesigns und nur begrenzte Vergleichbarkeit der aktuellen Erkenntnisse. Dieser Limitation zum Trotz zeigte sich mit einer Ausnahme (van den Heuvel et al., 2015) in fünf analysierten Studien eine Korrelation zwischen dem Vitamin K-Spiegel und kognitiver Leistung (Chouet et al., 2015; Kiely et al., 2020; Presse et al., 2008, 2013; Soutif-Veillon et al., 2016). Diese Erkenntnis ermutigt zu weiteren Untersuchungen mit einheitlicher und standardisierter Methodik, um den über die Ernährung modulierbaren präventiven Nutzens eines ausreichenden Vitamin K-Spiegels auf kognitive Leistung besser zu verstehen und das Risiko an Neurodegeneration im Alter zu verringern.

## 5.5 Ausblick

Seit seiner Entdeckung ist Vitamin K Gegenstand der Grundlagenforschung. Neuere Erkenntnisse werfen die Frage nach Bedeutung und Rolle des Vitamin K<sub>2</sub> als Modulator zentralnervöser Prozesse auf. Insbesondere zeigte sich eine Korrelation zwischen Vitamin K im Plasma und dem Auftreten der Alzheimerdemenz. Die Fragestellung nach einem Einfluss des Vitamins über Eingreifen in den menschlichen Lipidmetabolismus wurde in der Literatur bis jetzt nicht ausreichend adressiert. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit der grundsätzliche Zusammenhang zwischen Vitamin K<sub>2</sub> und Lipiden der Zellmembran und des Energiemetabolismus in neuronalen Zellen überprüft werden, um daraus mögliche Implikationen auf die Alzheimererkrankung ableiten zu können.

Als grundlegende Methodik wurde ein zelluläres Modell mit der Neuroblastozelllinie SH-SY5Y (Wildtyp) etabliert. Es erfolgte für alle Experimente eine Inkubation mit der supraphysiologischen Konzentration von 100 µM MK4 für 72 Stunden. Nach Ausschluss einer MK4-bedingten Zytotoxizität erfolgte eine Untersuchung des Lipidprofils mittels ESI-MS/MS und anschließender statistischer Auswertung. Das untersuchte Lipidprofil zeigte signifikante Alterationen einzelner Lipide innerhalb der Lipide der Zellmembran. Insbesondere zeigte sich eine Zunahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Diacyl-Phosphatidylcholine, Phosphatidylcholin-Plasmalogene und lysierten Phosphatidylcholine. Bei letzterer Klasse konnte dabei die Zunahme der Docosahexaensäure und Arachidonsäure nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in der Gruppe der Diacyl-Phosphatidylcholine und Phosphatidylcholin-Plasmalogene eine signifikante Zunahme der kurzkettigen gesättigten Fettsäuren. Die Analyse der Lipide des Energiemetabolismus zeigte eine signifikante Abnahme der Klasse der Triacylglyceride und Carnitinester.

Ferner wurde im Anschluss eine Untersuchung der Enzymaktivität der APP-prozessierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase mittels Echtzeit-Fluoreszenzspektrometrie und Genexpressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt der Enzymaktivität der  $\alpha$ -Sekretase unter Inkubation mit MK4, wohingegen in dieser Arbeit eine Abnahme der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase, sowie eine Expressionsminderung von *BACE-1* beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend kann die eingangs formulierte Hypothese eines Einflusses des Vitamin K<sub>2</sub> auf die Lipidhomöostase und APP-Prozessierung in neuronalen Zellen bestätigt werden. Die Zunahme der mehrfach ungesättigten sowie kurzkettig-gesättigten Fettsäuren innerhalb der Membranlipide ist im Kontext der Alzheimererkrankung als protektiver Faktor zu werten. Insbesondere die Veränderung der Docosahexaensäure unter Anwesenheit von MK4 ist im Rahmen der Alzheimererkrankung hervorzuheben. Da im experimentellen Aufbau keine Substitution erfolgte, kann die DHA-Zunahme nur durch Vitamin K<sub>2</sub>-bedingte metabolische Prozesse bedingt sein. Ferner zeigte MK4 einen Einfluss auf den zellulären

Energiemetabolismus in SH-SY5Y-Zellen, wobei insbesondere der in der Literatur aufkommende Verdacht auf peroxisomale Modulation gestärkt werden konnte. Die Abnahme der Triacylglyceride zusammen mit verminderten Carnitinstern kann auf eine gesteigerte Energiegewinnung außerhalb der Mitochondrien gedeutet werden. Zuletzt konnte die bereits in der Literatur postulierte Senkung der Enzymaktivität der  $\beta$ -Sekretase und Expressionsminderung von *BACE-1* durch MK4 bestätigt werden. Die verminderte Aktivität der  $\beta$ -Sekretase führt im Rahmen einer verminderten amyloidogenen Prozessierung in letzter Konsequenz zu weniger extrazellulärem A $\beta$  mit positiven Konsequenzen auf die Entstehung und Unterhaltung der Alzheimerkrankheit. Eine Substitution, beziehungsweise ein ausgewogener Haushalt von Vitamin K2 im Alter sprechen auf Basis der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zusammen mit der aktuellen Datenlage für eine protektive Wirkung und sollten als präventive Maßnahme in klinischen Studien erwogen werden. Alle Erkenntnisse dieser Arbeit basieren auf einem in vitro Modell. SH-SY5Y-Zellen eignen sich insbesondere als Modell neurodegenerativer Erkrankungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch weitere Zelllinien und variierende Inkubationskonzentrationen tiefergreifend untersucht und bestätigt werden. Auch muss die Limitation der verwendeten massenspektrometrischen Methodik abwägend genannt werden. So ließen sich in dieser Arbeit bestimmte Lipidalterationen nur auf Basis von Fettsäureverteilungen einschätzen. Auch kann auf Basis der Lipidalterationen keine Aussage über die Ursache und beteiligte Signal- und Synthesewege getroffen werden. Zudem wurden nicht alle möglichen Lipidklassen untersucht. Hier bedarf es weiteren Untersuchungen und Methodiken, um das Lipidprofil tiefergreifender zu untersuchen. Auch die Genexpressionsanalyse sollte weiterführend untersucht werden, insbesondere weitere  $\alpha$  und  $\gamma$ -Sekretase-kodierende Gene. Verändertere Enzymkinetik in Folge einer veränderten Lipidalteration sollte mittels isolierter Lipidfraktion untersucht werden. Nicht zuletzt bedarf es ebenfalls in vivo Experimente, um den Einfluss des MK4 auf die Lipidhomöostase besser zu verstehen und ein abschließendes Fazit fällen zu können

## 6 Literaturverzeichnis

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K., & Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(3), 207–219. <https://doi.org/10.1038/nrn1868>
- Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010). An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(4), 1069–1082. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091363>
- Agostinho, P., A. Cunha, R., & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(25), 2766–2778. <https://doi.org/10.2174/138161210793176572>
- Ahn, K., Shelton, C. C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M. L., Sisodia, S. S., & Li, Y.-M. (2010). Activation and intrinsic  $\gamma$ -secretase activity of presenilin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(50), 21435–21440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013246107>
- Akiyama, H. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *21*(3), 383–421. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00124-X)
- Alam, P., Chaturvedi, S. K., Siddiqi, M. K., Rajpoot, R. K., Ajmal, M. R., Zaman, M., & Khan, R. H. (2016). Vitamin k3 inhibits protein aggregation: Implication in the treatment of amyloid diseases. *Scientific Reports*, *6*(1), 26759. <https://doi.org/10.1038/srep26759>
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
- Alisi, L., Cao, R., De Angelis, C., Cafolla, A., Caramia, F., Cartocci, G., Librando, A., & Fiorelli, M. (2019). The Relationships Between Vitamin K and Cognition: A Review of Current Evidence. *Frontiers in Neurology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00239>
- Allen, M. P., Zeng, C., Schneider, K., Xiong, X., Meintzer, M. K., Bellosta, P., Basilico, C., Varnum, B., Heidenreich, K. A., & Wierman, M. E. (1999). Growth Arrest-Specific Gene 6 (Gas6)/Adhesion Related Kinase (Ark) Signaling Promotes Gonadotropin-Releasing

- Hormone Neuronal Survival via Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Akt. *Molecular Endocrinology*, 13(2), 191–201. <https://doi.org/10.1210/mend.13.2.0230>
- Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. *Journal of Neuroscience Research*, 74(3), 342–352. <https://doi.org/10.1002/jnr.10737>
- Allison, A. C. (2001). The possible role of vitamin K deficiency in the pathogenesis of Alzheimer's disease and in augmenting brain damage associated with cardiovascular disease. *Medical Hypotheses*, 57(2), 151–155. <https://doi.org/10.1054/mehy.2001.1307>
- Almquist, H. (1935). Stokstad ELR: Haemorrhagic chick disease of dietary origin. *J Biol Chem*, 111, 105–113.
- Alonso, A. C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5562–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5562>
- Alonso, A., Jacobs, D. R., Menotti, A., Nissinen, A., Dontas, A., Kafatos, A., & Kromhout, D. (2009). Cardiovascular risk factors and dementia mortality: 40 years of follow-up in the Seven Countries Study. *Journal of the Neurological Sciences*, 280(1–2), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.02.004>
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Alzheimer's Association. (2022). 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 18(4), 700–789. <https://doi.org/10.1002/alz.12638>
- Alzheimer's Association. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Anastasiou, C. A., Yannakouli, M., Kontogianni, M. D., Kosmidis, M. H., Mamalaki, E., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G., Sakka, P., Tsapanou, A., Lykou, A., & Scarmeas, N. (2018). Mediterranean Lifestyle in Relation to Cognitive Health: Results from the HELIAD Study. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101557>
- Andel, R., Crowe, M., Pedersen, N. L., Fratiglioni, L., Johansson, B., & Gatz, M. (2008). Physical Exercise at Midlife and Risk of Dementia Three Decades Later: A Population-

- Based Study of Swedish Twins. *The Journals of Gerontology: Series A*, 63(1), 62–66.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/63.1.62>
- Andrews, S. J., Fulton-Howard, B., O'Reilly, P., Marcora, E., Goate, A. M., & collaborators of the Alzheimer's Disease Genetics Consortium. (2021). Causal Associations Between Modifiable Risk Factors and the Alzheimer's Phenome. *Annals of Neurology*, 89(1), 54–65. <https://doi.org/10.1002/ana.25918>
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 592(5), 692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
- Apelt, J., Bigl, M., Wunderlich, P., & Schliebs, R. (2004). Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(7), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.006>
- Apostolova, L. G., Green, A. E., Babakchanian, S., Hwang, K. S., Chou, Y.-Y., Toga, A. W., & Thompson, P. M. (2012). Hippocampal atrophy and ventricular enlargement in normal aging, mild cognitive impairment (MCI), and Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 26(1), 17–27. <https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3182163b62>
- Arispe, N. (2004). Architecture of the Alzheimer's A $\beta$  Ion Channel Pore. *Journal of Membrane Biology*, 197(1), 33–48. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-0638-7>
- Arispe, N., Pollard, H. B., & Rojas, E. (1993). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10573–10577. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10573>
- Arispe, N., Pollard, H. B., & Rojas, E. (1994). The Ability of Amyloid  $\beta$ -Protein [A $\beta$ P (1–40)] to Form Ca<sup>2+</sup> Channels Provides a Mechanism for Neuronal Death in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 747(1), 256–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44414.x>
- Arispe, N., Rojas, E., & Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 567–571. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.567>

- Armstrong, N. M., An, Y., Doshi, J., Erus, G., Ferrucci, L., Davatzikos, C., Deal, J. A., Lin, F. R., & Resnick, S. M. (2019). Association of Midlife Hearing Impairment With Late-Life Temporal Lobe Volume Loss. *JAMA Otolaryngology-- Head & Neck Surgery*, *145*(9), 794–802. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.1610>
- Arner, P. (2018). *Fat Tissue Growth and Development in Humans* (pp. 37–45). <https://doi.org/10.1159/000486491>
- Aureli, M., Grassi, S., Prioni, S., Sonnino, S., & Prinetti, A. (2015). Lipid membrane domains in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1851*(8), 1006–1016. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.02.001>
- Azzi, A., Gysin, R., Kempna, P., Munteanu, A., Negis, Y., Villacorta, L., Viasrius, T., & Zingg, J.-M. (2004). Vitamin E Mediates Cell Signaling and Regulation of Gene Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1031*(1), 86–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1331.009>
- Baba, H., & Ishibashi, T. (2019). *The Role of Sulfatides in Axon–Glia Interactions* (pp. 165–179). [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9636-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9636-7_11)
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer’s disease. *Neuropeptides*, *52*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Bartels, C., Wagner, M., Wolfsgruber, S., Ehrenreich, H., Schneider, A., & Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. (2018). Impact of SSRI Therapy on Risk of Conversion From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer’s Dementia in Individuals With Previous Depression. *The American Journal of Psychiatry*, *175*(3), 232–241. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17040404>
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science*, *217*(4558), 408–414. <https://doi.org/10.1126/science.7046051>
- Bateman, R. J., Barthélemy, N. R., & Horie, K. (2020). Another step forward in blood-based diagnostics for Alzheimer’s disease. *Nature Medicine*, *26*(3), 314–316. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0797-4>
- Batheja, A. D., Uhlinger, D. J., Carton, J. M., Ho, G., & D’Andrea, M. R. (2003). Characterization of Serine Palmitoyltransferase in Normal Human Tissues. *Journal of*

- Histochemistry* & *Cytochemistry*, 51(5), 687–696.  
<https://doi.org/10.1177/002215540305100514>
- Batra, R., Arnold, M., Wörheide, M. A., Allen, M., Wang, X., Blach, C., Levey, A. I., Seyfried, N. T., Ertekin-Taner, N., Bennett, D. A., Kastenmüller, G., Kaddurah-Daouk, R. F., & Krumsiek, J. (2023). The landscape of metabolic brain alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 19(3), 980–998. <https://doi.org/10.1002/alz.12714>
- Behl. (1999). Vitamin E and Other Antioxidants in Neuroprotection. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 69(3), 213–219. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.69.3.213>
- Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.-C., Curran, E., Citron, M., & Vassar, R. (2000). Expression Analysis of BACE2 in Brain and Peripheral Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20647–20651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002688200>
- Benson, D. F., Kuhl, D. E., Hawkins, R. A., Phelps, M. E., Cummings, J. L., & Tsai, S. Y. (1983). The Fluorodeoxyglucose 18F Scan in Alzheimer's Disease and Multi-infarct Dementia. *Archives of Neurology*, 40(12), 711–714. <https://doi.org/10.1001/archneur.1983.04050110029003>
- Bernardini, C., Algieri, C., La Mantia, D., Trombetti, F., Pagliarani, A., Forni, M., & Nesci, S. (2021). Vitamin K Vitamers Differently Affect Energy Metabolism in IPEC-J2 Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.682191>
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80510-3)
- Binder, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1371–1378. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>
- Binder, M. D., Cate, H. S., Prieto, A. L., Kemper, D., Butzkueven, H., Gresle, M. M., Cipriani, T., Jokubaitis, V. G., Carmeliet, P., & Kilpatrick, T. J. (2008). Gas6 Deficiency Increases Oligodendrocyte Loss and Microglial Activation in Response to Cuprizone-Induced Demyelination. *The Journal of Neuroscience*, 28(20), 5195–5206. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1180-08.2008>
- Binder, M. D., Xiao, J., Kemper, D., Ma, G. Z. M., Murray, S. S., & Kilpatrick, T. J. (2011). Gas6 Increases Myelination by Oligodendrocytes and Its Deficiency Delays Recovery following Cuprizone-Induced Demyelination. *PLoS ONE*, 6(3), e17727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017727>

- Binkley, S., MacCorquodale, D., Thayer, S., & Doisy, E. (1940). The constitution of vitamin K<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, *133*, 721–729.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, *385*(6618), 729–733. <https://doi.org/10.1038/385729a0>
- Blass, J. P., Sheu, R. K., & Gibson, G. E. (2000). Inherent Abnormalities in Energy Metabolism in Alzheimer Disease: Interaction with Cerebrovascular Compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *903*(1), 204–221. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06370.x>
- Bloudek, L. M., Spackman, D. E., Blankenburg, M., & Sullivan, S. D. (2011a). Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *26*(4), 627–645. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110458>
- Bloudek, L. M., Spackman, D. E., Blankenburg, M., & Sullivan, S. D. (2011b). Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *26*(4), 627–645. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110458>
- Blusztajn, J. K., & Slack, B. E. (2023). Accelerated Breakdown of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Is a Predominant Brain Metabolic Defect in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *93*(4), 1285–1289. <https://doi.org/10.3233/JAD-230061>
- Booth, S. L., & Rajabi, A. Al. (2008). *Determinants of Vitamin K Status in Humans* (pp. 1–22). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00001-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00001-5)
- Booth, S. L., Shea, M. K., Barger, K., Leurgans, S. E., James, B. D., Holland, T. M., Agarwal, P., Fu, X., Wang, J., Matuszek, G., & Schneider, J. A. (2022). Association of vitamin K with cognitive decline and neuropathology in community-dwelling older persons. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *8*(1). <https://doi.org/10.1002/trc2.12255>
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., & Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's Disease–Linked Presenilin 1 Variants Elevate A $\beta$ <sub>1–42</sub>/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron*, *17*(5), 1005–1013. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80230-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80230-5)

- Borroni, M. V., Vallés, A. S., & Barrantes, F. J. (2016). The lipid habitats of neurotransmitter receptors in brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(11), 2662–2670. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.005>
- Bozelli, J. C., & Epan, R. M. (2021). Plasmalogen Replacement Therapy. *Membranes*, 11(11), 838. <https://doi.org/10.3390/membranes11110838>
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442–1452. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brenner, R. (1984). Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in Lipid Research*, 23(2), 69–96. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(84\)90008-0](https://doi.org/10.1016/0163-7827(84)90008-0)
- British Psychological Society. (2007). *Dementia: A NICE-SCIE Guideline on Supporting People With Dementia and Their Carers in Health and Social Care*.
- Brown, D. A., & London, E. (2000). Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17221–17224. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000005200>
- Brustovetsky, N., LaFrance, R., Purl, K. J., Brustovetsky, T., Keene, C. D., Low, W. C., & Dubinsky, J. M. (2005). Age-Dependent Changes in the Calcium Sensitivity of Striatal Mitochondria in Mouse Models of Huntington's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1361–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03036.x>
- Buckingham, S. D., Jones, A. K., Brown, L. A., & Sattelle, D. B. (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 61(1), 39–61. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000562>
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2015a). *Introduction to Fatty Acids and Lipids* (pp. 1–16). <https://doi.org/10.1159/000365423>
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2015b). *Introduction to Fatty Acids and Lipids* (pp. 1–16). <https://doi.org/10.1159/000365423>
- 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. W. (2013). Plant Sterols the Better

- Cholesterol in Alzheimer's Disease? A Mechanistical Study. *The Journal of Neuroscience*, 33(41), 16072–16087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1506-13.2013>
- Butner, K. A., & Kirschner, M. W. (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *The Journal of Cell Biology*, 115(3), 717–730. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.717>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1S). <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Calder, P. C., Yaqoob, P., Harvey, D. J., Watts, A., & Newsholme, E. A. (1994). Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochemical Journal*, 300(2), 509–518. <https://doi.org/10.1042/bj3000509>
- Calderon-Garcidueñas, A. L., & Duyckaerts, C. (2017). Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 325–337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7>
- Calon, F., Lim, G. P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Ashe, K. H., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2004a). Docosahexaenoic Acid Protects from Dendritic Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Neuron*, 43(5), 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.013>
- Calon, F., Lim, G. P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Ashe, K. H., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2004b). Docosahexaenoic Acid Protects from Dendritic Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Neuron*, 43(5), 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.013>
- Cammack, R., Atwood, T., Campbell, P., Parish, H., Smith, A., Vella, F., & Stirling, J. (Eds.). (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acref/9780198529170.001.0001>
- Candore, G., Bulati, M., Caruso, C., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., Di Bona, D., Duro, G., Lio, D., Matranga, D., Pellicanò, M., Rizzo, C., Scapagnini, G., & Vasto, S. (2010). Inflammation, Cytokines, Immune Response, Apolipoprotein E, Cholesterol, and Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Therapeutic Implications. *Rejuvenation Research*, 13(2–3), 301–313. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.0993>
- Carlberg, C. (1999). Lipid soluble vitamins in gene regulation. *BioFactors*, 10(2–3), 91–97. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100202>

- Carrié, I., Vicaretti, R., Potvin, S., Ferland, G., Portoukalian, J., & Rochford, J. (2004). Menaquinone-4 Concentration Is Correlated with Sphingolipid Concentrations in Rat Brain. *The Journal of Nutrition*, *134*(1), 167–172. <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.167>
- Cerk, I. K., Wechselberger, L., & Oberer, M. (2017). Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Current Protein & Peptide Science*, *19*(2). <https://doi.org/10.2174/1389203718666170918160110>
- Cerqua, C., Casarin, A., Pierrel, F., Vazquez Fonseca, L., Viola, G., Salviati, L., & Trevisson, E. (2019). Vitamin K2 cannot substitute Coenzyme Q10 as electron carrier in the mitochondrial respiratory chain of mammalian cells. *Scientific Reports*, *9*(1), 6553. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43014-y>
- Chawluk, J. B., Alavi, A., Dann, R., Hurtig, H. I., Bais, S., Kushner, M. J., Zimmerman, R. A., & Reivich, M. (1987). Positron emission tomography in aging and dementia: effect of cerebral atrophy. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *28*(4), 431–437.
- Chen, J.-C., Espeland, M. A., Brunner, R. L., Lovato, L. C., Wallace, R. B., Leng, X., Phillips, L. S., Robinson, J. G., Kotchen, J. M., Johnson, K. C., Manson, J. E., Stefanick, M. L., Sarto, G. E., & Mysiw, W. J. (2016). Sleep duration, cognitive decline, and dementia risk in older women. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, *12*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.03.004>
- Cheng, T., Liu, D., Griffin, J. H., Fernández, J. A., Castellino, F., Rosen, E. D., Fukudome, K., & Zlokovic, B. V. (2003). Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nature Medicine*, *9*(3), 338–342. <https://doi.org/10.1038/nm826>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Chouet, J., Ferland, G., Féart, C., Rolland, Y., Presse, N., Boucher, K., Barberger-Gateau, P., Beauchet, O., & Annweiler, C. (2015). Dietary Vitamin K Intake Is Associated with Cognition and Behaviour among Geriatric Patients: The CLIP Study. *Nutrients*, *7*(8), 6739–6750. <https://doi.org/10.3390/nu7085306>

- Collins, M. D., & Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiological Reviews*, 45(2), 316–354. <https://doi.org/10.1128/mr.45.2.316-354.1981>
- Colpa-Boonstra, J. P., & Slater, E. C. (1958). The possible role of vitamin K in the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 27, 122–133. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90298-1](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90298-1)
- Conly, J. M., & Stein, K. (1992). Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *The American Journal of Gastroenterology*, 87(3), 311–316.
- Conquer, J. A., Tierney, M. C., Zecevic, J., Bettger, W. J., & Fisher, R. H. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*, 35(12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0646-3>
- Croze, M. L., & Zimmer, L. (2018). Ozone Atmospheric Pollution and Alzheimer's Disease: From Epidemiological Facts to Molecular Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(2), 503–522. <https://doi.org/10.3233/JAD-170857>
- Cuchillo-Ibanez, I., Seereeram, A., Byers, H. L., Leung, K., Ward, M. A., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (2008). Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *The FASEB Journal*, 22(9), 3186–3195. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109181>
- Cummings, J., Rabinovici, G. D., Atri, A., Aisen, P., Apostolova, L. G., Hendrix, S., Sabbagh, M., Selkoe, D., Weiner, M., & Salloway, S. (2022). Aducanumab: Appropriate Use Recommendations Update. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 9(2), 221–230. <https://doi.org/10.14283/jpad.2022.34>
- da Silva, F. L., Coelho Cerqueira, E., de Freitas, M. S., Gonçalves, D. L., Costa, L. T., & Follmer, C. (2013). Vitamins K interact with N-terminus  $\alpha$ -synuclein and modulate the protein fibrillization in vitro. Exploring the interaction between quinones and  $\alpha$ -synuclein. *Neurochemistry International*, 62(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.001>
- Dabrowski, S., & Kur, J. (1998). Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). *Acta Biochimica Polonica*, 45(3), 661–667.

- Dagai, L., Peri-Naor, R., & Birk, R. Z. (2009). Docosahexaenoic Acid Significantly Stimulates Immediate Early Response Genes and Neurite Outgrowth. *Neurochemical Research*, 34(5), 867–875. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9845-z>
- Dahm, R. (2006). Alzheimer's discovery. *Current Biology: CB*, 16(21), R906-10. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.056>
- Dam, H. (1929). Cholesterinstoffwechsel in Hühnereiern und Hühnchen. *Biochemische Zeitschrift*, 215, 475–492.
- Dam, H. (1935). The antihæmorrhagic vitamin of the chick. Occurrence and chemical nature. *Nature*, 135, 652–653.
- Dam, V., Dalmeijer, G. W., Vermeer, C., Drummen, N. E., Knapen, M. H., van der Schouw, Y. T., & Beulens, J. W. (2015). Association Between Vitamin K and the Metabolic Syndrome: A 10-Year Follow-Up Study in Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), 2472–2479. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4449>
- Danziger, J. (2008). Vitamin K-dependent Proteins, Warfarin, and Vascular Calcification. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(5), 1504–1510. <https://doi.org/10.2215/CJN.00770208>
- Dash, N. R., & Al Bataineh, M. T. (2021). Metagenomic Analysis of the Gut Microbiome Reveals Enrichment of Menaquinones (Vitamin K2) Pathway in Diabetes Mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal*, 45(1), 77–85. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0202>
- Davidson, R. T., Foley, A. L., Engelke, J. A., & Suttie, J. W. (1998). Conversion of Dietary Phylloquinone to Tissue Menaquinone-4 in Rats is Not Dependent on Gut Bacteria. *The Journal of Nutrition*, 128(2), 220–223. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.220>
- de Carvalho, C., & Caramujo, M. (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 23(10), 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- de Fouw, N. J., Haverkate, F., Bertina, R. M., Koopman, J., van Wijngaarden, A., & van Hinsbergh, V. W. (1986). The cofactor role of protein S in the acceleration of whole blood clot lysis by activated protein C in vitro. *Blood*, 67(4), 1189–1192.
- Denisova, N. A. (1990). Phospholipid composition of myelin and synaptosomal proteolipid from vertebrate brain. *International Journal of Biochemistry*, 22(5), 439–442. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(90\)90255-2](https://doi.org/10.1016/0020-711X(90)90255-2)
- Denisova, N. A., & Booth, S. L. (2005). Vitamin K and Sphingolipid Metabolism: Evidence to Date. *Nutrition Reviews*, 63(4), 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00129.x>

- Denisova, N. A., Gorbunov, N. V., & Avrova, N. F. (1991). Fatty acid composition of phospholipids of myelin and synaptosomal proteolipid complexes from vertebrate brain. *International Journal of Biochemistry*, 23(9), 811–818. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(91\)90064-T](https://doi.org/10.1016/0020-711X(91)90064-T)
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1. <https://doi.org/10.3791/2565>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
- Dexter, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- DGN e. V. & DGPPN e. V. (2023, November 8). *S3-Leitlinie Demenzen*.
- Di Scipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G., & Davie, E. W. (1977). A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*, 16(4), 698–706. <https://doi.org/10.1021/bi00623a022>
- Diaz, J. C., Simakova, O., Jacobson, K. A., Arispe, N., & Pollard, H. B. (2009). Small molecule blockers of the Alzheimer A $\beta$  calcium channel potently protect neurons from A $\beta$  cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3348–3353. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813355106>
- Dickson, D. W. (1997). The Pathogenesis of Senile Plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(4), 321–339. <https://doi.org/10.1097/00005072-199704000-00001>
- Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M. H., & Colart, I. (2015). *Internationale Klassifikation psychischer Störungen* (WHO, Ed.). Hogrefe .
- Diniz, B. S., Butters, M. A., Albert, S. M., Dew, M. A., & Reynolds, C. F. (2013). Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 202(5), 329–335. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.112.118307>
- Dougall, N. J., Bruggink, S., & Ebmeier, K. P. (2004). Systematic review of the diagnostic accuracy of 99mTc-HMPAO-SPECT in dementia. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 12(6), 554–570. <https://doi.org/10.1176/appi.ajgp.12.6.554>

- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Dulin, F., L veill , F., Ortega, J. B., Mornon, J.-P., Buisson, A., Callebaut, I., & Colloc'h, N. (2008). p3 peptide, a truncated form of A $\beta$  devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Letters*, 582(13), 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.002>
- Duncan, R. E., & Bazinet, R. P. (2010). Brain arachidonic acid uptake and turnover: implications for signaling and bipolar disorder. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(2), 130–138. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328336b615>
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J. M., Lemaire, H. G., Kang, J., Müller-Hill, B., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 7(4), 949–957. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02900.x>
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 258–289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, 160(1), 113–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207113>
- Eldufani, J., & Blaise, G. (2019). The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, 5, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.03.004>
- Engelborghs, S., De Vreese, K., Van de Casteele, T., Vanderstichele, H., Van Everbroeck, B., Cras, P., Martin, J.-J., Vanmechelen, E., & De Deyn, P. P. (2008). Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiology of Aging*, 29(8), 1143–1159. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.016>
- Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Ruitenberg, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., Witteman, J. C. M., & Breteler, M. M. B. (2002). Diet and risk of dementia: Does fat matter? *Neurology*, 59(12), 1915–1921. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000038345.77753.46>
- Epand, R. M. (2015). Introduction to membrane lipids. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1232, 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_1)

- Escribá, P. V., González-Ros, J. M., Goñi, F. M., Kinnunen, P. K. J., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A. M., Busquets, X., Horváth, I., & Barceló-Coblijn, G. (2008). Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 829–875. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x>
- Esmon, C., & Esmon, N. (1984). Protein C Activation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 10(02), 122–130. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004414>
- Estes, R. E., Lin, B., Khera, A., & Davis, M. Y. (2021). Lipid Metabolism Influence on Neurodegenerative Disease Progression: Is the Vehicle as Important as the Cargo? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.788695>
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Falls, D. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research*, 284(1), 14–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00102-7)
- Fann, J. R., Ribe, A. R., Pedersen, H. S., Fenger-Grøn, M., Christensen, J., Benros, M. E., & Vestergaard, M. (2018). Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *The Lancet. Psychiatry*, 5(5), 424–431. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30065-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30065-8)
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., & Choe, H. (2000). BACE2, a  $\beta$ -secretase homolog, cleaves at the  $\beta$  site and within the amyloid- $\beta$  region of the amyloid- $\beta$  precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9712–9717. <https://doi.org/10.1073/pnas.160115697>
- Féart, C. (2009). Adherence to a Mediterranean Diet, Cognitive Decline, and Risk of Dementia. *JAMA*, 302(6), 638. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1146>

- Feldman, H. H., Jacova, C., Robillard, A., Garcia, A., Chow, T., Borrie, M., Schipper, H. M., Blair, M., Kertesz, A., & Chertkow, H. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, *178*(7), 825–836. <https://doi.org/10.1503/cmaj.070798>
- Feles, S., Overath, C., Reichardt, S., Diegeler, S., Schmitz, C., Kronenberg, J., Baumstark-Khan, C., Hemmersbach, R., Hellweg, C. E., & Liemersdorf, C. (2022). Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. *Methods and Protocols*, *5*(4), 58. <https://doi.org/10.3390/mps5040058>
- Ferland, G. (2009). The Vitamin K-dependent Proteins: An Update. *Nutrition Reviews*, *56*(8), 223–230. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01753.x>
- Ferland, G. (2012a). The discovery of vitamin K and its clinical applications. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *61*(3), 213–218. <https://doi.org/10.1159/000343108>
- Ferland, G. (2012b). Vitamin K, an emerging nutrient in brain function. *BioFactors*, *38*(2), 151–157. <https://doi.org/10.1002/biof.1004>
- Ferland, G. (2013). Vitamin K and Brain Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *39*(08), 849–855. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1357481>
- Fernandez, F., & Collins, M. D. (1987). Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *41*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02191.x>
- Ferreira, G. C., & McKenna, M. C. (2017). I-Carnitine and Acetyl-I-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochemical Research*, *42*(6), 1661–1675. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2288-7>
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C., & Camins, A. (2018). Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *62*(3), 1223–1240. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>
- Foley, P. (2010). Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(8), 750–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.004>
- Frankfort, S. V, Tulner, L. R., van Campen, J. P. C. M., Verbeek, M. M., Jansen, R. W. M. M., & Beijnen, J. H. (2008). Amyloid beta protein and tau in cerebrospinal fluid and plasma

- as biomarkers for dementia: a review of recent literature. *Current Clinical Pharmacology*, 3(2), 123–131. <https://doi.org/10.2174/157488408784293723>
- Fraser, T., Tayler, H., & Love, S. (2010). Fatty Acid Composition of Frontal, Temporal and Parietal Neocortex in the Normal Human Brain and in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 35(3), 503–513. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0087-5>
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Friesen, R. W., & Innis, S. M. (2009). Dietary Arachidonic Acid to EPA and DHA Balance Is Increased among Canadian Pregnant Women with Low Fish Intake. *The Journal of Nutrition*, 139(12), 2344–2350. <https://doi.org/10.3945/jn.109.112565>
- Fukaya, T., Gondaira, T., Kashiya, Y., Kotani, S., Ishikura, Y., Fujikawa, S., Kiso, Y., & Sakakibara, M. (2007). Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiology of Aging*, 28(8), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.023>
- Funakoshi, H., Yonemasu, T., Nakano, T., Matumoto, K., & Nakamura, T. (2002). Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 68(2), 150–160. <https://doi.org/10.1002/jnr.10211>
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., & Mattson, M. P. (1996). Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of  $\alpha$ -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain. *Journal of Neurochemistry*, 67(5), 1882–1896. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051882.x>
- Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). *An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown* (pp. 1–23). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1)
- Gauster, M., Rechberger, G., Sovic, A., Hörl, G., Steyrer, E., Sattler, W., & Frank, S. (2005). Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research*, 46(7), 1517–1525. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500054-JLR200>
- Gely-Pernot, A., Coronas, V., Harnois, T., Prestoz, L., Mandairon, N., Didier, A., Berjeaud, J. M., Monvoisin, A., Bourmeyster, N., De Frutos, P. G., Philippe, M., & Benzakour, O. (2012). An Endogenous Vitamin K-Dependent Mechanism Regulates Cell Proliferation in the Brain Subventricular Stem Cell Niche. *Stem Cells*, 30(4), 719–731. <https://doi.org/10.1002/stem.1045>

- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., & Vias, M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, *111*(6), 1021–1046. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
- Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., & Herman, M. M. (2006). High cholesterol content in neurons increases BACE,  $\beta$ -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Experimental Neurology*, *200*(2), 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.03.019>
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, *6*(10), 995–1001. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995>
- Giusto, N. M., Roque, M. E., & Ilincheta de Boschero, M. G. (1992). Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids*, *27*(11), 835–839. <https://doi.org/10.1007/BF02535859>
- Glennner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *120*(3), 885–890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., & Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, *8*(1), 159–168. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90117-V)
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, *3*(4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
- Gómez Ravetti, M., Rosso, O. A., Berretta, R., & Moscato, P. (2010). Uncovering Molecular Biomarkers That Correlate Cognitive Decline with the Changes of Hippocampus' Gene Expression Profiles in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *5*(4), e10153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010153>
- Gong, C., Shaikh, S., Wang, J., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1995). Phosphatase Activity Toward Abnormally Phosphorylated  $\tau$ : Decrease in Alzheimer Disease Brain. *Journal of Neurochemistry*, *65*(2), 732–738. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x>

- Gorbacheva, L., Pinelis, V., Ishiwata, S., Strukova, S., & Reiser, G. (2010). Activated protein C prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor- $\kappa$ B in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, *165*(4), 1138–1146. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.027>
- Gornati, R., Berra, B., Montorfano, G., Martini, C., Ciana, G., Ferrari, P., Romano, M., & Bembi, B. (2002). Glycolipid Analysis of Different Tissues and Cerebrospinal Fluid in Type II Gaucher Disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *25*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1023/A:1015137917508>
- Götz, M. E., Gerstner, A., Harth, R., Dirr, A., Janetzky, B., Kuhn, W., Riederer, P., & Gerlach, M. (2000). Altered redox state of platelet coenzyme Q 10 in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *107*(1), 41–48. <https://doi.org/10.1007/s007020050003>
- Grabner, G. F., Xie, H., Schweiger, M., & Zechner, R. (2021). Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nature Metabolism*, *3*(11), 1445–1465. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00493-6>
- Green, K. N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E. B., Yurko-Mauro, K. A., Ellis, L., & LaFerla, F. M. (2007). Dietary Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Ameliorate Amyloid- $\beta$  and Tau Pathology via a Mechanism Involving Presenilin 1 Levels. *The Journal of Neuroscience*, *27*(16), 4385–4395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0055-07.2007>
- Griffiths, T. D., Lad, M., Kumar, S., Holmes, E., McMurray, B., Maguire, E. A., Billig, A. J., & Sedley, W. (2020). How Can Hearing Loss Cause Dementia? *Neuron*, *108*(3), 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.003>
- Grimm, M., Hauptenthal, V., Rothhaar, T., Zimmer, V., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Lehmann, J., Grimm, H., & Hartmann, T. (2013). Effect of Different Phospholipids on  $\alpha$ -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 5879–5898. <https://doi.org/10.3390/ijms14035879>
- Grimm, M. O. W., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2007). Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(8), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.06.004>
- Grimm, M. O. W., Grimm, H. S., Pätzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschäpe, J.-A., Strooper, B. De, Müller, U., Shen, J., & Hartmann, T. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- $\beta$  and presenilin. *Nature Cell Biology*, *7*(11), 1118–1123. <https://doi.org/10.1038/ncb1313>

- Grimm, M. O. W., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11302–11311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801520200>
- Grimm, M. O. W., Grösgen, 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. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7713–7722. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.073>
- Grimm, M. O. W., Grösgen, S., Riemenschneider, M., Tanila, H., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2011b). From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin–plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7713–7722. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.073>
- Grimm, M. O. W., 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. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2011/695413>
- Grimm, M. O. W., Hauptenthal, V. J., Mett, J., Stahlmann, C. P., Blümel, T., Mylonas, N. T., Endres, K., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2016). Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegenerative Diseases*, 16(1–2), 44–54. <https://doi.org/10.1159/000440839>
- Grimm, M. O. W., 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  $\alpha$ -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5879–5898. <https://doi.org/10.3390/ijms14035879>
- Grimm, M. O. W., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14028–14039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182329>

- Grimm, M. O. W., Mett, J., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2017). APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00063>
- Grimm, M. O. W., Mett, J., Stahlmann, C. P., Hauptenthal, V. J., Blümel, T., Stötzel, H., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2016). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid- $\beta$  by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(6), 534–542. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0149>
- Grimm, M. O. W., Rothhaar, T. L., & Hartmann, T. (2012). The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Experimental Brain Research*, 217(3–4), 365–375. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2975-6>
- Grimm, M. O. W., Zimmer, V. C., Lehmann, J., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2013). The Impact of Cholesterol, DHA, and Sphingolipids on Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/814390>
- Grösgen, S. (2013). *Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer-Krankheit*. Universität des Saarlandes.
- Grösgen, S., Grimm, M. O. W., Frieß, P., & Hartmann, T. (2010). Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8), 966–974. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.002>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 6084–6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13), 4913–4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>
- Grziwa, B., Grimm, M. O. W., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6803–6808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210047200>
- Gu, J., Chen, L., Sun, R., Wang, J.-L., Wang, J., Lin, Y., Lei, S., Zhang, Y., Lv, D., Jiang, F., Deng, Y., Collman, J. P., & Fu, L. (2022). Plasmalogens Eliminate Aging-Associated Synaptic Defects and Microglia-Mediated Neuroinflammation in Mice. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.815320>

- Guerreiro, R., & Bras, J. (2015). The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Medicine*, 7(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0232-5>
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T. Y., Xu, H., & Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3021–3024.
- Haeflner, E. W., & Privett, O. S. (1975). Influence of dietary fatty acids on membrane properties and enzyme activities of liver mitochondria of normal and hypophysectomized rats. *Lipids*, 10(2), 75–81. <https://doi.org/10.1007/BF02532159>
- Hager, K. (2022). [Alzheimer's disease-Which substances are at present in phase III studies?]. *Der Nervenarzt*, 93(10), 1028–1034. <https://doi.org/10.1007/s00115-022-01275-5>
- Halder, M., Petsophonakul, P., Akbulut, A., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2019). Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 896. <https://doi.org/10.3390/ijms20040896>
- Han, X., & Ye, H. (2021). Overview of Lipidomic Analysis of Triglyceride Molecular Species in Biological Lipid Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 8895–8909. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07175>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175–191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
- Harris, E. (2023). Alzheimer Drug Lecanemab Gains Traditional FDA Approval. *JAMA*, 330(6), 495. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.12548>
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., & Grimm, M. O. W. (2007). Alzheimer's disease: the lipid connection. *Journal of Neurochemistry*, 103(s1), 159–170. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04715.x>
- Harvey, P. D. (2019). Domains of cognition and their assessment . *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 21(3), 227–237. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.3/pharvey>
- Hashimoto, M., Hossain, S., Agdul, H., & Shido, O. (2005). Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid  $\beta$ -infused rats relates to the decreases of amyloid  $\beta$  and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1–3), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2005.11.011>
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J., & Shido, O. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *Journal of Neurochemistry*, 81(5), 1084–1091. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00905.x>
- Hashimoto, M., Tanabe, Y., Fujii, Y., Kikuta, T., Shibata, H., & Shido, O. (2005). Chronic Administration of Docosahexaenoic Acid Ameliorates the Impairment of Spatial Cognition Learning Ability in Amyloid  $\beta$ -Infused Rats. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 549–555. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.549>
- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.-X., & Schuchman, E. H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 31(3), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.010>
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919–947. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0438-z>
- Herholz, K., Carter, S. F., & Jones, M. (2007). Positron emission tomography imaging in dementia. *The British Journal of Radiology*, 80 Spec No 2, S160-7. <https://doi.org/10.1259/bjr/97295129>
- Hicks, D. A., Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2012). Lipid Rafts and Alzheimer's Disease: Protein-Lipid Interactions and Perturbation of Signaling. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00189>
- Hirose, K., Okajima, K., Taoka, Y., Uchiba, M., Tagami, H., Nakano, K., Utoh, J., Okabe, H., & Kitamura, N. (2000). Activated Protein C Reduces the Ischemia/Reperfusion-Induced Spinal Cord Injury in Rats by Inhibiting Neutrophil Activation. *Annals of Surgery*, 232(2), 272–280. <https://doi.org/10.1097/00000658-200008000-00018>
- Hirota, Y., & Suhara, Y. (2019). New Aspects of Vitamin K Research with Synthetic Ligands: Transcriptional Activity via SXR and Neural Differentiation Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3006. <https://doi.org/10.3390/ijms20123006>
- Höglinger, G., & Trenkwalder, C. (2023). *Parkinson-Krankheit, S2k-Leitlinie*. [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien)
- Holliday, M. A. (1971). Metabolic rate and organ size during growth from infancy to maturity and during late gestation and early infancy. *Pediatrics*, 47(1), Suppl 2:169+.

- 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*(17), 3565–3575. <https://doi.org/10.1021/bi300303g>
- Honsho, M., Okumoto, K., Tamura, S., & Fujiki, Y. (2020). *Peroxisome Biogenesis Disorders* (pp. 45–54). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_4)
- 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*(4), 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.12.011>
- Hoscheidt, S., Sanderlin, A. H., Baker, L. D., Jung, Y., Lockhart, S., Kellar, D., Whitlow, C. T., Hanson, A. J., Friedman, S., Register, T., Leverenz, J. B., & Craft, S. (2022). Mediterranean and Western diet effects on Alzheimer's disease biomarkers, cerebral perfusion, and cognition in mid-life: A randomized trial. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *18*(3), 457–468. <https://doi.org/10.1002/alz.12421>
- Hossain, S., Hashimoto, M., Katakura, M., Miwa, K., Shimada, T., & Shido, O. (2009). Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of *in vitro* A $\beta$  1–42 fibrillation and A $\beta$  1–42 -induced toxicity in SH-S5Y5 cells. *Journal of Neurochemistry*, *111*(2), 568–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06336.x>
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(5), 469–477. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>
- Hoy, S. M. (2023). Lecanemab: First Approval. *Drugs*, *83*(4), 359–365. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01851-2>
- 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. *Nature Neuroscience*, *9*(12), 1520–1525. <https://doi.org/10.1038/nn1797>
- Huang, S.-H., Fang, S.-T., & Chen, Y.-C. (2021). Molecular Mechanism of Vitamin K2 Protection against Amyloid- $\beta$ -Induced Cytotoxicity. *Biomolecules*, *11*(3), 423. <https://doi.org/10.3390/biom11030423>
- Hung, S.-C., Liao, K.-F., Muo, C.-H., Lai, S.-W., Chang, C.-W., & Hung, H.-C. (2015). Hearing Loss is Associated With Risk of Alzheimer's Disease: A Case-Control Study in Older People. *Journal of Epidemiology*, *25*(8), 517–521. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20140147>

- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M.-Y., & Doms, R. W. (2002).  $\beta$ -Secretase Processing in the Trans-Golgi Network Preferentially Generates Truncated Amyloid Species That Accumulate in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16278–16284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111141200>
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M.-Y., & Doms, R. W. (2000). Maturation and Endosomal Targeting of  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33729–33737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004175200>
- Hussain, G., Anwar, H., Rasul, A., Imran, A., Qasim, M., Zafar, S., Imran, M., Kamran, S. K. S., Aziz, N., Razzaq, A., Ahmad, W., Shabbir, A., Iqbal, J., Baig, S. M., Ali, M., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Sun, T., Muhammad, A., & Muhammad Umair, A. (2020). Lipids as biomarkers of brain disorders. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(3), 351–374. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1529653>
- Hutchinson, A. D., & Mathias, J. L. (2007). Neuropsychological deficits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: a meta-analytic review. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 78(9), 917–928. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.100669>
- Huy, P. D. Q., Yu, Y.-C., Ngo, S. T., Thao, T. Van, Chen, C., Li, M. S., & Chen, Y.-C. (2013). In silico and in vitro characterization of anti-amyloidogenic activity of vitamin K3 analogues for Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(4), 2960–2969. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.026>
- Icer, M. A., Arslan, N., & Gezmen-Karadag, M. (2021). Effects of vitamin E on neurodegenerative diseases: an update. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 81(1), 21–33. <https://doi.org/10.21307/ane-2021-003>
- Ihl, R., Grass-Kapanke, B., Lahrem, P., Brinkmeyer, J., Fischer, S., Gaab, N., & Kaupmannsennecke, C. (2000). [Development and validation of a test for early diagnosis of dementia with differentiation from depression (TFDD)]. *Fortschritte Der Neurologie-Psychiatrie*, 68(9), 413–422. <https://doi.org/10.1055/s-2000-11799>
- Inoue, S. (2008). In situ A  $\beta$  pores in AD brain are cylindrical assembly of A  $\beta$  protofilaments. *Amyloid*, 15(4), 223–233. <https://doi.org/10.1080/13506120802524858>
- 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 A $\beta$  by Nephilysin. *Science*, 292(5521), 1550–1552. <https://doi.org/10.1126/science.1059946>
- Jack, C. R., Albert, M. S., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carrillo, M. C., Thies, B., & Phelps, C. H. (2011). Introduction to the recommendations from the National

- Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.004>
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Contributors. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
- Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., Chai, X., Proctor, N. K., Eichenlaub, U., Zetterberg, H., Blennow, K., Reiman, E. M., Stomrud, E., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine*, 26(3), 379–386. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>
- Jicha, G. (2010). Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 45. <https://doi.org/10.2147/CIA.S5231>
- Jones, L. L., McDonald, D. A., & Borum, P. R. (2010). Acylcarnitines: Role in brain. *Progress in Lipid Research*, 49(1), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.004>
- Kang, M. S., Ahn, K. H., Kim, S. K., Jeon, H. J., Ji, J. E., Choi, J. M., Jung, K. M., Jung, S. Y., & Kim, D. K. (2010). Hypoxia-induced neuronal apoptosis is mediated by de novo synthesis of ceramide through activation of serine palmitoyltransferase. *Cellular Signalling*, 22(4), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.015>
- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>
- Kawahara, M., Arispe, N., Kuroda, Y., & Rojas, E. (1997). Alzheimer's disease amyloid beta-protein forms Zn(2+)-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. *Biophysical Journal*, 73(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78048-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78048-2)
- Kayed, 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 (New York, N.Y.)*, *300*(5618), 486–489. <https://doi.org/10.1126/science.1079469>
- Khan, A. A., Allemailem, K. S., Alhumaydhi, F. A., Gowder, S. J. T., & Rahmani, A. H. (2020). The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, *20*(6), 855–868. <https://doi.org/10.2174/1871530320666191230141110>
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, *18*(11), 1106–1125. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200528142429>
- Kiely, A., Ferland, G., Ouliass, B., O'Toole, P. W., Purtill, H., & O'Connor, E. M. (2020). Vitamin K status and inflammation are associated with cognition in older Irish adults. *Nutritional Neuroscience*, *23*(8), 591–599. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1536411>
- Kim, D. Y., Ingano, L. A. M., Carey, B. W., Pettingell, W. H., & Kovacs, D. M. (2005). Presenilin/γ-Secretase-mediated Cleavage of the Voltage-gated Sodium Channel β2-Subunit Regulates Cell Adhesion and Migration. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23251–23261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412938200>
- Kim, J. Y., Lee, H. J., Lee, S.-J., Jung, Y. H., Yoo, D. Y., Hwang, I. K., Seong, J. K., Ryu, J. M., & Han, H. J. (2017). Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid-β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1α and Akt/NF-κB pathways. *Scientific Reports*, *7*(1), 4335. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04175-w>
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2003). γ-Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(11), 6382–6387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>
- Kins, S., Kurosinski, P., Nitsch, R. M., & Götz, J. (2003). Activation of the ERK and JNK Signaling Pathways Caused by Neuron-Specific Inhibition of PP2A in Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology*, *163*(3), 833–843. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63444-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63444-X)
- Kivipelto, M., & Solomon, A. (2008). Alzheimer's disease — The ways of prevention. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, *12*, S89–S94. <https://doi.org/10.1007/BF02982595>
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., März, W., & Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α-secretase ADAM 10.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5815–5820.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.081612998>
- Kołąkowski, A., Kurzyna, P. F., Bzdęga, W., Żywno, H., Harasim-Symbor, E., Chabowski, A., & Konstantynowicz-Nowicka, K. (2021). Influence of vitamin K2 on lipid precursors of inflammation and fatty acids pathway activities in HepG2 cells. *European Journal of Cell Biology*, 100(7–8), 151188. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151188>
- Koshihara, Y., Hoshi, K., & Shiraki, M. (1993). Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochemical Pharmacology*, 46(8), 1355–1362. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90099-1)
- Kröger, E., Verreault, R., Carmichael, P.-H., Lindsay, J., Julien, P., Dewailly, É., Ayotte, P., & Laurin, D. (2009). Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 184–192. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26987>
- Kuns, B., Rosani, A., Patel, P., & Varghese, D. (2024). *Memantine*.
- L. Booth, S. (2012). Vitamin K: food composition and dietary intakes. *Food & Nutrition Research*, 56(1), 5505. <https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.5505>
- Lamprey, R. N. L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., & Singh, J. (2022). A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- Lan, J., & Jiang, D. H. (1997). Excessive iron accumulation in the brain: A possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 104(6–7), 649–660. <https://doi.org/10.1007/BF01291883>
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., & Lansbury, P. T. (2002). Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418(6895), 291–291. <https://doi.org/10.1038/418291a>
- Lauer, A. A. (2022). *Der Einfluss bioaktiver Substanzen auf die molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung*. Universität des Saarlandes.
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., & Agostoni, C. (2016). DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>

- Law, S.-H., Chan, M.-L., Marathe, G. K., Parveen, F., Chen, C.-H., & Ke, L.-Y. (2019). An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1149. <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>
- Lee, C.-H., Jo, E.-S., Yeo, J.-Y., Choi, S. J., Hwang, K. W., & Park, S.-Y. (2022). Anti-amyloidogenic effect of menaquinone-7 on betaamyloid production and aggregation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *21*(1), 93–97.
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., & Hong, J. T. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, *5*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-37>
- Lee, S. J. C., Nam, E., Lee, H. J., Savelieff, M. G., & Lim, M. H. (2017). Towards an understanding of amyloid- $\beta$  oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chemical Society Reviews*, *46*(2), 310–323. <https://doi.org/10.1039/C6CS00731G>
- Lehtisalo, J., Ngandu, T., Valve, P., Antikainen, R., Laatikainen, T., Strandberg, T., Soininen, H., Tuomilehto, J., Kivipelto, M., & Lindström, J. (2017). Nutrient intake and dietary changes during a 2-year multi-domain lifestyle intervention among older adults: secondary analysis of the Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability (FINGER) randomised controlled trial. *The British Journal of Nutrition*, *118*(4), 291–302. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001982>
- Leßig, J., & Fuchs, B. (2009). Plasmalogens in Biological Systems: Their Role in Oxidative Processes in Biological Membranes, their Contribution to Pathological Processes and Aging and Plasmalogen Analysis. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(16), 2021–2041. <https://doi.org/10.2174/092986709788682164>
- Lev, M. (1958). Apparent Requirement for Vitamin K of Rumen Strains of *Fusiformis nigrescens*. *Nature*, *181*(4603), 203–204. <https://doi.org/10.1038/181203a0>
- Lev, M. (1968). Vitamin K Deficiency in *Fusiformis nigrescens* I. Influence on Whole Cells and Cell Envelope Characteristics. *Journal of Bacteriology*, *95*(6), 2317–2324. <https://doi.org/10.1128/jb.95.6.2317-2324.1968>
- Lev, M., & Milford, A. F. (1971). Vitamin K stimulation of sphingolipid synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *45*(2), 358–362. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(71\)90826-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(71)90826-6)

- Lev, M., & Milford, A. F. (1972). Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Lipid Research*, 13(3), 364–370.
- Lev, M., & Milford, A. F. (1973). The 3-ketodihydrosphingosine synthetase of *Bacteroides melaninogenicus*: Induction by vitamin K. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 157(2), 500–508. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90668-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90668-1)
- Li, D., Ng, A., Mann, N. J., & Sinclair, A. J. (1998). Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids*, 33(4), 437–440. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0225-7>
- Li, J., Lin, J. C., Wang, H., Peterson, J. W., Furie, B. C., Furie, B., Booth, S. L., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2003). Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(13), 5816–5826. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05816.2003>
- Li, J., Wang, H., & Rosenberg, P. A. (2009). Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 87(9), 1997–2005. <https://doi.org/10.1002/jnr.22029>
- Lim, G. P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2005). A Diet Enriched with the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid Burden in an Aged Alzheimer Mouse Model. *The Journal of Neuroscience*, 25(12), 3032–3040. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4225-04.2005>
- Lim, J. R., Chae, C. W., Park, J. Y., Jung, Y. H., Yoon, J. H., Kim, M. J., Lee, H. J., Choi, G. E., & Han, H. J. (2023). Ethanol-induced ceramide production causes neuronal apoptosis by increasing MCL-1S-mediated ER-mitochondria contacts. *Neurobiology of Disease*, 177, 106009. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106009>
- Lin, H., Bhatia, R., & Lal, R. (2001). Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *The FASEB Journal*, 15(13), 2433–2444. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0377com>
- Lin, X., Wen, X., Wei, Z., Guo, K., Shi, F., Huang, T., Wang, W., & Zheng, J. (2021). Vitamin K2 protects against A $\beta$ 42-induced neurotoxicity by activating autophagy and improving mitochondrial function in *Drosophila*. *NeuroReport*, 32(6), 431–437. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001599>
- Liu, J.-J., Zhang, W., Wang, S.-S., Jia, Z.-Q., Shi, Y.-H., Yang, L., & Shi, R.-L. (2019). Effects of chain length of saturated fatty acids on A $\beta$  generation in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 698, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.024>

- Liu, S. J., Zhang, J. Y., Li, H. L., Fang, Z. Y., Wang, Q., Deng, H. M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Wang, J. Z. (2004). Tau Becomes a More Favorable Substrate for GSK-3 When It Is Prephosphorylated by PKA in Rat Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50078–50088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406109200>
- Liu-Ambrose, T., & Donaldson, M. G. (2008). Exercise and cognition in older adults: is there a role for resistance training programmes? *British Journal of Sports Medicine*, 43(1), 25–27. <https://doi.org/10.1136/bjism.2008.055616>
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., ... Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet (London, England)*, 390(10113), 2673–2734. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)
- Lopes, F. M., Schröder, R., Júnior, M. L. C. da F., Zanotto-Filho, A., Müller, C. B., Pires, A. S., Meurer, R. T., Colpo, G. D., Gelain, D. P., Kapczinski, F., Moreira, J. C. F., Fernandes, M. da C., & Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*, 1337, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.102>
- Lordan, R., Tsoupras, A., & Zabetakis, I. (2017). Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, 22(11), 1964. <https://doi.org/10.3390/molecules22111964>
- Lovell, M. A., Xie, C., & Markesbery, W. R. (2001). Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiology of Aging*, 22(2), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00235-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00235-9)
- Lu, Y., Li, T., Qureshi, H. Y., Han, D., & Paudel, H. K. (2011). Early Growth Response 1 (Egr-1) Regulates Phosphorylation of Microtubule-associated Protein Tau in Mammalian Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20569–20581. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220962>
- Lyketsos, C. G., Carrillo, M. C., Ryan, J. M., Khachaturian, A. S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., & Miller, D. S. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(5), 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2410>
- MacCorquodale, D., Binkley, S., Thayer, S., & Doisy, E. (1939). On the constitution of vitamin K1. *J Am Chem Soc*, 61, 1928–1929.

- Mackay, D. F., Russell, E. R., Stewart, K., MacLean, J. A., Pell, J. P., & Stewart, W. (2019). Neurodegenerative Disease Mortality among Former Professional Soccer Players. *The New England Journal of Medicine*, 381(19), 1801–1808. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908483>
- MacManus, A., Ramsden, M., Murray, M., Henderson, Z., Pearson, H. A., & Campbell, V. A. (2000). Enhancement of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  Influx and Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Activity by  $\beta$ -Amyloid-(1–40) in Rat Cortical Synaptosomes and Cultured Cortical Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4713–4718. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4713>
- Mahanama, A., & Wilson-Davies, E. (2021). Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery (Oxford)*, 39(11), 759–768. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.09.016>
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of  $\text{A}\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>
- Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., & Schneider, C. (1993). The Protein Encoded by a Growth Arrest-Specific Gene ( *gas6* ) Is a New Member of the Vitamin K-Dependent Proteins Related to Protein S, a Negative Coregulator in the Blood Coagulation Cascade. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4976–4985. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4976-4985.1993>
- Mann, N. J., O'Connell, S. L., Baldwin, K. M., Singh, I., & Meyer, B. J. (2010). Effects of Seal Oil and Tuna-Fish Oil on Platelet Parameters and Plasma Lipid Levels in Healthy Subjects. *Lipids*, 45(8), 669–681. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3450-z>
- Marksbery, W. R., Kryscio, R. J., Lovell, M. A., & Morrow, J. D. (2005). Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 58(5), 730–735. <https://doi.org/10.1002/ana.20629>
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nature02621>
- Mayerhöfer, T. G., Pahlow, S., & Popp, J. (2020). The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem*, 21(18), 2029–2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>
- McGahon, B., Clements, M. P., & Lynch, M. A. (1997). The ability of aged rats to sustain long-term potentiation is restored when the age-related decrease in membrane arachidonic

- acid concentration is reversed. *Neuroscience*, 81(1), 9–16.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00116-4)
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Mett, J. (2017). *Die Regulation Abeta-degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase*. Universität des Saarlandes.
- Mett, J., Lauer, A. A., Janitschke, D., Griebisch, L. V., Theiss, E. L., Grimm, H. S., Koivisto, H., Tanila, H., Hartmann, T., & Grimm, M. O. W. (2021). Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance A $\beta$  Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme. *Cells*, 10(11), 2941. <https://doi.org/10.3390/cells10112941>
- Meziane, H., Dodart, J.-C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., & Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12683–12688. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12683>
- Miao, H., Dong, Y., Zhang, Y., Zheng, H., Shen, Y., Crosby, G., Culley, D. J., Marcantonio, E. R., & Xie, Z. (2018). Anesthetic Isoflurane or Desflurane Plus Surgery Differently Affects Cognitive Function in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5623–5638. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0787-9>
- Michailov, G. V., Sereda, M. W., Brinkmann, B. G., Fischer, T. M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M. H., & Nave, K.-A. (2004). Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. *Science*, 304(5671), 700–703. <https://doi.org/10.1126/science.1095862>
- Michalowsky, B., Kaczynski, A., & Hoffmann, W. (2019). Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 62(8), 981–992. <https://doi.org/10.1007/s00103-019-02985-z>
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., & Love, S. (2008). SYMPOSIUM: Clearance of A $\beta$  from the Brain in Alzheimer's Disease: A $\beta$ -Degrading

- Enzymes in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, 18(2), 240–252. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00132.x>
- Misiura, M. B., Butts, B., Hammerschlag, B., Munkombwe, C., Bird, A., Fyffe, M., Hemphill, A., Dotson, V. M., & Wharton, W. (2023). Intersectionality in Alzheimer's Disease: The Role of Female Sex and Black American Race in the Development and Prevalence of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 20(4), 1019–1036. <https://doi.org/10.1007/s13311-023-01408-x>
- Mitchell, A. J. (2009a). A meta-analysis of the accuracy of the mini-mental state examination in the detection of dementia and mild cognitive impairment. *Journal of Psychiatric Research*, 43(4), 411–431. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.04.014>
- Mitchell, A. J. (2009b). CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 80(9), 966–975. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.167791>
- Mitchell, D. C., Niu, S., & Litman, B. J. (2003). Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids. *Lipids*, 38(4), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s11745-003-1081-1>
- Montesinos, J., Guardia-Laguarta, C., & Area-Gomez, E. (2020). The fat brain. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 23(2), 68–75. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000634>
- Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V, Hyman, B. T., National Institute on Aging, & Alzheimer's Association. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathologica*, 123(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0910-3>
- Moro, M. L., Giaccone, G., Lombardi, R., Indaco, A., Uggetti, A., Morbin, M., Saccucci, S., Di Fede, G., Catania, M., Walsh, D. M., Demarchi, A., Rozemuller, A., Bogdanovic, N., Bugiani, O., Ghetti, B., & Tagliavini, F. (2012). APP mutations in the A $\beta$  coding region are associated with abundant cerebral deposition of A $\beta$ 38. *Acta Neuropathologica*, 124(6), 809–821. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1061-x>
- Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimer's &*

- Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(9), 1007–1014.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.11.009>
- Morris, M. C., Wang, Y., Barnes, L. L., Bennett, D. A., Dawson-Hughes, B., & Booth, S. L. (2018). Nutrients and bioactives in green leafy vegetables and cognitive decline. *Neurology*, 90(3). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004815>
- Moss, M. L., Jin, S.-L. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W.-J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., ... Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*, 385(6618), 733–736.  
<https://doi.org/10.1038/385733a0>
- Moulton, P. V., & Yang, W. (2012). Air Pollution, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 1–9.  
<https://doi.org/10.1155/2012/472751>
- Müller, P., Fendt, M., & Müller, N. G. (2019). [Drug treatment of Alzheimer's dementia : Status quo and perspectives]. *Der Internist*, 60(7), 761–768. <https://doi.org/10.1007/s00108-019-0625-4>
- Muro, E., Atilla-Gokcumen, G. E., & Eggert, U. S. (2014). Lipids in cell biology: how can we understand them better? *Molecular Biology of the Cell*, 25(12), 1819–1823.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0516>
- Murphy, M. G., & Byczko, Z. (1990). Effects of membrane polyunsaturated fatty acids on adenosine receptor function in intact N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(1), 392–395. <https://doi.org/10.1139/o90-055>
- Muzambi, R., Bhaskaran, K., Brayne, C., Smeeth, L., & Warren-Gash, C. (2019). Common bacterial infections and risk of incident cognitive decline or dementia: a systematic review protocol. *BMJ Open*, 9(9), e030874. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030874>
- Nagan, N., & Zoeller, R. A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research*, 40(3), 199–229. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00003-0)
- Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N., Watanabe, M., Uchino, Y., Okuda, N., Shimomura, Y., Suhara, Y., & Okano, T. (2010). Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, 468(7320), 117–121.  
<https://doi.org/10.1038/nature09464>

- Nakajima, M., Furukawa, S., Hayashi, K., Yamada, A., Kawashima, T., & Hayashi, Y. (1993). Age-dependent survival-promoting activity of vitamin K on cultured CNS neurons. *Developmental Brain Research*, 73(1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90041-8)
- Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bédirian, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., Cummings, J. L., & Chertkow, H. (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*, 53(4), 695–699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>
- Nimptsch, K., Rohrmann, S., & Linseisen, J. (2008). Dietary intake of vitamin K and risk of prostate cancer in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), 985–992. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.985>
- Nitsch, R. M., Blusztajn, J. K., Pittas, A. G., Slack, B. E., Growdon, J. H., & Wurtman, R. J. (1992). Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1671–1675. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1671>
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Nordström, A., & Nordström, P. (2018). Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study. *PLoS Medicine*, 15(1), e1002496. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002496>
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human Mutation*, 31(7), 763–780. <https://doi.org/10.1002/humu.21277>
- Okumoto, K., Tamura, S., Honsho, M., & Fujiki, Y. (2020). *Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis* (pp. 3–17). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_1)
- Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C., & Watzka, M. (2008). *The Vitamin K Cycle* (pp. 35–62). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00003-9)
- Olsson, N. U., Harding, A. J., Harper, C., & Salem, N. (1996). High-performance liquid chromatography method with light-scattering detection for measurements of lipid class composition: analysis of brains from alcoholics. *Journal of Chromatography B: Biomedical*

- Sciences and Applications*, 681(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00576-5](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00576-5)
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Ooi, K.-L. M., Vacy, K., & Boon, W. C. (2021). Fatty acids and beyond: Age and Alzheimer's disease related changes in lipids reveal the neuro-nutraceutical potential of lipids in cognition. *Neurochemistry International*, 149, 105143. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105143>
- Orticello, M., Cavallaro, R. A., Antinori, D., Raia, T., Lucarelli, M., & Fuso, A. (2023). Amyloidogenic and Neuroinflammatory Molecular Pathways Are Contrasted Using Menaquinone 4 (MK4) and Reduced Menaquinone 7 (MK7R) in Association with Increased DNA Methylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cell Line. *Cells*, 13(1), 58. <https://doi.org/10.3390/cells13010058>
- Parkin, E. T., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (1999). Characterization of Detergent-Insoluble Complexes Containing the Familial Alzheimer's Disease-Associated Presenilins. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1534–1543. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721534.x>
- Parr-Sturgess, C. A., Rushton, D. J., & Parkin, E. T. (2010). Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *Biochemical Journal*, 432(2), 283–294. <https://doi.org/10.1042/BJ20100321>
- Patwardhan, M. B., McCrory, D. C., Matchar, D. B., Samsa, G. P., & Rutschmann, O. T. (2004). Alzheimer disease: operating characteristics of PET--a meta-analysis. *Radiology*, 231(1), 73–80. <https://doi.org/10.1148/radiol.2311021620>
- Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., & Salem, N. (2001). Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *Journal of Lipid Research*, 42(8), 1257–1265.
- Pekala, J., Patkowska-Sokola, B., Bodkowski, R., Jamroz, D., Nowakowski, P., Lochynski, S., & Librowski, T. (2011). L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Current Drug Metabolism*, 12(7), 667–678. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>
- Perez, F. P., Bose, D., Maloney, B., Nho, K., Shah, K., & Lahiri, D. K. (2014). Late-Onset Alzheimer's Disease, Heating up and Foxed by Several Proteins: Pathomolecular Effects

- of the Aging Process. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-131544>
- Perez, S. E., Berg, B. M., Moore, K. A., He, B., Counts, S. E., Fritz, J. J., Hu, Y., Lazarov, O., Lah, J. J., & Mufson, E. J. (2010). DHA diet reduces AD pathology in young APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> transgenic mice: Possible gender effects. *Journal of Neuroscience Research*, 88(5), 1026–1040. <https://doi.org/10.1002/jnr.22266>
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 77(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Petersen, R. C., Lopez, O., Armstrong, M. J., Getchius, T. S. D., Ganguli, M., Gloss, D., Gronseth, G. S., Marson, D., Pringsheim, T., Day, G. S., Sager, M., Stevens, J., & Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 90(3), 126–135. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826>
- Pfaff, D. (2013). *Neuroscience in the 21st Century* (D. W. Pfaff, Ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6>
- Phillips, D. J., Greengard, J. S., Fernandez, J. A., Ribeiro, M., Evatt, B. L., Griffin, J. H., & Hooper, W. C. (1993). Protein S, an Antithrombotic Factor, Is Synthesized and Released by Neural Tumor Cells. *Journal of Neurochemistry*, 61(1), 344–347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03574.x>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Poitelon, Y., Kopec, A. M., & Belin, S. (2020). Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*, 9(4), 812. <https://doi.org/10.3390/cells9040812>
- Popa, D.-S., Bigman, G., & Rusu, M. E. (2021). The Role of Vitamin K in Humans: Implication in Aging and Age-Associated Diseases. *Antioxidants*, 10(4), 566. <https://doi.org/10.3390/antiox10040566>
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., Davies, K. J. A., & Grune, T. (2006). Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of *RCAN1* and oxidative stress. *Biochemical Journal*, 400(3), 511–520. <https://doi.org/10.1042/BJ20060463>

- Posse de Chaves, E., & Sipione, S. (2010). Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters*, *584*(9), 1748–1759. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.010>
- Post, J. A., Verkleij, A. J., Roelofsen, B., & de Kamp, J. A. F. O. (1988). Plasmalogen content and distribution in the sarcolemma of cultured neonatal rat myocytes. *FEBS Letters*, *240*(1–2), 78–82. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80343-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80343-0)
- Prasad, M. R., Lovell, M. A., Yatin, M., Dhillon, H., & Markesbery, W. R. (1998). Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, *23*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1023/A:1022457605436>
- Prasuhn, J., Kasten, M., Vos, M., König, I. R., Schmid, S. M., Wilms, B., Klein, C., & Brüggemann, N. (2021). The Use of Vitamin K2 in Patients With Parkinson's Disease and Mitochondrial Dysfunction (PD-K2): A Theranostic Pilot Study in a Placebo-Controlled Parallel Group Design. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.592104>
- Presse, N., Belleville, S., Gaudreau, P., Greenwood, C. E., Kergoat, M.-J., Morais, J. A., Payette, H., Shatenstein, B., & Ferland, G. (2013). Vitamin K status and cognitive function in healthy older adults. *Neurobiology of Aging*, *34*(12), 2777–2783. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.031>
- Presse, N., Shatenstein, B., Kergoat, M.-J., & Ferland, G. (2008). Low Vitamin K Intakes in Community-Dwelling Elders at an Early Stage of Alzheimer's Disease. *Journal of the American Dietetic Association*, *108*(12), 2095–2099. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.09.013>
- Prieto, A. L., O'Dell, S., Varnum, B., & Lai, C. (2007). Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons. *Neuroscience*, *150*(2), 319–334. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.047>
- Prieto, A. L., Weber, J. L., Tracy, S., Heeb, M. J., & Lai, C. (1999). Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system1Published on the World Wide Web on 2 December 1998.1. *Brain Research*, *816*(2), 646–661. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01159-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01159-7)
- Qiao, Y., Chi, Y., Zhang, Q., & Ma, Y. (2023). Safety and efficacy of lecanemab for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*, 1169499. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1169499>

- Qiu, C., De Ronchi, D., & Fratiglioni, L. (2007). The epidemiology of the dementias: an update. *Current Opinion in Psychiatry*, 20(4), 380–385. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32816ebc7b>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32730–32738. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32730>
- Qu, Z., Zhang, L., Huang, W., & Zheng, S. (2022). Vitamin K2 Enhances Fat Degradation to Improve the Survival of *C. elegans*. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.858481>
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., & Lal, R. (2005). Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10427–10432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502066102>
- Rami, L., Sala-Llonch, R., Solé-Padullés, C., Fortea, J., Olives, J., Lladó, A., Peña-Gómez, C., Balasa, M., Bosch, B., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., Bartrés-Faz, D., & Molinuevo, J. L. (2012). Distinct functional activity of the precuneus and posterior cingulate cortex during encoding in the preclinical stage of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 31(3), 517–526. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120223>
- Rapoport, S. I. (1986). Positron Emission Tomography in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Gerontology*, 32(1), 6–13. <https://doi.org/10.1159/000212819>
- Ravera, M., Nickolas, T., Plebani, M., Iervasi, G., Aghi, A., Khairallah, P., Gallieni, M., Mereu, M. C., Giannini, S., Sella, S., Zaninotto, M., Paoletti, E., Bussalino, E., Di Lullo, L., Bellasi, A., Cosmai, L., Foramitti, M., Malberti, F., Brandi, M. L., ... Fusaro, M. (2021). Overweight-obesity is associated with decreased vitamin K2 levels in hemodialysis patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 59(3), 581–589. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0194>
- Rhee, S. K., Quist, A. P., & Lal, R. (1998). Amyloid  $\beta$  Protein-(1–42) Forms Calcium-permeable, Zn<sup>2+</sup>-sensitive Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13379–13382. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13379>
- Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I., & Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of  $\beta$ -secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Current Biology*, 11(16), 1288–1293. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00394-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00394-3)

- Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K., & Felsenstein, K. M. (1994). Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(4), 3111–3116.
- Rovira, C., Arbez, N., & Mariani, J. (2002). A $\beta$ (25–35) and A $\beta$ (1–40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *296*(5), 1317–1321. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02072-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02072-7)
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, *203*, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Sanchez-Mejia, R. O., Newman, J. W., Toh, S., Yu, G.-Q., Zhou, Y., Halabisky, B., Cissé, 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. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1311–1318. <https://doi.org/10.1038/nn.2213>
- Sánchez-Sarasúa, S., Fernández-Pérez, I., Espinosa-Fernández, V., Sánchez-Pérez, A. M., & Ledesma, J. C. (2020). Can We Treat Neuroinflammation in Alzheimer's Disease? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8751. <https://doi.org/10.3390/ijms21228751>
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Progress in Lipid Research*, *24*(2), 69–176. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(85\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0163-7827(85)90011-6)
- Scarmeas, N. (2009). Physical Activity, Diet, and Risk of Alzheimer Disease. *JAMA*, *302*(6), 627. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1144>
- Scheltens, P., Kamphuis, P. J. G. H., Verhey, F. R. J., Olde Rikkert, M. G. M., Wurtman, R. J., Wilkinson, D., Twisk, J. W. R., & Kurz, A. (2010). Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *6*(1), 1-10.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2009.10.003>
- Scheltens, P., Twisk, J. W. R., Blesa, R., Scarpini, E., von Arnim, C. A. F., Bongers, A., Harrison, J., Swinkels, S. H. N., Stam, C. J., de Waal, H., Wurtman, R. J., Wiegers, R. L., Vellas, B., & Kamphuis, P. J. G. H. (2012). Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *31*(1), 225–236. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121189>

- Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R. S., Diaz Brinton, R., & Mosconi, L. (2018). Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 5(4), 225–230. <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.34>
- Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F., & Islinger, M. (2015). Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 681–702. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9819-7>
- Schurgers, L. J., & Vermeer, C. (2000). Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Food. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 30(6), 298–307. <https://doi.org/10.1159/000054147>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Shah, R. C., Kamphuis, P. J., Leurgans, S., Swinkels, S. H., Sadowsky, C. H., Bongers, A., Rappaport, S. A., Quinn, J. F., Wieggers, R. L., Scheltens, P., & Bennett, D. A. (2013). The S-Connect study: results from a randomized, controlled trial of Souvenaid in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(6), 59. <https://doi.org/10.1186/alzrt224>
- Shandilya, S., Kesari, K. K., & Ruokolainen, J. (2021). Vitamin K2 Modulates Organelle Damage and Tauopathy Induced by Streptozotocin and Menadione in SH-SY5Y Cells. *Antioxidants*, 10(6), 983. <https://doi.org/10.3390/antiox10060983>
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., & Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
- Shankar, S. L., O'Guin, K., Cammer, M., McMorris, F. A., Stitt, T. N., Basch, R. S., Varnum, B., & Shafit-Zagardo, B. (2003). The *Growth Arrest-Specific* Gene Product Gas6 Promotes the Survival of Human Oligodendrocytes via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 23(10), 4208–4218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04208.2003>
- Shankar, S. L., O'Guin, K., Kim, M., Varnum, B., Lemke, G., Brosnan, C. F., & Shafit-Zagardo, B. (2006). Gas6/Axl Signaling Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt1 Survival Pathway to Protect Oligodendrocytes from Tumor Necrosis Factor $\alpha$ -Induced Apoptosis.

- The Journal of Neuroscience*, 26(21), 5638–5648.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5063-05.2006>
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Shatenstein, B., Kergoat, M.-J., & Reid, I. (2007). Poor Nutrient Intakes during 1-Year Follow-Up with Community-Dwelling Older Adults with Early-Stage Alzheimer Dementia Compared to Cognitively Intact Matched Controls. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(12), 2091–2099. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.09.008>
- Shayman, J. A. (2000). Sphingolipids. *Kidney International*, 58(1), 11–26. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00136.x>
- Shearer, M. J., Fu, X., & Booth, S. L. (2012). Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research. *Advances in Nutrition*, 3(2), 182–195. <https://doi.org/10.3945/an.111.001800>
- Shearer, M. J., & Newman, P. (2008). Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*, 100(4), 530–547.
- Shearer, M. J., & Newman, P. (2014). Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 345–362. <https://doi.org/10.1194/jlr.R045559>
- Sheng, J. (2003). Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid  $\beta$  peptide in APP<sup>swe</sup> transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 14(1), 133–145. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00069-X)
- Shi, L., Chen, S.-J., Ma, M.-Y., Bao, Y.-P., Han, Y., Wang, Y.-M., Shi, J., Vitiello, M. V., & Lu, L. (2018). Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 40, 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.06.010>
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, 108. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Shoieb, S. M., El-Ghiaty, M. A., Alqahtani, M. A., & El-Kadi, A. O. S. (2020). Cytochrome P450-derived eicosanoids and inflammation in liver diseases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 147, 106400. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106400>

- Silva, N. G., Preto, M., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2024). Reduction of neutral lipid reservoirs, bioconversion and untargeted metabolomics reveal distinct roles for vitamin K isoforms on lipid metabolism. *Food & Function*, 15(4), 2170–2180. <https://doi.org/10.1039/D3FO02915H>
- Simes, D. C., Viegas, C. S. B., Araújo, N., & Marreiros, C. (2020). Vitamin K as a Diet Supplement with Impact in Human Health: Current Evidence in Age-Related Diseases. *Nutrients*, 12(1), 138. <https://doi.org/10.3390/nu12010138>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simpson, J. E., Ince, P. G., Haynes, L. J., Theaker, R., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Lace, G. L., Shaw, P. J., Matthews, F. E., Savva, G. M., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(1), 25–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01030.x>
- Sindi, S., Hagman, G., Håkansson, K., Kulmala, J., Nilsen, C., Kåreholt, I., Soininen, H., Solomon, A., & Kivipelto, M. (2017). Midlife Work-Related Stress Increases Dementia Risk in Later Life: The CAIDE 30-Year Study. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 72(6), 1044–1053. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbw043>
- Singh, R., & Sadiq, N. M. (2024). *Cholinesterase Inhibitors*.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., ... John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain. *Nature*, 402(6761), 537–540. <https://doi.org/10.1038/990114>
- Sioen, I., Huybrechts, I., Verbeke, W., Camp, J. Van, & Henauw, S. De. (2007). n-6 and n-3 PUFA intakes of pre-school children in Flanders, Belgium. *British Journal of Nutrition*, 98(04). <https://doi.org/10.1017/S0007114507756544>
- 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. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- Sochocka, M., Zwolińska, K., & Leszek, J. (2017). The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 15(7). <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170313122937>
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids*, 26(6). <https://doi.org/10.1007/BF02536067>
- Sogabe, N., Maruyama, R., Baba, O., Hosoi, T., & Goseki-Sone, M. (2011). Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone*, 48(5), 1036–1042. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.01.020>
- Soininen, H., Solomon, A., Visser, P. J., Hendrix, S. B., Blennow, K., Kivipelto, M., Hartmann, T., & LipiDiDiet clinical study group. (2021). 36-month LipiDiDiet multinutrient clinical trial in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 17(1), 29–40. <https://doi.org/10.1002/alz.12172>
- Sokoloff, L. (1999). Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochemical Research*, 24(2), 321–329. <https://doi.org/10.1023/A:1022534709672>
- Song, H., Sieurin, J., Wirdefeldt, K., Pedersen, N. L., Almqvist, C., Larsson, H., Valdimarsdóttir, U. A., & Fang, F. (2020). Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Neurodegenerative Diseases. *JAMA Neurology*, 77(6), 700–709. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.0117>
- Sonnino, S., Aureli, M., Mauri, L., Ciampa, M. G., & Prinetti, A. (2015). Membrane lipid domains in the nervous system. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 20(2), 280–302. <https://doi.org/10.2741/4309>
- Soutif-Veillon, A., Ferland, G., Rolland, Y., Presse, N., Boucher, K., Féart, C., & Annweiler, C. (2016). Increased dietary vitamin K intake is associated with less severe subjective memory complaint among older adults. *Maturitas*, 93, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.02.004>
- Sprecher, H., & Chen, Q. (1999). Polyunsaturated fatty acid biosynthesis: a microsomal-peroxisomal process. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 60(5–6), 317–321. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(99\)80006-4](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(99)80006-4)
- Stafford, D. W. (2005). The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1873–1878. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01419.x>

- Stahlmann, C. (2018). *Der Einfluss der intrazellulären Domäne von APP auf die Lipidhomöostase und der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung*. Universität des Saarlandes.
- Stefanis, L. (2012). -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), a009399–a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Stenflo, J. (1984). Structure and Function of Protein C. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 10(02), 109–121. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004413>
- Stillwell, W., Shaikh, S. R., Zerouga, M., Siddiqui, R., & Wassall, S. R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reproduction Nutrition Development*, 45(5), 559–579. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005046>
- Stitt, T. N., Conn, G., Goret, M., Lai, C., Bruno, J., Radzlejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., Masiakowski, P., Ryan, T. E., Tobkes, N. J., Chen, D. H., DiStefano, P. S., Long, G. L., Basilico, C., Goldfarb, M. P., Lemke, G., ... Yancopoulos, G. D. (1995). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80(4), 661–670. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0)
- Stubbs, C. D., & Smith, A. D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 779(1), 89–137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)
- Sundaram, K. S., Fan, J. H., Engelke, J. A., Foley, A. L., Suttie, J. W., & Lev, M. (1996). Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats. *The Journal of Nutrition*, 126(11), 2746–2751. <https://doi.org/10.1093/jn/126.11.2746>
- Sundaram, K. S., & Lev, M. (1988). Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *Journal of Lipid Research*, 29(11), 1475–1479.
- Sundaram, K. S., & Lev, M. (1990). Regulation of sulfotransferase activity by vitamin K in mouse brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277(1), 109–113. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90557-F](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90557-F)
- Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., Bartko, J. J., & Cohen, R. M. (2003). Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, 289(16), 2094–2103. <https://doi.org/10.1001/jama.289.16.2094>

- Sutachan, J. J., Casas, Z., Albarracin, S. L., Stab, B. R., Samudio, I., Gonzalez, J., Morales, L., & Barreto, G. E. (2012). Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease. *Nutritional Neuroscience*, *15*(3), 120–126. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000033>
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2010). The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(s2), S265–S279. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100339>
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., & Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature*, *422*(6930), 438–441. <https://doi.org/10.1038/nature01506>
- 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., 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. *Journal of Neurochemistry*, *104*(3), 683–695. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05072.x>
- Tanprasertsuk, J., Ferland, G., Johnson, M. A., Poon, L. W., Scott, T. M., Barbey, A. K., Barger, K., Wang, X.-D., & Johnson, E. J. (2020). Concentrations of Circulating Phylloquinone, but Not Cerebral Menaquinone-4, Are Positively Correlated with a Wide Range of Cognitive Measures: Exploratory Findings in Centenarians. *The Journal of Nutrition*, *150*(1), 82–90. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz200>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015a). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *11*(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015b). Clearance systems in the

- brain—implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 11(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015c). Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 11(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Thal, D. R., Capetillo-Zarate, E., Del Tredici, K., & Braak, H. (2006). The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Science of Aging Knowledge Environment : SAGE KE*, 2006(6), re1. <https://doi.org/10.1126/sageke.2006.6.re1>
- Thijssen, E. H., La Joie, R., Wolf, A., Strom, A., Wang, P., Iaccarino, L., Bourakova, V., Cobigo, Y., Heuer, H., Spina, S., VandeVrede, L., Chai, X., Proctor, N. K., Airey, D. C., Shcherbinin, S., Duggan Evans, C., Sims, J. R., Zetterberg, H., Blennow, K., ... Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration (ARTFL) investigators. (2020). Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nature Medicine*, 26(3), 387–397. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0762-2>
- Thijssen, H. H. W., & Drijfhout-Reijnders, M. J. (1994). Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *British Journal of Nutrition*, 72(3), 415–425. <https://doi.org/10.1079/BJN19940043>
- Thijssen, H. H. W., & Drijfhout-Reijnders, M. J. (1996). Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *British Journal of Nutrition*, 75(1), 121–127. <https://doi.org/10.1079/BJN19960115>
- Thijssen, H. H. W., Drijfhout-Reijnders, M. J., & Fischer, M. A. J. G. (1996). Phylloquinone and Menaquinone-4 Distribution in Rats: Synthesis rather than Uptake Determines Menaquinone-4 Organ Concentrations. *The Journal of Nutrition*, 126(2), 537–543. <https://doi.org/10.1093/jn/126.2.537>
- Thijssen, H. H. W., Vervoort, L. M. T., Schurgers, L. J., & Shearer, M. J. (2006). Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *British Journal of Nutrition*, 95(2), 260–266. <https://doi.org/10.1079/BJN20051630>
- Thiyagarajan, M., Fernández, J. A., Lane, S. M., Griffin, J. H., & Zlokovic, B. V. (2008). Activated Protein C Promotes Neovascularization and Neurogenesis in Postischemic Brain via Protease-Activated Receptor 1. *The Journal of Neuroscience*, 28(48), 12788–12797. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3485-08.2008>

- Thomas, M. H., Pelleieux, S., Vitale, N., & Olivier, J. L. (2016). Dietary arachidonic acid as a risk factor for age-associated neurodegenerative diseases: Potential mechanisms. *Biochimie*, *130*, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.07.013>
- Todd, S., Barr, S., Roberts, M., & Passmore, A. P. (2013). Survival in dementia and predictors of mortality: a review. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *28*(11), 1109–1124. <https://doi.org/10.1002/gps.3946>
- Tong, Y., Zhou, W., Fung, V., Christensen, M. A., Qing, H., Sun, X., & Song, W. (2005). Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and A $\beta$  generation. *Journal of Neural Transmission*, *112*(3), 455–469. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0255-3>
- Tsiperson, V., Li, X., Schwartz, G. J., Raine, C. S., & Shafit-Zagardo, B. (2010). GAS6 Enhances Repair Following Cuprizone-Induced Demyelination. *PLoS ONE*, *5*(12), e15748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015748>
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., & Johnson, E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in Neurosciences*, *25*(8), 412–417. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02215-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02215-4)
- Tully, A. M., Roche, H. M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D., & Gibney, M. J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case–control study. *British Journal of Nutrition*, *89*(4), 483–489. <https://doi.org/10.1079/BJN2002804>
- Turck, D., Bresson, J., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K. I., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Van Loveren, H., Vinceti, M., ... Neuhäuser-Berthold, M. (2017). Dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal*, *15*(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4780>
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE - A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Biomedical Papers*, *155*(2), 117–130. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.038>
- Tycova, A., Prikryl, J., Kotzianova, A., Datinska, V., Velebny, V., & Foret, F. (2021). Electrospray: More than just an ionization source. *ELECTROPHORESIS*, *42*(1–2), 103–121. <https://doi.org/10.1002/elps.202000191>

- Udagawa, J., & Hino, K. (2022). Plasmalogen in the brain: Effects on cognitive functions and behaviors attributable to its properties. *Brain Research Bulletin*, *188*, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.08.008>
- van den Heuvel, E. G. H. M., van Schoor, N. M., Vermeer, C., Zwijsen, R. M. L., den Heijer, M., & Comijs, H. C. (2015). Vitamin K status is not associated with cognitive decline in middle aged adults. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, *19*(9), 908–912. <https://doi.org/10.1007/s12603-015-0579-8>
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, *388*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- Van Veldhoven, P. P. (2010). Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *Journal of Lipid Research*, *51*(10), 2863–2895. <https://doi.org/10.1194/jlr.R005959>
- 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., ... Citron, M. (1999).  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, *286*(5440), 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
- 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. *The Journal of Neuroscience*, *29*(41), 12787–12794. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009>
- Vaz, F. M., & Wanders, R. J. A. (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*, *361*(3), 417. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610417>
- Vénien-Bryan, C., & Fernandes, C. A. H. (2023). Overview of Membrane Protein Sample Preparation for Single-Particle Cryo-Electron Microscopy Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms241914785>
- Vermunt, L., Sikkes, S. A. M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W. M., Kern, S., Ousset, P.-J., Maruff, P., Skoog, I., Verhey, F. R. J., Freund-Levi, Y., Tsolaki, M., Wallin, Å. K., Olde Rikkert, M., Soinen, H., Spuru, L., Zetterberg, H., Blennow, K., ... ICTUS/DSA study groups. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia

- stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 15(7), 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44945–44954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407986200>
- Violante, S., IJlst, L., te Brinke, H., Koster, J., Tavares de Almeida, I., Wanders, R. J. A., Ventura, F. V., & Houten, S. M. (2013). Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(9), 1467–1474. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.06.007>
- Vitek, G. E., Decourt, B., & Sabbagh, M. N. (2023). Lecanemab (BAN2401): an anti-beta-amyloid monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 32(2), 89–94. <https://doi.org/10.1080/13543784.2023.2178414>
- Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2001). PP2A mRNA Expression Is Quantitatively Decreased in Alzheimer's Disease Hippocampus. *Experimental Neurology*, 168(2), 402–412. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7630>
- Vogeser, M., & Parhofer, K. (2007). Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and Applications in Endocrinology. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115(09), 559–570. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
- Vos, M., Esposito, G., Edirisinghe, J. N., Vilain, S., Haddad, D. M., Slabbaert, J. R., Van Meensel, S., Schaap, O., De Strooper, B., Meganathan, R., Morais, V. A., & Verstreken, P. (2012). Vitamin K<sub>2</sub> Is a Mitochondrial Electron Carrier That Rescues Pink1 Deficiency. *Science*, 336(6086), 1306–1310. <https://doi.org/10.1126/science.1218632>
- Walker, F. (1984). Protein S and the Regulation of Activated Protein C. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 10(02), 131–138. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1004415>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14634–14641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011116200>
- Wang, H.-Y., Lee, D. H. S., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., & Reitz, A. B. (2000).  $\beta$ -Amyloid<sub>1–42</sub> Binds to  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity.

- Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5626–5632.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>
- Wang, J., Wu, Q., Smith, A., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1998).  $\tau$  is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Letters*, 436(1), 28–34.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01090-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01090-4)
- Wang, L., Shen, W., Kazachkov, M., Chen, G., Chen, Q., Carlsson, A. S., Stymne, S., Weselake, R. J., & Zou, J. (2012). Metabolic Interactions between the Lands Cycle and the Kennedy Pathway of Glycerolipid Synthesis in *Arabidopsis* Developing Seeds. *The Plant Cell*, 24(11), 4652–4669. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104604>
- Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, 3(10), 136. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>
- Ward, A., Tardiff, S., Dye, C., & Arrighi, H. M. (2013). Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 3(1), 320–332.  
<https://doi.org/10.1159/000354370>
- Wassall, S. R., & Stillwell, W. (2008). Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chemistry and Physics of Lipids*, 153(1), 57–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010>
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43–69.  
<https://doi.org/10.1042/bse0590043>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- Wells, K., Farooqui, A. A., Liss, L., & Horrocks, L. A. (1995). Neural membrane phospholipids in alzheimer disease. *Neurochemical Research*, 20(11), 1329–1333.  
<https://doi.org/10.1007/BF00992508>
- Westwood, A. J., Beiser, A., Jain, N., Himali, J. J., DeCarli, C., Auerbach, S. H., Pase, M. P., & Seshadri, S. (2017). Prolonged sleep duration as a marker of early neurodegeneration predicting incident dementia. *Neurology*, 88(12), 1172–1179.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003732>

- White, J. A., Manelli, A. M., Holmberg, K. H., Van Eldik, L. J., & LaDu, M. J. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- $\beta$ 1–42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiology of Disease*, *18*(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.12.013>
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., & Nowak, J. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *24*(6), 931–941. <https://doi.org/10.17219/acem/31243>
- 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*(5799), 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.1132341>
- Winkler, E., Kamp, F., Scheuring, J., Ebke, A., Fukumori, A., & Steiner, H. (2012). Generation of Alzheimer Disease-associated Amyloid  $\beta$ 42/43 Peptide by  $\gamma$ -Secretase Can Be Inhibited Directly by Modulation of Membrane Thickness. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(25), 21326–21334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356659>
- 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*(6727), 513–517. <https://doi.org/10.1038/19077>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23009–23017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414648200>
- World Health Organisation. (2019). *Risk Reduction of Cognitive Decline and Dementia: WHO Guidelines*.
- World Health Organization. (2021). *Global status report on the public health response to dementia*. <http://apps.who.int/>
- Wüst, R., Maurer, B., Hauser, K., Woitalla, D., Sharma, M., & Krüger, R. (2016). Mutation analyses and association studies to assess the role of the presenilin-associated rhomboid-like gene in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *39*, 217.e13–217.e15. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.025>
- Xiao, H., Chen, J., Duan, L., & Li, S. (2020). Role of emerging vitamin K-dependent proteins: Growth arrest-specific protein 6, Gla-rich protein and periostin (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *47*(3), 2. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4835>

- Xie, H., Hu, L., & Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, *123*(8), 1086–1092.
- Yaffe, K., Lwi, S. J., Hoang, T. D., Xia, F., Barnes, D. E., Maguen, S., & Peltz, C. B. (2019). Military-related risk factors in female veterans and risk of dementia. *Neurology*, *92*(3), e205–e211. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006778>
- Yagami, T. (2002). Gas6 rescues cortical neurons from amyloid  $\beta$  protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology*, *43*(8), 1289–1296. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00333-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00333-7)
- Yagami, T., Yamamoto, Y., & Koma, H. (2014). The Role of Secretory Phospholipase A2 in the Central Nervous System and Neurological Diseases. *Molecular Neurobiology*, *49*(2), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8565-9>
- Yamauchi, T., Sakurai, M., Abe, K., Takano, H., & Sawa, Y. (2006). Neuroprotective Effects of Activated Protein C Through Induction of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1), IGF-1 Receptor, and Its Downstream Signal Phosphorylated Serine-Threonine Kinase After Spinal Cord Ischemia in Rabbits. *Stroke*, *37*(4), 1081–1086. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000206280.30972.21>
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashler, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., & Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase activity. *Nature*, *402*(6761), 533–537. <https://doi.org/10.1038/990107>
- Yang, A., & Mottillo, E. P. (2020). Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochemical Journal*, *477*(5), 985–1008. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190468>
- Yang, L., & Ksiezak-Reding, H. (1995). Calpain-Induced Proteolysis of Normal Human Tau and Tau Associated with Paired Helical Filaments. *European Journal of Biochemistry*, *233*(1), 9–17. [https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.009\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.009_1.x)
- Yang, X., Sheng, W., Sun, G. Y., & Lee, J. C.-M. (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry International*, *58*(3), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.004>

- Yesilirmak, D. C., Kumral, A., Tugyan, K., Cilaker, S., Baskin, H., Yilmaz, O., Duman, N., & Ozkan, H. (2008). Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Research*, *1210*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.088>
- Yin, F. (2023). Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *The FEBS Journal*, *290*(6), 1420–1453. <https://doi.org/10.1111/febs.16344>
- Yoon, J. H., Seo, Y., Jo, Y. S., Lee, S., Cho, E., Cazenave-Gassiot, A., Shin, Y.-S., Moon, M. H., An, H. J., Wenk, M. R., & Suh, P.-G. (2022). Brain lipidomics: From functional landscape to clinical significance. *Science Advances*, *8*(37). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adc9317>
- Yu, Y., Li, Y., Gao, F., Hu, Q., Zhang, Y., Chen, D., & Wang, G. (2016). Vitamin K2 suppresses rotenone-induced microglial activation in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, *37*(9), 1178–1189. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.68>
- Yu, Y.-X., Yu, X.-D., Cheng, Q., Tang, L., & Shen, M.-Q. (2020). The association of serum vitamin K2 levels with Parkinson's disease: from basic case-control study to big data mining analysis. *Aging*, *12*(16), 16410–16419. <https://doi.org/10.18632/aging.103691>
- Yuan, X.-Z., Sun, S., Tan, C.-C., Yu, J.-T., & Tan, L. (2017). The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *58*(2), 303–322. <https://doi.org/10.3233/JAD-170061>
- Zhang, L., Sheng, R., & Qin, Z. (2009). The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *41*(6), 437–445. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp031>
- Zhang, X.-X., Tian, Y., Wang, Z.-T., Ma, Y.-H., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021). The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 1–9. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>
- Zhang, Y., Chen, J., Qiu, J., Li, Y., Wang, J., & Jiao, J. (2016). Intakes of fish and polyunsaturated fatty acids and mild-to-severe cognitive impairment risks: a dose-response meta-analysis of 21 cohort studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *103*(2), 330–340. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.124081>
- Zhang, Y., Liu, Y., Sun, J., Zhang, W., Guo, Z., & Ma, Q. (2023). Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm*, *4*(5). <https://doi.org/10.1002/mco2.363>
- Zheng, L., Cedazo-Minguez, A., Hallbeck, M., Jerhammar, F., Marcusson, J., & Terman, A. (2012). Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the

- lysosomal system. *Translational Neurodegeneration*, 1(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-19>
- Zheng, Z., Li, Y., Jin, G., Huang, T., Zou, M., & Duan, S. (2020). The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110354. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110354>
- Zhong, Z., Wang, Y., Guo, H., Sagare, A., Fernández, J. A., Bell, R. D., Barrett, T. M., Griffin, J. H., Freeman, R. S., & Zlokovic, B. V. (2010). Protein S Protects Neurons from Excitotoxic Injury by Activating the TAM Receptor Tyro3–Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway through Its Sex Hormone-Binding Globulin-Like Region. *The Journal of Neuroscience*, 30(46), 15521–15534. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4437-10.2010>
- Zhu, R., Chen, M., Zhang, Z., Wu, T., & Zhao, W.-H. (2021). Dietary fatty acids and risk for Alzheimer’s disease, dementia, and mild cognitive impairment: A prospective cohort meta-analysis. *Nutrition*, 90, 111355. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111355>
- Ziegler, U., & Doblhammer, G. (2009). [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002]. *Gesundheitswesen (Bundesverband Der Ärzte Des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*, 71(5), 281–290. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1119384>
- Zimmer, V. C., Lauer, A. A., Haupenthal, V., Stahlmann, C. P., Mett, J., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Rothhaar, T., Endres, K., Eckhardt, M., Hartmann, T., Grimm, H. S., & Grimm, M. O. W. (2024). A bidirectional link between sulfatide and Alzheimer’s disease. *Cell Chemical Biology*, 31(2), 265-283.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.10.021>
- Zipper, H. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103–e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>
- Zlokovic, B. V., Zhang, C., Liu, D., Fernandez, J., Griffin, J. H., & Chopp, M. (2005). Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C. *Annals of Neurology*, 58(3), 474–477. <https://doi.org/10.1002/ana.20602>
- Züllig, T., Trötz Müller, M., & Köfeler, H. C. (2020). Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(10), 2191–2209. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02241-y>

## 7 Anhang

**Tabelle 26: Vorkommen und Funktion der Gla-Proteine** (Modifiziert nach (Xiao et al., 2020)).

<b>Proteinname</b>	<b>Synonym / Akronym</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Funktion</b>
Faktor II	Prothrombin	Leber	Plasmatischer Gerinnungsfaktor
Faktor VII	Proconvertin	Leber	Plasmatischer Gerinnungsfaktor
Faktor IX	Christmas-Faktor	Leber	Plasmatischer Gerinnungsfaktor
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor	Leber	Plasmatischer Gerinnungsfaktor
Protein C		Leber	Antikoagulans, wirkt zellprotektiv, anti-inflammatorisch und antiapoptotisch
Protein S		Leber	Antikoagulans, Ligand der TAM-Tyrosinkinasefamilie
Protein Z		Leber	Antikoagulans
Prolinreiches Gla-Protein 1	Proline-rich-Gla protein	Rückenmark	Signaltransduktion
Prolin-reiches-Gla Protein 2	Proline-rich-Gla protein 2	Schilddrüse	
Transmembran-Gla-Protein 3	Transmembrane Gla protein 3	Herz Gehirn Niere	Signaltransduktion, Einfluss auf Zellzyklus und Proteinabbau
Transmembran-Gla-Protein 4	Transmembrane Gla protein 4	Niere Pankreas Plazenta	
Osteocalcin	OC	Knochen	Regulator der Knochenhomöostase, Knochenmineraldichte und des systemischen Glukose- und Energiestoffwechsels
Matrix-Gla-Protein	MGP	Lunge Herz Niere	Inhibitor der Weichgewebemineralisierung
Wachstumsarrest-spezifisches Gen 6	Growth-arrest-specific gene-6 Gas6	Gehirn Herz Lunge Niere	Hemmt vaskuläre Kalzifizierung, Regulator der Zellproliferation, Zellmigration, Apoptose und Seneszenz, wirkt antiinflammatorisch
Glareiches Protein	Gla-rich protein GRP	Knochen Knorpel	Inhibitor der osteogenen Differenzierung, Regulator der Knochenhomöostase, Hemmt vaskuläre

<b>Proteinname</b>	<b>Synonym / Akronym</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Funktion</b>
			Kalzifizierung, wirkt antiinflammatorisch
Periostin		Periost Parodontalligament	Regulator der Periostaktivierung Und kardialen Fibrose, Promotor der Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion und Angiogenese
Periostinartiger Faktor	Periostin-like- factor	Herz Knochen Glatte Muskulatur	Promotor der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten

**Tabelle 27: Auswertungstabelle Phosphatidylcholine (PCaa).** Abkürzungsbedeutung: PC aa = Phosphatidylcholin / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b>Phosphatidylcholine</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK-4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
Pcaa total	90,6945	2,82	92,6085	5,41	102,11	7,36E-01	
PCaa SFA	12,3010	2,78	14,7741	4,85	120,10	4,36E-03	**
PCaa MUFA	43,8352	2,80	43,8965	5,35	100,14	9,82E-01	
PCaa PUFA	34,5583	2,87	33,9379	5,83	98,20	7,81E-01	
PCaa X:0	12,3010	2,78	14,7741	4,85	120,10	4,36E-03	**
PCaa X:1	43,8352	2,80	43,8965	5,35	100,14	9,82E-01	
PCaa X:2	22,7746	2,86	21,3217	5,67	93,62	2,99E-01	
PCaa X:3	6,8377	2,92	7,0077	6,12	102,49	7,22E-01	
PCaa X:4	2,8622	2,95	3,1190	6,35	108,97	2,44E-01	
PCaa X:5	1,2663	2,81	1,4415	6,21	113,83	8,14E-02	
PCaa X:6	0,8174	2,97	1,0479	6,22	128,21	3,00E-03	**
PCaa 20:X	0,0298	2,46	0,0315	3,80	105,80	2,27E-01	
PCaa 24:X	0,0372	5,80	0,0486	8,76	130,57	2,43E-02	*
PCaa 26:X	0,1429	6,25	0,1838	8,95	128,62	3,71E-02	*
PCaa 28:X	0,5252	2,91	0,5186	5,30	98,76	8,37E-01	
PCaa <30:X	0,7350	3,38	0,7825	5,59	106,46	3,53E-01	
PCaa 30:X	3,8838	2,85	4,3466	5,33	111,92	8,28E-02	
PCaa 32:X	21,6701	2,89	23,5926	5,08	108,87	1,66E-01	
PCaa 34:X	34,3319	2,79	34,1351	5,26	99,43	9,24E-01	
PCaa 36:X	23,2698	2,84	22,0440	6,00	94,73	4,14E-01	
PCaa 38:X	4,6365	2,88	5,1864	6,26	111,86	1,30E-01	
PCaa 40:X	1,9313	2,76	2,2562	6,12	116,82	3,82E-02	*
PCaa 42:X	0,2299	2,60	0,2586	5,52	112,49	7,58E-02	
PCaa >42:X	0,0063	3,14	0,0064	4,88	101,76	7,66E-01	
PCaa 44:X	0,0036	3,22	0,0035	4,86	98,27	7,66E-01	
PCaa 48:X	0,0027	3,86	0,0029	6,07	106,37	4,04E-01	
PCaa C20:0	0,0298	2,46	0,0315	3,80	105,80	2,27E-01	
PCaa C24:0	0,0372	5,80	0,0486	8,76	130,57	2,43E-02	*
PCaa C26:0	0,1429	6,25	0,1838	8,95	128,62	3,71E-02	*
PCaa C28:0	0,4028	2,80	0,3942	5,31	97,86	7,20E-01	
PCaa C28:1	0,1223	3,85	0,1244	6,35	101,72	8,21E-01	
PCaa C30:0	3,6934	2,84	4,1458	5,32	112,25	7,52E-02	

<b>Phosphat- idylcholine</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK-4</b>		<i>Rel. Veränderung</i> (%)	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW- Detektion</i> (CPS <sub>MBV</sub> )	<i>Rel. SEM</i> (%)	<i>MW- Detektion</i> (CPS <sub>MBV</sub> )	<i>Rel. SEM</i> (%)			
PCaa C30:2	0,1904	3,15	0,2009	5,91	105,49	4,38E-01	
PCaa C32:0	6,8122	2,81	8,7165	4,71	127,95	2,72E-04	***
PCaa C32:1	11,8713	2,89	11,7772	5,39	99,21	8,97E-01	
PCaa C32:2	2,6877	3,14	2,7521	5,68	102,40	7,20E-01	
PCaa C32:3	0,2989	3,24	0,3468	6,21	116,02	5,29E-02	
PCaa C34:1	24,0642	2,75	24,4200	5,14	101,48	8,04E-01	
PCaa C34:2	8,7123	2,87	8,1473	5,59	93,51	2,86E-01	
PCaa C34:3	1,3685	3,02	1,3721	5,87	100,26	9,69E-01	
PCaa C34:4	0,1868	3,02	0,1958	6,05	104,81	5,00E-01	
PCaa C36:0	0,8323	2,89	0,8369	6,08	100,55	9,36E-01	
PCaa C36:1	7,4388	2,86	7,2092	6,24	96,91	6,49E-01	
PCaa C36:2	11,0583	2,80	10,0838	5,79	91,19	1,51E-01	
PCaa C36:3	2,9542	2,93	2,8343	6,16	95,94	5,43E-01	
PCaa C36:4	0,7444	3,13	0,8044	6,61	108,05	3,12E-01	
PCaa C36:5	0,1723	2,99	0,1948	6,28	113,10	1,02E-01	
PCaa C36:6	0,0695	3,07	0,0806	5,02	116,06	2,11E-02	*
PCaa C38:0	0,2809	3,13	0,3460	6,47	123,16	1,25E-02	*
PCaa C38:1	0,2692	2,84	0,3001	6,03	111,47	1,29E-01	
PCaa C38:3	1,7862	2,88	1,9332	6,38	108,23	2,82E-01	
PCaa C38:4	1,3068	2,95	1,3981	6,53	106,99	3,65E-01	
PCaa C38:5	0,6430	2,81	0,7290	6,28	113,36	9,40E-02	
PCaa C38:6	0,3503	3,13	0,4800	6,26	137,02	4,91E-04	***
PCaa C40:0	0,0543	2,88	0,0567	5,57	104,33	5,10E-01	
PCaa C40:1	0,0488	2,54	0,0486	4,87	99,59	9,40E-01	
PCaa C40:2	0,1093	2,67	0,1207	6,06	110,49	1,58E-01	
PCaa C40:3	0,4299	2,76	0,5214	6,48	121,29	1,79E-02	*
PCaa C40:4	0,5736	2,80	0,6607	5,96	115,19	5,16E-02	
PCaa C40:5	0,3825	2,84	0,4378	6,31	114,48	7,47E-02	
PCaa C40:6	0,3329	2,94	0,4102	6,56	123,21	1,28E-02	*
PCaa C42:0	0,0088	2,69	0,0077	4,43	87,78	1,39E-02	*
PCaa C42:1	0,0205	2,48	0,0169	3,97	82,26	1,01E-04	***
PCaa C42:2	0,0167	2,54	0,0169	4,75	101,53	7,81E-01	
PCaa C42:4	0,0506	2,72	0,0600	5,91	118,64	2,07E-02	*
PCaa C42:5	0,0686	2,73	0,0799	5,69	116,52	2,99E-02	*
PCaa C42:6	0,0647	2,74	0,0771	6,21	119,20	2,32E-02	*

<b>Phosphatidylcholine</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK-4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
PCaa C44:0	0,0036	3,22	0,0035	4,86	98,27	7,66E-01	
PCaa C48:0	0,0027	3,86	0,0029	6,07	106,37	4,04E-01	

**Tabelle 28: Auswertungstabelle Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae).** Abkürzungsbedeutung: PC ae = Phosphatidylcholin-Plasmalogen / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b>Plasmalogene</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
PCae total	407,0789	1,23	394,1300	2,27	96,82	2,17E-01	
PCae SFA	43,5440	1,18	47,8249	2,33	109,83	1,94E-03	**
PCae MUFA	161,3775	1,25	154,8961	2,42	95,98	1,40E-01	
PCae PUFA	202,1575	1,26	191,4090	2,27	94,68	4,18E-02	*
PCae CX:0	43,5440	1,18	47,8249	2,33	109,83	1,94E-03	**
PCae CX:1	161,3775	1,25	154,8961	2,42	95,98	1,40E-01	
PCae CX:2	83,4842	1,28	73,8466	2,38	88,46	6,24E-05	***
PCae CX:3	54,0632	1,37	51,5996	2,60	95,44	1,20E-01	
PCae CX:4	32,8284	1,28	32,5737	2,26	99,22	7,66E-01	
PCae CX:5	20,7121	1,21	21,1016	2,10	101,88	4,51E-01	
PCae CX:6	11,0696	1,29	12,2875	2,75	111,00	3,09E-03	**
PCae C32:X	42,8320	1,33	39,0718	2,75	91,22	4,69E-03	**
PCae C34:X	153,1819	1,25	156,0533	2,45	101,87	5,08E-01	
PCae C36:X	100,6887	1,29	87,7515	2,41	87,15	1,42E-05	***
PCae C38:X	63,4198	1,22	62,6345	2,13	98,76	6,15E-01	
PCae C40:X	33,5273	1,26	35,0314	1,86	104,49	6,17E-02	
PCae C42:X	3,6863	1,36	3,7063	1,62	100,54	7,99E-01	
PCae C42:X >	0,4962	1,20	0,5089	1,41	102,55	1,83E-01	
PCae C30:0	7,2002	1,21	7,5251	2,81	104,51	1,70E-01	
PCae C30:1	1,8195	1,11	1,6137	2,30	88,69	4,55E-05	***
PCae C30:2	0,2269	2,04	0,2335	4,62	102,92	5,78E-01	
PCae C32:1	35,6713	1,35	31,8951	2,82	89,41	1,02E-03	**
PCae C32:2	7,1607	1,25	7,1767	2,52	100,22	9,38E-01	
PCae C34:0	24,2424	1,29	28,0489	2,81	115,70	1,99E-04	***

<b>Plasma- logene</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung (%)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
PCae C34:1	95,2553	1,25	96,4932	2,45	101,30	6,44E-01	
PCae C34:2	27,8827	1,29	26,0448	2,45	93,41	1,84E-02	*
PCae C34:3	5,8016	1,33	5,4663	2,36	94,22	3,35E-02	*
PCae C36:0	5,1036	1,67	4,7899	2,31	93,85	3,09E-02	*
PCae C36:1	23,3885	1,32	20,2695	2,28	86,66	3,63E-06	***
PCae C36:2	38,3590	1,32	31,5954	2,52	82,37	5,67E-08	***
PCae C36:3	25,1717	1,41	22,4324	2,92	89,12	1,10E-03	**
PCae C36:4	7,3189	1,32	7,2789	2,67	99,45	8,55E-01	
PCae C36:5	1,3471	1,01	1,3855	2,12	102,85	2,48E-01	
PCae C38:0	1,9144	1,26	1,9413	1,37	101,40	4,58E-01	
PCae C38:1	3,8688	1,42	3,2881	1,41	84,99	5,13E-11	***
PCae C38:2	8,0592	1,33	7,0956	2,25	88,04	2,03E-05	***
PCae C38:3	16,9237	1,40	17,4984	2,65	103,40	2,80E-01	
PCae C38:4	15,1969	1,28	14,7195	2,41	96,86	2,49E-01	
PCae C38:5	11,6338	1,22	11,3908	2,33	97,91	4,26E-01	
PCae C38:6	5,8230	1,28	6,7007	2,85	115,07	3,32E-04	***
PCae C40:0	4,3443	1,24	4,7594	1,72	109,55	1,88E-04	***
PCae C40:1	0,9081	1,20	0,8610	1,30	94,81	4,15E-03	**
PCae C40:2	1,4039	1,37	1,2825	1,82	91,35	2,60E-04	***
PCae C40:3	5,4458	1,43	5,4855	2,27	100,73	7,88E-01	
PCae C40:4	9,5083	1,36	9,7794	2,19	102,85	2,88E-01	
PCae C40:5	6,7914	1,31	7,3942	2,09	108,88	2,22E-03	**
PCae C40:6	5,1255	1,35	5,4695	2,68	106,71	4,47E-02	*
PCae C42:0	0,7390	1,16	0,7602	1,35	102,87	1,21E-01	
PCae C42:1	0,4662	1,00	0,4755	1,22	102,01	2,16E-01	
PCae C42:2	0,3917	1,24	0,4180	1,19	106,70	4,58E-04	***
PCae C42:3	0,5919	2,37	0,5813	2,36	98,21	5,90E-01	
PCae C42:4	0,6838	1,46	0,6717	2,34	98,22	5,18E-01	
PCae C42:5	0,8136	1,75	0,7997	2,35	98,28	5,57E-01	
PCae C44:3	0,1285	1,47	0,1357	1,91	105,64	3,04E-02	*
PCae C44:4	0,1205	1,30	0,1242	1,54	103,04	1,46E-01	
PCae C44:5	0,1262	1,48	0,1316	2,19	104,23	1,31E-01	
PCae C44:6	0,1210	1,62	0,1174	2,58	97,01	3,23E-01	

**Tabelle 29: Auswertungstabelle Lysierte Phosphatidylcholine (LPC).** Abkürzungsbedeutung: Lyso PC = Lysiertes Phosphatidylcholin / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b><u>Lysierte Phosphat- idylcholine</u></b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<b>Rel. Veränderung (%)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Sig.</b>
	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>			
LPC total	1,3227	2,79	1,2090	4,52	91,41	9,49E-02	
LPC SFA	0,6104	2,88	0,5887	5,60	96,45	5,67E-01	
LPC MUFA	0,6213	3,54	0,5262	4,25	84,69	3,90E-03	**
LPC PUFA	0,0910	3,16	0,0941	3,63	103,48	4,82E-01	
LPC CX:0	0,6104	2,88	0,5887	5,60	96,45	5,67E-01	
LPC CX:1	0,6213	3,54	0,5262	4,25	84,69	3,90E-03	**
LPC CX:2	0,0315	3,59	0,0256	4,51	81,30	6,55E-04	***
LPC CX:3	0,0342	3,22	0,0361	3,85	105,65	2,83E-01	
LPC CX:4	0,0117	3,45	0,0148	4,64	127,07	4,73E-04	***
LPC CX:5	0,0024	3,24	0,0024	4,34	98,69	8,08E-01	
LPC CX:6	0,0112	3,31	0,0152	6,28	135,67	8,12E-04	***
LPC C6:X	0,0732	6,06	0,0699	13,5 3	95,58	7,60E-01	
LPC C10:X	0,0139	4,49	0,0130	9,78	93,17	5,08E-01	
LPC C12:X	0,0024	5,10	0,0021	8,26	89,19	2,36E-01	
LPC C14:X	0,0168	3,12	0,0139	6,96	82,45	1,24E-02	*
LPC C16:X	0,2692	3,64	0,2409	6,45	89,49	1,34E-01	
LPC C17:X	0,0112	2,40	0,0101	3,43	90,23	1,73E-02	*
LPC C18:X	0,5353	3,78	0,4530	4,70	84,64	7,43E-03	**
LPC C20:X	0,0586	2,90	0,0623	3,67	106,25	2,06E-01	
LPC C22:X	0,0351	5,60	0,0392	9,29	111,88	3,24E-01	
LPC C24:X	0,0672	6,75	0,0651	10,8 9	96,80	8,00E-01	
LPC C26:X	0,1457	5,70	0,1492	9,55	102,41	8,33E-01	
LPC C28:X	0,0941	5,24	0,0903	7,85	95,97	6,64E-01	
LPC 10:0	0,0139	4,49	0,0130	9,78	93,17	5,08E-01	
LPC 12:0	0,0024	5,10	0,0021	8,26	89,19	2,36E-01	
LPC 14:0	0,0168	3,12	0,0139	6,96	82,45	1,24E-02	*
LPC 16:0	0,1831	3,39	0,1722	6,79	94,04	4,17E-01	
LPC 16:1	0,0862	4,59	0,0688	6,04	79,84	3,99E-03	**
LPC 17:0	0,0112	2,40	0,0101	3,43	90,23	1,73E-02	*
LPC 18:0	0,0793	2,65	0,0743	4,81	93,72	2,40E-01	
Lyso PC 18:1	0,4221	4,19	0,3509	5,04	83,13	6,49E-03	**

<b><u>Lysierte Phosphat- idylcholine</u></b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>			<b>p-Wert</b>	<b>Sig.</b>
	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>	<b>Rel. Veränderung (%)</b>		
Lyso PC 18:2	0,0315	3,59	0,0256	4,51	81,30	6,55E-04	***
Lyso PC 18:3	0,0023	3,29	0,0021	4,82	92,94	2,13E-01	
Lyso PC 20:0	0,0126	4,55	0,0111	5,57	87,65	7,09E-02	
Lyso PC 20:3	0,0319	3,24	0,0340	3,89	106,57	2,20E-01	
Lyso PC 20:4	0,0117	3,45	0,0148	4,64	127,07	4,73E-04	***
Lyso PC 20:5	0,0024	3,24	0,0024	4,34	98,69	8,08E-01	
Lyso PC 22:0	0,0239	7,17	0,0240	12,1 1	100,71	9,60E-01	
Lyso PC 22:6	0,0112	3,31	0,0152	6,28	135,67	8,12E-04	***
Lyso PC 24:0	0,0672	6,75	0,0651	10,8 9	96,80	8,00E-01	
Lyso PC 26:0	0,0822	6,36	0,0874	10,6 8	106,31	6,32E-01	
Lyso PC 26:1	0,0635	4,91	0,0618	8,04	97,36	7,77E-01	
Lyso PC 28:0	0,0446	4,69	0,0456	6,32	102,41	7,65E-01	
Lyso PC 28:1	0,0495	5,82	0,0447	9,72	90,18	3,58E-01	

**Tabelle 30: Auswertungstabelle Sphingomyeline (SM).** Abkürzungsbedeutung: SM = Sphingomyelin / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b><u>Sphingo- myeline</u></b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>			<b>p-Wert</b>	<b>Sig.</b>
	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>	<b>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</b>	<b>Rel. SEM (%)</b>	<b>Rel. Veränderung (%)</b>		
SM total	1,1086	2,38	1,0769	4,16	97,14	5,46E-01	
SM non OH	0,8942	2,38	0,8593	4,19	96,10	4,09E-01	
SM OH	0,2145	2,46	0,2177	4,19	101,49	7,64E-01	
SM OH/non OH	0,2398	0,56	0,2536	1,17	105,78	2,06E-04	***
SM SFA	0,5738	2,38	0,5275	4,04	91,94	7,60E-02	
SM MUFA	0,3952	2,40	0,4013	4,38	101,54	7,62E-01	
SM PUFA	0,1397	2,46	0,1481	4,23	106,04	2,47E-01	
SM CX:2	0,1249	2,50	0,1325	4,32	106,13	2,49E-01	
SM CX:3	0,0148	2,64	0,0156	4,43	105,25	3,35E-01	
SM C14:X	0,0091	2,62	0,0091	4,79	99,26	8,93E-01	
SM C16:X	0,2566	2,47	0,2252	3,90	87,78	6,01E-03	**

<b><u>Sphingo- myeline</u></b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung (%)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW- Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
SM C16:X OH	0,0421	2,54	0,0428	4,13	101,76	7,23E-01	
SM C18:X	0,2885	2,58	0,2787	4,32	96,60	4,93E-01	
SM C20:X	0,0130	2,52	0,0130	4,49	100,42	9,35E-01	
SM C22:X	0,0148	2,64	0,0156	4,43	105,25	3,35E-01	
SM C22:X OH	0,1558	2,48	0,1588	4,28	101,96	6,99E-01	
SM C24:X	0,2753	2,39	0,2749	4,55	99,86	9,79E-01	
SM C24:X OH	0,0075	2,36	0,0070	4,04	92,83	1,14E-01	
SM C26:X	0,0460	2,46	0,0518	4,84	112,65	4,34E-02	*
SM C16:0	0,2402	2,45	0,2089	3,87	86,96	3,18E-03	**
SM C16:1	0,0164	3,10	0,0163	4,95	99,68	9,57E-01	
SM C16:1 OH	0,0421	2,54	0,0428	4,13	101,76	7,23E-01	
SM C18:0	0,2563	2,57	0,2450	4,30	95,60	3,70E-01	
SM C18:1	0,0322	2,69	0,0337	4,51	104,59	4,04E-01	
SM C20:2	0,0130	2,52	0,0130	4,49	100,42	9,35E-01	
SM C22:1 OH	0,0439	2,42	0,0393	4,15	89,63	2,50E-02	*
SM C22:2 OH	0,1119	2,52	0,1195	4,34	106,80	2,07E-01	
SM C22:3	0,0148	2,64	0,0156	4,43	105,25	3,35E-01	
SM C24:0	0,0696	2,41	0,0658	4,49	94,59	2,76E-01	
SM C24:1	0,2057	2,38	0,2091	4,58	101,64	7,55E-01	
SM C24:1 OH	0,0075	2,36	0,0070	4,04	92,83	1,14E-01	
SM C26:0	0,0077	2,39	0,0078	4,38	101,49	7,70E-01	
SM C26:1	0,0383	2,49	0,0440	4,94	114,89	2,31E-02	*

**Tabelle 31: Auswertungstabelle Carnitiner (CE).** Abkürzungsbedeutung: C = Carnitin(ester) / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b>Carnitiner</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>			<b>p-Wert</b>	<b>Sig.</b>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>Rel. Veränderung (%)</i>		
CE0 - C18:2 tot	0,0586	2,01	0,0510	3,70	87,03	1,56E-03	**
CE SFA	0,0331	2,77	0,0268	4,88	81,23	3,68E-04	***
CE X:1	0,0112	1,86	0,0105	3,28	94,24	1,19E-01	
CE X:2	0,0026	1,74	0,0026	2,87	99,98	9,94E-01	
CE X-OH	0,0032	1,53	0,0030	3,48	92,54	4,50E-02	*
CE X non OH	0,0386	2,42	0,0321	4,45	83,07	4,57E-04	***
CE X-OH/non OH	0,0861	2,18	0,0965	4,62	112,11	4,00E-02	*
CE X DC	0,0041	0,95	0,0039	1,78	96,12	5,54E-02	
CE X DC / non DC	0,1084	2,49	0,1265	4,89	116,66	1,23E-02	*
CE 4X	0,0111	2,23	0,0093	4,62	83,63	8,27E-04	***
CE 5X	0,0079	1,41	0,0059	1,67	74,26	5,54E-21	***
CE 6X	0,0013	2,42	0,0011	4,34	83,74	6,22E-04	***
CE 8X	0,0052	5,64	0,0039	9,82	73,39	5,60E-03	**
CE 10X	0,0023	3,57	0,0019	6,50	81,54	6,28E-03	**
CE 12X	0,0035	2,59	0,0031	4,59	86,85	8,71E-03	**
CE 14X	0,0019	2,09	0,0017	3,79	92,75	8,50E-02	
CE 16X	0,0104	4,33	0,0094	8,01	89,96	2,41E-01	
CE 18X	0,0026	3,13	0,0034	5,09	130,31	2,71E-04	***
CE 0:X	0,0036	2,59	0,0030	4,70	84,08	1,72E-03	**
CE 2:X	0,0067	2,87	0,0070	6,10	105,57	4,36E-01	
CE 3:X	0,0013	2,36	0,0008	3,45	62,44	1,14E-17	***
CE 3:X OH	0,0002	2,62	0,0002	7,15	79,30	2,48E-03	**
CE 4:X	0,0104	2,34	0,0086	4,77	83,31	9,28E-04	***
CE 4:X OH	0,0007	2,02	0,0006	4,65	88,31	1,59E-02	*
CE 5:X	0,0035	2,63	0,0017	4,30	50,29	7,75E-23	***
CE 5:X DC	0,0032	0,87	0,0032	1,41	99,28	6,66E-01	
CE 5:X OH	0,0010	2,82	0,0008	4,68	73,99	4,69E-07	***
CE 6:X	0,0011	2,39	0,0009	4,48	83,95	9,23E-04	***
CE 6:X OH	0,0002	3,65	0,0002	5,91	82,84	7,35E-03	**
CE 7:X DC	0,0003	3,94	0,0002	7,14	79,48	4,97E-03	**
CE 8:X	0,0052	5,64	0,0039	9,82	73,39	5,60E-03	**

<b>Carnitiner</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
CE 9:X	0,0002	3,05	0,0002	4,60	83,65	1,70E-03	**
CE 10:X	0,0023	3,57	0,0019	6,50	81,54	6,28E-03	**
CE 12:X	0,0032	2,64	0,0028	4,57	86,83	8,74E-03	**
CE 12:X DC	0,0003	3,40	0,0003	7,55	87,06	9,01E-02	
CE 14:X	0,0011	2,27	0,0010	3,96	91,95	6,85E-02	
CE 14:X OH	0,0007	2,58	0,0007	4,80	94,01	2,58E-01	
CE 16:X	0,0090	4,96	0,0081	9,12	89,98	3,03E-01	
CE 16:X OH	0,0014	1,82	0,0012	3,23	89,87	5,38E-03	**
CE 18:X	0,0017	4,41	0,0025	7,19	147,03	3,27E-04	***
CE 18:X OH	0,0009	2,62	0,0009	4,89	98,96	8,52E-01	
CE 02	0,0067	2,87	0,0070	6,10	105,57	4,36E-01	
CE 03	0,0011	2,71	0,0006	3,88	58,58	5,05E-18	***
CE 03 OH	0,0002	2,62	0,0002	7,15	79,30	2,48E-03	**
CE 03:1	0,0002	3,54	0,0002	7,01	80,88	6,94E-03	**
CE 04	0,0094	2,58	0,0078	5,16	83,35	2,10E-03	**
CE 04 OH / C3-DC	0,0007	2,02	0,0006	4,65	88,31	1,59E-02	*
CE 04:1	0,0010	1,63	0,0008	3,59	82,86	1,61E-05	***
CE 05	0,0027	2,91	0,0012	5,67	42,80	1,58E-23	***
CE 05 M DC	0,0032	0,87	0,0032	1,41	99,28	6,66E-01	
CE 05 OH / C3-DC-M	0,0010	2,82	0,0008	4,68	73,99	4,69E-07	***
CE 05:1	0,0007	2,64	0,0006	4,20	77,70	2,82E-06	***
CE 05:1 DC	0,0002	3,19	0,0002	6,30	82,93	8,43E-03	**
CE 06 / C4:1-DC	0,0004	3,56	0,0004	4,50	85,34	6,99E-03	**
CE 06 OH / C5-DC	0,0002	3,65	0,0002	5,91	82,84	7,35E-03	**
CE 06:1	0,0006	2,72	0,0005	5,91	82,96	4,59E-03	**
CE 7X (C07 DC)	0,0003	3,94	0,0002	7,14	79,48	4,97E-03	**
CE 08	0,0047	6,19	0,0034	10,68	72,61	8,22E-03	**
CE 08:1	0,0005	2,27	0,0004	4,50	80,68	6,29E-05	***
CE 9X (CE09)	0,0002	3,05	0,0002	4,60	83,65	1,70E-03	**
CE 10	0,0007	2,46	0,0006	3,18	83,07	1,86E-05	***
CE 10:1	0,0012	5,83	0,0010	10,69	80,26	6,42E-02	
CE 10:2	0,0004	2,93	0,0003	5,88	82,98	5,04E-03	**
CE 12	0,0002	3,60	0,0002	5,74	90,04	1,21E-01	

<b>Carnitinester</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
CE12 DC	0,0003	3,40	0,0003	7,55	87,06	9,01E-02	
CE 12:1	0,0030	2,69	0,0026	4,74	86,57	9,31E-03	**
CE 14	0,0003	3,36	0,0003	7,70	98,34	8,43E-01	
CE 14:1	0,0004	3,69	0,0003	7,48	92,78	3,65E-01	
CE 14:1 OH	0,0003	3,69	0,0003	5,48	91,80	1,96E-01	
CE 14:2	0,0004	2,73	0,0004	5,94	86,19	2,34E-02	*
CE 14:2 OH	0,0004	3,39	0,0004	5,73	96,04	5,45E-01	
CE 16	0,0075	5,72	0,0064	10,67	86,06	2,06E-01	
CE 16 OH	0,0005	2,91	0,0004	4,18	85,35	2,56E-03	**
CE 16:1	0,0010	2,97	0,0011	6,22	111,71	1,33E-01	
CE 16:1 OH	0,0005	2,71	0,0004	4,88	91,25	1,02E-01	
CE 16:2	0,0006	2,60	0,0006	4,60	103,70	5,00E-01	
CE 16:2 OH	0,0004	2,56	0,0004	5,21	94,26	3,08E-01	
CE 18:0	0,0004	4,78	0,0005	7,25	123,80	2,57E-02	*
CE 18:1	0,0008	5,86	0,0014	9,26	166,54	4,30E-04	***
C18:1 OH	0,0009	2,62	0,0009	4,89	98,96	8,52E-01	
CE 18:2	0,0004	3,09	0,0006	5,54	131,03	5,16E-04	***

**Tabelle 32: Auswertungstabelle Triacylglyceride (TAG).** Abkürzungsbedeutung: TAG = Triacylglycerid / SFA = Gesättigte Fettsäuren / MUFA = Einfach ungesättigte Fettsäuren / PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren / X = Anzahl variabel / Rel. = relativ / MW = Mittelwert / CPS = Counts per seconds / MBV = Mean batch value / SEM = Standardfehler / Sig. = Signifikanz.

<b>Triacyl-glyceride</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>		<i>Rel. Veränderung</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Sig.</i>
	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>	<i>MW-Detektion (CPS<sub>MBV</sub>)</i>	<i>Rel. SEM (%)</i>			
TAG total	289,0130	4,51	175,6377	5,71	60,77	5,35E-09	***
TAG SFA (X:0)	43,6381	4,87	28,9899	5,99	66,43	1,94E-06	***
TAG PUFA (X:>3)	22,4662	5,17	17,9356	6,10	79,83	6,60E-03	**
TAG X:1	93,5255	4,66	53,1465	6,14	56,83	7,14E-10	***
TAG X:2	96,3394	4,49	54,9372	6,10	57,02	4,28E-10	***
TAG X:3	33,0439	4,40	20,6286	7,18	62,43	3,17E-07	***
TAG X:4	9,7293	4,92	6,6545	6,32	68,40	1,28E-05	***

<b>Triacyl- glyceride</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>			<i>p</i> -Wert	Sig.
	<i>MW</i> - Detektion (CPS <sub>MBV</sub> )	<i>Rel.</i> SEM (%)	<i>MW</i> - Detektion (CPS <sub>MBV</sub> )	<i>Rel.</i> SEM (%)	<i>Rel.</i> Veränderung (%)		
TAG X:5	3,3843	5,16	2,1253	6,27	62,80	4,15E-07	***
TAG X:6	3,9327	7,88	3,9602	9,11	100,70	9,54E-01	
TAG X:7	3,2755	6,98	3,3494	9,77	102,26	8,54E-01	
TAG X:8	1,5812	7,86	1,3300	10,81	84,11	1,94E-01	
TAG X:9	0,5631	17,59	0,5161	24,21	91,65	7,70E-01	
TAG 48:X	19,8097	4,55	13,3234	6,49	67,26	4,15E-06	***
TAG 50:X	81,6364	9,39	44,4597	15,52	54,46	6,08E-04	***
TAG 52:X	79,3548	9,41	47,2791	15,80	59,58	3,56E-03	**
TAG 54:X	24,1667	9,31	16,1736	15,68	66,93	2,22E-02	*
TAG 56:X	4,0406	9,83	3,4319	15,57	84,94	3,66E-01	
TAG 58:X	3,2086	10,49	3,2334	18,44	100,77	9,71E-01	
TAG 60:X	0,7457	11,60	0,7163	18,35	96,07	8,53E-01	
C50:0	18,2265	5,40	11,5132	5,41	63,17	3,37E-07	***
C50:1	61,9156	4,53	33,1196	6,31	53,49	3,13E-11	***
C50:2	28,6243	4,56	14,9746	6,11	52,31	8,03E-12	***
C50:3	4,8930	5,22	3,0832	7,94	63,01	5,43E-06	***
C52:0	5,6019	5,63	4,1533	9,20	74,14	5,78E-03	**
C52:1	29,0931	5,08	18,0049	6,38	61,89	2,12E-07	***
C52:2	58,1068	4,61	33,6189	6,39	57,86	2,43E-09	***
C52:3	13,9294	4,65	8,0298	7,92	57,65	4,67E-08	***
C52:4	2,7205	5,21	1,8761	10,05	68,96	1,03E-03	**
C52:5	0,4658	7,01	0,4295	6,78	92,21	4,11E-01	
C52:6	0,7070	8,60	0,5564	10,21	78,69	7,64E-02	
C54:1	2,0802	6,39	1,5153	8,77	72,84	4,28E-03	**
C54:2	7,5301	4,47	4,8058	7,67	63,82	2,28E-06	***
C54:3	12,7818	4,55	8,0408	8,21	62,91	3,17E-06	***
C54:4	6,4613	5,17	4,4441	6,03	68,78	1,76E-05	***
C54:5	1,7370	5,08	1,0310	9,86	59,36	5,25E-06	***
C54:6	0,7615	12,39	0,6150	16,36	80,76	2,94E-01	
C54:7	1,2539	11,69	1,2383	13,19	98,76	9,44E-01	
C54:8	0,5779	11,29	0,5730	17,64	99,15	9,68E-01	
C54:9	0,5631	17,59	0,5161	24,21	91,65	7,70E-01	
C56:1	0,4366	10,71	0,5067	13,22	116,06	3,97E-01	
C56:2	1,1585	7,29	0,7298	11,87	62,99	9,32E-04	***
C56:3	0,1815	20,27	0,1380	32,32	76,06	4,57E-01	

<b>Triacyl- glyceride</b>	<b>Kontrolle</b>		<b>MK4</b>			<i>p</i> -Wert	Sig.
	<i>MW</i> - Detektion ( <i>CPS</i> <sub>MBV</sub> )	<i>Rel.</i> <i>SEM</i> (%)	<i>MW</i> - Detektion ( <i>CPS</i> <sub>MBV</sub> )	<i>Rel.</i> <i>SEM</i> (%)	<i>Rel.</i> Veränderung (%)		
C56:4	0,1597	16,35	0,1624	19,13	101,71	9,47E-01	
C56:5	0,3766	14,35	0,2355	20,34	62,54	5,63E-02	
C56:6	1,2185	8,68	1,3293	10,62	109,10	5,34E-01	
C56:7	1,1351	5,39	0,9704	10,77	85,49	1,85E-01	
C56:8	1,0033	8,32	0,7571	10,16	75,45	3,49E-02	*
C58:2	0,9197	9,53	0,8081	18,01	87,87	5,17E-01	
C58:3	0,8568	8,33	0,9064	11,24	105,78	6,93E-01	
C58:4	0,2234	15,21	0,0836	43,76	37,43	7,61E-03	**
C58:5	0,5942	11,30	0,3000	25,85	50,49	6,53E-03	**
C58:6	0,9673	10,15	1,1547	10,58	119,37	2,39E-01	
C58:7	0,8866	7,89	1,1408	14,52	128,67	1,72E-01	
C60:3	0,4014	9,54	0,4303	14,25	107,21	6,92E-01	
C60:4	0,1644	19,67	0,0882	36,78	53,65	1,03E-01	
C60:5	0,2107	16,49	0,1292	25,64	61,33	9,61E-02	
C60:6	0,2784	14,90	0,3048	23,46	109,50	7,51E-01	

## 8 Publikationen

Bei folgenden Publikationen besteht eine Mitautorenschaften

Griebsch, L. V., Theiss, E. L., Janitschke, D., Erhardt, V. K. J., Erhardt, T., Haas, E. C., **Kuppler, K. N.**, Radermacher, J., Walzer, O., Lauer, A. A., Matschke, V., Hartmann, T., Grimm, M. O. W., & Grimm, H. S. (2023). Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells. *Nutrients*, 15(6), 1467. <https://doi.org/10.3390/nu15061467>

Theiss, E. L., Griebsch, L. V., Lauer, A. A., Janitschke, D., Erhardt, V. K. J., Haas, E. C., **Kuppler, K. N.**, Radermacher, J., Walzer, O., Portius, D., Grimm, H. S., Hartmann, T., & Grimm, M. O. W. (2022). Vitamin B12 Attenuates Changes in Phospholipid Levels Related to Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Cells*, 11(16), 2574. <https://doi.org/10.3390/cells11162574>

## 9 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem ersten Doktorvater Prof. Dr. habil. Marcus Grimm für seine ansteckende Begeisterung in die Biochemie, der Vergabe und Beaufsichtigung dieses spannenden Forschungsthemas, und seinem stets offenen Ohr bei Fragen und Problemen. Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater für sein uneingeschränktes Vertrauen in meine Entscheidungen und die jederzeit vorhandene Rede- und Kompromissbereitschaft. Ebenfalls danke ich meinem zweiten Doktorvater Prof. Dr. Tobias Hartmann für die Übernahme der Betreuung in der Abschlussphase und das ebenfalls stets offene Ohr und die hilfreichen Ratschläge.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Betreuerinnen Dr. Heike Grimm und Dr. Anna Lauer, welche mich in die Welt der Laborarbeit eingeführt haben. Für die unermüdliche Geduld möchte ich mich bedanken. Ohne die Unterstützung sowohl in der Erlernung der erforderlichen Handgriffe als auch in der strukturierten Erstellung einer wissenschaftlichen Arbeit hätte dieses Werk niemals entstehen können.

Ebenfalls gebührt mein Dank meinen Kommilitonen und Laborpartnern Vincent Erhardt, Oliver Walzer, Juliane Radermacher und Elodie Haas. Zusammen haben wir große Durststreckung überstanden, Probleme geteilt und Erfolge gemeinsam zelebrieren können. Wissenschaft ist Teamarbeit. Ich bedanke mich für intensive, konstruktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit während meiner Zeit im Labor. Ohne die stets ertragreiche Teamarbeit mit euch wäre diese Arbeit niemals entstanden.

Gesondert bedanke ich mich für die orthografische Kontrolle dieser Arbeit durch Shaline Keßler, Dr. Anna Lauer und Vincent Erhardt, sowie der Erstellung und Auswertung des Normfinders durch Daniel Janitschke.

Das Erstellen dieser Arbeit hat viel Zeit und Ressourcen verbraucht. Ohne meine Lebensgefährtin Shaline Keßler wäre diese Arbeit niemals entstanden. Nur deine unermüdliche Unterstützung hat das Erstellen dieser Arbeit erst ermöglicht. In Momenten der größten Verzweiflung hast du mich stets auf den richtigen Pfad geleitet und mir neuen Mut schenken können. Für deine Liebe, Glauben und Vertrauen in mich werde ich dir ein Leben lang dankbar sein. Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Eltern, Groß- und Schwiegereltern für ihre Unterstützung und Glauben an mich.

## **10 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.