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

**DIE REGULATION A β -DEGRADIERENDER ENZYME
DURCH DIE INTRAZELLULÄRE DOMÄNE VON APP
(AICD) UND DIE LIPIDHOMÖOSTASE**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von
Diplom Biologin Janine Mett
geboren am 22. April 1985 in St. Wendel

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die im Kapitel Kooperationen aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, 18.11.2016

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | VIII |
| KOOPERATIONEN | IX |
| 1 ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 1.1 DIE REGULATION Aβ-DEGRADIERENDER ENZYME DURCH DIE INTRAZELLULÄRE DOMÄNE VON APP UND DIE LIPID-HOMÖOSTASE..... | 1 |
| 1.2 THE REGULATION OF Aβ-DEGRADING ENZYMES BY THE INTRACELLULAR DOMAIN OF APP AND LIPID HOMEOSTASIS | 2 |
| 2 EINLEITUNG | 4 |
| 2.1 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT | 4 |
| 2.1.1 <i>Historischer Rückblick.....</i> | 4 |
| 2.1.2 <i>Epidemiologie.....</i> | 4 |
| 2.1.3 <i>Krankheitsbild.....</i> | 5 |
| 2.1.4 <i>Neuropathologie.....</i> | 5 |
| 2.2 MOLEKULARE MECHANISMEN DER ALZHEIMER KRANKHEIT..... | 7 |
| 2.2.1 <i>Das amyloide Vorläuferprotein APP.....</i> | 7 |
| 2.2.2 <i>Proteolytische APP-Prozessierung und Entstehung von Aβ.....</i> | 8 |
| 2.2.3 <i>Beseitigung von Aβ aus dem Hirngewebe.....</i> | 11 |
| 2.2.3.1 <i>Mechanismen zur Beseitigung von Aβ aus dem Hirngewebe.....</i> | 12 |
| 2.2.3.2 <i>Aβ-Degradation durch Neprilysin</i> | 13 |
| 2.2.3.3 <i>Aβ-Degradation durch das Insulin degradierende Enzym</i> | 15 |
| 2.2.4 <i>Funktionen der intrazellulären Domäne von APP (AICD).....</i> | 15 |
| 2.3 LIPIDE BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT..... | 17 |
| 2.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT..... | 18 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN..... | 20 |
| 3.1 MATERIAL | 20 |
| 3.1.1 <i>Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....</i> | 20 |
| 3.1.2 <i>Geräte.....</i> | 24 |
| 3.1.3 <i>Zelllinien.....</i> | 26 |
| 3.1.4 <i>In vivo-Material</i> | 27 |
| 3.1.4.1 <i>Mausmodelle.....</i> | 27 |
| 3.1.4.2 <i>Kokosnussöl-Fütterungsexperiment.....</i> | 27 |
| 3.1.4.3 <i>Humane post mortem Gehirnprouben.....</i> | 28 |
| 3.1.5 <i>Lipide</i> | 29 |
| 3.1.6 <i>Antikörper.....</i> | 30 |
| 3.1.7 <i>Kits.....</i> | 31 |
| 3.1.8 <i>Plasmide.....</i> | 32 |
| 3.2 METHODEN | 32 |
| 3.2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i> | 32 |
| 3.2.1.1 <i>Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS.....</i> | 32 |
| 3.2.1.2 <i>Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien</i> | 33 |
| 3.2.1.3 <i>Isolation von Gesamt-RNS aus Zellen und Gewebe</i> | 33 |
| 3.2.1.4 <i>Synthese komplementärer DNS.....</i> | 34 |
| 3.2.1.5 <i>Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....</i> | 35 |
| 3.2.1.6 <i>Promotor-Aktivitätsmessungen mittels Luciferase-Assay.....</i> | 36 |
| 3.2.2 <i>Zellbiologische Methoden.....</i> | 37 |
| 3.2.2.1 <i>Kultivierung eukaryotischer Zellen</i> | 37 |
| 3.2.2.2 <i>Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen</i> | 39 |
| 3.2.2.3 <i>Transfektion eukaryotischer Zellen durch Lipofektion</i> | 39 |
| 3.2.2.4 <i>Generierung stabil transfizierter IDE-Knockdown Zellen.....</i> | 40 |
| 3.2.2.5 <i>Inkubation von Zellen mit additiven Substanzen.....</i> | 41 |
| 3.2.2.5.1 <i>Inkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten.....</i> | 41 |
| 3.2.2.5.2 <i>Inkubation von Zellen mit Inhibitoren</i> | 43 |
| 3.2.2.5.3 <i>Inkubation von Zellen mit Phospholipiden.....</i> | 43 |
| 3.2.2.5.4 <i>Inkubation von Zellen mit zerebralen Lipidextrakten</i> | 43 |
| 3.2.2.6 <i>Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Test</i> | 44 |
| 3.2.2.7 <i>Messung der Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk mittels SEAP-Assay</i> | 44 |
| 3.2.3 <i>Proteinbiochemische Methoden</i> | 45 |
| 3.2.3.1 <i>Verarbeitung von Zellen und konditioniertem Medium</i> | 45 |
| 3.2.3.2 <i>Konzentrierung von Proteinen aus konditioniertem Medium</i> | 45 |
| 3.2.3.3 <i>Herstellung von Homogenaten aus Zellen und Gewebe.....</i> | 45 |
| 3.2.3.4 <i>Herstellung von Lysaten aus Zellen und Gewebe.....</i> | 46 |
| 3.2.3.5 <i>Herstellung von Membranprotein-Extrakten aus Zellen.....</i> | 46 |
| 3.2.3.6 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test</i> | 47 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.3.7 | Immunpräzipitation von APP-Prozessierungsprodukten..... | 47 |
| 3.2.3.8 | Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels vertikaler diskontinuierlicher Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) | 48 |
| 3.2.3.9 | Western Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen..... | 49 |
| 3.2.3.10 | Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen | 49 |
| 3.2.3.11 | Nachweis von löslichem A β aus murinem Hirnmaterial mittels ELISA | 50 |
| 3.2.3.12 | Messung der Gesamtdegradation von A β 40..... | 51 |
| 3.2.3.13 | Fluorometrische Enzymaktivitätsmessungen..... | 52 |
| 3.2.3.13.1 | Anregungs- und Emissions-Scan zur Ermittlung der optimalen Messparameter..... | 53 |
| 3.2.3.13.2 | Messung der NEP-Aktivität aus Zellen und Gewebe..... | 53 |
| 3.2.3.13.3 | Messung der IDE-Aktivität aus Zellen und Gewebe..... | 54 |
| 3.2.3.13.4 | Messung der IDE-Aktivität in Serum | 55 |
| 3.2.3.13.5 | Messung des direkten Effekts von Lipiden auf die Enzymaktivität von rekombinatem IDE | 56 |
| 3.2.3.13.6 | Messung der γ -Sekretase-Aktivität..... | 56 |
| 3.2.3.13.7 | Messung der aSMase-Aktivität | 57 |
| 3.2.3.14 | Fluorometrischer Nachweis der zellulären AICD-Aufnahme..... | 58 |
| 3.2.4 | <i>Lipidanalytische Methoden</i> | 58 |
| 3.2.4.1 | Herstellung zerebraler Lipidextrakte..... | 58 |
| 3.2.4.2 | Analyse der Bindung von Phosphatidylcholinen an IDE..... | 59 |
| 3.2.4.3 | Massenspektrometrie..... | 59 |
| 3.2.4.3.1 | Messung von Phosphatidylcholinen, Lyso-Phosphatidylcholinen und Carnitinen in Serum und Hirngewebe | 60 |
| 3.2.4.3.2 | Messung der mit IDE ko-immunpräzipitierten Phosphatidylcholone..... | 61 |
| 3.2.5 | <i>Statistische Datenauswertung</i> | 62 |
| 4 | ERGEBNISSE | 63 |
| 4.1 | ETABLIERUNG VON METHODEN ZUR ANALYSE DER Aβ-DEGRADATION | 63 |
| 4.1.1 | <i>Messung der Aβ40-Gesamtdegradation in lebenden N2a-Zellen</i> | 63 |
| 4.1.2 | <i>Messung der Aktivität einzelner Aβ-degradierender Enzyme</i> | 64 |
| 4.1.2.1 | Messung der NEP-Enzymaktivität..... | 66 |
| 4.1.2.2 | Messung der IDE-Enzymaktivität | 67 |
| 4.2 | EINFLUSS DER APP-PROZESSIERUNG AUF DAS Aβ-DEGRADIERENDE ENZYM NEPRILYSIN | 68 |
| 4.2.1 | <i>Einfluss von Presenilin auf NEP</i> | 68 |
| 4.2.2 | <i>Einfluss der APP-Proteinfamilie auf NEP</i> | 71 |
| 4.2.3 | <i>Einfluss von Aβ auf NEP</i> | 72 |
| 4.2.4 | <i>Einfluss von AICD auf NEP</i> | 73 |
| 4.2.4.1 | Einfluss des APP C-Terminus auf NEP | 74 |
| 4.2.4.2 | Einfluss der AICD-Supplementierung auf NEP | 75 |
| 4.2.4.3 | Einfluss der AICD50-Expression auf NEP..... | 77 |
| 4.2.5 | <i>Mechanismen der transkriptionellen Regulation von NEP durch AICD</i> | 78 |
| 4.2.5.1 | Einfluss der APP _{sw} -Mutation auf NEP..... | 78 |
| 4.2.5.2 | Einfluss der α - und β -Sekretase geschnittenen C-terminalen APP-Fragmente auf NEP..... | 79 |
| 4.2.5.3 | Einfluss der pharmakologischen α -, β - und γ -Sekretase-Inhibition auf NEP | 80 |
| 4.2.5.4 | Einfluss von IDE auf NEP | 81 |
| 4.2.5.5 | Einfluss von Fe65 auf NEP..... | 83 |
| 4.2.6 | <i>Analyse der transkriptionellen Regulation von NEP durch AICD in murinem Hirngewebe</i> | 84 |
| 4.2.6.1 | Einfluss der APP-Proteinfamilie auf NEP <i>in vivo</i> | 84 |
| 4.2.6.2 | Einfluss des APP C-Terminus auf NEP <i>in vivo</i> | 84 |
| 4.2.6.3 | Einfluss von FAD APP- und PS1-Mutationen auf NEP <i>in vivo</i> | 85 |
| 4.3 | EINFLUSS DER MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN EPA UND DHA AUF DIE Aβ-DEGRADATION | 86 |
| 4.3.1 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die Zellviabilität</i> | 87 |
| 4.3.2 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die Aβ-Gesamtdegradation</i> | 87 |
| 4.3.3 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die transkriptionelle Regulation von IDE</i> | 90 |
| 4.3.3.1 | Einfluss von EPA und DHA auf die IDE-Genexpression..... | 90 |
| 4.3.3.2 | Einfluss von EPA auf die IDE-Promotoraktivität..... | 90 |
| 4.3.4 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die Sekretion von IDE</i> | 91 |
| 4.3.4.1 | Einfluss von EPA und DHA auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteingehalt | 91 |
| 4.3.4.2 | Einfluss von DHA auf die exosomale IDE-Sekretion | 93 |
| 4.3.5 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die IDE-Aktivität</i> | 94 |
| 4.3.5.1 | Direkter Effekt von EPA und DHA auf die Aktivität von rekombinatem IDE | 94 |
| 4.3.5.2 | Bindung von EPA und DHA an rekombinantes IDE | 95 |
| 4.4 | EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE Aβ-DEGRADATION | 96 |
| 4.4.1 | <i>Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Zellviabilität</i> | 96 |
| 4.4.2 | <i>Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Gesamtdegradation</i> | 97 |
| 4.4.3 | <i>Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression</i> | 100 |
| 4.4.4 | <i>Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion von IDE</i> | 101 |
| 4.4.5 | <i>Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Enzymaktivität von rekombinatem IDE</i> | 105 |
| 4.4.6 | <i>Einfluss einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten Diät auf die Aβ-Degradation im APP_{sw}/PS1ΔExon9-Mausmodell.....</i> | 106 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.4.6.1 | Überprüfung der Aufnahme und Metabolisierung mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussöl-reichen Diät durch APP ^{sw} /PS1 Δ Exon9-Mäuse..... | 106 |
| 4.4.6.2 | Einfluss einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten Diät auf den Gehalt an löslichem A β im Gehirn von APP ^{sw} /PS1 Δ Exon9-Mäusen..... | 109 |
| 4.4.6.3 | Einfluss einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten Diät auf die IDE-Enzymaktivität im Serum von APP ^{sw} /PS1 Δ Exon9-Mäusen..... | 109 |
| 4.4.7 | <i>Veränderung des Gehalts von mittelkettigen Fettsäuren in von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe.....</i> | <i>110</i> |
| 4.5 | EINFLUSS DER BEI DER ALZHEIMER-KRANKHEIT VERÄNDERTEN ZEREBRALEN LIPIDKOMPOSITION AUF DIE Aβ-DEGRADATION..... | 113 |
| 4.5.1 | <i>Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf die Zellviabilität.....</i> | <i>113</i> |
| 4.5.2 | <i>Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf die Aβ-Degradation.....</i> | <i>114</i> |
| 4.5.3 | <i>Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf die IDE-Sekretion.....</i> | <i>116</i> |
| 4.6 | IM RAHMEN VON KOOPERATIONEN GENERIERTE ERGEBNISSE ZU WEITEREN PROJEKTEN..... | 118 |
| 4.6.1 | <i>Einfluss von Vitamin D₃ auf die APP-Prozessierung und Aβ-Degradation.....</i> | <i>118</i> |
| 4.6.2 | <i>Einfluss oxidierter DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die amyloidogene APP-Prozessierung.....</i> | <i>120</i> |
| 4.6.3 | <i>Einfluss von α-, γ- und δ-Tocopherol auf die APP-Prozessierung und Aβ-Degradation.....</i> | <i>123</i> |
| 4.6.4 | <i>Einfluss der APP-Prozessierung auf die Genexpression von PGC-1α.....</i> | <i>125</i> |
| 4.6.5 | <i>Ergebnisse zu weiteren Projekten.....</i> | <i>127</i> |
| 4.6.5.1 | <i>Einfluss von Amitriptylin und anderer Antidepressiva auf die APP-Prozessierung und Aβ-Degradation.....</i> | <i>127</i> |
| 4.6.5.2 | <i>Einfluss von Phytosterinen auf die Aβ-Degradation.....</i> | <i>129</i> |
| 4.6.5.3 | <i>Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität Aβ-degradierender Enzyme.....</i> | <i>130</i> |
| 4.6.5.4 | <i>Untersuchung der bidirektionalen Wechselwirkung zwischen Sulfatiden und der APP-Prozessierung.....</i> | <i>132</i> |
| 4.6.5.5 | <i>Einfluss von Gangliosiden und Gangliosidvorläufern auf die APP-Prozessierung und Aβ-Degradation.....</i> | <i>135</i> |
| 4.6.6 | <i>Zusammenfassung der Beteiligungen an Kooperationsprojekten.....</i> | <i>138</i> |
| 5 | DISKUSSION..... | 140 |
| 5.1 | TRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON NEPRILYSIN DURCH AICD..... | 140 |
| 5.1.1 | <i>Genregulatorische Funktion von AICD.....</i> | <i>140</i> |
| 5.1.2 | <i>Einfluss der APP-Proteinfamilie, der γ-Sekretase und AICD auf NEP.....</i> | <i>145</i> |
| 5.1.3 | <i>Mechanismen der transkriptionellen Regulation von NEP durch AICD.....</i> | <i>149</i> |
| 5.1.4 | <i>Mögliche Gründe für die inhomogene Literaturlage.....</i> | <i>152</i> |
| 5.1.5 | <i>Therapeutisches Potenzial der AICD-vermittelten transkriptionellen Regulation von NEP bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>153</i> |
| 5.2 | EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER FETTSÄUREN AUF DIE Aβ-DEGRADATION..... | 155 |
| 5.2.1 | <i>Vielfalt und Funktionen von Fettsäuren.....</i> | <i>155</i> |
| 5.2.2 | <i>Glycerophospholipide.....</i> | <i>155</i> |
| 5.2.3 | <i>EPA und DHA bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>157</i> |
| 5.2.4 | <i>Einfluss von EPA und DHA auf die Aβ-Degradation.....</i> | <i>158</i> |
| 5.2.5 | <i>Mittelkettige und langkettige Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>160</i> |
| 5.2.6 | <i>Einfluss mittel- und langkettiger Fettsäuren auf die Aβ-Degradation.....</i> | <i>161</i> |
| 5.2.7 | <i>Steigerung der IDE-abhängigen Aβ-Degradation durch EPA, DHA und mittelkettige Fettsäuren: Mögliche gemeinsame Mechanismen.....</i> | <i>165</i> |
| 5.2.7.1 | <i>Einfluss der Fettsäuren auf PPAR-Transkriptionsfaktoren.....</i> | <i>166</i> |
| 5.2.7.2 | <i>Einfluss der Fettsäuren auf die Membranfluidität und die Exosomen-Freisetzung.....</i> | <i>167</i> |
| 5.2.8 | <i>Therapeutisches Potenzial von EPA, DHA und mittelkettigen Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>168</i> |
| 5.2.8.1 | <i>Therapeutisches Potenzial von EPA und DHA bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>168</i> |
| 5.2.8.2 | <i>Therapeutisches Potenzial mittelkettiger Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit.....</i> | <i>170</i> |
| 5.2.8.3 | <i>Fazit.....</i> | <i>172</i> |
| 5.3 | EINFLUSS DER BEI DER ALZHEIMER-KRANKHEIT VERÄNDERTEN ZEREBRALEN LIPIDKOMPOSITION AUF DIE Aβ-DEGRADATION..... | 173 |
| 5.4 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 175 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 178 |
| 7 | ANHANG..... | 207 |
| 8 | PUBLIKATIONEN..... | 210 |
| 9 | DANKSAGUNG..... | 213 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celcius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| ‰ | Promille |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | engl. angiotensin converting enzyme |
| AD | Alzheimer's disease |
| ADAM | engl. a disintegrin and metalloprotease |
| AFT-Komplex | AICD/Fe65/Tip60-Komplex |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AGPS | Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthase |
| AICD | engl. APP intracellular domain |
| AJT-Komplex | AICD/JIP1/Tip60-Komplex |
| ALID | engl. amyloid precursor-like protein intracellular domain |
| ANOVA | engl. analysis of variance |
| Aph1 | engl. anterior pharynx defective 1 |
| APLP | engl. amyloid precursor-like protein |
| APOE | Apolipoprotein E |
| APP | engl. amyloid precursor protein |
| ARNI | Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitoren |
| ARSA | Arylsulfatase A |
| AS | Aminosäure |
| aSMase | azidische Sphingomyelinase |
| Aβ | Amyloid-β |
| BACE1 | engl. β-site APP cleaving enzyme 1 |
| BCA | engl. bicinchoninic acid |
| BDNF | engl. brain-derived neurotrophic factor |
| BSA | engl. bovine serum albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C31 | AICD31 |
| C50 | AICD50 |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CAD | engl. collisionally activated dissociation |
| CALLA | engl. common acute lymphocytic leukemia antigen |
| cDNS | engl. complementary DNA, cDNA |
| CE | engl. collision energy |
| CERAD | engl. Consortium to Establish A Registry for Alzheimer's Disease |
| CGT | Ceramid-Galaktosyltransferase |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CSL | CBF1-SU(H)-LAG1 |
| CUR | engl. curtain gas |
| CuSO ₄ | Kupfersulfat |
| CXP | engl. collision cell exit potential |
| dd | bidestilliert |

| | |
|------------------|---|
| DHA | engl. docosahexaenoic acid |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagels medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| Dnp | 2,4-dinitrophenyl |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DP | engl. declustering potential |
| DSL | Delta, Serrate/Jagged |
| E. Coli | Escherichia coli |
| ECE | engl. endothelin converting enzyme |
| ECL | engl. enhanced chemo-luminescence |
| EDTA | engl. ethylenediaminetetraacetic acid |
| EGTA | engl. ethylene glycol tetraacetic acid |
| ELISA | engl. enzyme linked immunosorbent assay |
| engl. | englisch |
| EOAD | engl. early onset Alzheimer's disease |
| EP | engl. entrance potential |
| EPA | engl. eicosapentaenoic acid |
| ESI | engl. electrospray ionization |
| et al. | und weitere |
| FAD | engl. familial Alzheimer's disease |
| FCS | engl. fetal calf serum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| g | Gramm oder Erdbeschleunigung |
| Gal3St1 | engl. galactosylceramide 3'-sulfotransferase 1 |
| GCS | Glukosylceramid-Synthase |
| GD3S | GD3-Synthase |
| GluCer | Glukosylceramid |
| GPI | Glykosylphosphatidylinositol |
| GS1 | engl. nebulizer gas |
| GS2 | engl. heater gas |
| GSK3 β | Glycogen Synthase Kinase 3 β |
| GWAS | engl. genome-wide association study |
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Salzsäure |
| HDAC | engl. histone deacetylases |
| HHE | 4-Hydroxy-Hexenal |
| HMGCR | Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase |
| HNE | 4-Hydroxy-Nonenal |
| HPLC | engl. high performance liquid chromatography |
| HRP | engl. horseradish peroxidase |
| IC ₅₀ | engl. half maximal inhibitory concentration (IC ₅₀) |
| IDE | engl. insulin degrading enzyme |
| ihe | engl. interface heater |
| ILVs | engl. intraluminal vesicles |
| Inh. | Inhibitor |
| IS | engl. ion spray |
| JIP1 | engl. Janus kinase interacting protein 1 |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |

| | |
|----------------------------------|--|
| KCl | Kaliumchlorid |
| KD | Knockdown |
| kDa | Kilodalton |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| Kontr. | Kontrolle |
| LakCer | Laktosylceramid |
| LB | lysogeny broth |
| LCFAs | engl. long chain fatty acids |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LOAD | engl. late onset Alzheimer's disease |
| LRP1 | engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1 |
| Lyso-PCa | Lyso-Phosphatidylcholin |
| M | Molar |
| m/ z | Masse durch Ladung |
| mA | Milliampere |
| männl. | männl. |
| Mca | 7-methoxycoumarin |
| MCFAs | engl. medium chain fatty acids |
| MCI | engl. mild cognitive impairment |
| MCTs | engl. medium chain triglycerides |
| MEF | engl. mouse embryonic fibroblast |
| MEM | engl. minimum essential medium |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minuten |
| MINT1 | engl. neuronal munc18-1-interacting protein 1 |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mm | Millimeter |
| MMP | engl. matrix metalloproteinase |
| MRM | engl. multi reaction monitoring |
| mRNS | engl. messenger RNA |
| MUFAs | engl. monounsaturated fatty acids |
| MVEs | engl. multivesicular endosomes |
| n.s. | nicht signifikant |
| N2a | Neuro-2a |
| Na ₂ HPO ₄ | di-Natriumhydrogenphosphat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| Nedd8 | engl. neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8 |
| NEM | N-Ethylmaleimide |
| NEP | Nepriylisin |
| NEXT | engl. notch extracellular truncation |
| NFTs | engl. neurofibrillary tangles |
| ng | Nanogramm |
| NICD | engl. notch intracellular domain |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar |
| NP-40 | Nonidet P40 Substitut |
| Nr. | Nummer |

| | |
|------------------|---|
| nSMase | neutrale Sphingomyelinase |
| OD | optische Dichte |
| PBS | engl. phosphate buffered saline |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCaa | Diacyl-Phosphatidylcholin |
| PC-PL | Phosphatidylcholin-Plasmalogen |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PEN2 | engl. presenilin enhancer 2 |
| PE-PL | Phosphatidylethanolamin-Plasmalogen |
| PGC1 α | engl. peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PITC | Phenylisothiocyanat |
| PLA ₂ | Phosphatidylcholin-2-acylhydrase, Phospholipase A ₂ |
| p-NPP | para-Nitrophenyl Phosphat |
| PPAR | engl. peroxisome proliferator-activated receptors |
| PPRE | engl. PPAR response element |
| PS | Presenilin |
| psi | engl. pound-force per square inch |
| PTB | Phosphotyrosin-Bindedomänen |
| PUFAs | engl. polyunsaturated fatty acids |
| qRT-PCR | engl. quantitative real time polymerase chain reaction |
| RAGE | engl. receptor for advanced glycation end products |
| RIP | engl. regulated intramembrane proteolysis |
| RNA | engl. ribonucleic acid |
| RNAi | engl. RNA interference |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| ROS | engl. reactive oxygen species |
| RT | Raumtemperatur |
| RXRs | engl. retinoid X receptors |
| sAPP α | engl. soluble α -secreted APP |
| sAPP β | engl. soluble β -secreted APP |
| SDS | engl. sodium dodecyl sulfate |
| SDS-Page | engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SEAP | sekretorische alkalische Phosphatase |
| Sek | Sekunden |
| shRNS | engl. short hairpin RNA, shRNA |
| siRNS | engl. small interfering RNA, siRNA |
| sLRP | engl. soluble lipoprotein receptor-related protein |
| SNP | engl. single nucleotide polymorphism |
| SOD2 | Superoxid-Dismutase 2 |
| SPT | Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase |
| StabwM | Standardabweichung des Mittelwertes |
| Std | Stunden |
| swe | engl. swedish |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | engl. Tris-buffered saline |
| TEM | engl. temperature |
| Tm | engl. melting temperature |
| TGN | Trans-Golgi-Netzwerk |
| ü. N. | über Nacht |

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| u.a. | unter anderem |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| v.a. | vor allem |
| v/v | Volumen / Volumen |
| W | Watt |
| w/v | Gewicht / Volumen |
| weibl. | weiblich |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZnCl ₂ | Zinkchlorid |
| α-CTF | engl. α-cleaved C-terminal fragment |
| β-CTF | engl. β-cleaved C-terminal fragment |

Aminosäuren

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| R | Arginin |
| N | Asparagin |
| D | Asparaginsäure |
| C | Cystein |
| Q | Glutamin |
| E | Glutaminsäure |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| L | Leucin |
| K | Lysin |
| M | Methionin |
| F | Phenylalanin |
| P | Prolin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |
| V | Valin |

Gensymbol

| | |
|-----------------|--------------------|
| <i>ACTB</i> | β-Aktin |
| <i>AGPS</i> | AGPS |
| <i>APBB1</i> | Fe65 |
| <i>APH1a</i> | Aph1a |
| <i>APH1b</i> | Aph1b |
| <i>APP</i> | APP |
| <i>ARSA</i> | ARSA |
| <i>BACE1</i> | BACE1 |
| <i>GAL3ST1</i> | Gal3St1 |
| <i>GSK3b</i> | GSK3β |
| <i>IDE</i> | IDE |
| <i>LRP1</i> | LRP1 |
| <i>MME</i> | NEP |
| <i>NCSTN</i> | Nicastrin |
| <i>PPARGC1A</i> | PGC1α |
| <i>PSEN1</i> | PS1 |
| <i>PSEN2</i> | PS2 |
| <i>PSENE1</i> | PEN2 |
| <i>SPTLC2</i> | SPT Untereinheit 2 |
| <i>ST8SIA1</i> | GD3S |
| <i>TP53</i> | p53 |

Nukleotide

| | |
|---|---------|
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| T | Thymin |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung..... | 8 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung der C-terminalen Region von APP..... | 10 |
| Abb. 3: Kinetische Beziehungen zwischen dem zerebralen A β -Gehalt und der Produktion, des Abbaus sowie des Exports von A β -Peptiden..... | 11 |
| Abb. 4: Fragestellung der Arbeit..... | 19 |
| Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen..... | 63 |
| Abb. 6: A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl..... | 64 |
| Abb. 7: Anregungs- und Emissionsspektrum des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH..... | 65 |
| Abb. 8: Linearität und Spezifität der NEP-Aktivitätsmessung..... | 66 |
| Abb. 9: Linearität und Spezifität der IDE-Aktivitätsmessung..... | 67 |
| Abb. 10: Einfluss der Presenilin-Genexpression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 69 |
| Abb. 11: Einfluss der FAD PS1-Mutation T354I auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 70 |
| Abb. 12: Einfluss der APP- und APLP2-Genexpression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 71 |
| Abb. 13: Einfluss der γ -Sekretase-Inhibition auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 72 |
| Abb. 14: Einfluss der A β -Supplementierung auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 73 |
| Abb. 15: Einfluss des APP C-Terminus auf NEP und die A β -Gesamtdegradation in embryonalen Mausfibroblasten..... | 74 |
| Abb. 16: Aufnahme supplementierter AICD-Peptide in embryonale Mausfibroblasten und Einfluss auf die Zellviabilität..... | 76 |
| Abb. 17: Einflusses der AICD-Supplementierung auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 77 |
| Abb. 18: Einfluss der C50-Expression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten..... | 78 |
| Abb. 19: Einfluss der FAD APPswe-Mutation auf NEP in SH-SY5Y-Zellen..... | 79 |
| Abb. 20: Einfluss der α - und β -CTF-Expression auf NEP in SH-SY5Y-Zellen..... | 79 |
| Abb. 21: Einfluss der α -, β - und γ -Sekretase-Inhibition auf NEP in SH-SY5Y-Zellen..... | 80 |
| Abb. 22: Einfluss des IDE-Knockdowns auf NEP in α -CTF-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen..... | 82 |
| Abb. 23: Einfluss der pharmakologischen IDE-Inhibition auf NEP in α -CTF überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen..... | 82 |
| Abb. 24: Einfluss des Fe65-Knockdowns auf NEP in SH-SY5Y-Zellen..... | 83 |
| Abb. 25: Einfluss von APP und APLP2 auf NEP in murinem Hirngewebe..... | 84 |
| Abb. 26: Einfluss des APP C-Terminus auf NEP in murinem Hirngewebe..... | 85 |
| Abb. 27: Einfluss der FAD-Mutationen APPswe und APPswe/PS1 Δ Exon9 auf die NEP-Genexpression in murinem Hirngewebe..... | 85 |
| Abb. 28: Einfluss von EPA und DHA auf die Viabilität von N2a-Zellen..... | 87 |
| Abb. 29: Einfluss von EPA und DHA auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen..... | 88 |
| Abb. 30: Knockdown-Effizienz und Gesamt-A β -Degradation in stabilen N2a IDE-Knockdown-Zellen..... | 89 |
| Abb. 31: Einfluss von EPA und DHA auf die A β -Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen..... | 89 |
| Abb. 32: Einfluss von EPA und DHA auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen..... | 90 |
| Abb. 33: Einfluss von EPA auf die IDE-Promotoraktivität in N2a-Zellen..... | 91 |
| Abb. 34: Einfluss von EPA und DHA auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen..... | 92 |
| Abb. 35: A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen unter Einfluss von DHA nach Exosomen-Inhibition..... | 93 |
| Abb. 36: Einfluss von EPA und DHA auf die Enzymaktivität von rekombinantem IDE..... | 94 |
| Abb. 37: Bindung von EPA und DHA an rekombinantes IDE..... | 95 |
| Abb. 38: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Viabilität von N2a-Zellen..... | 97 |
| Abb. 39: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen..... | 98 |
| Abb. 40: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen..... | 99 |
| Abb. 41: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen..... | 100 |
| Abb. 42: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen..... | 101 |
| Abb. 43: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) in N2a-Zellen..... | 103 |
| Abb. 44: Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der IDE-Sekretion bzw. der Gesamt-A β -Degradation in N2a-Zellen..... | 104 |
| Abb. 45: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Enzymaktivität..... | 105 |
| Abb. 46: Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussölreichen Diät in das Hirngewebe und das Serum von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen..... | 107 |
| Abb. 47: Einfluss einer kokosnussölreichen Diät auf den Gehalt an löslichem A β 40 und A β 42 im frontalen Kortex von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen..... | 109 |
| Abb. 48: Einfluss einer kokosnussölreichen Diät auf die IDE-Aktivität im Serum von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen..... | 110 |
| Abb. 49: Gehalt von Phosphatidylcholin mit mittelkettigen Fettsäuren in humanem <i>post mortem</i> AD-Hirngewebe..... | 111 |
| Abb. 50: Gehalt von Phosphatidylcholin mit mittelkettigen Fettsäuren im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells..... | 112 |
| Abb. 51: Viabilität von N2a-Zellen nach Inkubation mit Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe..... | 113 |
| Abb. 52: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem humanem Hirngewebe auf die A β -Degradation in N2a-Zellen..... | 114 |
| Abb. 53: Einfluss von Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen auf die A β -Degradation in N2a-Zellen..... | 115 |
| Abb. 54: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf die A β -Degradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen..... | 116 |
| Abb. 55: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen..... | 117 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 56: Einfluss von 25(OH)D ₃ auf den A β -Gehalt in murinem Hirngewebe und N2a-Zellen..... | 119 |
| Abb. 57: Einfluss von 25(OH)D ₃ auf den BACE1-Proteinspiegel in murinem Hirngewebe | 119 |
| Abb. 58: Einfluss von 25(OH)D ₃ auf die NEP-Enzymaktivität in murinem Hirngewebe und N2a-Zellen..... | 120 |
| Abb. 59: Zytotoxizität von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten..... | 121 |
| Abb. 60: Einfluss von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die Genexpression der β - und γ - Sekretase-Komponenten in SH-SY5Y-Zellen | 122 |
| Abb. 61: Einfluss von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen | 124 |
| Abb. 62: Einfluss der Presenilin-Genexpression auf SOD2 in embryonalen Mausfibroblasten | 126 |
| Abb. 63: Einflusses der AICD-Supplementierung auf die PGC1 α -Promotoraktivität in embryonalen Mausfibroblasten | 126 |
| Abb. 64: aSMase-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen nach transientem aSMase-Knockdown und Inkubation mit Antidepressiva..... | 127 |
| Abb. 65: Einfluss von Amitriptylin auf den Proteingehalt von APP, α -CTF und β -CTF in SH-SY5Y-Zellen | 128 |
| Abb. 66: Einfluss von Amitriptylin und des aSMase-Knockdowns auf die A β -Degradation im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen..... | 129 |
| Abb. 67: Einfluss von β -Sitosterin und Stigmasterin auf die Gesamt-A β - Degradation in N2a-Zellen | 130 |
| Abb. 68: Einfluss von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von IDE..... | 131 |
| Abb. 69: Einfluss von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von NEP | 131 |
| Abb. 70: Einfluss von Sulfatiden auf den A β 40- und A β 42-Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen | 133 |
| Abb. 71: Einfluss des ARSA-Knockdowns auf den A β -Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen | 133 |
| Abb. 72: Einfluss von Sulfatiden auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a- und SH-SY5Y-Zellen..... | 134 |
| Abb. 73: Einfluss der γ -Sekretase-Inhibition auf die Gal3St1-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen und der AICD- Supplementierung auf die Gal3St1-Promotoraktivität in embryonalen Mausfibroblasten | 135 |
| Abb. 74: Einfluss von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf den Proteingehalt von A β , sAPP β und sAPP α im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen | 136 |
| Abb. 75: Einfluss von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a- Zellen..... | 137 |
| Abb. 76: Modell zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen durch AICD..... | 142 |
| Abb. 77: Modell zur endogenen Regulation der NEP-Genexpression durch AICD | 151 |
| Abb. 78: Schematische Darstellung von Phosphatidylcholin | 156 |
| Abb. 79: Mögliche gemeinsame Mechanismen des Einflusses von EPA, DHA und MCFAs auf die IDE-abhängige A β - Degradation..... | 166 |
| Abb. 80: Zusammenfassung der identifizierten Mechanismen zur Regulation von NEP und IDE..... | 177 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten A β -degradierenden Proteasen | 13 |
| Tab. 2: Chemikalien | 20 |
| Tab. 3: Verbrauchsmaterialien | 22 |
| Tab. 4: Geräte und Zubehör | 24 |
| Tab. 5: Zelllinien | 26 |
| Tab. 6: Mausmodelle | 27 |
| Tab. 7: Für die Fütterungsstudie verwendete Öle | 28 |
| Tab. 8: Übersicht über humanes <i>post mortem</i> Hirngewebe aus Münster | 29 |
| Tab. 9: Statistische Übersicht über humanes <i>post mortem</i> Hirngewebe aus Amsterdam | 29 |
| Tab. 10: Lipide | 30 |
| Tab. 11: Antikörper | 30 |
| Tab. 12: Kits | 31 |
| Tab. 13: Plasmide | 32 |
| Tab. 14: Primer für murine Proben | 35 |
| Tab. 15: Primer für humane Proben | 35 |
| Tab. 16: Zellkulturmedien | 38 |
| Tab. 17: Volumina der Reagenzien für die Transfektion eukaryotischer Zellen in Abhängigkeit von der Zellkulturschalen- oberfläche | 40 |
| Tab. 18: IDE-shRNS-Plasmide | 40 |
| Tab. 19: Für Inkubationen verwendete additive Substanzen und Inkubationsbedingungen | 41 |
| Tab. 20: Für Immunpräzipitation verwendete Antikörper | 47 |
| Tab. 21: Blockier- und Inkubationsbedingungen der für den immunologischen Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen verwendeten Antikörper | 50 |
| Tab. 22: Versuchsansätze zur Bestimmung der Gesamtdegradation von A β 40 | 52 |
| Tab. 23: Fluorometrische Substrate und Messparameter für Enzymaktivitätsmessungen | 52 |
| Tab. 24: Messeinstellungen zur massenspektrometrischen Lipidanalyse | 60 |
| Tab. 25: Statistik des zeitlichen Verlaufs der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen | 63 |
| Tab. 26: Statistik der A β -Degradation in lebenden N2a -Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl | 64 |
| Tab. 27: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Viabilität von N2a-Zellen | 97 |
| Tab. 28: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen | 98 |
| Tab. 29: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen | 99 |
| Tab. 30: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen | 100 |
| Tab. 31: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen .. | 102 |
| Tab. 32: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Kulturmedium von N2a-Zellen | 103 |
| Tab. 33: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aktivität von rekombinantem IDE | 106 |
| Tab. 34: Statistik der Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussölreichen Diät in das Hirngewebe und das Serum von APP ^{swe} /PS1 Δ Exon9-Mäusen | 108 |
| Tab. 35: Statistik des Gehalts von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren in humanem <i>post mortem</i> AD- Hirngewebe | 111 |
| Tab. 36: Statistik des Gehalts von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren im Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen | 112 |
| Tab. 37: Statistik der Zytotoxizität von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten | 121 |
| Tab. 38: Statistik des Einflusses von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die Genexpression der β - und γ -Sekretase-Komponenten in SH-SY5Y-Zellen | 122 |
| Tab. 39: Statistik des Einflusses von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen | 124 |
| Tab. 40: Statistik der aSMase-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit Antidepressiva und transientem aSMase- Knockdown | 127 |
| Tab. 41: Statistik des Einflusses von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von IDE | 131 |
| Tab. 42: Statistik des Einflusses von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von NEP | 132 |
| Tab. 43: Statistik des Einflusses von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf den Proteingehalt von A β , sAPP β und sAPP α im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen | 136 |
| Tab. 44: Beteiligungen an Kooperationsprojekten | 138 |
| Tab. 45: Übersicht der Studien und Ergebnisse zur AICD-abhängigen transkriptionellen Regulation von NEP | 143 |

KOOPERATIONEN

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen von Kooperationen erarbeitet. In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über die entsprechenden Abbildungen und die experimentellen Beiträge der einzelnen Personen gegeben.

| Abbildung | Experiment/ Tätigkeit | ausführende Person |
|-----------|--|-------------------------------|
| allgemein | Betreuung/ Projekt- und Versuchsplanung | Dr. Marcus Grimm |
| Abb. 10A | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| | Bestimmung des NEP-Proteingehalts | Janine Mett |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| Abb. 10B | Messung der γ -Sekretase-Enzymaktivität | Viola Hauptenthal |
| Abb. 11A | RNS-Isolation, cDNS-Synthese | Dr. Sven Grösgen |
| | RT-PCR | Janine Mett |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| Abb. 11B | Messung der γ -Sekretase-Enzymaktivität | Viola Hauptenthal |
| Abb. 12 | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| | Bestimmung des NEP-Proteingehalts | Janine Mett |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| Abb. 14A | MEF PS1/2 -/-: | |
| | Inkubation der Zellen mit A β 40/42-Peptiden | Dr. Benjamin Hundsdoerfer |
| | RNS-Isolation, cDNS-Synthese | Dr. Sven Grösgen |
| | RT-PCR | Janine Mett |
| | MEF APP/APLP2 -/-: | |
| | Inkubation der Zellen mit A β 40/42-Peptiden, RNS-Isolation | Dr. Sven Grösgen |
| | cDNS-Synthese, RT-PCR | Janine Mett |
| Abb. 14B | Inkubation der Zellen mit A β 40/42-Peptiden, Nachweis von A β | Dr. Verena Burg |
| Abb. 15 | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| | Bestimmung des NEP-Proteingehalts | Janine Mett |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| | Messung der A β -Gesamtdegradation | Janine Mett |
| Abb. 17A | Inkubation der Zellen mit AICD-Peptiden | Janine Mett |
| | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| Abb. 19 | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| Abb. 24A | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| | Messung der NEP-Enzymaktivität | Janine Mett |
| Abb. 25 | Hirngewebe von APP -/- Mäusen: | |
| | RNS-Isolation, cDNS-Synthese | Dr. Sven Grösgen |
| | RT-PCR | Janine Mett |
| | Hirngewebe von APP/APLP2 -/- Mäusen: | |
| | RNS-Isolation, cDNS-Synthese | Dr. Sven Grösgen |
| | RT-PCR | Dr. Sven Grösgen, Janine Mett |
| | Hirngewebe von APLP2 -/- Mäusen: | |
| | RNS-Isolation | Christoph Stahlmann |
| | cDNS-Synthese, RT-PCR | Janine Mett |
| Abb. 26 | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |
| Abb. 27 | RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Dr. Sven Grösgen |

| Abbildung | Experiment/ Tätigkeit | ausführende Person |
|-------------|--|--|
| Abb. 37 | <i>in vitro</i> -Inkubation und Ko-Immunpräzipitation von IDE mit Phospholipiden massenspektrometrische Analyse | Janine Mett Christoph Stahlmann |
| Abb. 46 | Tierfütterung Vorbereitung der Proben massenspektrometrische Analyse | Prof. Dr. Heikki Tanila, Universität Kuopio, Finnland Janine Mett Christoph Stahlmann |
| Abb. 47 | Tierfütterung Bestimmung des A β 40- und A β 42-Gehalts | Prof. Dr. Heikki Tanila, Universität Kuopio, Finnland Janine Mett |
| Abb. 48 | Tierfütterung IDE-Aktivitätsmessung | Prof. Dr. Heikki Tanila, Universität Kuopio, Finnland Janine Mett |
| Abb. 49 | Vorbereitung der Proben massenspektrometrische Analyse | Janine Mett Nadine Mylonas |
| Abb. 50 | Vorbereitung der Proben massenspektrometrische Analyse | Janine Mett Nadine Mylonas |
| Abb. 56A | Bestimmung des A β 40- und A β 42-Gehalts | Janine Mett, Johannes Lehmann |
| Abb. 59 | Inkubation der Zellen mit oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten Messung der Zytotoxizität von 7,17-OH-DPA und 19,20-Epoxy-DPA Messung der Zytotoxizität von 17-OH-DHA, 17-Keto-DHA, 17-Hydroperoxy-DHA, HHE und HNE | Viola Hauptenthal Janine Mett Viola Hauptenthal |
| Abb. 60 | Inkubation der Zellen mit oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR | Viola Hauptenthal Janine Mett |
| Abb. 61A+ B | Inkubation der Zellen mit Tocopherolen Messung der A β -Gesamtdegradation | Christoph Stahlmann Janine Mett |
| Abb. 63 | Messung der PGC1 α -Promotoraktivität | Janine Mett, Christoph Stahlmann |
| Abb. 64 | Inkubation der Zellen mit Antidepressiva, Behandlung der Zellen mit aSMase-siRNS Messung der aSMase-Enzymaktivität | Dr. Tatjana Rothhaar Janine Mett |
| Abb. 65 | Inkubation der Zellen mit Amitriptylin Bestimmung des APP-, α -CTF- und β -CTF-Proteingehalts | Dr. Tatjana Rothhaar Janine Mett |
| Abb. 66 | Inkubation der Zellen mit Amitriptylin, Behandlung der Zellen mit aSMase-siRNS Messung der A β -Gesamtdegradation | Dr. Tatjana Rothhaar Janine Mett |
| Abb. 67 | Inkubation der Zellen mit β -Sitosterin und Stigmasterin Messung der A β -Gesamtdegradation | Dr. Verena Burg Janine Mett |
| Abb. 70 | Inkubation der Zellen mit Sulfatidextrakt Bestimmung des A β 40- und A β 42-Gehalts | Valerie Zimmer Janine Mett |
| Abb. 72 | Inkubation der Zellen mit Sulfatidextrakt Messung der A β -Gesamtdegradation | Valerie Zimmer Janine Mett |
| Abb. 74 | Inkubation der Zellen mit Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid Bestimmung des A β -, sAPP β - und sAPP α -Proteingehalts nach Inkubation mit Gangliosidextrakt und Glukosylceramid Bestimmung des A β -, sAPP β - und sAPP α -Proteingehalts nach Inkubation mit Laktosylceramid | Dr. Benjamin Hundsdörfer Janine Mett Dr. Benjamin Hundsdörfer |
| Abb. 75 | Inkubation der Zellen mit Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid Messung der A β -Gesamtdegradation | Dr. Benjamin Hundsdörfer Janine Mett |

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 DIE REGULATION A β -DEGRADIERENDER ENZYME DURCH DIE INTRAZELLULÄRE DOMÄNE VON APP UND DIE LIPIDHOMÖOSTASE

Die Alzheimer Krankheit stellt die häufigste Ursache primärer Demenz dar. Neuropathologisch ist die Erkrankung durch die Ablagerung des Peptids A β in Form von extrazellulär lokalisierten, amyloiden Plaques und intrazellulär auftretenden Neurofibrillenbündel aus dem Protein Tau charakterisiert. Zur Entstehung von A β kommt es infolge der sequenziellen, proteolytischen Prozessierung des Vorläuferproteins APP durch die β - und γ -Sekretase. Bei der alternativen α - und γ -Sekretase-vermittelten, nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung wird die Entstehung von A β -Peptiden hingegen verhindert. Der zerebrale A β -Gehalt wird nicht nur durch die A β -Produktion, sondern auch durch A β -abbauende Mechanismen und Transportprozesse bestimmt. Nepilysin (NEP) und das Insulin-degradierende Enzym (IDE) zählen zu den Enzymen, für die *in vivo* eine Relevanz bei der A β -Degradation gezeigt werden konnte. Da eine verringerte A β -Degradation als eine der möglichen Ursachen der Alzheimer Krankheit diskutiert wird, kann ein besseres Verständnis der an der Regulation von A β -degradierenden Enzymen beteiligten Mechanismen zur Entwicklung therapeutischer und präventiver Maßnahmen hinsichtlich der Erkrankung beitragen.

Als Beispiel für die endogene Regulation einer A β -degradierenden Protease wurde in dieser Arbeit die kontrovers diskutierte transkriptionelle Regulation von NEP durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) analysiert. Für AICD, welches infolge der proteolytischen APP-Prozessierung in das Zytosol freigesetzt wird, wurden in der Literatur eine Translokation in den Nukleus und genregulatorische Funktionen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die infolge der amyloidogenen APP-Prozessierung in azidischen, intrazellulären Kompartimenten freigesetzte AICD-Domäne die Genexpression von NEP steigert. Im Gegensatz dazu hat das bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung an der Zelloberfläche freigesetzte AICD keinen Einfluss auf die NEP-Genexpression, was wahrscheinlich auf die größere Distanz zum Zellkern und die daraus resultierende verstärkte zytosolische Degradation dieser AICD-Spezies durch IDE zurückzuführen ist. Unter Betrachtung dieser Ergebnisse können zwei Regelkreise postuliert werden, die bei der Alzheimer Krankheit möglicherweise gestört sind. Zum einen wird eine erhöhte A β -Produktion durch die AICD-vermittelte Steigerung der NEP-Genexpression und der damit einhergehenden erhöhten Degradation von A β -Peptiden ausgeglichen. Zum anderen wird eine reduzierte IDE-Enzymaktivität durch die Erhöhung des intrazellulären AICD-Gehalts und der infolgedessen gesteigerten Genexpression von NEP kompensiert.

Lipide spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten wurden weitreichende Veränderungen der Lipidkomposition beschrieben. Des Weiteren konnte vielfach belegt werden, dass die Lipidumgebung einen starken Einfluss auf die proteolytische APP-Prozessierung und somit auf die Produktion von A β -Peptiden hat. Der Einfluss der Lipidhomöostase auf A β -abbauende Mechanismen ist bislang hingegen weitestgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der mehrfach ungesättigten, in Fischölen enthaltenen Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sowie der verstärkt in Kokosnussöl vorkommenden mittelkettigen Fettsäuren (MCFAs) auf die A β -Degradation analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich EPA, DHA und MCFAs über verschiedene Mechanismen positiv auf den enzymatischen A β -Abbau auswirken. EPA steigert die Genexpression von IDE durch die Aktivierung des IDE-Promotors. DHA und MCFAs erhöhen hingegen die Sekretion von IDE in den

Extrazellulärraum, was zu einer gesteigerten Degradation von extrazellulär vorliegenden A β -Peptiden führt. Des Weiteren haben EPA und DHA einen direkten, steigernden Effekt auf die enzymatische Aktivität von IDE, der wahrscheinlich aus der stärkeren Bindung des Enzyms an diese Fettsäuren als an die korrespondierenden gesättigten Fettsäuren resultiert. Die Verabreichung von MCFAs in Form von Kokosnussöl hat auch *in vivo* einen Einfluss auf die A β -Degradation wie unter Verwendung eines Mausmodells der Alzheimer-Krankheit gezeigt werden konnte. Im Serum der mit Kokosnussöl angereicherter Diät gefütterten Mäuse liegt eine gesteigerte IDE-Aktivität vor, die auf einer erhöhten Sekretion des Enzyms in den Extrazellulärraum basieren könnte. Zudem ist der A β -Gehalt im frontalen Kortex der Tiere tendenziell reduziert. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Supplementierung von EPA, DHA und MCFAs aufgrund der gesteigerten A β -Degradation in Anwesenheit dieser Fettsäuren ein präventives bzw. therapeutisches Potential hinsichtlich der Alzheimer Krankheit besitzen könnte.

Um den Einfluss der unter den pathologischen Bedingungen der Alzheimer Krankheit veränderten zerebralen Lipidkomposition auf den A β -Abbau zu analysieren, wurden Neuroblastomzellen mit Lipidextrakten aus dem *post mortem* Hirngewebe von Alzheimer-Patienten und Kontrollpersonen behandelt. Es zeigte sich eine Reduktion der IDE-abhängigen A β -Degradation unter Einfluss der Lipidextrakte aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe, die wahrscheinlich auf eine reduzierte IDE-Sekretion in den Extrazellulärraum zurückzuführen ist. Die Behandlung der Zellen mit Lipidextrakten aus dem Hirngewebe eines Mausmodells der Alzheimer Krankheit führte zu vergleichbaren Effekten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die veränderte Lipidkomposition in von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe durch die Reduktion des enzymatischen A β -Abbaus die Akkumulation von A β -Peptiden induzieren kann und somit eine mögliche Ursache der Erkrankung darstellt.

1.2 THE REGULATION OF A β -DEGRADING ENZYMES BY THE INTRACELLULAR DOMAIN OF APP AND LIPID HOMEOSTASIS

Alzheimer's disease is the most common cause of primary dementia. Neuropathologically the disease is characterized by an accumulation of the peptide A β in the form of extracellularly localized amyloid plaques and the presence of intracellular neurofibrillary tangles composed of the protein tau. The production of A β is a consequence of the sequential proteolytic processing of the amyloid precursor protein APP by β - and γ -secretase. In contrast, in the alternative α - and γ -secretase-dependent non-amyloidogenic APP-processing pathway the generation of A β -peptides is precluded. The cerebral A β -level is not only determined by A β -production, but also by A β -degrading mechanisms and transport processes. Neprilysin (NEP) and insulin-degrading enzyme (IDE) are enzymes for which *in vivo*-relevance in A β -degradation has been demonstrated. As the reduction of A β -degradation is discussed to be a possible cause of Alzheimer's disease, a better understanding of the mechanisms involved in the regulation of A β -degrading enzymes could contribute to the development of therapeutic and preventive strategies regarding Alzheimer's disease.

As an example for the endogenous regulation of an A β -degrading protease, the controversial regulation of NEP by the intracellular domain of APP (AICD) was analyzed in this thesis. For AICD, which is released into the cytosol as a consequence of proteolytic APP-processing, translocation to the nucleus and gene-

regulatory functions have been described in literature. It could be demonstrated that the AICD-domain liberated by amyloidogenic APP-processing in intracellular acidic compartments increases the gene expression of NEP. In strong contrast, AICD released by non-amyloidogenic APP-processing at the cell surface has no impact on NEP gene expression, probably due to the greater distance to the nucleus and the resulting enhanced cytosolic degradation of this AICD-species by IDE. In consideration of these results two regulatory cycles can be postulated, which might be disturbed in Alzheimer's disease. On the one hand, enhanced A β -production is balanced by the AICD-mediated increase in NEP gene expression resulting in enhanced degradation of A β -peptides. On the other hand, reduced IDE enzyme activity is compensated by the increase in the intracellular AICD level leading to stimulation of NEP gene expression.

Lipids play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In the brain tissue of people suffering from Alzheimer's disease extensive alterations in lipid composition have been described. Additionally, it is well established that the lipid environment has a strong impact on proteolytic APP-processing and hence on the production of A β -peptides. In contrast, the influence of lipid homeostasis on A β -degrading mechanisms is largely unknown. In this thesis the impact of the polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) contained in fish oils as well as of medium chain fatty acids (MCFAs) comprised in coconut oil on A β -degradation was analyzed. It could be demonstrated, that EPA, DHA and MCFAs stimulate enzymatic A β -degradation via several mechanisms. EPA enhances the gene expression of IDE by activating the IDE promoter. DHA and MCFAs increase the secretion of IDE into the extracellular space resulting in increased degradation of extracellularly localized A β -peptides. Additionally, EPA and DHA have a direct stimulating effect on IDE enzyme activity, probably due to stronger direct interaction between the enzyme and these fatty acids than between IDE and the corresponding saturated fatty acids. Supplementation of MCFAs in the form of coconut oil also has an influence on A β -degradation *in vivo* as demonstrated by using a mouse model of Alzheimer's disease. In the serum of mice fed with a coconut oil-rich diet IDE activity is increased, possibly due to enhanced secretion of the enzyme into the extracellular space. In addition, in the frontal cortex of these animals A β -levels tend to be reduced. Altogether these results indicate that supplementation of EPA, DHA and MCFAs could have a preventive and therapeutic potential regarding Alzheimer's disease due to increased A β -degradation in the presence of these fatty acids.

In order to analyze the impact of the altered cerebral lipid composition under the pathological situation of Alzheimer's disease on A β -degradation, neuroblastoma cells were incubated with lipid extracts derived from *post mortem* brain tissue of individuals affected by Alzheimer's disease and control persons. A reduction of IDE-dependent A β -degradation in the presence of lipid extracts derived from Alzheimer's disease brain tissue was observed, probably due to reduced IDE secretion into the extracellular space. Treatment of cells with lipid extracts derived from the brain tissue of an Alzheimer's disease mouse model lead to similar effects. These results indicate that the altered lipid composition in brain tissue affected by Alzheimer's disease can induce the accumulation of A β -peptides by reducing enzymatic A β -degradation and therefore may be a possible cause of the disease.

2 EINLEITUNG

2.1 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT

2.1.1 HISTORISCHER RÜCKBLICK

Die erste Beschreibung der Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimer's disease, AD) als "einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde" erfolgte im Jahr 1906 im Rahmen der 37. Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer. Er beschrieb den Fall seiner Patientin Auguste Deter, die nach 4 1/2-jährigem, durch Gedächtnisverlust, Aggression und Verwirrung geprägtem Krankheitsverlauf im Alter von 55 Jahren verstarb. Alzheimer erkannte erstmals den Zusammenhang zwischen dieser klinischen Symptomatik und den histologischen Auffälligkeiten im Hirngewebe seiner Patientin, die heute als neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs) und amyloide Plaques bekannt sind (Alzheimer, 1907). Das Vorkommen einer „stärkeähnlichen“ Substanz (Amyloid) in humanem Hirngewebe wurde bereits 1854 durch Rudolf Virchow beobachtet (Virchow, 1854a, b), einen möglichen Zusammenhang dieser Ablagerungen mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten stellte Virchow allerdings nicht her.

In einer Publikation Emil Kräplins aus dem Jahr 1910 wurde die Krankheit erstmals nach ihrem Entdecker als „Alzheimer Krankheit“ bezeichnet (Kraepelin, 1910).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIE

Im Jahr 2015 waren weltweit schätzungsweise 46,8 Millionen Menschen von Demenzerkrankungen betroffen, wobei die Prävalenz bei Frauen etwas höher als bei Männern ist (World Alzheimer Report, 2015). AD stellt mit etwa 50-70% die häufigste Ursache von Demenz im höheren Erwachsenenalter dar (Plassman et al., 2007) und ist neben Krebs, Herz-Kreislauf-erkrankungen und Diabetes eine der Haupttodesursachen in westlichen Industrienationen (St George-Hyslop, 2000).

Ein hohes Lebensalter ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz. Die Prävalenzrate nimmt mit zunehmendem Alter exponentiell zu, innerhalb der westeuropäischen Bevölkerung steigt sie von 1,6% in der Altersgruppe der 60-64-Jährigen auf 39,8% in der Gruppe der über 90-Jährigen an (World Alzheimer Report, 2015). In Übereinstimmung damit sind nur 4% der an AD erkrankten US-Amerikaner jünger als 65 Jahre, während 81% der Betroffenen ein Alter von mehr als 75 Jahren aufweisen (Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2015). In der US-amerikanischen Bevölkerung beträgt das geschätzte Lebenszeitrisko für AD ab einem Alter von 65 Jahren 12% für Frauen und 6,3% für Männer (Seshadri et al., 2006).

Aktuellen Schätzungen zufolge beläuft sich die weltweite prozentuale Prävalenz von Demenzen für Personen mit einem Lebensalter von mehr als 60 Jahren auf 5,2%. Die weltweite jährliche Inzidenz beträgt für über 60-Jährige mehr als 9,9 Millionen, was einer Neuerkrankung alle 3,2 Sekunden entspricht (World Alzheimer Report, 2015). Es ist davon auszugehen, dass sich die Anzahl der von Demenzerkrankungen betroffenen Menschen bis 2030 nahezu verdoppeln bzw. bis 2050 sogar nahezu verdreifachen wird (World Alzheimer Report, 2015). AD bzw. Demenzerkrankungen allgemein werden daher zunehmend an klinischer, sozialer und sozioökonomischer Bedeutung gewinnen.

2.1.3 KRANKHEITSBILD

Der Verlauf von AD, der durch einen unaufhaltsam fortschreitenden Verlust kognitiver Leistung gekennzeichnet ist, wird in drei Stadien unterteilt (Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2015). Die präklinische Phase der Erkrankung, die bis zu 20 Jahre dauern kann (Jack et al., 2009; Reiman et al., 2012; Villemagne et al., 2013), ist durch beginnende pathologische Veränderungen im Hirngewebe charakterisiert. Diese können durch bildgebende Verfahren oder die Untersuchung von Biomarkern im Blut bzw. der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden, gehen allerdings noch nicht mit klinischen Symptomen einer Demenz einher. Im zweiten Stadium von AD kommt es zu milden kognitiven Beeinträchtigungen (engl. mild cognitive impairment, MCI), die bereits messbar sind, das alltägliche Leben der Betroffenen aber nicht deutlich beeinflussen. Zu diesen anfänglichen klinischen Symptomen zählen Gedächtnisschwund sowie räumliche und zeitliche Desorientierung. Etwa 50% der Personen, bei denen MCI diagnostiziert wurde entwickeln innerhalb von drei bis vier Jahren eine Demenz (Petersen et al., 1999), welche das dritte Krankheitsstadium von AD darstellt. Hierbei kommt es zu einem starken Gedächtnis- und Sprachverfall, Erkennungsstörungen und Inkontinenz. Die Patienten versterben im Durchschnitt drei bis zehn Jahre nach der Diagnose meist infolge von Sekundärerkrankungen (Zanetti et al., 2009).

Man unterscheidet die präsenile, familiäre von der senilen, sporadisch auftretenden Form der AD, wobei diese bezüglich ihrer Symptomatik und Neuropathologie große Ähnlichkeiten aufweisen. Eine Unterscheidung der beiden Erkrankungsformen ist klinisch häufig nur anhand des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Manifestation der ersten Symptome möglich.

Im Fall der weitaus häufigeren sporadischen Variante der Krankheit (Bekris et al., 2010; Goedert et al., 1994) treten die klinischen Symptome klassischerweise nach Erreichen des 65. Lebensjahres auf, weshalb diese AD-Form auch als LOAD (engl. late onset Alzheimer's disease) bezeichnet wird. Neben dem Alter stellen u.a. Arteriosklerose, Übergewicht, Diabetes mellitus, Hypertonie sowie Hypercholesterinämie die Hauptrisikofaktoren für das Auftreten von LOAD dar (Barnes und Yaffe, 2011; Polidori et al., 2012). Als bedeutendster genetischer Risikofaktor für die sporadisch auftretende AD gilt das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E (ApoE) (2.3) (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). In genomweiten Assoziationsstudien (engl. genome-wide association studies, GWAS) wurden mehr als 20 weitere Genloci identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für LOAD assoziiert sind. Die von den entsprechenden Genen kodierten Proteine besitzen Funktionen bei dem Cholesterin- und Lipidmetabolismus (2.3), der Immunantwort, inflammatorischen Prozessen und dem endosomalen Transport. Teilweise ist für diese Proteine aber auch ein Einfluss auf die mit der A β - und Taupathologie assoziierten Mechanismen bekannt (Van Cauwenberghe et al., 2016).

Im Gegensatz zu LOAD manifestiert sich die Symptomatik der seltenen familiären AD (engl. familial Alzheimer's disease, FAD) bereits vor dem 60. Lebensjahr, in Einzelfällen sogar im juvenilen Alter, weshalb sie auch EOAD (engl. early onset Alzheimer's disease) genannt wird (Bagyinszky et al., 2014; Wisniewski et al., 1998). Sie wird meistens durch autosomal dominant vererbte Punktmutationen in den für das amyloide Vorläuferprotein APP (engl. amyloid precursor protein), Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) kodierenden Genen verursacht (2.2.2) (Levy-Lahad et al., 1995; Levy et al., 1990; Sherrington et al., 1995). Insgesamt sind nur etwa 1-5% der AD-Erkrankungen auf FAD/EOAD zurückzuführen (Bekris et al., 2010; Goedert et al., 1994).

2.1.4 NEUROPATHOLOGIE

Histopathologisch ist AD durch eine massive Degeneration von Neuronen sowie durch das Auftreten der intrazellulären NFTs und der Ablagerung des Peptids Amyloid- β (A β) in Form von extrazellulär

lokalisierten amyloiden Plaques charakterisiert (Goedert et al., 1991; Probst et al., 1991). Weder bei den NFTs noch bei den amyloiden Plaques handelt es sich um Veränderungen des Hirngewebes, die für AD spezifisch sind. Ihr gemeinsames und stark ausgeprägtes Vorkommen ist jedoch charakteristisch für AD, worauf die neuropathologische Diagnose basiert.

Im Hirngewebe von AD-Patienten tritt die neuronale Degeneration und ein signifikanter Verlust von Synapsen vor allem im Bereich des Hippocampus sowie in den frontalen, temporalen und parietalen Kortexregionen auf (Gomez-Isla et al., 1996; Scheff und Price, 1993, 1998). Makroskopisch hat dies eine starke kortikale und hippocampale Atrophie und eine damit einhergehende Erweiterung der Sulci und Ventrikel zur Folge (Dickerson et al., 2001; Mouton et al., 1998; Schott et al., 2005).

Die intrazellulären NFTs bestehen überwiegend aus gepaarten, doppelhelikalen Filamenten des Proteins Tau in hyperphosphorylierter Form (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Grundke-Iqbal et al., 1986b). Bei Tau handelt es sich um ein mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches als Stabilisator der Mikrotubuli-Struktur agiert (Drubin und Kirschner, 1986; Weingarten et al., 1975). Durch die bei AD auftretende Tau-Hyperphosphorylierung (Goedert et al., 1993; Grundke-Iqbal et al., 1986b) ist die Wechselwirkung zwischen dem Protein und den Mikrotubuli gestört (Jameson et al., 1980). Daraus resultiert eine Destabilisierung des Zytoskeletts, eine Beeinträchtigung axonaler Transportprozesse sowie die Ablagerung des ungebundenen Taus in Form von NFTs, was zu einem Absterben der betroffenen Zellen führen kann (Iqbal et al., 2005; Kolarova et al., 2012). Bei AD folgt das Auftreten und die Verteilung der Taupathologie einem stereotypischen Muster, worauf die Einteilung von AD in sechs Verlaufsstadien, die sogenannten Braak-Stadien basiert. Demnach sind die neurofibrillären Ablagerungen zunächst im transentorhinalen Kortex, anschließend im limbischen System und erst mit zunehmender Schwere der Erkrankung im Neokortex nachzuweisen (Braak und Braak, 1991).

Bei dem Hauptbestandteil der extrazellulär lokalisierten amyloiden Plaques handelt es sich um das bei der proteolytischen Prozessierung des Vorläuferproteins APP freigesetzte, hydrophobe Peptid A β (Glennner und Wong, 1984; Kang et al., 1987; Masters et al., 1985). Dieses etwa 4kDa große Peptid wird nicht nur unter pathologischen Bedingungen, sondern auch während des normalen Zellmetabolismus gebildet (Haass et al., 1992b). Bei AD kommt es jedoch infolge eines Ungleichgewichts zwischen der Bildung und dem Abbau von A β zu einer Akkumulation von bis zu 10mg des Peptids im Hirngewebe (Hama und Saido, 2005; Hardy und Selkoe, 2002; Karran et al., 2011; Saido, 2013). A β kommt in verschiedenen Varianten vor, die meist an Position 38-43 enden (Glennner und Wong, 1984) und häufig N-terminal verkürzt sind. Die am häufigsten vorkommende Form des Peptids stellt A β X-40 (im Folgenden vereinfacht als A β 40 bezeichnet) dar. Neben A β 40 ist A β X-42 (im Folgenden vereinfacht als A β 42 bezeichnet) von großer Bedeutung, da es aufgrund der beiden zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren Isoleucin (an Position 41) und Alanin (an Position 42) eine verstärkte Aggregationstendenz aufweist (Jarrett et al., 1993) und die dominanteste A β -Form innerhalb der amyloiden Plaques darstellt (Iwatsubo et al., 1994; Tamaoka et al., 1995). Bei dem mehrstufigen Aggregationsprozess der Peptide entstehen zunächst A β -Oligomere, welche dann weiter zu Protofibrillen, reifen Fibrillen und schließlich zu unlöslichen Plaques aggregieren (Caughey und Lansbury, 2003; Chiti und Dobson, 2006). Man geht heute davon aus, dass insbesondere oligomere A β -Spezies neurotoxische Eigenschaften aufweisen (Lambert et al., 1998; Lesne et al., 2006; Shankar et al., 2008).

Der genaue temporäre und pathophysiologische Zusammenhang zwischen der Akkumulation von A β und der Taupathologie bei AD ist bislang nicht bekannt. Der allgemein favorisierten „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ zufolge stellt die Ablagerung von A β -Peptiden im Hirngewebe jedoch das initiale Ereignis der Pathogenese dar (Hardy und Higgins, 1992). Diese leitet bereits Jahre bzw. Jahrzehnte (Jack et al., 2009; Reiman et al., 2012; Villedaigne et al., 2013) vor dem Auftreten erster Symptome zelluläre

Kaskaden ein, welche zur Ablagerung von Tau, dem Untergang von Neuronen und Synapsen und folglich zur Manifestation der Demenz führen (Hardy und Selkoe, 2002). Die These, dass es sich bei den NFTs um ein A β -induziertes sekundäres Ereignis während der Progression der Erkrankung handelt, wird von unterschiedlichen Studien gestützt. So konnte mehrfach *in vivo* unter Verwendung verschiedener AD-Mausmodelle eine Induktion der NFT-Bildung durch A β sowie ein zeitliches Vorausgehen der A β -Pathologie vor dem Auftreten von NFTs nachgewiesen werden (Bolmont et al., 2007; Gotz et al., 2001; Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2003). Umgekehrt scheint die A β -Pathologie unabhängig von Tau zu sein (Hurtado et al., 2010; Saul et al., 2013).

2.2 MOLEKULARE MECHANISMEN DER ALZHEIMER KRANKHEIT

2.2.1 DAS AMYLOIDE VORLÄUFERPROTEIN APP

A β entsteht auch während des normalen Zellmetabolismus durch die sequentielle proteolytische Prozessierung des Vorläuferproteins APP. APP ist ein ubiquitär exprimiertes TypI-Transmembranprotein, welches aus einer großen Ektodomäne, einer einzelnen hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne besteht (Dyrks et al., 1988; Kang et al., 1987). Das Protein verfügt zudem über ein N-terminales Signalpeptid, wodurch es vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat und das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran transportiert wird. Hierbei unterliegt APP posttranslationalen Modifikationen in Form von N- und O-Glykosylierungen (Weidemann et al., 1989). Nach der Internalisierung an der Plasmamembran gelangt APP über den endosomalen Transportweg wieder zurück an die Zelloberfläche oder wird lysosomal abgebaut (Haass et al., 1992a; Koo und Squazzo, 1994; Lai et al., 1995).

APP bildet zusammen mit den Proteinen APLP (engl. amyloid precursor-like protein) 1 und 2 eine evolutionär konservierte Proteinfamilie (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993), wobei APLP1 und APLP2 im Gegensatz zu APP keine A β -Domänen beinhalten (Aydin et al., 2012). APLP2 wird wie APP ubiquitär exprimiert, die Expression von APLP1 ist hingegen auf neuronales Gewebe beschränkt (Lorent et al., 1995; Slunt et al., 1994; Thinakaran, 1995). Das für APP kodierende Gen ist beim Menschen auf Chromosom 21 lokalisiert (21q21.3) und besteht aus 18 Exons (Yoshikai et al., 1990). Durch alternatives Spleißen entstehen acht verschiedene APP-Isoformen, von denen APP₆₉₅ (Bezeichnung entsprechend der Länge in Aminosäuren) die häufigste in Neuronen vorkommende Isoform darstellt (Kang und Muller-Hill, 1990; Sandbrink et al., 1994b).

Die genauen physiologischen Funktionen von APP und seinen Homologen sind trotz intensiver Forschung nicht bekannt. In der Literatur werden die Proteine vor allem mit der Langzeitpotenzierung (Dawson et al., 1999), der Zelladhäsion (Soba et al., 2005), der Synaptogenese (Ashley et al., 2005; Priller et al., 2006), dem Wachstum von Neuriten (Milward et al., 1992; Young-Pearse et al., 2008), der neuronalen Migration (Young-Pearse et al., 2007), der neuronalen Differenzierung (Caille et al., 2004; Ohsawa et al., 1999) sowie der Regulation der Lipidhomöostase (2.3) in Verbindung gebracht. Der Gen-Knockout einzelner Mitglieder der Proteinfamilie führt zu nicht letalen Defiziten wie dem Verlust an Körper- und Hirngewicht und einer verringerten Lokomotion (Magara et al., 1999; Zheng et al., 1995). Die Defizienz von APP oder APLP1 in Kombination mit APLP2 bzw. die Defizienz aller drei Homologen wirkt sich hingegen perinatal letal aus (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004; Wang et al., 2005b). Die Letalität dieser Knockout-Tiere sowie die starke evolutionäre Konservierung von APP, APLP1 und APLP2 deuten auf wichtige, teilweise überlappende Funktionen der Proteine im Nervensystem von Säugetieren hin (Aydin et al., 2012).

2.2.2 PROTEOLYTISCHE APP-PROZESSIERUNG UND ENTSTEHUNG VON A β

Die proteolytische Spaltung von APP, welche starke Ähnlichkeiten mit der Prozessierung des Notch-Rezeptors aufweist (5.1.1) (Grimm et al., 2013b), kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Dabei kommt es infolge der sequentiellen Proteolyse von APP durch Enzyme, die als Sekretasen bezeichnet werden, zur Entstehung membrangebundener und sezernierter Prozessierungsprodukte. A β stellt im Fall des durch die β - und γ -Sekretase katalysierten sogenannten amyloidogenen APP-Prozessierungsweges eines dieser Produkte dar. Bei der in den meisten Zelllinien dominanten, nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung durch die α - und γ -Sekretase wird hingegen kein A β gebildet (Abb. 1) (De Strooper und Annaert, 2000; Lammich et al., 1999).

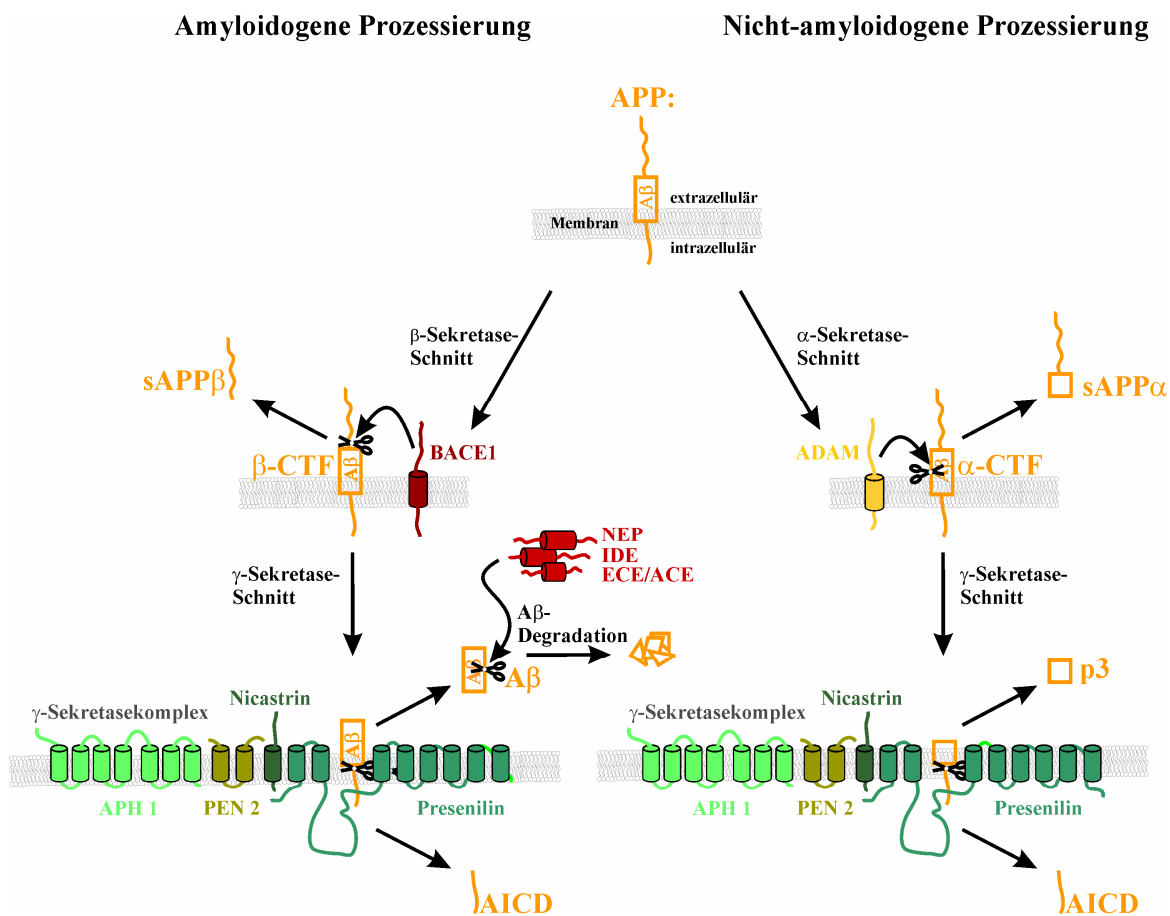


Abb. 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

Bei der amyloidogenen APP-Prozessierung (links) wird APP zunächst durch die β -Sekretase BACE1 geschnitten, wodurch sAPP β und β -CTF entstehen. β -CTF wird anschließend durch den γ -Sekretasekomplex weiter zu A β und AICD prozessiert. Das entstandene A β kann durch verschiedene Enzyme degradiert werden. Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (rechts) wird APP von der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne geschnitten, wodurch es zur Entstehung von sAPP α und α -CTF kommt. Durch den γ -Sekretase-Schnitt werden schließlich AICD und das Peptid p3 gebildet.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2013b)

Bei der α -Sekretase, die die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung einleitet, handelt es sich um Mitglieder der ADAM (engl. a disintegrin and metalloprotease)-Proteinfamilie. Die α -Sekretase-katalysierte APP-Prozessierung an Position 16 innerhalb der A β -Sequenz ist hauptsächlich auf die enzymatische Aktivität der Proteine ADAM9, ADAM10, ADAM17 zurückzuführen (Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999; Slack et al., 2001), wobei die konstitutive α -Sekretase-Aktivität in neuronalen Zellen hauptsächlich von ADAM10 ausgeht (Kuhn et al., 2010). Neben APP ist als weiteres wichtiges

Substrat der α -Sekretase ADAM17 der Notch-Rezeptor zu nennen, dessen proteolytische Prozessierung eine hohe entwicklungsbiologische Relevanz besitzt (Brou et al., 2000).

Als proteolytisch aktive β -Sekretase wurde die membrangebundene Aspartatprotease BACE1 (engl. β -site APP cleaving enzyme 1) identifiziert (Vassar et al., 1999). Das Enzym katalysiert den ersten Schritt der amyloidogenen APP-Prozessierung, die letztlich in der Freisetzung von A β resultiert. BACE1 verfügt über ein saures pH-Optimum, und ist vor allem im Golgi-Apparat, dem TGN und den Endosomen lokalisiert (Grbovic et al., 2003; Vassar et al., 1999).

Die γ -Sekretase ist ein Enzymkomplex, für dessen enzymatische Aktivität mindestens vier Proteine erforderlich sind: PS1 oder PS2 als katalytisches Zentrum, Aph1a oder b (engl. anterior pharynx defective 1), PEN2 (engl. presenilin enhancer 2) und Nicastrin (Baulac et al., 2003; Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003). Die γ -Sekretase ist in zahlreichen intrazellulären Kompartimenten sowie der Plasmamembran lokalisiert (Chyung et al., 2005; Frykman et al., 2010) und schneidet ihre Substrate nach Abspaltung der Ektodomäne innerhalb des hydrophoben Bereichs der Membran. Diese proteolytische Aktivität, die häufig bei wichtigen zellulären Signalkaskaden zu beobachten ist, wird als RIP (engl. regulated intramembrane proteolysis) bezeichnet (Brown et al., 2000; Selkoe und Kopan, 2003). Aktuell sind mehr als 90 Substrate des Enzyms bekannt, bei denen es sich überwiegend um Typ I-Transmembranproteine handelt (Haapasalo und Kovacs, 2011). Unter anderem katalysiert die γ -Sekretase den S3-Schnitt des Notch-Rezeptors, der in der Freisetzung der genregulatorisch aktiven intrazellulären Notch-Domäne (engl. notch intracellular domain, NICD) resultiert (De Strooper et al., 1999).

Im Fall der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP zunächst innerhalb der Ektodomäne durch die α -Sekretase geschnitten, wodurch sAPP α (engl. soluble α -secreted APP) freigesetzt wird und das 83 Aminosäuren umfassende Fragment α -CTF (engl. α -cleaved C-terminal fragment) in der Membran verbleibt. α -CTF wird anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert, was zu der Sekretion des Peptids p3 und der Freisetzung der intrazellulären Domäne von APP (engl. APP intracellular domain, AICD) in das Zellinnere führt (Haass et al., 1992b; Haass et al., 1993; Lammich et al., 1999; Le Brocque et al., 1998). Da die Schnittstelle der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne von APP lokalisiert ist (Esch et al., 1990), wird bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung kein A β , sondern das N-terminal um 16 Aminosäuren verkürzte Peptid p3 freigesetzt (Abb. 1). p3 besitzt keine ausgeprägten Aggregationseigenschaften und somit kein pathogenes Potential (Dulin et al., 2008). Im Gegensatz zur amyloidogenen APP-Prozessierung findet der nicht-amyloidogene APP-Prozessierungsweg durch die α - und γ -Sekretase an der Plasmamembran statt (Ehehalt et al., 2003; Parvathy et al., 1999).

Die amyloidogene APP-Prozessierung wird durch die β -Sekretase initiiert. Durch den β -Sekretase-Schnitt in der Ektodomäne von APP entsteht sAPP β (engl. soluble β -secreted APP), das in den Extrazellulärraum sezerniert wird und das 99 Aminosäuren umfassende, membranständige Fragment β -CTF (engl. β -cleaved C-terminal fragment). β -CTF wird anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert, wodurch es zur Freisetzung von A β in den Extrazellulärraum und von AICD in das Zytosol kommt (Abb. 1) (Kakuda et al., 2006; Le Brocque et al., 1998; Vassar et al., 1999). Aufgrund der intrazellulären Lokalisation von BACE1 findet die amyloidogene APP-Prozessierung überwiegend in den Endosomen statt (Carey et al., 2005; Grbovic et al., 2003; Rajendran et al., 2006). Aktuellen Modellen zufolge ist die amyloidogene APP-Prozessierung innerhalb der Membran in den sogenannten *Lipid raft*-Mikrodomänen lokalisiert, mit denen APP, BACE1 und der γ -Sekretasekomplex zumindest partiell assoziiert sind (Ehehalt et al., 2003; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004). Hierbei handelt es sich um kleine (10-200nm), dynamische, detergentenresistente Membran-Mikrodomänen, die einen besonders hohen Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden aufweisen. *Lipid raft*-Membranmikrodomänen sind im Vergleich zu den sogenannten *Non raft*-Domänen, die überwiegend aus Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren bestehen, dichter

gepackt und haben eine große Bedeutung für Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen sowie für verschiedene intrazelluläre Transportprozesse und Signalwege (Lingwood und Simons, 2010; London und Brown, 2000). Im Gegensatz zu der amyloidogenen APP-Prozessierung erfolgt die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP primär in den *Non raft*-Membranmikrodomänen (Ehehalt et al., 2003).

Neben dem klassischen β -Sekretase-Schnitt vor der ersten Aminosäure von A β katalysiert BACE1 auch den sogenannten alternativen β -Sekretase-Schnitt (β') an Position 11 der A β -Sequenz (Abb. 2A), der zur Bildung N-terminal verkürzter A β -Peptide führt (Gouras et al., 1998; Vassar et al., 1999). Das Auftreten von A β - und AICD-Peptiden unterschiedlicher Länge kann außerdem durch die Existenz weiterer γ -Sekretase-Schnittstellen erklärt werden. Diese sind weiter in C-terminaler Richtung innerhalb der Transmembrandomäne von APP lokalisiert und werden als ϵ - und ζ -Schnittstellen bezeichnet (Abb. 2B) (Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004). Man geht davon, dass zunächst der ϵ -Schnitt zwischen Position 49/50 bzw. 48/49 der A β -Sequenz erfolgt, wodurch AICD50/51 und A β 48/49 entsteht. Die A β 48- bzw. A β 49-Peptide werden anschließend schrittweise um jeweils drei Aminosäuren zu A β 42 (A β 48 \rightarrow A β 45 \rightarrow A β 42) bzw. A β 40 (A β 49 \rightarrow A β 46 \rightarrow A β 43 \rightarrow A β 40) verkürzt (Abb. 2B) (Funamoto et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005). Die Verkürzung um jeweils drei Aminosäuren kann dadurch erklärt werden, dass die Schnittstellen der γ -Sekretase im äußeren Bereich der α -helikalen Transmembrandomäne von APP lokalisiert sind und jede Windung der α -Helix etwa 3,6 Aminosäuren umfasst (Qi-Takahara et al., 2005). Durch die weitere Abspaltung von drei, vier oder fünf Aminosäuren wird ein geringer Anteil der A β 40-, A β 42- und A β 43-Peptide zu A β 39, A β 38 und A β 37 umgesetzt (Morishima-Kawashima, 2014).

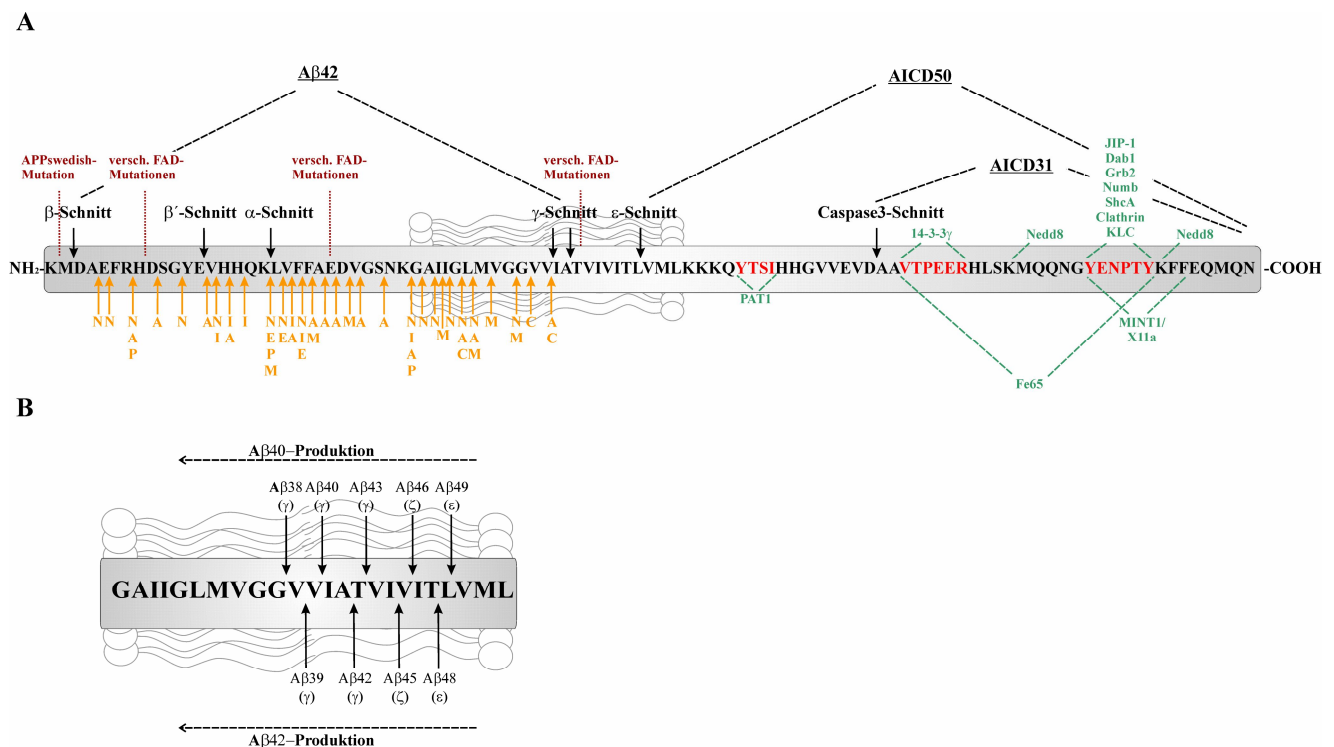


Abb. 2: Schematische Darstellung der C-terminalen Region von APP

(A) Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz von APP₆₉₅ inklusive der Sekretase-Schnittstellen und den Positionen von FAD-Mutationen (dunkelrot). Nach seiner Freisetzung kann A β durch eine Vielzahl von Proteasen an zahlreichen Positionen enzymatisch angebannt werden (orange): A: engl. angiotensin converting enzyme (ACE), C: Cathepsin B, E: engl. endothelin converting enzyme (ECE), I: engl. insulin degrading enzyme (IDE), M: engl. matrix metalloproteinase (MMP), N: Nephrylysin (NEP), P: Plasmin. Die freigesetzte AICD-Domäne beinhaltet Sequenz-Motive (rot), die wichtig für die Interaktion mit Adapterproteinen (grün) sind.

(B) Vergrößerte Darstellung der Transmembrandomäne von APP inklusive der verschiedenen Schnittstellen der γ -Sekretase.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2013b, Abb. B nach Haass et al., 2012)

Mutationsbedingte Modifikationen der APP-Prozessierung stellen die Ursache der seltenen, vererbaren AD-Variante FAD dar. Bislang konnten mehr als 200 Mutationen in den für APP, PS1 und PS2 kodierenden Genen identifiziert werden, die mit FAD assoziiert sind. Die meisten der bekannten pathogenen FAD-APP-Mutationen sind in oder nahe der A β -Domäne lokalisiert (Abb. 2A) und resultieren in einer Steigerung der Gesamt-A β -Produktion. Bei den FAD-Mutationen in den für PS1 und PS2 kodierenden Genen handelt es sich hingegen häufig um γ -Sekretase-*loss of function*-Mutationen, die eine Verschiebung des A β 40/42-Verhältnisses zugunsten von A β 42 zur Folge haben (Bertram et al., 2010; De Strooper, 2007; Levy-Lahad et al., 1995; Levy et al., 1990; Sherrington et al., 1995; Tanzi, 2012). Die heute bekannten FAD-Mutationen werden vielfach zur Generierung von AD-Zellkultur- und Mausmodellen eingesetzt, wodurch sie zur Gewinnung wichtiger Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Erkrankung beitragen.

2.2.3 BESEITIGUNG VON A β AUS DEM HIRNGEWEBE

Der zerebrale A β -Gehalt wird nicht nur durch die A β -Produktion infolge der amyloidogenen APP-Prozessierung, sondern auch durch A β -abbauende Mechanismen und Transportprozesse bestimmt. Wie in Abb. 3 dargestellt ist die A β -Konzentration im Hirngewebe [A β] abhängig von dem APP-Proteingehalt [APP], der A β -Anabolismusrate (K1), der A β -Katabolismusrate (K2) und der A β -Exportrate aus dem Hirngewebe (K3). Sie kann mit der folgenden Formel beschrieben werden (Saido, 2013):

$$[A\beta] = K1 / (K2 + K3) \times [APP]$$

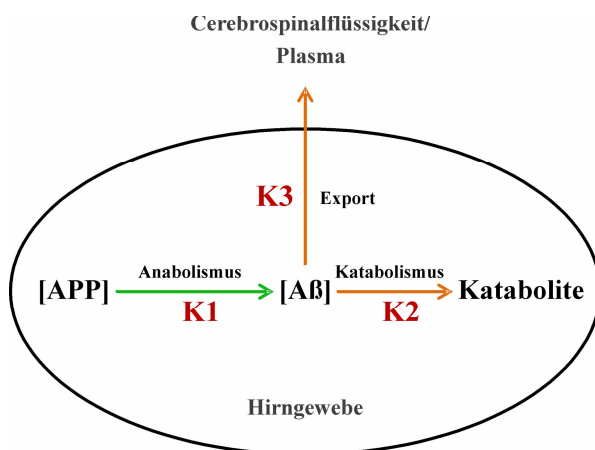


Abb. 3: Kinetische Beziehungen zwischen dem zerebralen A β -Gehalt und der Produktion, des Abbaus sowie des Exports von A β -Peptiden

Der A β -Gehalt [A β] im Hirngewebe kann als Funktion des APP-Proteingehalts [APP], der A β -Anabolismusrate K1, der A β -Katabolismusrate K2 und der A β -Exportrate aus dem Hirngewebe K3 angesehen werden. (Abb. nach Saido, 2013)

Dabei wird von der Linearität und der gegenseitigen Unabhängigkeit der einzelnen Konstanten ausgegangen. Der Funktion zufolge resultiert eine Erhöhung der A β -Anabolismusrate K1 bzw. eine Reduktion der A β -Katabolismus- und/oder -Exportraten K2 und K3 in einem gesteigerten zerebralen A β -Gehalt [A β] und somit in pathologischen Ablagerungen des Peptids im Hirngewebe. Umgekehrt kann eine Reduktion von K1 bzw. eine Steigerung von K2 und/oder K3 durch therapeutische oder präventive Maßnahmen die zerebrale A β -Akkumulation verringern (Saido, 2013).

Ein verringerter A β -Katabolismus wird in der Literatur seit Längerem als mögliche Ursache für AD diskutiert (Hama und Saido, 2005; Saido, 1998). In einer Publikation von Bateman et al. wurde in humaner Cerebrospinalflüssigkeit eine A β -Produktionsrate von 7,6%/Stunde (Std) sowie eine A β -

Abbaurate von 8,3%/Std gemessen. Unter physiologischen Bedingungen ist daher von einem Gleichgewicht zwischen Katabolismus und Anabolismus des Peptids auszugehen, wodurch eine A β -Akkumulation verhindert wird. Geringe Defizite im A β -Abbau würden diesen Daten zufolge allerdings mit einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der A β -Produktion einhergehen (Bateman et al., 2006). In der Cerebrospinalflüssigkeit von LOAD-Patienten konnte im Vergleich zu Kontrollpersonen eine signifikant um 30% verringerte A β -Abbaurate nachgewiesen werden, die A β -Produktionsrate war hingegen unverändert (Mawuenyega et al., 2010). Diese Daten verdeutlichen die Relevanz A β -abbauender Mechanismen bei AD.

2.2.3.1 Mechanismen zur Beseitigung von A β aus dem Hirngewebe

Die Eliminierung von A β -Peptiden aus dem Hirngewebe resultiert aus einer Kombination zahlreicher Mechanismen, die in ihrer Summe zu einer zerebralen A β -Halbwertszeit von etwa 25-150 Minuten (min) führen (Cirrito et al., 2003; Savage et al., 1998; Shibata et al., 2000).

Zu den bedeutendsten Transportmechanismen der A β -Beseitigung zählen der Transport entlang perivaskulärer Basalmembranen zu den Lymphknoten und in die Cerebrospinalflüssigkeit (Preston et al., 2003; Weller et al., 2000; Weller et al., 2009) sowie der Transport des Peptids über die Blut-Hirn-Schranke. Der Export von A β aus dem Hirngewebe über die Blut-Hirn-Schranke wird durch LRP (engl. lipoprotein receptor-related protein) (Kang et al., 2000; Shibata et al., 2000) und die P-Glykoprotein-Efflux-Pumpe (Lam et al., 2001) vermittelt. Umgekehrt ist auch ein RAGE (engl. receptor for advanced glycation end products)-abhängiger Import von A β über die Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe möglich (Deane et al., 2003). Im Blutkreislauf wird A β an eine lösliche Form von LRP, sLRP (engl. soluble lipoprotein receptor-related protein) gebunden. Nach dem Transport zu Leber und Niere findet in diesen Organen der systemische A β -Abbau statt (Hone et al., 2003; Sagare et al., 2007), wodurch die Halbwertszeit des Peptids im Blutkreislauf nur 1,2 bis 15min beträgt (Ghiso et al., 2004; Hone et al., 2003). Innerhalb des Hirnparenchyms stellen die Phagozytose von A β durch Mikroglia und Astrozyten (Frautschy et al., 1992; Rogers et al., 2002; Wyss-Coray et al., 2003) und der enzymatische A β -Abbau durch eine Vielzahl von Proteasen die Hauptmechanismen der A β -Eliminierung dar. Bei den A β -degradierenden Enzymen handelt es sich überwiegend um Metalloproteasen, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden und den proteolytischen Abbau der A β -Peptide an vielen verschiedenen Positionen katalysieren (Tab. 1, Abb. 2A) (Miners et al., 2011; Nalivaeva et al., 2012a). Eine A β -abbauende Aktivität wurde *in vitro* u.a. für ACE (engl. angiotensin converting enzyme), ECE (engl. endothelin converting enzyme) 1 und 2, IDE (engl. insulin degrading enzyme), Cathepsin B, MMP (engl. matrix metalloproteinase) 2 und 9, Nepilysin (NEP) und Plasmin nachgewiesen. Eine *in vivo*-Relevanz bei der A β -Degradation konnte allerdings nur für einige der Enzyme unter Verwendung entsprechender Knockout-Tiere bestätigt werden (Tab. 1) (Baranello et al., 2015; Miners et al., 2011; Saido und Leissring, 2012).

Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten A β -degradierenden Proteasen

Endo: Endosomen, ER: Endoplasmatisches Retikulum, F: Fibrillen, G: Golgi-Apparat, Lyso: Lysosomen, M: Monomere, Mito: Mitochondrien, n.s.: nicht signifikant, O: Oligomere, Per: Peroxisomen, PM: Plasmamembran, Zyto: Zytosol.

(Baranello et al., 2015; Miners et al., 2011; Saido und Leissring, 2012).

| Protease | Typ | degradierte A β -Spezies | subzelluläre Lokalisation | <i>in vivo</i> -Relevanz bei A β -Degradation: bestätigt? | zerebraler A β 40/ A β 42-Spiegel bei Knockout-Mäusen |
|-------------|-----------------|--------------------------------|---|---|---|
| ACE | Metalloprotease | M | PM, ER, G | Nein | n.s./ n.s. (Eckman et al., 2006) |
| Cathepsin B | Cysteinprotease | M, F | sezerniert, Endo, Lyso | Nein | n.s./ n.s. (Mueller-Steiner et al., 2006) |
| ECE 1 | Metalloprotease | M | PM, ER, G, Endo | Ja | 130%/ 130% (Eckman et al., 2003) |
| ECE 2 | Metalloprotease | M | PM, ER, G, Endo | Ja | 130%/130% (Eckman et al., 2003) |
| IDE | Metalloprotease | M | sezerniert, PM, ER, Endo, Lyso, Mito, Zyto, Per | Ja | 160%/ 140% (Farris et al., 2003; Miller et al., 2003) |
| MMP 2 | Metalloprotease | M, O, F | sezerniert, ER, G | Ja | 120%/ 130% (Yin et al., 2006) |
| MMP 9 | Metalloprotease | M, F | sezerniert, PM, ER, G | Ja | ns/ 130% (Yin et al., 2006) |
| NEP | Metalloprotease | M, O | PM, ER, G | Ja | 200%/ 200% (Huang et al., 2006; Iwata et al., 2001) |
| Plasmin | Serinprotease | M, O, F | sezerniert, Zyto, ER, G | Nein | n.s./ n.s. (Tucker et al., 2004) |

2.2.3.2 A β -Degradation durch Neprilysin

Das Enzym NEP (EC 3.4.24.11), welches auch als CALLA (engl. common acute lymphocytic leukemia antigen), Enkephalinase und CD10-Antigen bezeichnet wird, gehört zur Familie der M13-Zinkmetalloproteasen (Brown et al., 1974; Letarte et al., 1988; Schwartz et al., 1980). NEP kommen Funktionen bei Neuropeptid-Signalwegen und der Regulation des Gefäßtonus zu (Roques et al., 1993). Des Weiteren wird das Protein als Marker bei der Diagnose der akuten lymphozytischen Leukämie und weiterer Krebserkrankungen verwendet (Brown et al., 1975; Gohring et al., 1998; Papandreou et al., 1998).

Bei NEP handelt es sich um ein Typ-II-Transmembranprotein aus 742 Aminosäuren, das in Abhängigkeit des Glykosylierungsgrads ein Molekulargewicht von 85 bis 110kDa aufweist (Malfroy et al., 1988; Relton et al., 1983). Das Protein besteht aus einem kurzen N-terminalen intrazellulären Bereich, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne. Die Ektodomäne beinhaltet das Zink-Bindemotiv HEXXH und das aktive Zentrum des Enzyms, was die Umsetzung von extrazellulären und membranassoziierten Substraten begünstigt (Malfroy et al., 1988). Die Substrate von NEP stellen klassischerweise Oligopeptide aus maximal 40 bis 50 Aminosäuren dar. Zu diesen zählen neben A β Neurotensin, Enkephaline, die Substanz P, das Neuropeptid Y, Bradykinin und Somatostatin (Miners et al., 2011; Oefner et al., 2000; Turner et al., 2001). Die Schnittstellen des Enzyms innerhalb dieser Substrate sind üblicherweise N-terminal von hydrophoben Aminosäuren lokalisiert (Howell et al., 1995).

Das für NEP kodierende, stark konservierte Gen *MME*, dessen Transkription durch mindestens zwei verschiedene Promotoren reguliert wird, ist beim Menschen auf Chromosom 3 lokalisiert (3q21-q27) (Barker et al., 1989; Ishimaru und Shipp, 1995). Die Expression von NEP zeigt eine starke gewebeabhängige Varianz, wobei sie in der Niere, der Lunge und im Gehirn verhältnismäßig hoch ist (Erdos und Skidgel, 1988). Im zentralen Nervensystem wird NEP auch von aktivierten Astrozyten und Mikroglia, aber vor allem von Neuronen exprimiert, in denen das Protein überwiegend im Bereich von Axonen und Synapsen lokalisiert ist (Fisk et al., 2007; Fukami et al., 2002; Hickman et al., 2008; Matsas et al., 1986).

Die Fähigkeit von NEP, A β -Monomere an vielen verschiedenen Positionen zu schneiden (Abb. 2A), wurde durch mehrere Studien belegt (Howell et al., 1995; Leissring et al., 2003b). Hinsichtlich der Degradation von A β -Oligomeren durch NEP ist die Literaturlage nicht eindeutig, da der Abbau von synthetischen, nicht aber von natürlichen oligomeren A β -Spezies durch das Enzym nachgewiesen werden konnte (Kanemitsu et al., 2003; Leissring et al., 2003a; Meilandt et al., 2009). NEP wurde von Iwata et al. als das Haupt-A β -degradierende Enzym im Gehirn von Ratten und Mäusen identifiziert. In NEP-Knockout-Mäusen wurde eine Gendosis-abhängige Erhöhung des zerebralen A β 40- und A β 42-Gehalts sowie eine reduzierte Degradation von injizierten synthetischen A β -Peptiden nachgewiesen (Iwata et al., 2000; Iwata et al., 2001). NEP-defiziente Tiere weisen zudem eine verringerte synaptische Plastizität und kognitive Beeinträchtigungen auf (Huang et al., 2006; Madani et al., 2006). Umgekehrt führt die Überexpression des Proteins in AD-Mausmodellen zu einer Verringerung des zerebralen A β -Gehalts und der Plaquebildung sowie zu einer Steigerung der kognitiven Fähigkeiten (Iwata et al., 2004; Leissring et al., 2003a; Marr et al., 2003; Poirier et al., 2006). Die in diesen Modellen gewonnenen Daten belegen, dass eine Reduktion der NEP-Aktivität in einer Akkumulation von A β resultieren kann und ferner, dass eine Stimulation der NEP-Aktivität ein therapeutisches Potential hinsichtlich AD besitzt. Demnach ist der Einsatz der neuen ARNI (Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren)-Wirkstoffklasse zur Behandlung von symptomatischer chronischer Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2014) kritisch zu betrachten. Die Einnahme des kürzlich in der Europäischen Union zugelassenen Medikaments Entresto® (Wirkstoffe: Sacubitril / Valsartan) könnte aufgrund der Inhibition von NEP langfristig mit einer verstärkten Bildung von amyloiden Plaques und somit mit einem erhöhten Demenzrisiko einhergehen (Ollendorf et al., 2015).

In mehreren Studien wurden sowohl eine AD- als auch eine altersabhängige Reduktion der NEP-Genexpression bzw. -Enzymaktivität festgestellt. Es besteht eine negative Korrelation zwischen dem zerebralen NEP-Gehalt und dem Lebensalter bei nicht-dementen Personen sowie bei AD-Patienten (Hellstrom-Lindahl et al., 2008; Miners et al., 2009; Russo et al., 2005). In *post mortem* AD-Hirnen wurde ein reduzierter NEP-Gehalt v.a. in Hirnregionen mit starken A β -Ablagerungen wie dem Hippocampus (Carpentier et al., 2002; Yasojima et al., 2001), dem temporalen Gyrus (Yasojima et al., 2001) und der Hirnrinde (Miners et al., 2006; Russo et al., 2005; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2010) nachgewiesen. In einigen anderen Publikationen wurde allerdings auch ein unveränderter oder erhöhter NEP-Gehalt im Hirngewebe von AD-Patienten beschrieben (Hellstrom-Lindahl et al., 2008; Miners et al., 2009).

Die Literaturlage hinsichtlich einer möglichen Assoziation zwischen Polymorphismen in dem für NEP kodierenden Gen *MME* und dem Risiko, an AD zu erkranken ist ebenfalls inhomogen (Blomqvist et al., 2010; Giedraitis et al., 2009; Helisalimi et al., 2004; Wood et al., 2007). In einer Studie von Miners et al. konnte kein Zusammenhang zwischen sieben Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) in *MME*, für die zuvor eine Assoziation mit AD berichtet wurde, und dem A β -Gehalt im frontalen Kortex festgestellt werden (Miners et al., 2012).

2.2.3.3 A β -Degradation durch das Insulin degradierende Enzym

IDE (EC 3.4.24.56), das auch als Insulin Protease, Insulinase und Insulysin bezeichnet wird, zählt zu den M16-Zinkmetalloproteasen (Duckworth et al., 1979; Song et al., 2003). Das aus 1019 Aminosäuren bestehende Protein weist ein Molekulargewicht von 110kDa auf und besteht strukturell aus zwei etwa gleichgroßen muldenförmigen Domänen, zwischen denen das aktive Zentrum mit dem inversen Zink-Bindemotiv HXXEH lokalisiert ist (Shen et al., 2006). Das stark konservierte für IDE kodierende Gen *IDE* liegt beim Menschen auf Chromosom 10 (10q23-q25) (Affholter et al., 1990). IDE wird ubiquitär exprimiert, wobei die IDE-Genexpression u.a. in der Leber, der Niere, im Muskelgewebe und im Gehirn besonders stark ausgeprägt ist (Kuo et al., 1993). Subzellulär liegt das Protein überwiegend im Zytosol, aber auch in anderen Organellen sowie in zell-assoziiierter und sezernierter Form im Extrazellulärraum vor (Qiu et al., 1998; Saido und Leissring, 2012; Vekrellis et al., 2000). IDE stellt das Haupt-A β -degradierende Enzym im Kulturmedium verschiedener neuronaler und mikroglialer Zelllinien dar (Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998) und kann unter physiologischen Bedingungen auch in humanem Serum und der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (Liu et al., 2012; Qiu et al., 1998). Das Protein verfügt jedoch nicht über ein typisches Signalpeptid und wird nicht auf dem klassischen Sekretionsweg über das TGN, sondern in Assoziation mit Exosomen sezerniert (Bulloj et al., 2010; Tamboli et al., 2010; Zhao et al., 2009). IDE katalysiert die Proteolyse unterschiedlicher 3 bis 10kDa großer Substrate, zu denen neben A β und Insulin u.a. Glukagon, die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II, Amylin und AICD zählen (Edbauer et al., 2002; Malito et al., 2008). Diese Substrate weisen keine Homologie in ihrer Aminosäuresequenz, aber große Ähnlichkeit in ihrer Sekundärstruktur auf und verfügen alle über einen amyloiden Charakter (Kurochkin, 2001; Malito et al., 2008).

Die A β -degradierende Aktivität von IDE wurde erstmals 1994 nachgewiesen und anschließend vielfach in verschiedenen Systemen bestätigt (Kurochkin und Goto, 1994; McDermott und Gibson, 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). Aufgrund der Enzymstruktur beschränkt sich die katalytische Aktivität von IDE auf die Hydrolyse monomerer A β -Spezies (Malito et al., 2008; Morelli et al., 2003). Die *in vivo*-Relevanz des Enzyms bei der A β -Degradation konnte unter Verwendung transgener Tiermodelle bestätigt werden. Während IDE-defiziente Mäuse einen erhöhten zerebralen A β -Gehalt aufweisen (Farris et al., 2003; Miller et al., 2003), ist dieser in IDE-überexprimierenden Tieren signifikant reduziert, was mit einer reduzierten Sterblichkeitsrate der Tiere einhergeht (Leissring et al., 2003a).

In Analogie zu NEP wurde auch eine Reduktion der IDE-Genexpression bzw. -Enzymaktivität im Hippocampus (Cook et al., 2003; Stargardt et al., 2013; Zhao et al., 2007) und im frontalen Kortex (Perez et al., 2000) von AD-Patienten beschrieben, wobei die Literaturlage auch hier inhomogen ist (Miners et al., 2009; Wang et al., 2010). Eine verringerte IDE-abhängige A β -Degradation infolge einer kompetitiven Inhibition des Enzyms durch Insulin erklärt möglicherweise das erhöhte AD-Risiko bei Patienten mit Hyperinsulinämie (Qiu und Folstein, 2006).

Ähnlich wie bei NEP wurde eine Assoziation zwischen Polymorphismen in dem für IDE kodierenden Gen und dem AD-Risiko berichtet, die Literaturlage ist aber auch hier nicht eindeutig (Cheng et al., 2015; Marlowe et al., 2006; Ozturk et al., 2006; Wang et al., 2015b; Zhang et al., 2013).

2.2.4 FUNKTIONEN DER INTRAZELLULÄREN DOMÄNE VON APP (AICD)

Für die bei der APP-Prozessierung ins Zytosol freigesetzte AICD-Domäne ist eine Translokation in den Nukleus und eine damit einhergehende Funktion bei der transkriptionellen Regulation verschiedener Zielgene beschrieben. Eine genregulatorische Bedeutung von AICD ist naheliegend, da APP und der Notch-Rezeptor bezüglich ihrer Struktur und ihrer proteolytischen Prozessierung starke Homologien aufweisen und für NICD bereits genregulatorische Funktionen bekannt sind (Gu et al., 2001; Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002). Eine AICD-abhängige Regulation ist u.a. für Gene, die in direktem

Zusammenhang mit der APP-Prozessierung (Gensymbole: *APP*, *BACE1*), der A β -Degradation (Gensymbol: *MME*, für NEP kodierend), Apoptose (Gensymbol: *TP53*, für p53 kodierend), der Tau-Phosphorylierung (Gensymbol: *GSK3b*, für Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) kodierend), dem mitochondrialen Energiemetabolismus (Gensymbol: *PPARGC1A*, für engl. peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC1 α) kodierend) und dem Lipidstoffwechsel (2.3) stehen, bekannt (Alves da Costa et al., 2006; Grimm et al., 2013b; Kim et al., 2003; Pardossi-Piquard et al., 2005; Robinson et al., 2014; von Rotz et al., 2004). Die Bedeutung von AICD bei der transkriptionellen Regulation wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert, da die AICD-abhängige Regulation einiger dieser Zielgene nicht unabhängig validiert werden konnte (Chen und Selkoe, 2007; Hebert et al., 2006; Waldron et al., 2008). Aufgrund seines schnellen Abbaus durch IDE (Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003), Cathepsin B (Asai et al., 2011) und das Proteasom (Nunan et al., 2003) verfügt AICD nur über eine geringe Halbwertszeit von etwa 5min (Cupers et al., 2001). AICD wird außerdem auch von der Caspase3 proteolytisch gespalten, wodurch das N-terminal verkürzte pro-apoptotische Fragment AICD31 (C31) entsteht (Abb. 2A) (Gervais et al., 1999; Lu et al., 2000). Die nukleäre Lokalisation sowie die genregulatorische Aktivität scheinen auf das von der APP₆₉₅-Isoform stammende und bei der amyloidogenen APP-Prozessierung generierte AICD beschränkt zu sein (Belyaev et al., 2010; Goodger et al., 2009).

In der C-terminalen Region von APP sind mehrere wichtige Sequenzmotive enthalten, die für den basolateralen APP-Transport (YTSI) und die APP-Phosphorylierung (VTPEER) sowie für die Interaktion von AICD mit Adapterproteinen (YENPTY) relevant sind (Abb. 2A) (Müller und Wild, 2013). Über das YENPTY-Motiv findet die Wechselwirkung von AICD mit Adapterproteinen statt, die über Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB-Domänen) verfügen wie z.B. das Protein Fe65 (Borg et al., 1996; Uhlik et al., 2005). Man geht davon aus, dass AICD nach seiner Freisetzung durch den γ -Sekretase-Schnitt an Fe65 bindet, wodurch die Stabilität des Peptids erhöht wird (Kimberly et al., 2001; Kinoshita et al., 2002). Dem allgemein favorisierten Modell (Abb. 76) zufolge transloziert der AICD/Fe65-Komplex anschließend in den Zellkern und bildet dort nach Interaktion mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 den sogenannten AFT (AICD/Fe65/Tip60)-Komplex (Cao und Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004). Alternativ zu Fe65 kann AICD auch an JIP1 (Janus kinase interacting protein 1) und anschließend an Tip60 binden, wodurch es zur Bildung des sogenannten AJT (AICD/JIP1/Tip60)-Komplexes kommt (Scheinfeld et al., 2003; von Rotz et al., 2004). Als Verbindung zwischen dem AFT-Komplex und der Transkriptionsmaschinerie wurde das Protein MED12, ein Bestandteil des eukaryotischen Mediator-Komplexes, identifiziert (Xu et al., 2011). Bei Mediator handelt es sich um einen großen Multiproteinkomplex, welcher Signale von verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur RNA-Polymerase II weiterleitet (Kelleher et al., 1990; Kornberg, 2005) (Abb. 76). Insgesamt wurden mehr als 20 Adapterproteine identifiziert, die mit AICD oder dem AICD/Fe65-Komplex interagieren und somit Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Zielgenen nehmen können (Abb. 2A) (Borquez und Gonzalez-Billault, 2012). Dimere 14-3-3 γ -Proteine binden beispielsweise gleichzeitig an das VTPEER-Motiv von AICD und an Fe65, was zu einer gesteigerten Bildung der AICD/Fe65-Komplexe führt. Hierbei wird die Wechselwirkung zwischen AICD und 14-3-3 γ durch eine Phosphorylierung von AICD an Position Thr668 inhibiert (Sumioka et al., 2005). Umgekehrt kann die genregulatorische Aktivität von AICD infolge der Interaktion mit Adapterproteinen auch negativ beeinflusst werden. Durch die Bindung von AICD an MINT1 (engl. neuronal Munc18-1-interacting protein 1)/X11 α wird beispielsweise die Translokation von AICD in den Nukleus verhindert, was in einer verstärkten Degradation des Peptids im Zytosol resultiert (von Rotz et al., 2004). Der Transport von AICD in den Zellkern wird ebenfalls negativ durch das Ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 (engl. neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8) beeinflusst, dessen Interaktion mit AICD zu einer reduzierten Bildung der AICD/Fe65-Komplexe führt (Lee et al., 2008).

2.3 LIPIDE BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT

Lipide machen mehr als 50% des Gehirn-Trockengewichts aus und haben eine Vielzahl von biologischen Funktionen. Sie stellen beispielsweise zusammen mit Proteinen die Hauptbestandteile zellulärer Membranen dar, fungieren als Energiespeicher und sind an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt (Linscheer und Vergroesen, 1994). Es ist bekannt, dass die Lipidumgebung eine modulierende Wirkung auf die Aktivität zahlreicher Membranproteine ausübt (Lee, 2004). Da es sich bei APP, den Sekretasen und den meisten A β -degradierenden Enzymen um Transmembranproteine handelt, ist ein Einfluss der Membran-Lipidkomposition auf den A β -Spiegel naheliegend. Für eine Vielzahl von Lipiden und Fettsäuren konnte eine Beeinflussung der APP-Prozessierung durch direkte, Sekretase-Aktivitätsmodulierende als auch durch indirekte Effekte wie z.B. Veränderungen des intrazellulären Transports von APP und den Sekretasen, nachgewiesen werden (Burg et al., 2013; Grimm et al., 2011c; Grimm et al., 2012a; Grimm et al., 2013a; Mett et al., 2016; Rothhaar et al., 2012). Cholesterin steigert beispielsweise die A β -Sekretion durch eine Steigerung der β - und γ -Sekretaseaktivität bei gleichzeitiger Reduktion der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (Ghribi et al., 2006; Grimm et al., 2008; Kojro et al., 2001; Refolo et al., 2000). Die Lipidumgebung beeinflusst außerdem die Länge (Hartmann et al., 1997; Winkler et al., 2012) und das Aggregationsverhalten der entstandenen A β -Peptide (Fantini und Yahi, 2010; Matsuzaki et al., 2010).

Umgekehrt konnte auch eine Regulation der Lipidhomöostase durch die APP-Prozessierungsprodukte A β und AICD sowie mit der AD-Pathologie einhergehende Veränderungen der zerebralen Lipidkomposition nachgewiesen werden (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016). Eine AICD-abhängige transkriptionelle Regulation ist beispielsweise für die katalytische Untereinheit der Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase (SPT) (Gensymbol: *SPTLC2*, Sphingolipidsynthese), die Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthase (AGPS) (Gensymbol: *AGPS*, Plasmalogensynthese), die GD3-Synthase (GD3S) (Gensymbol: *ST8SIA1*, Gangliosidsynthese) und LRP1 (Gensymbol: *LRP1*, ApoE und Cholesterin-Metabolismus im zentralen Nervensystem) bekannt (Grimm et al., 2011b; Grimm et al., 2011d; Grimm et al., 2012c; Liu et al., 2007). Außerdem konnte ein Einfluss von A β -Peptiden auf die Aktivität der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGCR, Cholesterinsynthese) sowie der neutralen Sphingomyelinase (nSMase, Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid) nachgewiesen werden (Grimm et al., 2005). Dies deutet auf die Existenz komplexer, bidirektionaler Regulationsmechanismen zwischen der APP-Prozessierung und der Lipidhomöostase hin. Bislang ist nicht eindeutig geklärt, ob die Lipidveränderungen im Hirngewebe von AD-Patienten als Ursache oder eher als Konsequenz der Erkrankung anzusehen sind (Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016).

Wie bereits erwähnt, stellt das $\epsilon 4$ -Allel von ApoE den stärksten genetischen Risikofaktor für die sporadische Form von AD dar. Die Tatsache, dass es sich bei ApoE um ein Apolipoprotein handelt, welches im zentralen Nervensystem an Transportprozessen von Cholesterin und anderen Lipiden beteiligt ist, ist ein weiterer Hinweis auf die Relevanz von Lipiden bei der AD-Pathogenese. Beim Menschen existieren drei verschiedene, für die ApoE ϵ -Isoformen ApoE $\epsilon 2$, ApoE $\epsilon 3$ und ApoE $\epsilon 4$ kodierende Allele (Holtzman et al., 2012; Mahley et al., 1996). Während das *APOE $\epsilon 4$* -Allel Gendosis-abhängig mit einem erhöhten AD-Risiko einhergeht (Corder et al., 1993; Kuusisto et al., 1994), ist das *APOE $\epsilon 2$* -Allel mit einem verringerten AD-Risiko assoziiert (Corder et al., 1994). Des Weiteren korreliert die *APOE $\epsilon 4$* -Gendosis negativ mit dem Alter bei der Manifestation von AD (Breitner et al., 1999; Corder et al., 1993) und positiv mit der Bildung von amyloiden Plaques (Tiraboschi et al., 2004). Die dem zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht genau bekannt. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass ApoE ϵ Isoform-abhängig ($\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$) an lösliches A β bindet, was sich auf die Beseitigung und das Aggregationsverhalten von A β auswirkt (Castellano et al., 2011; Deane et al., 2008; Holtzman et al., 2012; Ma et al., 1994).

2.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

AD ist die häufigste Ursache von primärer Demenz und zählt zu den Haupttodesursachen in westlichen Industrienationen (Plassman et al., 2007; St George-Hyslop, 2000). Neuropathologisch ist die Erkrankung durch intrazelluläre Ablagerungen des Proteins Tau und extrazellulär lokalisierte amyloide Plaques aus aggregierten A β -Peptiden charakterisiert (Goedert et al., 1991; Probst et al., 1991). Man geht davon aus, dass die Akkumulation von A β im Hirngewebe das initiale Ereignis der AD-Pathogenese darstellt (Hardy und Selkoe, 2002; Hardy und Higgins, 1992). Eine Vielzahl von Proteasen ist *in vitro* in der Lage, A β enzymatisch abzubauen. NEP und IDE zählen zu den A β -degradierenden Enzymen, für die auch eine *in vivo*-Relevanz bei dem zerebralen A β -Abbau nachgewiesen werden konnte (Baranello et al., 2015; Farris et al., 2003; Huang et al., 2006; Iwata et al., 2001; Miller et al., 2003; Miners et al., 2011; Saido und Leissring, 2012). Eine verringerte A β -Degradation wird in der Literatur seit Längerem als mögliche Ursache für AD diskutiert (Hama und Saido, 2005; Saido, 1998). Ein umfassendes Verständnis der an der Regulation von NEP, IDE und weiterer A β -degradierender Enzyme beteiligten Mechanismen kann daher zur Entwicklung therapeutischer und präventiver Maßnahmen hinsichtlich AD beitragen.

Aus diesem Grund sollte der Einfluss der APP-Prozessierung auf die Regulation der NEP-Genexpression sowie die dem zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Die physiologischen Funktionen des Vorläuferproteins APP und dessen Prozessierungsprodukten sind weitestgehend unbekannt. Eine Funktion von AICD bei der transkriptionellen Regulation verschiedener Zielgene wie u.a. NEP wird in der Literatur seit Längerem kontrovers diskutiert (Chen und Selkoe, 2007; Hebert et al., 2006; Pardossi-Piquard et al., 2005; Waldron et al., 2008). Zur Untersuchung der AICD-abhängigen Regulation von NEP wurden die Genexpression, der Proteingehalt und die Aktivität des Enzyms systematisch in einer Vielzahl genetischer und pharmakologischer Modellsysteme analysiert.

Eine Beeinflussung der proteolytischen APP-Prozessierung und somit der A β -Produktion durch die Lipidhomöostase wurde vielfach demonstriert (Burg et al., 2013; Ghribi et al., 2006; Grimm et al., 2008; Grimm et al., 2011c; Grimm et al., 2012a; Grimm et al., 2013a; Grimm et al., 2013c; Kojro et al., 2001; Mett et al., 2016; Refolo et al., 2000; Rothhaar et al., 2012). Die Auswirkung von Lipiden auf A β -degradierende Mechanismen wurde hingegen bislang nicht umfassend untersucht. Im Rahmen eines weiteren Projekts sollte daher der Einfluss der Kettenlänge und des Sättigungsgrades der in Phosphatidylcholin (PC) enthaltenen Fettsäuren auf die enzymatische A β -Degradation analysiert werden. Hierbei lag der Schwerpunkt der Analysen auf den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFAs) EPA und DHA, die in großen Mengen in Fischölen vorkommen (Oehlenschläger, 2012; White, 2009) sowie auf den verstärkt in Kokosnussöl enthaltenen MCFAs (Fernando et al., 2015). Die Fettsäuren können nach der Aufnahme mit der Nahrung nachweislich die Blut-Hirn-Schranke passieren (Marteinsdottir et al., 1998; Nguyen et al., 2014; Ouellet et al., 2009; Smith und Nagura, 2001; Spector, 1988) und somit molekulare Mechanismen im Hirngewebe beeinflussen. Unter Verwendung einer Neuroblastom-Zelllinie sollte die Auswirkung der verschiedenen Fettsäuren auf die Degradation von A β -Peptiden untersucht werden. Zusätzlich wurde der Einfluss von MCFAs auf den enzymatischen Abbau von A β *in vivo* in einem AD-Mausmodell überprüft.

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei den Veränderungen der Lipidkomposition in AD-Hirngewebe (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016) um die Ursache oder eher um eine Konsequenz der Erkrankung handelt, sollte in einem weiteren Projekt die Wirkung zerebraler Lipidextrakte aus *post mortem* AD-Hirngewebe auf den A β -Katabolismus analysiert werden. Hierzu wurden Neuroblastom-Zellen mit Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von AD-Patienten und einem AD-Mausmodell bzw. entsprechendem Kontrollgewebe inkubiert. Anschließend wurde überprüft, ob sich

diese auf die Degradation von A β -Peptiden auswirken, was möglicherweise für eine Induktion der A β -Pathologie durch die bei AD veränderte zerebrale Lipidkomposition sprechen würde.

Im Rahmen von Kooperationsprojekten wurde zudem der Einfluss weiterer Lipide und fettlöslicher Vitamine auf den enzymatischen A β -Abbau analysiert.

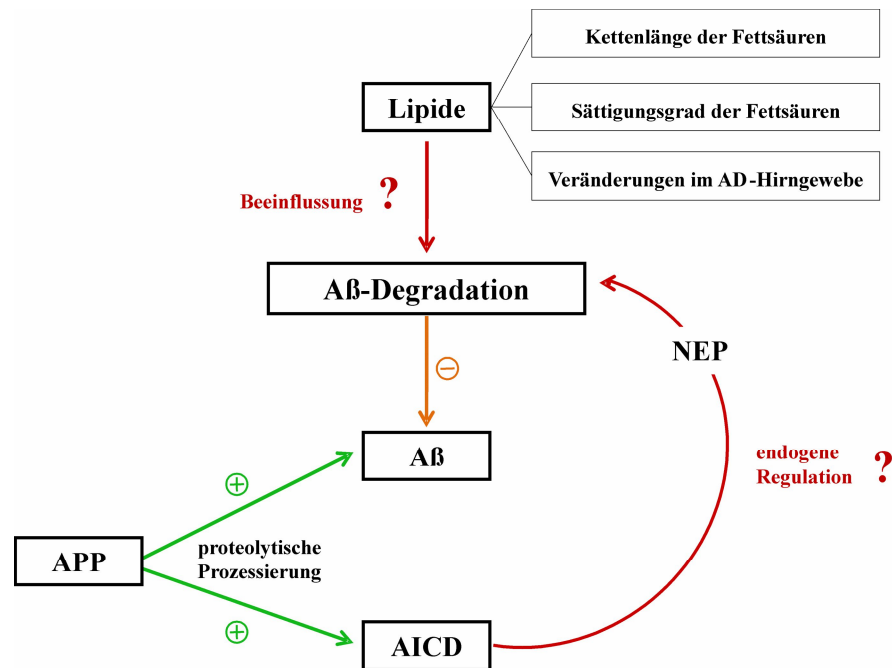


Abb. 4: Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der enzymatischen A β -Degradation analysiert werden. Ein Schwerpunkt hierbei lag in der Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge und des Sättigungsgrads von Fettsäuren sowie der veränderten Lipidkomposition im Hirngewebe von AD-Patienten auf den enzymatischen Abbau von A β . In einem weiteren Projekt sollte die mögliche endogene Regulation des A β -degradierenden Enzyms NEP durch das bei der proteolytischen APP-Prozessierung freigesetzte AICD analysiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN

Tab. 2: Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller/ Herkunft |
|--|---|
| 1-Step PNPP | Thermo Scientific |
| AICD (1-20)-Peptid | Genscript |
| AICD (1-20)-Peptid, FITC-markiert | Bachem |
| Ammoniumacetat | Sigma Aldrich |
| Ampicillin | Roth |
| A β (1-40)-Peptid | Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn) |
| A β (1-42)-Peptid | Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn) |
| Bacitracin | Santa Cruz Biotechnology |
| Bacto-Trypton | Roth |
| Bicinchoninsäure | Sigma Aldrich |
| Bromphenolblau | Roth |
| BSA | Roth |
| BSA, fettsäurefrei | Sigma Aldrich |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | Merck Millipore Millipore |
| Chloroform, HPLC grade | Merck Millipore Millipore |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail mit EDTA | Roche |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA | Roche |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | Roth |
| DAPT | Merck Millipore |
| DMEM | Sigma Aldrich |
| DMSO | Roth |
| ECL-Hyperfilm | Amersham |
| ECL-Lösungen (Western Lightning Plus ECL) | Perkin Elmer |
| EDTA | Roth |
| EGTA | Roth |
| Entwicklerlösung GBX | Kodak |
| Ethanol, HPLC grade | Sigma Aldrich |
| Fast SYBR Green Master Mix | Life Technologies |

| Chemikalie | Hersteller/ Herkunft |
|--|--------------------------|
| FCS | PAN Biotech |
| Fixiererlösung | Kodak |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Roth |
| GM6001 | Merck Millipore |
| GW4869 | Merck Millipore |
| HBS-Puffer | Synvolux Therapeutics |
| HCl, rauchend | Merck Millipore |
| Hefe-Extrakt | Roth |
| Hepes | Sigma Aldrich |
| Hygromycin B | PAN Biotech |
| IDE, rekombinant, human | R&D Systems |
| Insulin | Sigma Aldrich |
| Isopropanol, HPLC grade | VWR |
| Kanamycin B | Santa Cruz Biotechnology |
| KCl | Merck Millipore |
| KH ₂ PO ₄ x 3H ₂ O | Merck Millipore |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich |
| Lipofectamine 2000 | Life Technologies |
| MEM Aminosäure-Lösung | Sigma Aldrich |
| Methanol, HPLC grade | VWR |
| MgCl ₂ | Roth |
| Milchpulver, blotting grade | Roth |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | Roth |
| NaCl | AppliChem |
| NaOH | Roth |
| Natrium-Desoxycholat | Sigma Aldrich |
| Natriumpyruvat | Sigma Aldrich |
| NEM | Santa Cruz Biotechnology |
| NEP-/ IDE-Substrat | R&D Systems |
| NP-40 | Substitute Fluka |
| Opti-MEM | Life Technologies |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Sigma Aldrich |
| Phenylisothiocyanat | Merck Millipore |

| Chemikalie | Hersteller/ Herkunft |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF | Merck Millipore |
| Proteingrößenmarker Page Ruler | Promega |
| Protein-G-Sepharose | Sigma Aldrich |
| Saccharose | Sigma Aldrich |
| Saint PhD | Synvolux Therapeutics |
| SDS | Sigma Aldrich |
| Tricin | Biomol |
| Tris | Sigma Aldrich |
| Triton X-100 | Merck Millipore |
| Trizima Base | Sigma Aldrich |
| TRIzol Reagenz | Life Technologies |
| Trypsin/EDTA-Lösung | Sigma Aldrich |
| Tween-20 | Sigma Aldrich |
| Wasser, HPLC grade | VWR |
| Wasser, RNase-frei | Qiagen |
| Zeocin | Life Technologies |
| ZnCl ₂ | Sigma Aldrich |
| β-Mercaptoethanol | Sigma Aldrich |
| β-Sekretase-Inhibitor II | Merck Millipore |
| γ-Sekretase Inhibitor IV | Merck Millipore |
| γ-Sekretase Inhibitor X | Merck Millipore |
| γ-Sekretase Substrat | Merck Millipore |

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------|
| 10cm-Schalen für Zellkultur | Sarstedt |
| 12-Well-Platte für Zellkultur | Falcon |
| 24-Well-Platte für Zellkultur | Falcon |
| 6-Well-Platte für Zellkultur | Falcon |
| 96-DeepWell-Platte | Nunc |
| 96-Well-Platte für RT-PCR, 6x16, weiß | Thermo Scientific |
| 96-Well-Platte für Zellkultur | Falcon |
| 96-Well-Platte MaxiSorp, schwarz | VWR |
| 96-Well-Platte, schwarz | Costar |

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| 96-Well-Platte, transparent | Greiner |
| 96-Well-Platte, weiß | Nunc |
| 96-Well-Sammelplatte | Nunc |
| 96-Well-Sterilfilterplatte | Merck Millipore |
| Amicon Ultra-0,5mL 30K Filtrerröhrchen | Merck Millipore |
| ECL-Hyperfilm | Amersham |
| Einfrierröhrchen, 1,8ml | Nunc |
| Falconröhrchen, 15ml und 50ml | Sarstedt |
| Filterpapier | Whatman |
| Fotokopierfolien TypeC A4 | Xerox |
| Glasflaschen, 2ml | NeoLab |
| Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 0,5mm | Peqlab |
| Glaspipetten | NeoLab |
| Glasröhrchen | Wheaton |
| Gummischaber | Hartenstein |
| Kanülen 23G x 1", 0,6mm x 25mm | Becton, Dickinson and Company |
| Kanülen 24G x 1", 0,55mm x 25mm | Becton, Dickinson and Company |
| Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4mm | Peqlab |
| Nitrozellulosemembran 0,2 µm Porengröße | Whatman |
| Nitrozellulosemembran, 0,45µm Porengröße | Whatman |
| Pasteurpipetten | VWR |
| Petrischalen | Sarstedt |
| Reaktionsgefäß, 1,5ml | Eppendorf |
| Reaktionsgefäß, 2ml | Eppendorf |
| Silikonmatte | Nunc |
| Spritzen, 1ml | Becton, Dickinson and Company |
| Tris-Tricin-Gele, 10-20% | Anamed Gelelektrophorese |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Beckman Coulter |
| Verschlussfolie für 96-Well-Platten | Peqlab |
| Verschlussfolie für RT-PCR-Platten | Thermo Scientific |

3.1.2 GERÄTE

Tab. 4: Geräte und Zubehör

| Gerät/ Zubehör | Hersteller |
|--|------------------------|
| Analysenwaage ABS 80-4 | Kern |
| 8-Kanal-Pipette, elektronisch | Eppendorf |
| Brutschrank 37°C | Heraeus |
| Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container | Nalgene |
| Einkanal-Multipette M4 | Eppendorf |
| ELISA-Reader Multiskan EX | Thermo Scientific |
| Fluorometer Safire2 | Tecan |
| Fluorometer/Luminometer Infinite M1000 Pro | Tecan |
| Gefrierschrank -20°C Premium | Liebherr |
| Gefrierschrank -80°C Hera Freeze | Thermo Electron |
| Gelkammer Novex Mini-Cell | Life Technologies |
| Hamilton Kapillare | Hamilton |
| Heizblock Thermoshaker | Universal Labortechnik |
| Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44 | Eppendorf |
| Inkubator HeraCell 150 | Heraeus |
| Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100 | Nikon |
| Magnet-Heizrührer MR2002 | Heidolph Instruments |
| Massenspektrometer 4000 QTRAP | AB Sciex |
| Mikrowelle | Continent |
| Minilys Homogenisator | Peqlab |
| NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer | Thermo Scientific |
| PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED | Peqlab |
| pH-Meter 766 | Calimatic Knick |
| PikoReal PCR System | Thermo Scientific |
| Pipetboy Comfort | INTEGRA Biosciences AG |
| Pipettenset Research | Eppendorf |
| Potter-Röhrchen | B. Braun |
| PotterS Homogenisator | Satorius |
| Power Supply Consort EV231 | Sigma Aldrich |
| Präzisionswaage EW | Kern |
| Röntgenkassette Quanta III | Dupont |
| Rotor SW40 | Beckmann Coulter |

| Gerät/ Zubehör | Hersteller |
|------------------------------------|----------------------|
| Rotor TLA-55 | Beckmann Coulter |
| Scanner CanoScan LiDE 50 | Canon |
| Software Analyst 1.5 | AB Sciex |
| Software Image Gauge V3.45 | Fuji Science Lab |
| Software Piko Real 2.1 | Thermo Scientific |
| Software SPSS Statistics 22 | IBM Corporation |
| Sterilbank HeraSafe | Heraeus |
| Stickstoff-Abdampfvorrichtung | VLH |
| Stickstofftank -196°C GT 140 | Air Liquide |
| TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen | BioRad |
| Transferkammer TransBlot Cell | BioRad |
| Turbo Spray-Ionenquelle | AB Sciex |
| Überkopftaumler Reax2 | Heidolph Instruments |
| Ultraschallsonde Sonopuls HD2070 | Bandelin |
| Ultrazentrifuge Optima LE-80K | Beckman Coulter |
| Vortex Genie2 | Bender & Hobein |
| Wärmeschrank UT12 | Heraeus |
| Wasserbad | GFL |
| Wheaton-Schüttler Multi Reax | Heidolph Instruments |
| Wippschüttler SkyLine Shaker S-4 | ELMI |
| Zentrifuge 5415D | Eppendorf |
| Zentrifuge Avanti J-20 XP | Beckman Coulter |
| Zentrifuge Biofuge Pico | Heraeus |
| Zentrifuge Biofuge Primo | Heraeus |
| Zentrifuge Fresco21 | Heraeus |
| Zentrifuge Labfuge GL Heraeus | Heraeus |

3.1.3 ZELLINIEN

Tab. 5: Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung/ Herkunft/ Antibiotika-Resistenz |
|----------------------------|---|
| MEF WT | WT-Maus-Fibroblasten/ im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt |
| MEF PS1/2-/- | PS1/2-defiziente Maus-Fibroblasten/ im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Bart de Strooper (Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt (Herreman et al., 2000) |
| MEF PS1res | PS1-defiziente Maus-Fibroblasten, stabil retransfiziert mit humanem PS1 WT/ generiert von Dr. Eva Hesser (Plasmidkonstrukt-Klonierung durch Dr. Marcus Grimm)/ Zeocin-resistent |
| MEF PS1-T354I | PS1/2-defiziente Maus-Fibroblasten, stabil retransfiziert mit der humanen PS1-FAD-Mutante T354I (Rogaeva et al., 2001)/ generiert von Dr. Eva Hesser (Plasmidkonstrukt-Klonierung durch Dr. Marcus Grimm)/ Zeocin-resistent |
| MEF APP/APLP2-/- | APP/ APLP2-defiziente Mausfibroblasten/ im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Heber et al., 2000) |
| MEF APP Δ CT15 | Maus-Fibroblasten mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus/ im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Ring et al., 2007) |
| N2a WT | murine Neuroblastom-Zelllinie (Klebe et al., 1970) |
| N2a IDE-KD | N2a mit stabiler Expression von IDE sh-RNS/ im Rahmen dieser Arbeit generiert von Janine Mett/ Hygromycin B-resistent |
| N2a WT (mock) | N2a mit stabiler Expression von mock sh-RNS, die keine sh-RNS Funktion besitzt; Vergleichszellen für N2a IDE-KD/ im Rahmen dieser Arbeit generiert von Janine Mett/ Hygromycin B-resistent |
| SH-SY5Y WT | humane Neuroblastom-Zelllinie (Ross et al., 1983) |
| SH-SY5Y APP | SH-SY5Y mit stabiler Expression von humanem APP ₆₉₅ / generiert von Dr. Heike Grimm/ Hygromycin B-resistent |
| SH-SY5Y APP ^{swe} | SH-SY5Y mit stabiler Expression von humanem APP ₆₉₅ mit der „swedish“ Doppelmutation (K670N/M671L) (Mullan et al., 1992)/ generiert von Dr. Heike Grimm/ Hygromycin B-resistent |
| SH-SY5Y α -CTF | SH-SY5Y mit stabiler Expression der letzten 83 C-terminalen Aminosäuren des humanen APP ₆₉₅ / generiert von Christoph Stahlmann/ Zeocin-resistent |
| SH-SY5Y β -CTF | SH-SY5Y mit stabiler Expression der letzten 99 C-terminalen Aminosäuren des humanen APP ₆₉₅ / generiert von Christoph Stahlmann/ Zeocin-resistent |
| SH-SY5Y IDE-KD | SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von IDE sh-RNS/ im Rahmen dieser Arbeit generiert von Janine Mett/ Hygromycin B-resistent |
| SH-SY5Y APBB1 (Fe65)-KD | SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von APBB1-shRNS/ generiert von Dr. Sven Grösgen/ Hygromycin B-resistent |
| SH-SY5Y ARSA-KD | SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von ARSA-shRNS/ generiert von Valerie Zimmer/ Hygromycin B-resistent |

| Bezeichnung | Beschreibung/ Herkunft/ Antibiotika-Resistenz |
|-------------------|--|
| SH-SY5Y WT (mock) | SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von mock sh-RNS, die keine sh-RNS Funktion besitzt; Vergleichszellen für SH-SY5Y IDE-KD/ SH-SY5Y APBB1 (Fe65)-KD/ SH-SY5Y ARSA-KD generiert von Janine Mett/ Dr. Sven Grösgen/ Valerie Zimmer Hygromycin B-resistent |

3.1.4 *IN VIVO-MATERIAL*

3.1.4.1 Mausmodelle

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mausmodelle wurden von verschiedenen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über alle verwendeten Mausmodelle und deren Herkunft ist in Tab. 6 gegeben.

Tab. 6: Mausmodelle

| Bezeichnung | Beschreibung/ Herkunft |
|-------------------------------------|--|
| APP ^{-/-} | Mäuse mit Gen-Knockout von APP/ von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Heber et al., 2000) |
| APLP2 ^{-/-} | Mäuse mit Gen-Knockout von APLP2/ von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Heber et al., 2000) |
| APP/APLP2 ^{-/-} | Mäuse mit kombiniertem Gen-Knockout von APP und APLP2/ von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Heber et al., 2000) |
| APP Δ CT15 | Mäuse mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus/ von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Ring et al., 2007) |
| APP ^{swe} | Mäuse mit Expression von humanem APP ₆₉₅ mit der „swedish“-Doppelmutation (K670N/M671L) (Mullan et al., 1992)/ von Prof. Dr. Heikki Tanila (Kuopio, Finnland) zur Verfügung gestellt |
| APP ^{swe} /PS1 Δ E9 | Mäuse mit kombinierter Expression von humanem APP ₆₉₅ mit der „swedish“-Doppelmutation (K670N/M671L) (Mullan et al., 1992) und humanem PS1 mit Deletion des Exons 9 (PS1 Δ E9) (Perez-Tur et al., 1995)/ von Prof. Dr. Heikki Tanila (Kuopio, Finnland) zur Verfügung gestellt (Liu et al., 2004) |
| 5x FAD | Mäuse mit kombinierter Expression 5 verschiedener humaner FAD-APP- und -PS1-Mutationen (APP K670N/M671L (Mullan et al., 1992), APP I716V (Eckman et al., 1997), APP V717I (Goate et al., 1991), PS1 M146L und PS1 L286V (Sherrington et al., 1995)/ von Dr. Kristina Endres (Mainz) zur Verfügung gestellt (Reinhardt et al., 2014) |
| VitD3 ^{-/-} | Vitamin D3-defiziente WT-Mäuse (C57BL/6)/ von Prof. Dr. Dr. Robert Bals (Homburg) zur Verfügung gestellt (Grimm et al., 2014b) |

3.1.4.2 Kokosnussöl-Fütterungsexperiment

In dieser Arbeit wurde Hirngewebe und Serum von Mäusen aus einem Fütterungsexperiment verwendet, das in Kooperation mit Prof. Dr. Heikki Tanila (Kuopio, Finnland) durchgeführt wurde.

Zu Beginn der Fütterung wurden 18 männliche, acht Wochen alte APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäuse in zwei Gruppen aus neun Tieren eingeteilt. Eine Gruppe wurde über einen Zeitraum von zehn Wochen mit kokosnussölreichem Futtermittel gefüttert. Die Vergleichsgruppe erhielt über den gleichen Zeitraum eine isokalorische, mit Sonnenblumen-Öl versetzte Diät (Tab. 7). Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur von 20-22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12Std und

unbegrenztem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Am Ende des Fütterungsexperiments wurden die Mäuse mit jeweils 250µl Equithesin betäubt und dekapitiert. Die entnommenen Gehirne wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Blutproben aller Tiere wurden zur Serumgewinnung 1min lang bei 13000U/min zentrifugiert und anschließend ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Tab. 7: Für die Fütterungsstudie verwendete Öle

| Bezeichnung | Fettsäure-Komposition | Hersteller |
|-----------------|---|---------------|
| | hoher Anteil an MCFAs: | |
| Kokosnuss-Öl | 45,1% - 53,2% Laurinsäure (12:0) | Sigma Aldrich |
| | 16,8% - 21,0% Myristinsäure (14:0) | |
| | 7,5% - 10,2% Palmitinsäure (16:0) | |
| | 5,0% - 10,0% Ölsäure (18:1) | |
| | 4,6% - 10,0% Caprylsäure (8:0) | |
| | 5,0% - 8,0% Caprinsäure (10:0) | |
| | (Neufassung der Leitsätze für Speisefette und -öle, 2011) | |
| | hoher Anteil an Ölsäure (18:1): | |
| Sonnenblumen-Öl | 75,0% - 90,7% Ölsäure (18:1) | KD Pharma |
| | 2,1% - 17,0% Linolsäure (18:2) | |
| | 2,9% - 6,2% Stearinsäure (18:0) | |
| | 2,6% - 5,0% Palmitinsäure (16:0) | |
| | (Neufassung der Leitsätze für Speisefette und -öle, 2011) | |

3.1.4.3 Humane *post mortem* Gehirnproben

Humanes *post mortem* Hirngewebe wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Riemenschneider (Homburg) von Brain Net aus Münster bzw. Amsterdam erworben. Die Diagnose erfolgte nach CERAD (engl. Consortium to Establish A Registry for Alzheimer's Disease) (Morris et al., 1989; Morris et al., 1993) und/ oder Braak & Braak (Braak und Braak, 1991; Braak et al., 1993).

In Tab. 8 ist eine Übersicht über die verwendeten Hirnproben aus Münster dargestellt. Aufgrund der großen Anzahl der verwendeten Hirnproben aus Amsterdam ist in Tab. 9 nur eine statistische Übersicht über diese gegeben, eine ausführliche Liste der einzelnen Gewebeproben ist im Anhang zu finden. Alle Hirnproben aus Amsterdam stammen aus dem Bereich des frontalen Kortex.

Tab. 8: Übersicht über humanes *post mortem* Hirngewebe aus Münster

| Bezeichnung | Autopsie-Nr. | Alter | Braak/ CERAD | Diagnose |
|-------------|--------------|-------|-------------------|-----------|
| Kontr. #1 | 12/00 | 71 | | Kontrolle |
| AD #1 | 26/00 | 75 | CERAD C, Braak 6 | AD |
| Kontr. #2 | 139/03 | 64 | | Kontrolle |
| AD #2 | 158/05 | 79 | CERAD C, Braak >5 | AD |
| Kontr. #3 | 210/00 | 79 | | Kontrolle |
| AD #3 | 309/02 | 80 | CERAD C, Braak >5 | AD |

Tab. 9: Statistische Übersicht über humanes *post mortem* Hirngewebe aus Amsterdam

| | | Kontrollen | AD |
|--------|----------|------------|------------|
| Anzahl | männlich | 33 | 35 |
| | weiblich | 38 | 121 |
| | gesamt | 71 | 156 |
| Alter | | 82,1 ± 9,1 | 82,8 ± 8,5 |

3.1.5 LIPIDE

Alle verwendeten 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa) weisen an der sn1- und sn2-Position identische Fettsäuren auf. Sie werden daher im Folgenden vereinfacht benannt (z.B. PC10:0 statt PCaa10:0/10:0).

Zum Ansetzen der Stocklösungen wurden die Lipide in vorgewärmtem Ethanol gelöst. Zur Verwendung in Experimenten wurden alle PC-Spezies in Ethanol verdünnt, sodass die finale Konzentration 2mM betrug und der Lösungsmittelanteil bei den Experimenten für alle Lipide einheitlich war.

Tab. 10: Lipide

| Abkürzung | Bezeichnung | Konzentration der Stocklösung | Hersteller |
|-----------|---|-------------------------------|---------------------|
| PC10:0 | 1,2-Di-decanoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 25mM | Avanti Polar Lipids |
| PC12:0 | 1,2-Di-lauroyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 25mM | Avanti Polar Lipids |
| PC14:0 | 1,2-Di-myristoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 25mM | Avanti Polar Lipids |
| PC16:0 | 1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 25mM | Avanti Polar Lipids |
| PC18:0 | 1,2-Di-stearoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 10mM | Avanti Polar Lipids |
| PC20:0 | 1,2-Di-arachidoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 2,5mM | Avanti Polar Lipids |
| PC20:5 | 1,2-dieicosapentaenoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 25mM | Sigma Aldrich |
| PC22:0 | 1,2-Di-behenoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 2,5mM | Avanti Polar Lipids |
| PC22:6 | 1,2-Di-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 10mM | Avanti Polar Lipids |
| PC24:0 | 1,2-Di-lignoceroyl-sn-glycero-3-Phosphocholin | 2mM | Avanti Polar Lipids |

3.1.6 ANTIKÖRPER

Tab. 11: Antikörper

| Bezeichnung | Epitop | Klonalität | Verwendung | Hersteller/ Quelle |
|-------------|---|------------|---|--|
| 2214 | C-Terminus von APP (Aminosäure 683-695) | polyklonal | α -CTF-Immunpräzipitation, α -CTF- und β -CTF-Western Blot | in AG Hartmann / Multhaup/ Beyreuther (Heidelberg) hergestellt |
| G210 | freier C-Terminus von A β 40 | monoklonal | A β 40-Immunpräzipitation | in AG Hartmann / Multhaup/ Beyreuther (Heidelberg) hergestellt |
| G211 | freier C-Terminus von A β 42 | monoklonal | A β 42-Immunpräzipitation | in AG Hartmann / Multhaup/ Beyreuther (Heidelberg) hergestellt |
| W02 | APP (human, Aminosäure 5-10 der A β -Sequenz) | monoklonal | Gesamt-A β -Immunpräzipitation, APP-, A β - und sAPP α -Western Blot | in AG Hartmann / Multhaup/ Beyreuther (Heidelberg) hergestellt |
| Mbs492139 | freier C-Terminus von sAPP β | polyklonal | sAPP β -Western Blot | MyBioSource |

| Bezeichnung | Epitop | Klonalität | Verwendung | Hersteller/ Quelle |
|-------------|--------------------|------------|---|--------------------|
| PC529 | BACE1 | polyklonal | BACE1-Western Blot | Merck Millipore |
| ST1120 | N-Terminus von IDE | polyklonal | IDE-Western Blot, IDE-Aktivitätsmessung, IDE-Immunpräzipitation | Merck Millipore |
| ab951 | Ektodomäne von NEP | monoklonal | NEP-Western Blot | Abcam |
| AF1182 | NEP | polyklonal | NEP-Aktivitätsmessung | R&D Systems |
| ab13533 | SOD2 | polyklonal | SOD2-Western Blot | Abcam |
| W4011 | Kaninchen-IgG | polyklonal | HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot | Promega |
| P0260 | Maus-IgG | polyklonal | HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot | DAKO |

3.1.7 KITS

Tab. 12: Kits

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|--|---|-----------------------------|
| EndoFree Plasmid Maxi-Kit | Plasmid-Isolation aus transformierten Bakterien | Qiagen |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Synthese komplementärer DNS | Thermo Fisher Scientific |
| Dual-Glo Luciferase Assay System | PGC1 α -Promotor-Aktivitätsmessung | Promega |
| Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit | IDE- und Gal3St1-Promotor- Aktivitätsmessung | GeneCopoeia |
| Cytotoxicity Detection Kit | LDH-Test | Roche |
| Mouse A β 40 ELISA Kit | Nachweis von löslichem A β 40 in dem Hirnmateriale von WT-Mäusen | Life Technologies |
| Mouse A β 42 ELISA Kit | Nachweis von löslichem A β 42 in dem Hirnmateriale von WT-Mäusen | Life Technologies |
| Human A β 40 ELISA Kit | Nachweis von löslichem A β 40 in dem Hirnmateriale von transgenen Mäusen | Life Technologies |
| Human A β 42 ELISA Kit | Nachweis von löslichem A β 42 in dem Hirnmateriale von transgenen Mäusen | Life Technologies |
| Acid Sphingomyelinase Assay Kit | aSMase-Aktivitätsmessung | Echelon Biosciences |

3.1.8 PLASMIDE

Tab. 13: Plasmide

| Plasmid | Verwendung | Herkunft/ Hersteller |
|--|--|--------------------------------------|
| pcDNA3.1(+) <i>zeo</i> -APPC50 | C50-Expression in MEF APP Δ CT15 | Klonierung durch Christoph Stahlmann |
| pcDNA3.1(+) <i>zeo</i> -APPC83 | α -CTF-Expression in SH-SY5Y IDE-KD und SH-SY5Y WT (mock) | Klonierung durch Christoph Stahlmann |
| pcDNA3.1(+) <i>zeo</i> -APP695 | APP ₆₉₅ -Expression in N2a WT | Klonierung durch Christoph Stahlmann |
| pVectOZ-SEAP | Messung der SEAP-Sekretion durch N2a WT | OZ-Biosystems |
| pEZX-PG04-IDE-GLuc | IDE-Promotor-Aktivitätsmessung in N2a WT | GeneCopoeia |
| PGL3-PGC1 α -Luc | PGC1 α -Promotor-Aktivitätsmessung in MEF APP Δ CT15 | Addgene |
| pRL-CMV | PGC1 α -Promotor-Aktivitätsmessung in MEF APP Δ CT15 | Promega |
| pGL3-Basic | PGC1 α -Promotor-Aktivitätsmessung in MEF APP Δ CT15 | Promega |
| pEZX-PG04-GAL3ST1-GLuc | Gal3St1-Promotor-Aktivitätsmessung in MEF APP Δ CT15 | GeneCopoeia |
| SureSilencing IDE-shRNS Plasmide (Tab. 16) | Generierung stabiler N2a- und SH-SY5Y IDE-KD-Zellen | SABiosciences |

3.2 METHODEN

3.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1.1 Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS

(nach Sambrook et al., 1989)

Das Ziel dieser Methode ist die Amplifizierung von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Bakterien. Die hierfür verwendeten chemokompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α -Zellen, die die Fähigkeit besitzen, fremde DNS aus dem Medium aufzunehmen, wurden von Christoph Stahlmann zur Verfügung gestellt.

LB (engl. lysogeny broth)-Medium für Bakterien:

0,5% (w/v) NaCl
 1% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
 in ddH₂O

Einstellen des pH-Werts auf 7,0 mit HCl, Autoklavieren, Zugabe von 100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin B

LB (engl. lysogeny broth)-Agarplatten für Bakterien:

LB-Medium

1,5% (w/v) Agar

in Petrischalen gießen und Aushärten lassen

Zunächst erfolgte das Einbringen der Plasmid-DNS in die Bakterien mittels Hitzeschock. Die *E. Coli* DH5 α -Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 μ g der zu amplifizierenden Plasmid-DNS 20min lang auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 90 Sekunden (sek) bei 42°C und anschließend für 10min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 1ml LB-Medium resuspendiert und für 2min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Bakteriensediment in 50 μ l LB-Medium aufgenommen und in Abhängigkeit des verwendeten Plasmids auf einer Ampicillin- oder Kanamycin-haltigen Agarplatte ausgestrichen, die über Nacht (ü.N.) bei 37°C inkubiert wurde. Von den entstandenen Bakterienkolonien wurden einzelne Klone gepickt und zum Animpfen einer Vorkultur in 2ml antibiotikahaltigem LB-Medium verwendet. Diese wurde 6Std lang bei 37°C und 100U/min geschüttelt und diente im Folgenden zum Animpfen einer Übernacht-Kultur in 250ml antibiotikahaltigem LB-Medium. Während der Inkubation der Übernacht-Kultur bei 37°C und 100U/min kam es zur starken Teilung und daher zur Vervielfältigung der transformierten Bakterien. Am folgenden Tag erfolgte die Isolation der in den Bakterien amplifizierten Plasmid-DNS (3.2.1.2).

3.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

(nach EndoFree Plasmid Purification Handbook, Qiagen, Version April 2015)

Die Isolation von Plasmid-DNS aus Bakterien-Flüssigkulturen erfolgte durch Plasmid-DNS-Maxipräparation unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi-Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Methode beruht auf einer chemischen Lyse der transformierten Bakterien mit anschließender Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNS unter Verwendung einer Anionen-Austausch-Matrix.

Die Konzentration der isolierten DNS wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) mit einem NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Da eine Extinktion von 1 im Fall von doppelsträngiger DNS einer Konzentration von 50 μ g/ml entspricht, konnte anhand der gemessenen Extinktion bei 260nm die Konzentration der isolierten Plasmid-DNS berechnet werden. Außerdem wurde durch Messung der Extinktion bei 280nm (Extinktionsmaximum von Proteinen) das Maß an Verunreinigung durch Proteine abgeschätzt. Das Verhältnis von OD 260nm/280nm liegt für reine DNS bei 2,0. In der vorliegenden Arbeit wurde nur DNS verwendet, für die dieser Wert mehr als 1,8 betrug.

Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNS erfolgte bei -20°C.

3.2.1.3 Isolation von Gesamt-RNS aus Zellen und Gewebe

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

Für die Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS) aus Gewebe wurde dieses zunächst in TRIzol-Reagenz homogenisiert (3.2.3.3). Für die Gesamt-RNS-Isolation aus kultivierten Zellen wurde das Zellkulturmedium komplett abgenommen, 1ml TRIzol-Reagenz zugegeben (pro 6Well) und die Zellen mithilfe eines Gummischabers von dem Boden der Zellkulturschale abgelöst. Nach der Überführung des

Probenmaterials in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 200µl Chloroform. Die Proben wurden 15sek lang geschüttelt und 3min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation für 15min bei 13800 x g und 4°C kam es zur Ausbildung der folgenden Phasen: Eine untere DNS-enhaltende, rote Phase; eine weiße Interphase aus Proteinen und eine obere wässrige Phase, in der sich die RNS befindet. Letztere wurde in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol versetzt und 10min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Ausfällung der isolierten RNS, die nach weiterer zehnmütiger Zentrifugation bei 13800 x g und 4°C in Form von einem Pellet am Boden des Gefäßes sedimentierte. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und die Probe erneut für 5min bei 5400 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die RNS 5min an der Luft getrocknet und durch zehnmütige Inkubation bei 55°C in 100µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten RNS erfolgte mit einem NanoDrop-Spektrophotometer. Wie bereits erwähnt, ist die Extinktion von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm maximal, während das Extinktionsmaximum von Proteinen bei 280nm liegt. Die Berechnung des Quotienten OD 260nm/ 280nm erlaubt daher Rückschlüsse auf die Reinheit der isolierten RNS. Bei reiner RNS liegt dieser Wert bei 2,2. In der vorliegenden Arbeit wurden nur RNS-Präparationen verwendet, bei denen der Quotient OD 260/ 280nm zwischen 2,0 und 2,2 lag. Da für reine RNS eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm einer Konzentration von 40µg/ml entspricht, konnte anhand der gemessenen Extinktion bei 260nm die in den Proben vorhandene RNS-Konzentration ermittelt werden.

Die Langzeitlagerung der isolierten RNS erfolgte bei -80°C.

Die Isolation von Gesamt-RNS aus Zellen und Gewebe erfolgte teilweise in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen und Christoph Stahlmann (s. Kooperationen).

3.2.1.4 Synthese komplementärer DNS

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

Für die Synthese der komplementären DNS (cDNS) (engl. complementary DNA, cDNA) wurden jeweils 2µg der isolierten RNS unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits der Firma Life Technologies nach Herstellerangaben in einem PRIMUS 25 ADVANCED PCR-Cycler revers transkribiert.

Ansatz für cDNS-Synthese:

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

Programm für cDNS-Synthese:

| Schritt | Dauer | Temperatur | Zyklen |
|---------|----------|------------|--------|
| 1 | 10min | 25°C | 1 |
| 2 | 120min | 37°C | 1 |
| 3 | 5min | 85°C | 1 |
| 4 | konstant | 8°C | |

Abschließend wurde die gewonnene cDNS 1:10 in nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

Diese Methode wurde teilweise in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen durchgeführt (s. Kooperationen).

3.2.1.5 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

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

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Expressionsniveaus verschiedener Gene. Nach Isolation (3.2.1.3) und reverser Transkription (3.2.1.4) der in dem Probenmaterial enthaltenen RNS werden mittels PCR aus der gewonnenen cDNS bestimmte Gensequenzen amplifiziert. Dies ist durch Verwendung Gen-spezifischer Primer möglich (Tab. 14, Tab. 15). Die amplifizierten Produkte können durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, welcher in doppelsträngige DNS interkaliert, quantitativ nachgewiesen werden.

Tab. 14: Primer für murine Proben

| Gen (Protein) | forward primer | reverse primer |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>ACTB</i> (β-Aktin) | 5'-CCT AGG CAC CAG GGT GTG AT-3' | 5'-TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG-3' |
| <i>IDE</i> (IDE) | 5'-GCT ACG TGC AGA AGG ACC TC-3' | 5'-TGG ACG TAT AGC CTC GTG GT-3' |
| <i>MME</i> (NEP) | 5'-TGA ACT TTG CCC AGG TGT G-3' | 5'-GCA AAG TCC CAA TGA TCC TG-3' |

Tab. 15: Primer für humane Proben

| Gen (Protein) | forward primer | reverse primer |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>ACTB</i> (β-Aktin) | 5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3' | 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3' |
| <i>APBB1</i> (Fe65) | 5'-TTT GGA AGG ATG AAC CCA GT-3' | 5'-AAG CTT CTC CTC CTC TTG GG-3' |
| <i>APH1a</i> (APH1a) | 5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3' | 5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3' |
| <i>APH1b</i> (APH1b) | 5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3' | 5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3' |
| <i>ARSA</i> (ARSA) | 5'-GGA CTA GAG GCC CGC TAC AT-3' | 5'-GGG TGT GGT GAG AGG CAT AG-3' |
| <i>BACE1</i> (BACE1) | 5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3' | 5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3' |
| <i>GAL3ST1</i> (Gal3ST1) | 5'-CTC AAG TTC GCC TTC CCT AA-3' | 5'-TGT GGT TGC AGA TGA TGT TG-3' |
| <i>IDE</i> (IDE) | 5'-TGC CCT AGA CAG GTT TGC AC-3' | 5'-CTC CAG GCA TCA TTC ATC ACA T-3' |
| <i>MME</i> (NEP) | 5'-GAT CAG CCT CTC GGT CCT TG-3' | 5'-TGT TTT GGA TCA GTC GAG CAG-3' |
| <i>NCSTN</i> (Nicastrin) | 5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3' | 5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3' |

| Gen (Protein) | forward primer | reverse primer |
|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>PSENI</i> (PS1) | 5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3' | 5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3' |
| <i>PSEN2</i> (PS2) | 5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3' | 5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3' |
| <i>PSENEEN</i> (<i>PEN2</i>) | 5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3' | 5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3' |

Zur Messung der Genexpression wurden die RT-PCR-Ansätze in eine 96-Well-Platte pipettiert. Für die RT-PCR-Reaktionen und die Messung der entstandenen Fluoreszenz wurde das PikoReal PCR System der Firma Thermo Scientific verwendet.

Ansatz für RT-PCR:

| | |
|--------|----------------------------|
| 2,5µl | cDNS |
| 2µl | nukleasefreies Wasser |
| 0,25µl | Primer forward |
| 0,25µl | Primer reverse |
| 5µl | Fast SYBR Green Master Mix |

Programm für RT-PCR:

| Schritt | Prozess | Dauer | Temperatur | Zyklen |
|---------|---------------------------|-------|------------|--------|
| 1 | Denaturierung | 20sek | 95°C | 1 |
| 2 | Denaturierung | 3sek | 95°C | |
| 3 | Anlagerung/ Elongation | 30sek | 60°C | 40 |
| 4 | Schmelzkurven- analyse | | 60-95°C | 1 |

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der PikoReal Software (Version 2.1.158.545) und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001), wobei die Expression der zu analysierenden Gene auf die Expression des nicht regulierten Haushaltgens β -Aktin normiert wurde. Diese Methode wurde teilweise in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen durchgeführt (s. Kooperationen). Alle verwendeten RT-PCR-Primer wurden durch Dr. Sven Grösgen konzipiert.

3.2.1.6 Promotor-Aktivitätsmessungen mittels Luciferase-Assay

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Herstellerprotokoll Secret-Partner Dual Luminescence Assay Kit, GeneCopoeia, Version 2013 bzw. Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, Version Juni 2011)

Bei der Luciferase-Aktivitätsmessung handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung der Promotoraktivität. Diese wird indirekt durch die Messung der Aktivität eines Reporterenzym, dessen Transkription durch den zu untersuchenden Promotor reguliert wird, bestimmt. Hierzu werden Zellen zunächst mit entsprechenden Reporterplasmiden transfiziert. Zum Ausgleich von Schwankungen in der Transfektionseffizienz wird häufig ein zweites Reporter gen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors ko-transfiziert. Die Aktivität des sogenannten experimentellen Reporterenzym wird anschließend auf die Aktivität des Standardreporterenzym normiert (Alam und Cook, 1990).

Für die Analyse der IDE- und Gal3St1 (engl. galactosylceramid 3'-sulfotransferase 1)-Promotor-Aktivität wurden die auf 10cm-Schalen kultivierten Zellen transient mit den Plasmiden pEZX-PG04-IDE-Gluc bzw. pEZX-PG04-Gal3St1-GLuc transfiziert (3.2.2.3). Hierbei handelt es sich um Reporterplasmide, bei denen das für die sezernierte *Gaussia*-Luciferase kodierende Gen unter der Kontrolle des IDE- bzw. Gal3St1-Promotors steht. Zusätzlich enthalten diese Plasmide das für das Standardreporterenzym sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) kodierende Gen unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV (Cytomegalovirus)-Promotors. 24Std nach der Transfektion wurden die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät, die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen additiven Substanzen (3.2.2.5) wurde 48Std nach der Transfektion vorgenommen. Die *Gaussia*-Luciferase- und SEAP-Aktivitätsmessung in dem Zellkulturmedium wurde unter Verwendung des Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kits nach Herstellerangaben in weißen 96-Well-Platten durchgeführt. Die Detektion der entstandenen lumineszierenden Produkte erfolgte in einem Infinite M1000 Pro-Fluorometer/Luminometer. Das Signal der *Gaussia*-Luciferase wurde bei Messung der IDE-Promotoraktivität anschließend auf das SEAP-Signal der jeweiligen Probe normiert. Aufgrund des zu schwachen SEAP-Signals nach 30-minütiger-Inkubation mit AICD war diese Normierung bei der Messung der Gal3St1-Promotoraktivität nicht möglich.

Zur Untersuchung des Einflusses von synthetischem AICD-Peptid auf die Aktivität des PGC1 α -Promotors wurden MEF APP Δ CT15-Zellen zunächst mit den Reporterplasmiden PGL3-PGC1 α -Luc und pRL-CMV transient ko-transfiziert (3.2.2.3). Bei PGL3-PGC1 α -Luc steht die Transkription des für die Firefly-Luciferase kodierenden Gens unter der Kontrolle des PGC1 α -Promotors. Bei pRL-CMV wird die Transkription des Standardreporterenzym *Renilla*-Luciferase durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor kontrolliert. Als Negativkontrolle wurde das promotorfreie Plasmid PGL3-Basic verwendet. 24Std nach der Transfektion wurden die Zellen lipofektionsbasiert über 90min mit synthetischem AICD oder Wasser inkubiert (3.2.2.5.1). Der Nachweis der Luciferase-Aktivitäten aus den Zelllysaten erfolgte anschließend unter Verwendung des Dual-Glo Luciferase Assay Systems der Firma Promega nach Herstellerangaben in weißen 96-Well-Platten. Die entstandenen lumineszierenden Produkte wurden in einem Infinite M1000 Pro-Fluorometer/Luminometer detektiert. Für jede Probe wurde das Signal der Firefly-Luciferase auf das des Standardreporterenzym *Renilla*-Luciferase normiert.

Die Etablierung und Durchführung dieser Methode erfolgte in Kooperation mit Christoph Stahlmann (s. Kooperationen).

3.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

(nach Freshney, 2011)

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank mit zirkulierendem Luftstrom durchgeführt. Die Kultivierung der in Tab. 16 aufgeführten eukaryotischen Zellen erfolgte in 10ml Zellkulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 10cm-Zellkulturschalen. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100% wurden die Zellen mit 5ml PBS (engl. phosphate buffered saline) gewaschen und 2-3min mit 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, was zur Vereinzelung und zur Ablösung der adhären wachsenden Zellen von der Kulturschale diente. Nach Zugabe von 8,5ml frischem Medium wurden abhängig von der jeweiligen Zelllinie 0,5 bis 3ml der Zellsuspension zur Weiterkultivierung auf neue Kulturschalen verteilt und mit frischem Medium auf 10ml aufgefüllt. Für Experimente wurden die Zellen in Abhängigkeit von der folgenden Methode auf neue 10cm-Schalen oder auf 6-, 12-, 24- bzw. 96-Wellplatten ausgesät.

PBS:

| | |
|-------|--|
| 137mM | NaCl |
| 2,7mM | KCl |
| 8,1mM | Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O |
| 1,5mM | KH ₂ PO ₄ |

Einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit HCl

Tab. 16: Zellkulturmedien

| Zelllinie | Zellkulturmedium | Hygromycin B (400µg/ml) | Zeocin (300µg/ml) |
|------------------------------|--|----------------------------|----------------------|
| N2a WT | DMEM 0,1mM MEM Aminosäure-Lösung 10% (v/v) FCS | - | - |
| N2a IDE-KD | 100U/ml Penicillin 0,1mg/ml Streptomycin | + | - |
| N2a WT (mock) | 2mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat | + | - |
| MEF WT | | - | - |
| MEF PS1 ^{2/-} | | - | - |
| MEF PS1 ^{res} | DMEM 10% (v/v) FCS | - | + |
| MEF PS1 ^{T354I} | | - | + |
| MEF APP/APLP2 ^{-/-} | | - | - |
| MEF APP ^{ΔCT15} | | - | - |
| SH-SY5Y WT | | - | - |
| SH-SY5Y APP | | + | - |
| SH-SY5Y APP ^{swe} | | + | - |
| SH-SY5Y α-CTF | | - | + |
| SH-SY5Y β-CTF | DMEM 0,1mM MEM Aminosäure-Lösung 10% (v/v) FCS | - | + |
| SH-SY5Y WT (mock) | | + | - |
| SH-SY5Y IDE-KD | | + | - |
| SH-SY5Y Fe65-KD | | + | - |
| SH-SY5Y ARSA-KD | | + | - |

3.2.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen

(nach Freshney, 2011)

| Einfrierlösung A: | Einfrierlösung B: |
|-------------------|-------------------|
| 30% (v/v) FCS | 30% (v/v) FCS |
| in DMEM | 20% (v/v) DMSO |
| | in DMEM |

Zur Kryokonservierung wurden zu 60-80% konfluente Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit 5ml PBS (3.2.2.1) gewaschen und mit 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der 10cm-Zellkulturschale abgelöst bevor sie mit 4,5ml Kulturmedium verdünnt und in Falconröhrchen überführt wurden. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 355 x g wurde das Zellpellet in 1,5ml Einfrierlösung A resuspendiert. Nach der Zugabe von 1,5ml Einfrierlösung B wurde die Zellsuspension in jeweils zwei Kryogefäße aliquotiert. Diese wurden zunächst in einer Isopropanol-enthaltenden Einfrierbox bei -80°C gelagert, wobei es zu einer kontinuierlichen Abkühlung der Kryokulturen um 1°C/min kommt. Die Langzeitlagerung der Kryokulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Gefrierkulturen bei RT aufgetaut, in 8,5ml frischem, vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt und 5min bei 355 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 10cm Zellkulturschale überführt.

3.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen durch Lipofektion

(modifiziert nach Herstellerprotokoll Lipofectamine 2000, Invitrogen, Version Juli 2005)

Das Einbringen von Plasmid-DNS in eukaryotische Zellen erfolgte mittels Lipofektion unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000. Die Transfektion erfolgte bei einer Zellkonfluenz von 70-80%, die Volumina der verwendeten Reagenzien wurden an die Oberfläche der jeweiligen Zellkulturschalen angepasst (Tab. 17).

In einem 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde OptiMEM mit der Plasmid-DNS 5min bei RT inkubiert, in einem anderen OptiMEM mit Lipofectamine 2000. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und für weitere 20min bei RT inkubiert. Währenddessen erfolgten das Waschen der Zellen mit OptiMEM und das Vorlegen von OptiMEM zu den zu transfizierenden Zellen. Das Volumen des vorgelegten OptiMEMs wurde im Vergleich zu dem Herstellerprotokoll um etwa 50% reduziert, wodurch eine erhöhte Transfektionseffizienz erzielt werden konnte. Anschließend wurde das Plasmid-DNS/Lipofectamine 2000/OptiMEM-Gemisch zugegeben und für 4-6Std bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium durch neues Kulturmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden nach einer Expressionszeit von 48-72Std für folgende Experimente verwendet. Bei der Generierung stabil transfizierter Zellen wurde nach 24Std mit der Selektion transfizierter Zellen begonnen (3.2.2.4).

Tab. 17: Volumina der Reagenzien für die Transfektion eukaryotischer Zellen in Abhängigkeit von der Zellkulturschalenoberfläche

| Format | DNS [μg] | Lipofectamine 2000 [μl] | OptiMEM [μl] | vorgelegtes OptiMEM [ml] |
|-------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 24-Well | 1 | 1,5 | 50 | 0,5 |
| 12-Well | 2 | 3 | 100 | 0,7 |
| 6-Well | 6-7 | 6 | 200 | 0,8 |
| 10cm-Schale | 16 | 36 | 1200 | 7,5 |

3.2.2.4 Generierung stabil transfizierter IDE-Knockdown Zellen

(nach Herstellerprotokoll SureSilencing shRNA Plasmids, Qiagen, Version 2012)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden stabile N2a und SH-SY5Y IDE-Knockdown-Zelllinien generiert. Hierzu wurden die Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben mit vier verschiedenen shRNS (engl. short hairpin RNA, shRNA)-Plasmiden bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert (Tab. 18). Bei shRNS handelt es sich um RNS-Sequenzen, die zu siRNS (engl. small interfering RNA, siRNA) prozessiert werden und als solche durch komplementäre Bindung die Degradation der Zielgen-mRNS induzieren. Dieser Prozess, der als RNS-Interferenz (engl. RNA interference, RNAi) bezeichnet wird, resultiert in einer verringerten Expression eines spezifischen Zielgens (Elbashir et al., 2001; Hamilton und Baulcombe, 1999).

Tab. 18: IDE-shRNS-Plasmide

| Bezeichnung | Sequenz des Inserts |
|------------------|-----------------------|
| 1 | CCATGTTCTTGCCAGGGAAAT |
| 2 | GGAATGAAGTTCACAATAACT |
| 3 | AAGCTTGTCTCAACTTTGAAT |
| 4 | GCAGGAAAGTTGCACTATTAT |
| Negativkontrolle | GGAATCTCATTCGATCGATAC |

Da die verwendeten shRNS-Expressionsvektoren ein Hygromycin B-Resistenzgen aufweisen, können durch Zugabe von Hygromycin B zum Zellkulturmedium erfolgreich transfizierte Zellen selektioniert werden. Dazu wurde das normale Zellkulturmedium 24Std nach der Transfektion durch Hygromycin B-haltiges Selektionsmedium ersetzt. Um den Selektionsdruck konstant zu halten und abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde das Selektionsmedium alle 1-2 Tage gewechselt bis alle nicht transfizierten Zellen abgestorben waren. Die verbliebenen erfolgreich transfizierten Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90-100% kultiviert bevor Gefrierkulturen angelegt und die IDE-Genexpression überprüft wurde.

3.2.2.5 Inkubation von Zellen mit additiven Substanzen

In Abhängigkeit von den folgenden Experimenten erfolgte die Inkubation von eukaryotischen Zellen mit additiven Substanzen in 24-Well, 6-Well- oder 10cm-Zellkulturschalen. Die Inkubationsbedingungen wurden jeweils an die entsprechende Fragestellung angepasst und sind in Tab. 19 zusammengefasst. Für alle Inkubationen mit Ausnahme der lipofektionsbasierten AICD-Inkubation wurden ausschließlich konfluente Zellen verwendet, die zuvor mindestens zweimal passagiert wurden.

Tab. 19: Für Inkubationen verwendete additive Substanzen und Inkubationsbedingungen

| Additiv | finale Konzentration | Lösungsmittel, Anteil im Medium | Inkubationsdauer (Rhythmus) | FCS-Gehalt | inkubierte Zelllinien |
|--|---|---------------------------------|---|---------------|---|
| A β 40/42, Langzeitinkubation | A β 40:10ng/ml A β 42:1ng/ml | H ₂ O | 9Tage (12+12+12...Std) | 10% (v/v) | MEF PS1/2 -/- MEF APP/APLP2 -/- |
| (FITC)-AICD, Langzeitinkubation | 2 μ M | H ₂ O | 9Tage (12+12+12...Std) | 10% (v/v) | MEF APP Δ CT15 |
| (FITC)-AICD, lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation | 2,5 μ M | H ₂ O | variabel | 10% (v/v) | MEF APP Δ CT15 |
| α -Sekretase-Inhibitor GM6001 | 5 μ M | DMSO, 2‰ (v/v) | 24 Std (12+12Std) | 1% (v/v) | SH-SY5Y WT |
| β -Sekretase-Inhibitor IV | 500nM | DMSO, 2‰ (v/v) | 24 Std (12+12Std) | 1% (v/v) | SH-SY5Y WT |
| γ -Sekretase-Inhibitor X | 2 μ M | DMSO, 2‰ (v/v) | 24 Std (12+12Std) | 1% (v/v) | SH-SY5Y WT MEF WT MEF APP/APLP2 -/- |
| γ -Sekretase-Inhibitor DAPT | 2,5 μ M | DMSO, 1‰ (v/v) | 72Std (12+12+12+ 12+12+12Std) | 1% (v/v) | SH-SY5Y WT |
| Insulin | 10 μ M | H ₂ O | 24 Std (12+12Std) | 1% (v/v) | SH-SY5Y WT, SH-SY5Y α -CTF |
| Phosphatidylcholin (PC) | 10 μ M | Ethanol, 5‰ (v/v) | 18Std | 0,1% (v/v) | N2a WT (mock) |
| | 10 μ M | Ethanol, 5‰ (v/v) | 24Std (18+6Std mit A β 40) | 0,1% (v/v) | N2a WT (mock) N2a IDE-KD |
| GW4869 | 20 μ M | DMSO, 2‰ (v/v) | 24Std (18+6Std mit A β 40), Inkubation in Kombination mit PC | 0,1% (v/v) | N2a WT (mock) |
| zerebrale Lipidextrakte | 5 μ M | Ethanol, 5‰ (v/v) | 18Std | 0,1% (v/v) | N2a WT (mock) |
| | 5 μ M | Ethanol, 5‰ (v/v) | 24Std (18+6Std mit A β 40) | 0,1% (v/v) | N2a WT (mock) N2a IDE-KD |

3.2.2.5.1 Inkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten

(nach Grimm et al., 2012c)

Die Inkubation von Zellen mit einem synthetischen AICD-Peptid, welches die letzten 20 C-terminalen Aminosäuren von APP beinhaltet (Aminosäure-Sequenz: KMQQNGYENPTYKFFEQMQN), diente zur Bestätigung AICD-vermittelter Effekte in MEF APP Δ CT15. Da diese Zellen defizient für die letzten 15 Aminosäuren des APP-C-Terminus sind, sollte die Supplementierung des synthetischen Peptids im Fall

eines AICD-vermittelten Effekts zu einer Annäherung von MEF APP Δ CT15 an MEF WT führen. In Analogie dazu wurden APP/APLP2- und PS1/2-defiziente Zellen, die über kein endogenes A β verfügen, mit einem Gemisch aus synthetischen A β 40- und A β 42-Peptiden der humanen Sequenz (Aminosäure-Sequenz: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFF-AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV(IA)) in einem physiologischen 10:1-Verhältnis (Scheuner et al., 1996) behandelt.

Zur Betrachtung kurzfristiger AICD-induzierter Effekte wurde eine lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation der Zellen mit AICD-Peptiden durchgeführt. Hierzu wurde den Zellen 2,5 μ M AICD-Peptid in Kombination mit Saint PhD-Reagenz verabreicht (Tab. 19), was zu einer Liposomen-vermittelten Aufnahme des Peptids führt. Die Zellen wurden am Vortag in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24Std wurde das Medium von den zu 70-80% konfluenten Zellen abgenommen und durch 2,1ml neues Kulturmedium mit 10% FCS ersetzt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden pro Well 236,3 μ l HBS-Puffer und 6,23 μ l AICD-Peptid (Stock: 1mM) bzw. Wasser als Lösungsmittelkontrolle gemischt bevor 157,8 μ l Saint PhD-Reagenz zugegeben und der Ansatz erneut gevortext wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei RT wurde der Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Dauer der lipofektionsbasierten AICD-Inkubation variierte in Abhängigkeit der folgenden Experimente.

Diese AICD-Inkubationsvariante resultiert in einer rapiden Erhöhung der intrazellulären AICD-Konzentration, weshalb sie wahrscheinlich mit vergleichsweise starken Effekten einhergeht. Der Nachteil der lipofektionsbasierten AICD-Inkubation liegt jedoch in der kurzen Zeitspanne, in der potentielle Effekte nach der einmaligen Zugabe der AICD-Peptide zu verzeichnen sind. Es ist daher schwierig abzuschätzen, zu welchem Zeitpunkte nach der Supplementierung der Peptide die maximale Effektstärke zu erwarten ist.

Die Langzeitinkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten (Tab. 19) diente zur Betrachtung der Effekte einer langfristig erhöhten zellulären AICD- bzw. A β -Konzentration. Hierbei wurde AICD (2 μ M) bzw. A β 40/42 (10ng/ml bzw. 1ng/ml) über einen Zeitraum von neun Tagen in das Standard-Zellkulturmedium gegeben. Dieses wurde alle 12Std gewechselt, um eine konstante Konzentration der Peptide aufrecht zu erhalten. Die Zellen wurden während der Inkubation in einem 48Std-Rhythmus passagiert. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, deren Kulturmedium mit dem entsprechenden Volumen Wasser supplementiert wurde. Das Wechseln des Mediums bzw. das Passagieren der mit Peptiden und Lösungsmittel supplementierten Zellen erfolgte immer zeitgleich.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der physiologischeren Steigerung des intrazellulären AICD- (bzw. A β -) Gehalts. Es ist hierbei allerdings mit Adaptionsmechanismen zu rechnen, die möglicherweise mit geringeren Effektstärken einhergehen als die lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation der Zellen mit AICD-Peptiden.

Zur Überprüfung der effizienten Aufnahme des AICD-Peptides in die Zellen wurden diese wie oben beschrieben mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markiertem AICD (Aminosäure-Sequenz: FITC- ϵ Ahx-KMQQNGYENPTYKFFEQMQN) behandelt, welches anschließend in den Zelllysaten fluorometrisch nachgewiesen wurde (3.2.3.14). Alle Arbeiten mit FITC-markiertem AICD wurden zur Stabilisierung des Fluoreszenzsignals in weitestgehend abgedunkelten Räumen durchgeführt.

3.2.2.5.2 Inkubation von Zellen mit Inhibitoren

(Inkubation von Zellen mit γ -Sekretase-Inhibitor X: modifiziert nach Robinson et al., 2014; Inkubation von Zellen mit allen anderen Inhibitoren: Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Zur gezielten pharmakologischen Inhibition von Enzymen in lebenden Zellen wurden diese mit entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die γ -Sekretase-Inhibition unter Verwendung des γ -Sekretase-Inhibitors X erfolgte wie in Robinson et al., 2014 beschrieben mit dem Unterschied, dass für die Inkubation der Zellen Kulturmedium mit 1% FCS anstelle von 10% FCS verwendet wurde. Die Behandlung von Zellen mit allen anderen in Tab. 19 aufgeführten Inhibitoren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu etabliert.

Vor der Inkubation erfolgte zunächst eine Reduktion des FCS-Gehalts im Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 16Std bzw. 6Std bei GW4869, die zur langsamen Adaption der Zellen an die Inkubationsbedingungen diente. In Glasröhrchen wurde das Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt bevor die Zugabe der Inhibitoren erfolgte. Nach dem Durchmischen der Ansätze und dem Absaugen des alten Kulturmediums von den Zellen wurde das Inkubationsmedium zu den Zellen pipettiert. Dies wurde in einem bestimmten zeitlichen Abstand mehrfach wiederholt. Die Gesamt-Inkubationsdauer variierte in Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung (Tab. 19).

3.2.2.5.3 Inkubation von Zellen mit Phospholipiden

(modifiziert nach Grimm et al., 2013a)

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Fettsäuren auf die A β -Degradation und die daran beteiligten Enzyme wurden N2a-Zellen mit PC-Spezies inkubiert, die sich in dem Sättigungsgrad und der Kettenlänge der enthaltenen Fettsäuren unterscheiden (Tab. 10). Die Inkubation erfolgte wie in Grimm et al., 2013a beschrieben. Da zur Messung der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen jedoch ein anderer Inkubationsrhythmus erforderlich war (3.2.3.12), betrug dieser 18 + 6Std bzw. 18Std (Tab. 19) statt 8 + 16Std.

16Std vor der Inkubation wurde der FCS-Gehalts des Kulturmediums auf 0,1% reduziert. Die in Ethanol angesetzten Lipide und das in Glasröhrchen vorgelegte Medium wurden auf 37°C erwärmt, um die Löslichkeit der Lipide in dem wässrigen Kulturmedium zu erhöhen. Nach Zugabe der Phospholipide zu dem vorgewärmten Medium in einer finalen Konzentration von 10 μ M wurden die Ansätze gevortext und nach Absaugen des alten Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Bei Betrachtung Fettsäure-Kettenlänge-abhängiger Effekte wurden mit PC16:0 behandelte Zellen als Kontrolle verwendet. Als Kontrollen zu den PC-Spezies mit ungesättigten Fettsäuren dienten PC-Spezies mit den korrespondierenden gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge.

3.2.2.5.4 Inkubation von Zellen mit zerebralen Lipidextrakten

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Die Inkubation von Zellen mit Lipidextrakten aus Hirngewebe (3.2.4.1) erfolgte in Analogie zu der Behandlung mit Phospholipiden. Die Lipidextrakte wurden in einer finalen Konzentration von 5 μ M auf den Zellen inkubiert. Die Inkubationsdauer variierte in Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung (Tab. 19).

3.2.2.6 Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Test

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

Nach der Behandlung von Zellen mit additiven Substanzen musste eine Zytotoxizität der Additive ausgeschlossen werden. Für die Ermittlung der Zytotoxizität wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet. Die Methode beruht auf der Aktivitätsmessung des unter normalen Bedingungen zytosolisch vorliegenden Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium der behandelten Zellen. Da LDH infolge verringerter Plasmamembran-Integrität schnell in den Extrazellulärraum abgegeben wird, ist die LDH-Enzymaktivität im Zellkulturmedium direkt proportional zu der Anzahl geschädigter Zellen. Sie kann daher zur Bestimmung des zytotoxischen Potentials von Substanzen auf eukaryotische Zellen herangezogen werden. Die dieser Methode zugrunde liegende Reaktion besteht aus zwei Schritten: Die freigesetzte LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat, während NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert wird. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden durch den Katalysator Diaphorase zwei Protonen von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert, wodurch rotes Formazan entsteht.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde das Kulturmedium der behandelten Zellen sowie das der Positivkontrolle gesammelt und wie in 3.2.3.1 beschrieben aufbereitet. Als Positivkontrolle wurde das Kulturmedium vergleichbar konfluenten Zellen verwendet, die zuvor durch Zugabe von 1% (v/v) Triton-X100 abgetötet wurden. In eine transparente 96-Well-Platte wurden jeweils 100 μl des Mediums der inkubierten Zellen sowie einer aus dem Medium der Positivkontrolle hergestellten Standardreihe vorgelegt. Das weitere Vorgehen unter Verwendung des Cytotoxicity Detection Kits erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Der durch die LDH-Aktivität bedingte Farbumschlag von gelb zu rot-violett wurde mittels Absorptionsmessung bei 491nm nachgewiesen.

Da die LDH-Aktivität in den Proben immer relativ zu der Positivkontrolle gemessen wurde, konnte eine quantitative Aussage über die vorhandene Zytotoxizität getroffen werden. Die Zellviabilität wurde anschließend aus der ermittelten Zytotoxizität berechnet, wobei 0% Zytotoxizität mit 100% Zellviabilität gleichgesetzt wurde.

3.2.2.7 Messung der Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk mittels SEAP-Assay

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

Die Messung der Proteinsekretion über das TGN erfolgte durch den Nachweis der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Kulturmedium von zuvor entsprechend transfizierten Zellen. Bei SEAP handelt es sich um eine verkürzte Form der alkalischen Phosphatase, die über das TGN in sekretorischen Vesikeln sezerniert wird. Der Nachweis des Enzyms erfolgte durch die Zugabe des SEAP-spezifischen Substrats *para*-Nitrophenyl Phosphat (p-NPP), bei dessen Umsetzung der wasserlösliche Farbstoff p-Dinitrophenol entsteht.

Die Zellen wurden auf 10cm-Schalen bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und transient mit dem für SEAP kodierenden Plasmid pVectOZ-SEAP transfiziert (3.2.2.3). Nach einer Regenerationszeit von 24Std erfolgte das Aussäen der transfizierten Zellen auf 24-Well-Platten. Wiederum 24Std später wurden die Zellen wie in 3.2.2.5.3 beschrieben mit Phospholipiden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das konditionierte Medium gesammelt und aufbereitet (3.2.3.1), 10min lang in einem Heizblock bei 65°C erhitzt und 1:5 verdünnt. 100 μl der verdünnten Proben wurden in eine

transparente 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 100µl 1-Step-pNPP-Lösung zu jedem Well wurde die Platte 20min bei RT und 150U/min inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte anschließend durch die Zugabe von 100µl 1N NaOH. Die relative Menge des gebildeten p-Dinitrophenols wurde durch Messung der Absorption bei 405nm in einem Platten-Photometer bestimmt.

3.2.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.2.3.1 Verarbeitung von Zellen und konditioniertem Medium

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

Das konditionierte Zellkulturmedium wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Falcon-Röhrchen überführt und 5min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert, um abgestorbene Zellen und Zellfragmente zu sedimentieren. Der Überstand wurde anschließend in neue Gefäße überführt und sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Zellen dreimal mit PBS (3.2.2.1) gewaschen, unter Verwendung eines Gummischabers vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in Abhängigkeit von den folgenden Experimenten mechanisch oder chemisch aufgeschlossen.

3.2.3.2 Konzentrierung von Proteinen aus konditioniertem Medium

(nach Herstellerprotokoll Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters, Millipore, Version 2011)

Für den Nachweis von extrazellulär lokalisiertem IDE mittels Western Blot war eine Konzentrierung der im Kulturmedium vorhandenen Proteine erforderlich. Hierzu wurden 200µl des konditionierten Mediums 30min bei 13000 x g und 4°C durch Amicon Ultra-Filterröhrchen mit einer Molekulargewicht-Abscheidegrenze von 30kDa zentrifugiert. Der IDE-enthaltende Überstand wurde im Anschluss für die Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Herstellung von Homogenaten aus Zellen und Gewebe

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

Pelletierte Zellen oder Gewebestücke wurden entweder unter Verwendung eines Potter S- oder Minilys-Homogenisators mechanisch in Wasser aufgeschlossen, wobei das eingesetzte Volumen an die jeweilige Zell- bzw. Gewebemenge angepasst wurde. Bei Verwendung des Minilys-Homogenisators wird das Probenmaterial mittels hochbeschleunigter Keramikkügelchen aufgeschlossen (30sek, 5000U/min), während es bei Verwendung des Potter S-Homogenisators durch Auf- und Abbewegung eines rotierenden Teflonstößels (50 Wiederholungen, 1500 U/min) homogenisiert wird. Für die Aktivitätsmessung der azidischen Sphingomyelinase (3.2.3.13.7) erfolgte der Zellaufschluss durch Sonifizierung für 30sek bei niedrigster Stufe mit einer Ultraschallsonde.

3.2.3.4 Herstellung von Lysaten aus Zellen und Gewebe

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

10x Protease-Inhibitor-Cocktail mit EDTA: 1 Complete-Tablette gelöst in 5ml in ddH₂O, Lagerung bei -20°C

10x Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA: 1 Complete-Tablette gelöst in 5ml in ddH₂O, Lagerung bei -20°C

| Standard-Lysepuffer | | Lysepuffer für die IDE- und NEP-Aktivitätsmessung | |
|------------------------------|----------------|---|----------------|
| 50mM | Tris/HCl pH7,4 | 20mM | Tris/HCl pH7,4 |
| 150mM | NaCl | 10% (w/v) | Saccharose |
| 2mM | EDTA | 0,5% (v/v) | Triton X-100 |
| 0,1% (v/v) | Nonidet P-40 | in ddH ₂ O | |
| 0,1% (v/v) | Triton X-100 | frische Zugabe von Protease- | |
| in ddH ₂ O | | Inhibitor -Cocktail ohne EDTA | |
| frische Zugabe von Protease- | | | |
| Inhibitor-Cocktail mit EDTA | | | |

Zur Herstellung von Lysaten wurden pelletierte Zellen in Lysepuffer resuspendiert und 1Std auf Eis inkubiert. Gewebehomogenate wurden mit 2-fach konzentriertem Lysepuffer versetzt und ebenfalls 1Std auf Eis inkubiert. In Abhängigkeit von der nachfolgenden Methode wurden unterschiedliche Lysepuffer verwendet.

Die Proben wurden anschließend 5min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert, um Zelldebris zu sedimentieren. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und direkt für weitere Experimente verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.5 Herstellung von Membranprotein-Extrakten aus Zellen

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Dissertation Dr. Martin Siepmann; Universität Bonn, 2009)

Die Methode zur Herstellung von Membranprotein-Extrakten aus Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals im Labor etabliert und diente zur Anreicherung von membranständigen Proteinen. Die Methode wurde zur Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) des in den verwendeten Zelllinien relativ schwach exprimierten Proteins NEP verwendet.

Hypotonpuffer:

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 10mM | Tris/HCl pH 7,6 |
| 1mM | EDTA |
| 1mM | EGTA |
| in ddH ₂ O | |

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie in 3.2.3.1 beschrieben. Die pelletierten Zellen wurden in Hypotonpuffer resuspendiert und für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zehnmal durch eine 23G x 1"-Kanüle gepresst. Das erhaltene Zellhomogenat wurde 5min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, was zur Sedimentation größerer Zellbestandteile führte. Aus dem Überstand wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (12000 x g, 30min, 4°C) die Membranen sedimentiert. Das Membranpellet wurde in Lysepuffer (3.2.3.4) resuspendiert und für die Polyacrylamid Gelelektrophorese (3.2.3.8) verwendet.

3.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

(nach Smith et al., 1985; Durchführung wie in Rothhaar, 2012 beschrieben)

Um eine höhere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben zu erzielen, wurden diese vor allen Experimenten auf einen einheitlichen Proteingehalt eingestellt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben wurde der BCA (engl. bicinchoninic acid)-Test durchgeführt. Dieser basiert auf der Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) in Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu und der Bildung eines violetten Komplexes von Cu(I) mit Bicinchoninsäure. Die Bildung dieses Komplexes kann photometrisch bei einer Absorption von 560nm gemessen werden, wobei die Absorption direkt proportional zu der enthaltenen Proteinmenge ist.

BCA-Reaktionslösung:

4% (w/v) CuSO₄ x 5H₂O und Bicinchoninsäure 1:39 (v/v)

Für den BCA-Test wurden die Proben als Dreifachbestimmung in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Abhängig von dem geschätzten Proteingehalt wurden hierbei zwischen 0,5µl und 10µl der Lysate bzw. Homogenate eingesetzt. Zusätzlich wurde eine in Wasser angesetzte Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin (engl. bovine serum albumin, BSA) in zwölf verschiedenen Konzentrationen (0,1 bis 1,1mg/ml) aufgetragen, die später als Referenz bei der Berechnung der Proteinkonzentrationen diene. Nach der Zugabe von jeweils 200µl der frisch angesetzten BCA-Reaktionslösung unter Verwendung einer 8-Kanal-Pipette, wurden die Proben 15min bei 37°C inkubiert und dann weitere 15min bei RT geschüttelt (200U/min). Die Absorption bei 560nm wurde in einem Platten-Photometer bestimmt und die Proteinkonzentration in den Proben anhand der Messwerte der BSA-Standardreihe berechnet.

3.2.3.7 Immunpräzipitation von APP-Prozessierungsprodukten

(nach Dissertation Dr. Eva Zinser, Universität Heidelberg, 2009 und Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Die Immunpräzipitation (IP) diente zur Anreicherung von Aβ und α-CTF aus Probenmaterial, um die anschließende Detektion der Peptide mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) zu ermöglichen. Eine Übersicht über die hierfür verwendeten Antikörper ist in Tab. 20 gegeben, weitere Eigenschaften der Antikörper sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 20: Für Immunpräzipitation verwendete Antikörper

| Antikörper | Anreicherung von | für Immunpräzipitation eingesetzte Konzentration |
|------------|------------------|---|
| W02 | Gesamt-Aβ | 10µg/ml |
| G210 | Aβ40 | 12,5µg/ml |
| G211 | Aβ42 | 17,3µg/ml |
| 2214 | α-CTF | 10µg/ml |

| PBS: | Waschpuffer A: | | Waschpuffer B: | | Waschpuffer C: | |
|------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| s. 3.2.2.1 | 10mM | Tris/HCl pH7,5 | 10mM | Tris/HCl pH7,5 | 10mM | Tris/HCl pH7,5 |
| | 150mM | NaCl | 500mM | NaCl | in ddH ₂ O | |
| | 0,1% (v/v) | Nonidet P-40 | 0,1% (v/v) | Nonidet P-40 | | |
| | 0,1% (v/v) | Triton X-100 | 0,1% (v/v) | Triton X-100 | | |
| | 2mM | EDTA | 2mM | EDTA | | |
| | in ddH ₂ O | | in ddH ₂ O | | | |

Für die Immunpräzipitation wurde 1ml konditioniertes, an den Proteingehalt der Zellen angeglichenes Medium bzw. in PBS (3.2.2.1) verdünntes Zelllysate mit einem Gesamtproteingehalt von 1mg (3.2.3.6) in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Antikörper (Tab. 20) und 20µl Protein-G-Sepharose versetzt und ü.N. bei 4°C in einem Überkopftaunler inkubiert. Nach Zentrifugation für 1min bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen. Die Präzipitate wurden anschließend jeweils einmal mit 1ml Waschpuffer A, B und C gewaschen. Zwischen diesen Waschschritten wurden die Proben 1min lang bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Waschpuffer unter Verwendung einer Hamilton-Kapillare komplett abgenommen und die Präzipitate der gelelektrophoretischen Auftrennung und anschließender Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) unterzogen.

3.2.3.8 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels vertikaler diskontinuierlicher Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

(nach Schagger und von Jagow, 1987, Durchführung wie in Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 beschrieben)

Bei der SDS-Page (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) handelt es sich um eine Standardmethode zur Trennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht.

| 1x Laufpuffer für SDS-Page: | | 3x Protein-Probenpuffer: | |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|
| 100mM | Tris/HCl pH 8,25-8,5 | 187,5mM | Tris/HCl pH 6,8 |
| 100mM | Tricin | 6% (w/v) | SDS |
| 0,1% (w/v) | SDS | 30% (v/v) | Glycerin |
| in ddH ₂ O | | 15% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| | | 0,03% (w/v) | Bromphenolblau |
| | | in ddH ₂ O | |

Die Trennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen, 10-20%-igen Tris-Tricin-Gradienten-Gelen durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Für die Methode wurden Proteingemische aus Lysaten (3.2.3.4) und Membranprotein-Extrakten (3.2.3.5), angereicherte Proteine aus konditioniertem Zellkulturmedium (3.2.3.2) sowie Immunpräzipitate (3.2.3.7) eingesetzt. Zu Immunpräzipitaten wurden 15µl 3x Protein-Probenpuffer gegeben. Alle anderen Proben wurden mit 1/3 Volumen 3x Protein-Probenpuffer gemischt. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Inkubation der Proben bei 98°C in einem Heizblock, welche die Denaturierung der Proteine bewirkte. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene SDS (engl. sodium dodecyl sulfate) maskiert die Eigenladungen der Proteine mit einer negativen Ladung, was im elektrischen Feld zur Bewegung der Proteine in Richtung der Anode führt. Die denaturierten Proben wurden im Anschluss einige Sekunden lang zentrifugiert und unter Verwendung einer Hamilton-Kapillare in die Geltaschen geladen. Zusätzlich wurden auf jedes Gel 5µl des Proteingrößenstandards Page Ruler aufgetragen, was die spätere Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine ermöglichte. Die

elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 120V über einen Zeitraum von 60-90min.

3.2.3.9 Western Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach Towbin et al., 1979, Durchführung wie in Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 beschrieben)

Der Western Blot-Transfer ist ein Verfahren zur Übertragung und Immobilisierung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus dem Gel (3.2.3.8) auf eine Membran. Dies erfolgt durch Anlegen einer äußeren elektrischen Spannung und ermöglicht den späteren Nachweis der Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper (3.2.3.10).

Transferpuffer:

| | |
|-----------------------|----------------|
| 25mM | Tris/HCl pH8,7 |
| 192mM | Glycin |
| 20% (v/v) | Methanol |
| 0,025% (w/v) | SDS |
| in ddH ₂ O | |

Für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nass-Blot- (engl. Tank-Blot)-Verfahren wurden die Tris-Tricin-Gele auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und auf beiden Seiten mit zwei Lagen Whatman-Filterpapier und einem Schwamm umhüllt. Dieser Aufbau wurde dann in einer speziellen Plastikvorrichtung in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingehängt. Der Transfer der durch das SDS negativ geladenen Proteine erfolgte bei 380mA und 4°C in Richtung der Anode. Die Transferdauer richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und betrug standardmäßig 3Std. Im Fall von relativ kleinen Peptiden wie α - β -CTF und A β wurde die Transferzeit auf zwei bzw. eine Std verkürzt.

3.2.3.10 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011 und Ida et al., 1996)

Die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten (3.2.3.8) und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierten (3.2.3.9) Proteine wurden durch die Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen. Hierbei macht man sich die spezifische Bindung eines Primärantikörpers an sein Epitop zunutze. Der Primärantikörper wird in einem weiteren Schritt wiederum von einem speziesspezifischen Sekundärantikörper erkannt, welcher an das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Bei Kontakt der ECL (engl. enhanced chemiluminescence)-Reaktionslösung mit der Meerrettichperoxidase kommt es durch eine enzymatische Umsetzung zu einer Lichtreaktion, die die Darstellung der markierten Proteine auf lichtempfindlichen Filmen ermöglicht.

Die Membran wurde zunächst in Blockierlösung inkubiert, was der Maskierung freier Bindestellen und somit der Reduktion unspezifischer Bindungen der Antikörper diente. Bei Verwendung des Primärantikörpers W02 wurde die Nitrozellulosemembran vor dem Blocken für 5min in PBS in einer Mikrowelle bei 700W erhitzt (Ida et al., 1996). Es folgten drei Waschschrte und die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die

Membran anschließend für 1Std mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. In Tab. 21 ist eine Übersicht über alle verwendeten Primärantikörper sowie über die entsprechenden Blockier- und Inkubationsbedingungen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die ECL-Reaktionslösung auf die Membran pipettiert, wodurch es zu der HRP-katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion kam. Die Membran wurde luftblasenfrei zwischen zwei Kopierfolien gelegt und in einer Dunkelkammer auf einem lichtempfindlichen ECL-Hyperfilm exponiert. Für die densitometrische Auswertung der Banden wurde das Computerprogramm Image Gauge V3.45 verwendet.

| | | |
|---------|-------------------------------------|------------------|
| PBS: | TBS (engl. Tris-buffered saline)-T: | |
| 3.2.2.1 | 10mM | Tris/ HCl pH 8,0 |
| | 150mM | NaCl |
| | 0,2% (v/v) | Tween-20 |
| | in ddH ₂ O | |

ECL-Reaktionslösung:

ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1 (v/v)

Tab. 21: Blockier- und Inkubationsbedingungen der für den immunologischen Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen verwendeten Antikörper

| nachzuweisendes Protein bzw. Peptid | Blockierlösung, Inkubationsbedingungen | 1. Antikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingungen | 2. Antikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingungen | Waschpuffer |
|---|---|---|---|-------------|
| APP/ A β / sAPP α / β -CTF (human) | 10% Milchpulver (w/v) in PBS, ü.N., 4°C | W02, 1 μ g/ml in 1% Milchpulver (w/v) in PBS, 90min, RT | P0260, 1:5000 in PBS, 1Std, RT | PBS |
| APP/ α -CTF | 10% Milchpulver (w/v) in PBS, ü.N., 4°C | 2214, 1:5000 in 1% Milchpulver (w/v) in PBS, 90min, RT | W4011, 1:5000 in PBS, 1Std, RT | PBS |
| sAPP β | 10% Milchpulver (w/v) in PBS, ü.N., 4°C | Mbs492139, 1:200 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS, 90min, RT | W4011, 1:5000 in PBS, 1Std, RT | PBS |
| BACE1 (murin) | 10% Milchpulver (w/v) in PBS, ü.N., 4°C | PC529, 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS, 90min, RT | W4011, 1:5000 in PBS, 1Std, RT | PBS |
| NEP | 2% BSA (w/v) in TBS-T, 1Std, RT | ab951, 1:300 in TBS-T, ü.N., 4°C | P0260, 1:5000 in TBS-T, 1Std, RT | TBS-T |
| IDE | 10% Milchpulver (w/v) in TBS-T, ü.N., 4°C | ST1120, 1:2000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T, 90min, RT | W4011, 1:5000 in TBS-T, 1Std, RT | TBS-T |
| SOD2 | 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T, ü.N., 4°C | ab13533, 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T | W4011, 1:5000 in TBS-T, 1Std, RT | TBS-T |

3.2.3.11 Nachweis von löslichem A β aus murinem Hirnmaterial mittels ELISA

(Probenvorbereitung nach Burg et al., 2013, ELISA nach Herstellerprotokollen Mouse A β 40 und A β 42 ELISA-Kit bzw. Human A β 40 und A β 42 ELISA-Kit, Invitrogen, Version Januar 2010)

Für den Nachweis von A β 40 und A β 42 aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen wurden die kommerziell erhältlichen Mouse A β 40 ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay)- bzw. Mouse A β 42 ELISA-Kits der Firma Life Technologies benutzt. Der Nachweis von A β 40 und A β 42 aus dem

Hirnmateriale von APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäusen erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Human A β 40 ELISA- bzw. Human A β 42 ELISA-Kits. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Isolation vorhandener A β -Peptide durch Inkubation der Proben in einer mit spezifischen Antikörpern beschichteten 96-Well-Platte. Die auf diese Weise isolierten Peptide werden zunächst durch einen Detektionsantikörper gebunden, welcher wiederum von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wird. Die HRP katalysiert nach Zugabe der Stabilized Chromogen-Lösung eine Reaktion, bei der ein farbiger Komplex entsteht. Dieser kann durch Messung der Absorption bei 450nm in einem Platten-Photometer quantitativ nachgewiesen werden.

2x Lysepuffer für A β -ELISA:

| | |
|--|----------------------|
| 100mM | Tris/ HCl pH 7,4 |
| 2% (v/v) | Nonidet P-40 |
| 0,5% (w/v) | Natrium-Desoxycholat |
| 300mM | NaCl |
| 2mM | EDTA |
| in ddH ₂ O | |
| frische Zugabe von Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF | |

1x Lysepuffer für A β -ELISA:

| | |
|--|----------------------|
| 50mM | Tris/HCl pH 7,4 |
| 1% (v/v) | Nonidet P-40 |
| 0,25% (w/v) | Natrium-Desoxycholat |
| 150mM | NaCl |
| 1mM | EDTA |
| in ddH ₂ O | |
| frische Zugabe von Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF | |

Die Gewebe-Homogenate wurden zunächst 1:1 mit 2x Lysepuffer verdünnt und 15min bei 4°C lysiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation der Proben bei 900 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter Verwendung von 24G x 1“-Kanülen und 1ml-Spritzen in 150 μ l 1x Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden 90min auf Eis inkubiert und anschließend für 20min bei 16200 x g und 4°C zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand, welcher die löslichen A β -Peptide enthält, wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 50 μ l der Proben wurden für die anschließende Bestimmung des A β 40- bzw. A β 42-Gehalts mittels ELISA eingesetzt, welcher nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Berechnung des A β -Gehalts in APP^{swe}/PS1 Δ E9-Maushirnen erfolgte durch Normierung der Messwerte auf das Nassgewicht des Gewebes, die Proben aus WT-Mäusen wurden vor Beginn des ELISAs auf einen einheitlichen Proteingehalt von 4,5 μ g/ μ l eingestellt (3.2.3.6).

3.2.3.12 Messung der Gesamtdegradation von A β 40

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Sun et al., 2005)

Die Methode zur Bestimmung der Gesamtdegradation von A β 40 auf lebenden Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an Sun et al., 2005 erstmals im Labor etabliert. Hierfür wurden die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät und wie in 3.2.2.5 beschrieben mit dem zu untersuchenden Additiv behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem jeweiligen Additiv in Kombination mit 0,5 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml humanem A β 1-40 (im Folgenden vereinfacht als A β 40 bezeichnet) inkubiert (200 μ l/Well). Die Gesamtdegradation von A β 40 wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung auch in Zelllysaten und im konditionierten Medium von inkubierten Zellen bestimmt. Diese Methoden wurden ebenfalls neu etabliert und dienten zur separaten Betrachtung der Aktivität von intra- und extrazellulär lokalisierten A β -degradierenden Proteasen. Hierzu wurde das zu analysierende Probenmaterial in kleinen Glasflaschen mit synthetischem A β 40 der humanen Sequenz versetzt und bei 37°C und 300U/min geschüttelt. In Tab. 22 ist die eingesetzte A β 40-Konzentration sowie die Inkubationszeit der Proben mit dem synthetischen Peptid in Abhängigkeit des Probenmaterials aufgelistet.

Tab. 22: Versuchsansätze zur Bestimmung der Gesamtdegradation von A β 40

| Probenmaterial | Probenmenge/ Puffer | A β 40-Konzentration | Inkubationszeit |
|--|---|-------------------------------------|-----------------|
| lebende N2a -Zellen | 1 Well einer 24-Well-Platte + 200 μ l FCS-reduziertes Zellkulturmedium | 0,5 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml | 6Std |
| lebende SH-SY5Y-Zellen | 1 Well einer 24-Well-Platte + 200 μ l FCS-reduziertes Zellkulturmedium | 0,5 μ g/ml | 8Std |
| konditioniertes Medium von SH-SY5Y- Zellen | 500 μ l FCS-reduziertes, konditioniertes Zellkulturmedium | 0,25 μ g/ml | 24Std |
| MEF-Zelllysate | 60 μ g Gesamtprotein in 100 μ l PBS | 1 μ g/ml | 60min |

Die relative Menge an verbleibendem, nicht abgebautem, humanem A β 40 wurde anschließend mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) quantitativ bestimmt. Diese steht in umgekehrt proportionalem Verhältnis zu der in den Proben vorhandenen Gesamt-A β -degradierenden Aktivität. Da der bei der Western Blot-Analyse verwendete Antikörper W02 ausschließlich humanes A β detektiert, wurde bei Verwendung von murinen Zellen nur das supplementierte humane A β 40 nachgewiesen. Bei Verwendung von humanen Zellen (4.6.5.1, 4.6.5.4), wurde die Detektion von endogenem A β experimentell ausgeschlossen.

3.2.3.13 Fluorometrische Enzymaktivitätsmessungen

Die Messung der NEP-, IDE-, γ -Sekretase- und aSMase-Enzymaktivität erfolgte unter Verwendung fluorometrischer Substrate. Diese bestehen aus einem Fluorophor und einem Quencher, die über eine Aminosäure-Sequenz verbunden sind, welche die Schnittstelle für das jeweilige Enzym beinhaltet. In den intakten Substrat-Molekülen verhindert der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen der Quencher-Gruppe und dem Fluorophor die Freisetzung von Fluoreszenz. Infolge der Hydrolyse des Substrats kommt es jedoch zur räumlichen Trennung der beiden Gruppen und somit zur Anregbarkeit des Fluorophors bei einer bestimmten Wellenlänge. Die dabei freigesetzte Fluoreszenz kann mittels eines geeigneten Detektors in Echtzeit gemessen werden. Eine Übersicht über alle verwendeten Substrate und die jeweiligen Messparameter ist in Tab. 23 gezeigt.

Tab. 23: Fluorometrische Substrate und Messparameter für Enzymaktivitätsmessungen

| Enzym | Art der Messung | Substrat | Substrat- konzentration | Messparameter | Zyklusanzahl/ Messintervall |
|---------------------|--|---------------------------------------|----------------------------|--|--------------------------------|
| NEP | aus Zellen und Gewebe | Mca-RPPGFSAFK (Dnp)-OH | 5 μ M | Anregung: 320nm (\pm 10nm) Emission: 405nm (\pm 10nm) (3.2.3.13.1, Abb. 7) | 850/ 60sek |
| | aus Zellen und Gewebe | | 10 μ M | | 850/ 60sek |
| IDE | aus Serum | Mca-RPPGFSAFK (Dnp)-OH | 10 μ M | Anregung: 320nm (\pm 10nm) Emission: 405nm (\pm 10nm) (3.2.3.13.1, Abb. 7) | 50/ 15sek |
| | rekombinantes Enzym nach <i>in vitro</i> -Inkubation mit Lipiden | | 5 μ M | | 25/ 30sek |
| γ -Sekretase | aus Membran- präparation | NMA- GGVVIATVK(Dnp)- DRDRDR-NH2 | 6,25 μ M | Anregung: 355nm (\pm 10nm) Emission: 440nm (\pm 10nm) | 50/ 180sek |
| | aus lebenden Zellen | | 12,5 μ M | | 140/ 60sek |

| Enzym | Art der Messung | Substrat | Substrat-konzentration | Messparameter | Zyklusanzahl/ Messintervall |
|--------|-----------------|--|------------------------|--|--------------------------------|
| aSMase | aus Zellen | keine Angaben vom Hersteller des aSMase-Aktivitäts- Assay Kits | | Anregung: 360nm (\pm 10nm) Emission: 460nm (\pm 10nm) | Endpunkt- Bestimmung |

3.2.3.13.1 Anregungs- und Emissions-Scan zur Ermittlung der optimalen Messparameter

Zur Ermittlung der optimalen Messparameter wurde vor der erstmaligen Verwendung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH (Johnson und Ahn, 2000) ein Anregungs- und Emissions-Scan durchgeführt.

NEP-Assaypuffer:

| | |
|-----------------------|-------------------|
| 100mM | Tris/HCl pH 7,0 |
| 50mM | NaCl |
| 10 μ M | ZnCl ₂ |
| in ddH ₂ O | |

Hierzu wurde SH-SY5Y WT-Lysat (30 μ g Gesamtprotein) in 100 μ l NEP-Assaypuffer 30min lang mit dem Substrat in einer finalen Konzentration von 10 μ M bei RT unter Lichtausschluss vorinkubiert. In einem Safire2-Fluorometer wurde zunächst die entstandene Fluoreszenz bei schrittweise um 5nm ansteigender Anregungswellenlänge gemessen. Nach Festlegung der Anregungswellenlänge entsprechend des hierbei verzeichneten Fluoreszenzmaximums wurde anschließend mit dieser fixierten Anregungswellenlänge analog das Emissionsmaximum des Substrats ermittelt (Tab. 23).

3.2.3.13.2 Messung der NEP-Aktivität aus Zellen und Gewebe

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Miners et al., 2008b)

Die Methode zur NEP-Aktivitätsmessung aus Zellen und Gewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf Miners et al., 2008b etabliert. Sie beruht auf der Isolation des Enzyms durch Inkubation der Gewebe- bzw. Zellysate in einer mit NEP-Antikörper beschichteten 96-Well-Platte und der anschließenden Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH durch das in der Platte gebundene NEP.

Aufgrund der hohen Unspezifität bei Verwendung des von Miners et al. publizierten Protokolls wurden diverse Modifikationen wie Veränderungen des Waschpuffers, der Blockierlösung und der Inkubationszeiten vorgenommen. Da das verwendete Substrat Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH nicht spezifisch für NEP ist (Johnson und Ahn, 2000), sondern u.a. auch durch ECE1, MMPs, IDE, BACE1 und den γ -Sekretase-Komplex umgesetzt wird, erfolgte außerdem die Zugabe eines Protease Inhibitor Cocktails ohne EDTA, spezifischer β - und γ -Sekretase-Inhibitoren sowie des IDE-Inhibitors Bacitracin zu dem Assaypuffer.

| PBS: | Waschpuffer | Blockierlösung: | NEP-Assaypuffer mit Inhibitoren: |
|---------|--------------------------------|--|--|
| 3.2.2.1 | 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS | 10% (w/v) BSA in PBS (Fett- säure- frei) | 100mM Tris/HCl pH 7,0 50mM NaCl 10µM ZnCl ₂ in ddH ₂ O frische Zugabe von 1µM β-Sekretase-Inhibitor II 25µM γ-Sekretase-Inhibitor IV 10µM Bacitracin 1x Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA (3.2.3.4) |

Zum Beschichten der MaxiSorp-96-Well-Platte wurden zunächst 100µl des NEP-Antikörpers AF1182 (Tab. 11) in einer Konzentration von 1,6µg/ml in PBS zu jedem Well gegeben. Nach kurzem Schütteln bei 150U/min wurde dieser 24Std lang bei 4°C in der mit einer Folie verschlossenen Platte inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte das Blocken unspezifischer Bindestellen durch die Zugabe von 125µl Blockierlösung pro Well. Diese wurde über einen Zeitraum von 3Std bei RT in der Platte inkubiert. Währenddessen wurden die Proben wie in 3.2.3.4 beschrieben 60min lang lysiert und auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 1,25µg/µl in PBS eingestellt (3.2.3.6). Nachdem die Platte erneut sechsmal gewaschen wurde, erfolgte die 90-minütige Inkubation der Proben in der mit Antikörper beschichteten und geblockten Platte (100µl/Well) bei 20°C und 150U/min. Die Platte wurde anschließend erneut sechsmal gewaschen bevor die Zugabe von 100µl NEP-Assaypuffer pro Well und eine Inkubation über 30min bei RT und 150U/min erfolgte. Bei der Betrachtung des direkten Effekts eines Lipids auf die NEP-Enzymaktivität wurde dieses bzw. das entsprechende Lösungsmittel zusätzlich in den NEP-Assaypuffer gegeben. Nach Zugabe des Substrats in einer finalen Konzentration von 5µM wurde die entstandene Fluoreszenz kontinuierlich bei einer Anregungswellenlänge von 320nm und einer Emissionswellenlänge von 405nm in einem Safire2-Fluorometer gemessen (Tab. 23).

3.2.3.13.3 *Messung der IDE-Aktivität aus Zellen und Gewebe*

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Miners et al., 2008a)

Die Methode zur Messung der IDE-Aktivität beruht, in Analogie zu der NEP-Aktivitätsmessung, auf der Isolation von IDE aus dem Probenmaterial durch Inkubation der Proben in einer mit IDE-Antikörper beschichteten 96-Well-Platte und der anschließenden Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH. Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Vorlage von Miners et al., 2008a etabliert, wobei das ursprüngliche Protokoll ebenfalls stark modifiziert wurde. Um die Spezifität der Methode zu erhöhen, wurde ein zusätzlicher Blockierschritt durchgeführt, die Zusammensetzung des Waschpuffers verändert und ein anderer Assaypuffer, der verschiedene Inhibitoren enthält, verwendet.

| PBS: | Waschpuffer | Blockierlösung: | IDE-Assaypuffer A mit Inhibitoren: |
|---------|--------------------------------|--|--|
| 3.2.2.1 | 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS | 10% (w/v) BSA in PBS (Fett- säure- frei) | 50mM Tris/HCl pH 7,4 1M NaCl 10µM MgCl ₂ in ddH ₂ O frische Zugabe von 1µM β-Sekretase-Inhibitor II 25µM γ-Sekretase-Inhibitor IV 1x Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA (3.2.3.4) |

Zur Beschichtung der MaxiSorp-96-Well-Platte wurden 100µl des IDE-Antikörpers ST1120 (Tab. 11) in einer Konzentration von 5µg/ml in PBS zu jedem Well gegeben. Nach kurzem Schütteln bei 150U/min und 24-stündiger Inkubation bei RT wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen bevor 125µl Blockierlösung in jedes Well gegeben wurde. Das Blocken erfolgte für 2Std bei RT und 150U/min. Währenddessen wurden die Proben 60min lang auf Eis lysiert (3.2.3.4) und auf einen einheitlichen Proteingehalt von 0,5µg/µl in Waschpuffer eingestellt (3.2.3.6). Nach dreimaligem Waschen der 96-Well-Platte wurden 100µl von jeder Probe in die einzelnen Wells pipettiert und die Platte für 1Std bei 20°C und 150U/min inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platte erfolgte die Zugabe von 100µl IDE-Assaypuffer A in jedes Well und eine 30-minütige Inkubation bei 150U/min bei RT. Zur Betrachtung des direkten Effekts eines Lipids auf die IDE-Enzymaktivität wurde dieses bzw. das entsprechende Lösungsmittel zusätzlich in den IDE-Assaypuffer gegeben. Nach Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH in einer finalen Konzentration von 10µM wurde die bei der Umsetzung des Substrats entstehende Fluoreszenz kontinuierlich bei einer Anregungswellenlänge von 320nm und einer Emissionswellenlänge von 405nm in einem Safire2-Fluorometer detektiert (Tab. 23).

3.2.3.13.4 Messung der IDE-Aktivität in Serum

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Liu et al., 2012)

IDE ist als sezerniertes Protein nicht nur intrazellulär, sondern auch im Extrazellulärraum lokalisiert. Der Nachweis von IDE ist daher auch in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Serum möglich (Liu et al., 2012; Qiu et al., 1998).

IDE-Assaypuffer B mit Inhibitoren:

100mM Tris/HCl pH 7,5
50mM NaCl
10µM ZnCl₂
in ddH₂O
frische Zugabe von
1µM β-Sekretase-Inhibitor II
25µM γ-Sekretase-Inhibitor IV
1x Protease Inhibitor Cocktail
ohne EDTA (3.2.3.4)

Die Methode zur Messung der IDE-Enzymaktivität aus murinem Serum wurde im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an Liu et al., 2012 erstmals im Labor etabliert. Zur Erhöhung der Spezifität der Methode wurde auch hierbei ein anderer Assaypuffer als im Ursprungsprotokoll verwendet, dem verschiedene Inhibitoren zugegeben wurden. Das Serum wurde zunächst 1:100 in IDE-Assaypuffer B verdünnt und

jeweils 100µl der Proben in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Zur Bestimmung des Anteils der unspezifischen Substratumsetzung wurde zu den vereinigten Serumproben aller Tiere 1mM des IDE-Inhibitors N-Ethylmaleimide (NEM) gegeben. Nach einer Vorinkubation über 30min bei RT und 150U/min erfolgte die Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH in einer finalen Konzentration von 10µM. Die Detektion der freigesetzten Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 320nm und einer Emissionswellenlänge von 405nm in einem Safire2-Fluorometer (Tab. 23).

Bei der späteren Auswertung wurde von den Messwerten die in Anwesenheit von 1mM NEM gemessene unspezifische Umsetzung des Substrats subtrahiert. Die berechnete Steigung der Fluoreszenz über die Zeit wurde auf den Proteingehalt der einzelnen Serumproben (3.2.3.6) normiert.

3.2.3.13.5 *Messung des direkten Effekts von Lipiden auf die Enzymaktivität von rekombinantem IDE*

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Zur Untersuchung des direkten Einflusses verschiedener Phospholipide auf die IDE-Enzymaktivität wurde die Aktivität von rekombinantem humanem IDE nach *in vitro*-Inkubation mit den entsprechenden Lipiden analysiert.

IDE-Assaypuffer B ohne Inhibitoren:

| | |
|-----------------------|-------------------|
| 100mM | Tris/HCl pH7,5 |
| 50mM | NaCl |
| 10µM | ZnCl ₂ |
| in ddH ₂ O | |

Hierzu wurde rekombinantes humanes IDE (50ng/200µl IDE-Assaypuffer B) in kleinen Glasflaschen mit 10µM der Phospholipide versetzt und 15min lang bei 37°C und 300U/min geschüttelt. Jeweils 50µl der Inkubationsansätze wurden als Dreifachbestimmung in Vertiefungen einer schwarzen 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH in einer finalen Konzentration von 5µM wurde die freigesetzte Fluoreszenz kontinuierlich bei einer Anregungswellenlänge von 320nm und einer Emissionswellenlänge von 405nm in einem Safire2-Fluorometer detektiert (Tab. 23).

3.2.3.13.6 *Messung der γ -Sekretase-Aktivität*

(nach Grimm et al., 2015b)

| PBS: | γ -Sekretase-Assaypuffer A: | γ -Sekretase-Assaypuffer B: |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|
| 3.2.2.1 | 20mM Hepes pH 7,4 | 10mM Tris/HCl pH7,4 |
| | 140mM NaCl | 200mM Saccharose |
| | 2,5mM KCl | 1mM EDTA |
| | 1,8mM CaCl ₂ | in ddH ₂ O |
| | 1mM MgCl ₂ | |
| | in ddH ₂ O | |

Zur Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden Zellen wurden die zu analysierenden Zellen zunächst auf 96-Well-Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert, was etwa einer Zellzahl von 4×10^4 pro Well entspricht. Nach vorsichtigem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem γ -Sekretase-Assaypuffer A gewaschen, wobei dieser nach dem zweiten

Waschschritt vollständig abgesaugt wurde. Das γ -Sekretase-Substrat wurde in γ -Sekretase-Assaypuffer A zu einer finalen Konzentration von $12,5\mu\text{M}$ verdünnt. Nach der Zugabe von $50\mu\text{l}$ des verdünnten Substrats pro Well wurde die freigesetzte Fluoreszenz kontinuierlich in einem Infinite M1000-Fluorometer detektiert. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 355nm , einer Emissionswellenlänge von 440nm und einer Z-Position von $18000\mu\text{M}$ (Tab. 23). Die Messwerte wurden durch die Subtraktion der in Anwesenheit des γ -Sekretase-Inhibitors X gemessenen unspezifischen Substratumsetzung korrigiert.

Zur Messung der γ -Sekretase-Aktivität in zellulären Membranen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in γ -Sekretase-Assaypuffer B abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung des Minilys-Geräts und Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von $1,4\text{mm}$ bei $5000\text{U}/\text{min}$ für 30sek homogenisiert (3.2.3.3). Die Homogenate wurden auf einen einheitlichen Proteingehalt von $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (3.2.3.6). Durch Zentrifugation bei $900 \times g$ und 4°C für 10min erfolgte das Sedimentieren der Zellkerne und größerer Fragmente. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zum Pelletieren der Membranen für 75min bei $55000\text{U}/\text{min}$ und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Membranpellet wurde in einem Minilys-Gerät unter Verwendung von ca. 2mg Glaskügelchen mit einem Durchmesser von $0,5\text{mm}$ durch zehneckündiges Schütteln bei $4000\text{U}/\text{min}$ in $800\mu\text{l}$ γ -Sekretase-Assaypuffer B solubilisiert. Jeweils $100\mu\text{l}$ der Membranpräparationen wurden in eine Vertiefung einer schwarzen 96-Well-Platten pipettiert. Nach Zugabe des γ -Sekretase-Substrats in einer finalen Konzentration von $6,25\mu\text{M}$ erfolgte die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 355nm und einer Emissionswellenlänge von 440nm in einem Infinite M1000 Fluorometer (Tab. 23).

Die Methoden zur Messung der γ -Sekretase-Aktivität wurden in Kooperation mit Viola Hauptenthal durchgeführt (s. Kooperationen).

3.2.3.13.7 Messung der aSMase-Aktivität

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Herstellerprotokoll Acid Sphingomyelinase Assay Kit, Echelon Biosciences, Version November 2011)

Die Methode zur Messung der aSMase-Aktivität wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des aSMase-Aktivitäts-Assay Kits K-3200 der Firma Echelon Biosciences erstmals im Labor etabliert.

Substratlösung:

aSMase-Substrat in Substratpuffer 1:40 (v/v)

Die zu analysierenden Zellen wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben pelletiert. Der Aufschluss der Zellen in Wasser erfolgte durch Sonifikation mit einer Ultraschallsonde (3.2.3.3). Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von $1,25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (3.2.3.6). $20\mu\text{l}$ der eingestellten Proben, entsprechend $25\mu\text{g}$ Gesamtprotein, wurden in die Vertiefungen einer weißen 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von $30\mu\text{l}$ Substratpuffer wurden die Proben 5min bei RT und $150\text{U}/\text{min}$ geschüttelt. Anschließend wurden $50\mu\text{l}$ der Substratlösung zu jeder Probe gegeben, die Platte mit einer Folie verschlossen und über einen Zeitraum von 3Std bei 37°C und $150\text{U}/\text{min}$ inkubiert. Nach Zugabe von $50\mu\text{l}$ Stop-Lösung pro Well und einer zehneckündigen Inkubation bei RT wurde eine Endpunktbestimmung der entstandenen Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 360nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm in einem Safire2-Fluorometer vorgenommen (Tab. 23).

3.2.3.14 Fluorometrischer Nachweis der zellulären AICD-Aufnahme

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Zum Nachweis der effizienten Aufnahme von AICD-Peptiden in MEF APPΔCT15-Zellen nach AICD-Inkubation wurden diese wie in 3.2.2.5.1 beschrieben mit FITC-markierten AICD-Peptiden inkubiert. Die aufgenommenen Peptide wurden in den Zelllysaten mittels Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem entsprechenden Lösungsmittel Wasser behandelt wurden.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung von oberflächlich gebundenem FITC-AICD fünfmal mit PBS (3.2.2.1) gewaschen, lysiert (3.2.3.4) und auf einen einheitlichen Proteingehalt eingestellt (3.2.3.6). 50µg Gesamtprotein der eingestellten Proben wurden in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Der Nachweis des markierten Peptids in den Lysaten erfolgte durch Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 495nm und einer Emissionswellenlänge von 521nm in einem Safire2-Fluorometer.

3.2.4 LIPIDANALYTISCHE METHODEN

3.2.4.1 Herstellung zerebraler Lipidextrakte

(nach Bligh und Dyer, 1959; Durchführung wie in Dissertation Dr. Benjamin Hundsdörfer, Universität des Saarlandes, 2014 beschrieben)

Die Extraktion von Lipiden aus Hirngewebe erfolgte in Anlehnung an die von Bligh und Dyer publizierte Standardmethode zur Lipid-Isolation (Bligh und Dyer, 1959), die auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Fetten und anderen zellulären Bestandteilen in bestimmten Lösungsmitteln basiert. Die meisten Lipide sind hydrophob und weisen eine gute Löslichkeit in Chloroform auf. Polare Zellbestandteile wie beispielsweise Proteine und Zucker sind hingegen gut in Methanol löslich. Bei der Verwendung zweier flüssiger Phasen, einer in Form von Chloroform und einer in Form von Methanol, kommt es zur Anreicherung der Moleküle in dem ihrer Polarität entsprechenden Milieu. Die obere Methanolphase enthält dementsprechend Zucker, Proteine, DNS und andere polare Moleküle, die untere Chloroformphase apolare Zellbestandteile wie Lipide. In der Interphase kommt es zur Anreicherung von Molekülen mit polaren und apolaren Eigenschaften wie z.B. denaturierten Proteinen. Durch die wiederholte Isolation der Chloroformphase können die in der Probe enthaltenen Lipide aufgereinigt werden. Nach Abdampfen des Lösungsmittels in Stickstoffatmosphäre kann anschließend eine Anreicherung der isolierten Lipide erzielt werden.

Extraktionslösung:

Chloroform/ Methanol/ HCl (37%) 1:2:0,06

Zunächst wurde mittels BCA-Test die Proteinkonzentration in den Hirnhomogenaten (3.2.3.3) bestimmt und alle Proben auf einen Proteingehalt von 5mg/ml eingestellt (3.2.3.6). Anschließend wurde 1ml jeder Probe in ein Wheaton-Glasröhrchen überführt und nach Zugabe von 3,75ml Extraktionslösung 60min lang bei 2000U/min geschüttelt. Nach Zugabe von 1,25ml Chloroform und weiteren 60min Schütteln erfolgte die Zugabe von jeweils 1,25ml Chloroform und Wasser zu den Proben, die erneut 10min geschüttelt wurden. Durch den folgenden zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 5000U/min kam es zur oben beschriebenen Phasenbildung. Die obere, polare Phase wurde verworfen und die untere apolare Phase vollständig in ein neues Glasröhrchen überführt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels unter Stickstoffstrom wurde die Probe in 1ml Wasser aufgenommen und die gesamte Extraktion wiederholt,

was zum Erreichen einer höheren Reinheit der isolierten Lipide diente. Nach dem zweiten Abdampfschritt wurde das Gewicht der isolierten Lipide bestimmt. Basierend auf der publizierten Lipid-Komposition des humanen Gehirns (Zilkha und Mc, 1963) wurde 735 g/mol als durchschnittliches Molekulargewicht der Lipide angenommen. Die isolierten Lipide wurden in Ethanol aufgenommen und die Extrakte im Anschluss mit Ethanol auf eine Gesamtlipidkonzentration von 5mM eingestellt.

3.2.4.2 Analyse der Bindung von Phosphatidylcholinen an IDE (Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Die Bindung unterschiedlicher PC-Spezies an rekombinantes humanes IDE wurde mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht.

| IDE-Assaypuffer B ohne Inhibitoren: | | Waschpuffer C: | |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| 100mM | Tris/HCl pH 7,5 | 10mM | Tris/HCl pH7,5 |
| 50mM | NaCl | | in ddH ₂ O |
| 10µM | ZnCl ₂ | | |
| | in ddH ₂ O | | |

Zunächst erfolgte die *in vitro*-Inkubation von rekombinantem humanem IDE mit den entsprechenden Phospholipiden. Hierzu wurden in kleinen Glasflaschen 50ng IDE in 200µl IDE-Assaypuffer B mit Mischungen von PC20:0 und PC20:5 (jeweils 10µM) bzw. von PC22:0 und PC22:6 (jeweils 10µM) 15min bei 37°C und 300U/min inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils der gleiche Ansatz ohne rekombinantes IDE verwendet. Die Proben wurden 5min bei 13000 x g und 4°C durch Amicon Ultra-Filtrerröhrchen mit einer Molekulargewicht-Abscheidgrenze von 30kDa zentrifugiert. Dies diente zur Trennung des IDEs, welches ein Molekulargewicht von 110kDa aufweist, von den in den Proben enthaltenen überschüssigen Phospholipiden. Der IDE-enhaltende Überstand wurde fünfmal in Folge mit 200µl Waschpuffer C vermischt und erneut 5min lang bei 13000 x g und 4°C durch die Filtrerröhrchen zentrifugiert, was zum weiteren Waschen des rekombinanten Enzyms diente.

Für die Ko-Immunpräzipitation wurde der beim letzten Waschschrift erhaltene Überstand von 25µl in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 475µl IDE-Assaypuffer B verdünnt und mit 20µl Protein-G-Sepharose sowie 1,5µg des IDE-Antikörper ST1120 (Tab. 11) versetzt. Die Ansätze wurden 3Std lang bei RT in einem Überkopftaumler inkubiert. Nach Zentrifugation für 1min bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Präzipitate dreimal mit 1ml Waschpuffer C gewaschen, wobei die Proben zwischen den einzelnen Waschschriften jeweils 1min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer C unter Verwendung einer Hamilton-Kapillare komplett abgenommen und die Präzipitate 5min in 180µl Ethanol bei 98°C inkubiert. Die quantitative Bestimmung der in den Präzipitaten enthaltenen PC-Spezies erfolgte mittels Massenspektrometrie (3.2.4.3.2).

3.2.4.3 Massenspektrometrie

Alle Methoden zur ESI (engl. electrospray ionization)-basierten massenspektrometrischen Lipidanalyse erfolgten in Kooperation mit Christoph Stahlmann bzw. Nadine Mylonas (s. Kooperationen) unter Verwendung des Massenspektrometers 4000 QTRAP (ABSciex) in Kombination mit einer Turbo Spray-Ionenquelle. Für die Detektion und die Auswertung der Daten wurde die Analyst 1.5 Software von AB Sciex benutzt.

3.2.4.3.1 Messung von Phosphatidylcholinen, Lyso-Phosphatidylcholinen und Carnitinen in Serum und Hirngewebe

(nach Grimm et al., 2011a)

| PITC-Lösung: | Puffer A: | Puffer B: |
|--|--------------------------------------|---|
| Phenylisothiocyanat (PITC), 1:20 in Ethanol/ H ₂ O/ Pyridin (1:1:1; v/v/v) | 4,93mM Ammoniumacetat in Methanol | 4,85mM Ammoniumacetat in Wasser/Methanol (3:100 , v/v) |

Zur Messung des Gehalts verschiedener PC- und Lyso-PC-Spezies sowie Carnitinen im Hirngewebe bzw. im Serum wurden die Hirnhomogenate (3.2.3.3) zunächst in Wasser auf einen einheitlichen Proteingehalt von 5µg/µl eingestellt (3.2.3.6), das Serum wurde in unverdünnter Form verwendet. Kreisförmig ausgestanztes Filterpapier mit einem Durchmesser von 5mm wurde in die Vertiefungen einer 96-Well-Sterilfilterplatte gelegt, welche auf einer 96-Well-Sammelplatte befestigt war. 10µl der Proben wurden in jedes Well aufgetragen und unter Stickstoffzustrom von 1-2bar 60min bei RT getrocknet. Nach Zugabe von 20µl PITC-Lösung und einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben erneut wie oben beschrieben 60min getrocknet. Es folgte die Zugabe von 300µl Puffer A zu allen Proben, welche anschließend für 30min bei RT und 450 U/min geschüttelt wurden. Zum Transfer der Proben durch die Sterilfilterplatte in die 96-Well-Sammelplatte wurde die Platte 2min bei 500 x g zentrifugiert. Die Filtrate wurden mit 600µl Puffer B verdünnt und 2min bei 450U/min durchmischt. Anschließend wurde die Platte mit einer Silikonmatte verschlossen und in den auf 10°C vorgekühlten Autosampler gestellt. Die Injektion der Proben in das Massenspektrometer erfolgte mit dem folgenden Gradienten aus Puffer B: 0-2,4min: 30µl/min; 2,4-2,8min: 200µl/min; 2,8-3min: 30µl/min. Zur Verringerung der Messabweichungen wurden alle Proben als Triplikate gemessen. In Tab. 24 sind die für die Detektion verwendeten MRM (engl. multi reaction monitoring)-Paarungen sowie die Werte des *Declustering* Potentials (engl. declustering potential, DP) und die Kollisionsenergie (engl. collision energy, CE) für die einzelnen Spezies aufgeführt.

Tab. 24: Messeinstellungen zur massenspektrometrischen Lipidanalyse

| Metabolit | Q1 Masse (Da) | Q3 Masse (Da) | DP (Volt) | CE (Volt) |
|--------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| PCaa24:0 | 622,4 | 184 | 98 | 33 |
| PCaa26:0 | 650,5 | 184 | 103 | 35 |
| PCaa28:0 | 678,5 | 184 | 106 | 35 |
| PCaa28:1 | 676,5 | 184 | 106 | 35 |
| PCaa30:0 | 706,5 | 184 | 114 | 37 |
| PCaa38:0 | 818,7 | 184 | 138 | 45 |
| Lyso-PCa12:0 | 440,4 | 184 | 78 | 30 |
| Lyso-PCa14:0 | 468,3 | 184 | 79 | 30 |
| Lyso-PCa16:0 | 496,3 | 184 | 81 | 31 |

| Metabolit | Q1 Masse (Da) | Q3 Masse (Da) | DP (Volt) | CE (Volt) |
|--------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| Lyso-PCa18:0 | 524,3 | 184 | 85 | 31 |
| Carnitin C12 | 344,3 | 85,1 | 73 | 44 |
| Carnitin C14 | 372,3 | 85,1 | 86 | 45 |
| Carnitin C16 | 400,3 | 85,1 | 84 | 51 |
| Carnitin C18 | 428,4 | 85,1 | 96 | 63 |

Zur Detektion der Spezies wurden außerdem folgende Einstellungen gewählt:

curtain gas (CUR): 20psi; collision gas: medium; ion spray voltage: 5500V, temperature (TEM): 200°C; ion source gas 1: 40 psi; ion source gas 2: 50 psi; interface heater (ihe): on; entrance potential (EP): 10V; collision cell exit potential (CXP): 10V.

3.2.4.3.2 *Messung der mit IDE ko-immunpräzipitierten Phosphatidylcholine* (Neu-Etablierung durch Christoph Stahlmann)

Nach der Ko-Immünpräzipitation der unterschiedlichen PC-Spezies mit IDE (3.2.4.2) erfolgte der Nachweis der an IDE gebundenen Lipide mittels Massenspektrometrie. Hierzu wurden die Präzipitate in eine 96-DeepWell-Platte gegeben, die mit einer Silikonmatte verschlossen, für 2min bei 450U/min geschüttelt und in den auf 10°C vorgekühlten Autosampler gestellt wurde. Der Gehalt der einzelnen PC-Spezies in den Proben wurde dreimal durch die Injektion von jeweils 20µl der Proben, welche wie in 3.2.4.3.1 beschrieben erfolgte, und anschließend *Precursor ion scan* gemessen. Hierbei wurden alle Spezies zwischen m/z 820,0 und m/z 915,0 detektiert, die nach Fragmentierung durch Kollision mit Stickstoffmolekülen ein Produkt von m/z 184,1 bilden, was der Kopfgruppe von PC entspricht. Im Massenspektrum wurden anschließend folgende Peaks ausgewertet: PCaa40:0: m/z 846,7; PCaa40:10: m/z 826,7; PCaa44:0: m/z 902,7; PCaa44:12:878,7. Zur Optimierung der Messung wurden die nachfolgenden Einstellungen verwendet:

Curtain gas (CUR): 20psi, collision gas (CAD): medium, ion spray voltage (IS): +5500V, temperature (TEM): 200°C, ion source gas 1 (GS1): 40psi, ion source gas 2 (GS2): 50psi, interface heater (ihe): on, declustering potential (DP): 83V, entrance potential (EP): 10V, collision energy (CE): 48V, collision cell exit potential (CXP): 15V.

3.2.5 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel oder der SPSS Statistics 22-Software.

Die Überprüfung der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test.

Die statistische Signifikanz von Effekten wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student's t-test (bei Mittelwertsvergleich von zwei unabhängigen Stichproben) oder ANOVA (engl. analysis of variance) (bei Mittelwertsvergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben) ermittelt. Vor der Durchführung von ANOVA wurde die Varianzhomogenität mittels Levene-Test überprüft. Im Fall einer Varianzheterogenität wurde der Least significant difference-Bonferroni-Test angewandt, im Fall einer Homogenität der Varianzen der Scheffé-Test.

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus von Korrelationen wurde zunächst der Pearson-Korrelationskoeffizient r und anschließend die t-verteilte Testgröße PG mit der Formel $PG = r \cdot (n-2)^{0,5} / (1-r^2)^{0,5}$ berechnet. Unter Verwendung von Tabellen zur t-Verteilung konnte anschließend der entsprechende p-Wert ermittelt werden.

p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$), bei p-Werten zwischen 0,05 und 0,1 wurde von einer Tendenz ausgegangen.

4 ERGEBNISSE

4.1 ETABLIERUNG VON METHODEN ZUR ANALYSE DER A β -DEGRADATION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beeinflussung der enzymatischen A β -Degradation durch verschiedene Lipide sowie die transkriptionelle Regulation von NEP durch die APP-Prozessierung untersucht werden. Hierzu war zunächst die Etablierung von Methoden zur quantitativen Bestimmung der A β -Gesamtdegradation bzw. der Aktivität einzelner A β -degradierender Enzyme erforderlich.

4.1.1 MESSUNG DER A β 40-GESAMTDEGRADATION IN LEBENDEN N2A-ZELLEN

Zur Messung der A β -Gesamtdegradation wurde das Kulturmedium von N2a WT-Zellen wie in 3.2.3.12 beschrieben mit synthetischen A β 40-Peptiden der humanen Sequenz versetzt (0,5 μ g/ml). Die Quantifizierung des nach einer gewissen Zeit noch vorhandenen humanen A β 40 ermöglicht die Messung der A β -degradierenden Aktivität der in den Zellen bzw. im Zellkulturmedium vorhandenen Proteasen. Hierbei war es wichtig, die supplementierten humanen A β -Peptide von dem endogenen A β der verwendeten Zellen unterscheiden zu können, weshalb für diese Methode die murine Neuroblastom-Zelllinie N2a gewählt wurde. Aus dem gleichen Grund erfolgte die quantitative Bestimmung des verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot (3.2.3.8-3.2.3.10) unter Verwendung des Antikörpers W02, welcher ausschließlich humane A β -Peptide und somit nicht das endogene A β der murinen Zellen detektiert (Tab. 11).

Zur Betrachtung des zeitlichen Verlaufs des A β -Abbaus in lebenden N2a-Zellen wurde das verbleibende humane A β 40 nach einer Inkubationszeit von 0, 2, 4, 6 und 8 Std quantitativ bestimmt.

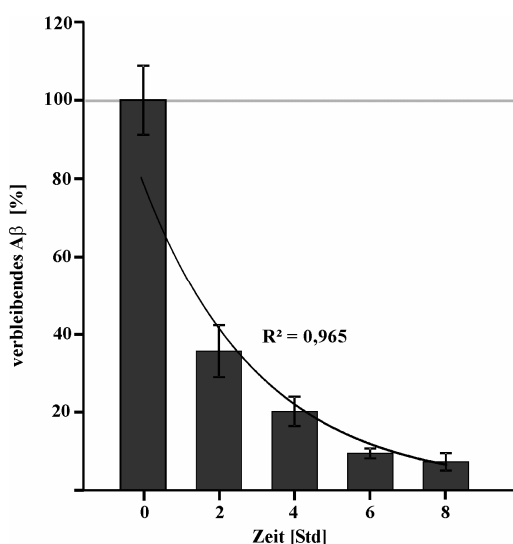


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen

Synthetisches humanes A β 40 (0,5 μ g/ml) wurde in das Kulturmedium von N2a WT-Zellen (DMEM/0,1% FCS) supplementiert und unterschiedlich lang auf den Zellen inkubiert. Dargestellt ist die quantitative Bestimmung des verbleibenden humanen A β 40 nach einer Inkubationszeit von 0, 2, 4, 6 und 8 Std mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

N2a WT = N2a Wildtyp, R^2 = Bestimmtheitsmaß der exponentiellen Regression.

Tab. 25: Statistik des zeitlichen Verlaufs der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen

| Inkubationszeit [Std] | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
|--------------------------------|-------|------|------|-----|-----|
| verbleibendes A β 40 [%] | 100,0 | 35,7 | 20,2 | 9,5 | 7,3 |
| StabwM [%] | 8,8 | 6,7 | 3,7 | 1,3 | 2,2 |
| n-Zahl | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Wie in Abb. 5 und Tab. 25 dargestellt, ergibt sich aus der Quantifizierung des verbleibenden humanen A β 40 eine relativ schnelle, mit steigender Inkubationszeit zunehmende Degradation des Peptids. Die Abnahme des verbleibenden humanen A β 40 zeigt hierbei einen exponentiellen Verlauf ($R^2 = 0,965$). Mit 6Std wurde eine Standard-Inkubationszeit festgelegt, nach der ein Großteil des zugegebenen synthetischen Peptids degradiert (verbleibendes A β 40: $9,5\% \pm 1,3\%$, $p \leq 0,001$), das Signal des verbleibenden A β 40 aber noch ausreichend stark für den Nachweis mittels Western Blot ist. Um die Abhängigkeit des A β -Abbaus von der Menge der vorhandenen A β -degradierenden Proteasen zu überprüfen, wurde humanes A β 40 ($0,5\mu\text{g/ml}$) auf N2a WT-Zellen unterschiedlicher Konfluenz inkubiert. Da es sich hierbei um ein Etablierungsexperiment handelt, wurde dieses nur einmalig als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung der nach 6Std verbleibenden humanen A β 40-Peptide ist in Abb. 6 gezeigt.

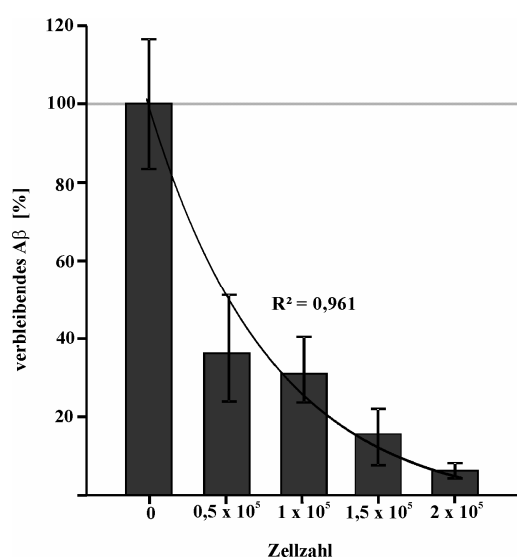


Abb. 6: A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl

Synthetisches humanes A β 40 ($0,5\mu\text{g/ml}$) wurde in das Kulturmedium (DMEM/0,1% FCS) von N2a WT-Zellen unterschiedlicher Konfluenz supplementiert. Dargestellt ist die quantitative Bestimmung des verbleibenden humanen A β 40 nach einer Inkubationszeit von 6Std mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. N2a WT = N2a Wildtyp, R^2 = Bestimmtheitsmaß der exponentiellen Regression.

Tab. 26: Statistik der A β -Degradation in lebenden N2a-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl

| Zellzahl | 0 | $0,5 \times 10^5$ | 1×10^5 | $1,5 \times 10^5$ | 2×10^5 |
|--------------------------------|-------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| verbleibendes A β 40 [%] | 100,0 | 36,1 | 30,8 | 15,5 | 6,2 |
| StabwM [%] | 16,5 | 13,6 | 8,4 | 7,2 | 2,0 |
| n-Zahl | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Die Menge des verbleibenden synthetischen A β 40 nimmt mit zunehmender Zellzahl ebenfalls exponentiell ab ($R^2 = 0,961$) (Abb. 6). Die exponentielle Abnahme des verbleibenden humanen A β 40 mit zunehmender Zellzahl bzw. Inkubationszeit ist möglicherweise durch eine Akkumulation von sezernierten Proteasen wie beispielsweise IDE in dem Zellkulturmedium zu erklären (Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998).

4.1.2 MESSUNG DER AKTIVITÄT EINZELNER A β -DEGRADIERENDER ENZYME

Zur spezifischen Messung der NEP- und IDE-Enzymaktivität wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden etabliert, die auf einer Antigen-Antikörperbindung und der anschließenden Umsetzung des fluorometrischen Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH beruhen. Die in dem Substrat enthaltene Peptidsequenz kann von verschiedenen Enzymen wie z.B. NEP, ECE 1, ECE 2, ACE 1, ACE 2, MMP 2,

MMP 9 und IDE geschnitten werden (Johnson und Ahn, 2000). Durch die enzymatische Spaltung der Peptidsequenz wird der Energie-Transfer zwischen dem Quencher Dnp und dem Fluorophor Mca unterbrochen, wodurch Mca fluorometrisch anregbar wird. Da in der Literatur leicht unterschiedliche Angaben zu den Anregungs- und Emissionsmaxima des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH zu finden sind (Johnson und Ahn, 2000; Miners et al., 2008b; Sigman et al., 2005), wurden nach Vorinkubation des Substrats mit SH-SY5Y WT-Lysat in einem Safire2-Fluorometer zunächst Anregungs- und Emissions-Scans durchgeführt (3.2.3.13.1).

Entsprechend der in Abb. 7 gezeigten Anregungs- und Emissionsmaxima wurden die Messparameter für das Substrat Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH folgendermaßen festgelegt:

Anregungswellenlänge: $320\text{nm} \pm 10\text{nm}$, Emissionswellenlänge: $405\text{nm} \pm 10\text{nm}$.

A

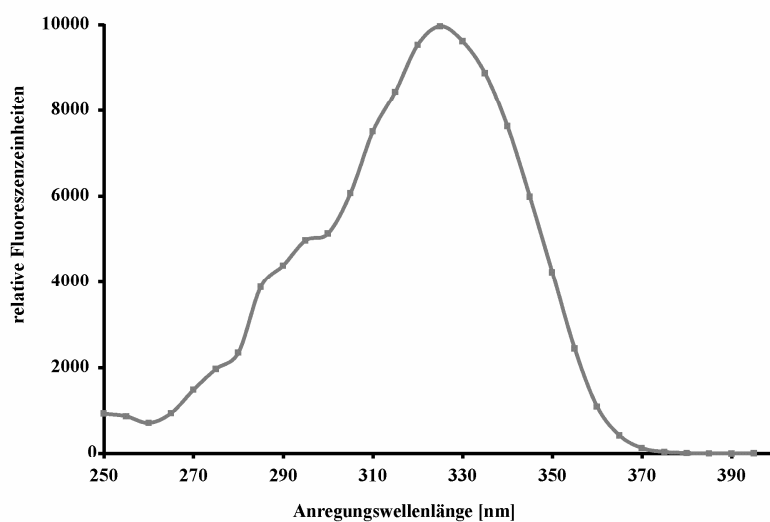
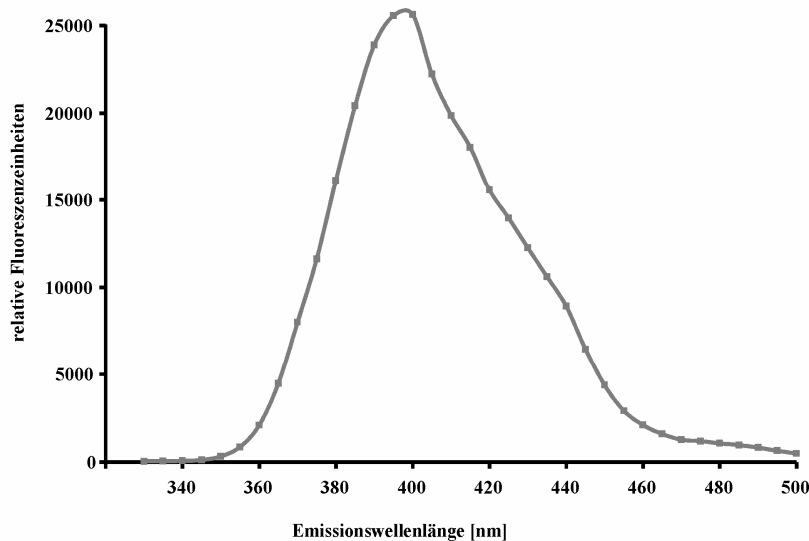


Abb. 7: Anregungs- und Emissionsspektrum des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH

Nach Vorinkubation des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH ($10\mu\text{M}$) mit SH-SY5Y WT-Lysat ($30\mu\text{g}$ Gesamtprotein) wurde durch Veränderung der Anregungs- und Emissionswellenlänge in 5nm-Schritten ein Anregungs- (A) und Emissionsspektrum (B) des Substrats erstellt. Dargestellt ist die entstandene Fluoreszenz in Abhängigkeit der Anregungs- und Emissionswellenlänge. SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

B

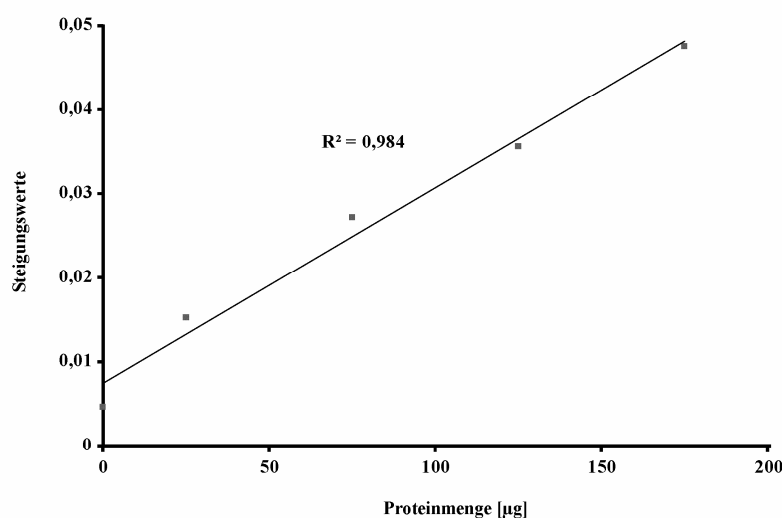


4.1.2.1 Messung der NEP-Enzymaktivität

Zur spezifischen Messung der NEP-Enzymaktivität wurde wie in 3.2.3.13.2 beschrieben vorgegangen. Die Methode beruht auf der Inkubation des zu analysierenden Probenmaterials in einer mit NEP-Antikörper beschichteten 96-Well-Platte und der anschließenden Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH. Um die Linearität des Assays zu überprüfen und die einzusetzende Proteinmenge zu ermitteln, wurden ansteigende Gesamtproteinmengen eines MEF WT-Lysates in der mit NEP-Antikörper beschichteten und mit BSA geblockten 96-Well-Platte inkubiert. Für die anschließende Messung der NEP-Aktivität wurde eine konstante Substratkonzentration von $5\mu\text{M}$ eingesetzt. Hierbei konnte eine linear zunehmende Steigung der Fluoreszenz über die Zeit mit steigender Gesamtproteinmenge im Bereich von $0\text{-}175\mu\text{g}$ verzeichnet werden ($R^2 = 0,984$; Abb. 8A). Die einzusetzende Proteinmenge für diese Methode wurde daher auf $125\mu\text{g}$ festgelegt.

Um die Spezifität des Assays zu überprüfen, wurde die NEP-Aktivität aus MEF WT-Lysat in Anwesenheit des NEP-Inhibitors Thiorphan (IC_{50} (engl. half maximal inhibitory concentration): 8nM (Roques et al., 1980)) gemessen. In Anwesenheit von $10\mu\text{M}$ Thiorphan ist eine Restaktivität von $22,1\%$ ($\pm 2,4\%$, $p \leq 0,001$) festzustellen. Unter den gewählten Konditionen werden daher $77,9\%$ des Substrats spezifisch von NEP geschnitten (Abb. 8B).

A



B

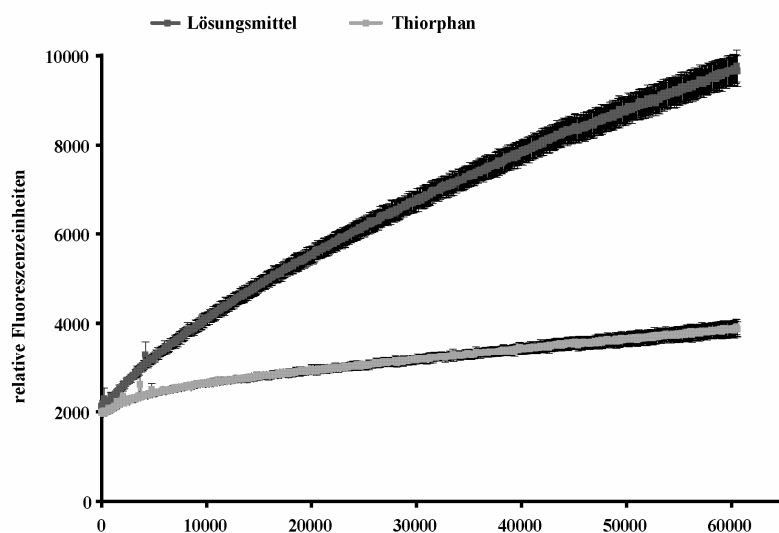


Abb. 8: Linearität und Spezifität der NEP-Aktivitätsmessung

(A) Überprüfung der Linearität der NEP-Aktivitätsmessung durch Einsetzen steigender Gesamtproteinmengen eines MEF WT-Lysates bei konstanter Substratkonzentration von $5\mu\text{M}$. Dargestellt sind die Steigungswerte der Fluoreszenz über die Zeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtproteinmenge. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

(B) Überprüfung der Spezifität der NEP-Aktivitätsmessung durch Messung der NEP-Aktivität in einem MEF WT-Lysat nach Zugabe von $10\mu\text{M}$ des NEP-Inhibitors Thiorphan bzw. des entsprechenden Lösungsmittels Ethanol ($n = 3$).

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten.

4.1.2.2 Messung der IDE-Enzymaktivität

Die Messung der IDE-Aktivität wurde wie in 3.2.3.13.3 beschrieben durchgeführt. In Analogie zur NEP-Aktivitätsmessung wurde hierbei das Probenmaterial zunächst in einer mit IDE-Antikörper beschichteten 96-Well-Platte inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde anschließend die Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH durch das in der Platte immobilisierte Enzym gemessen.

Zur Ermittlung der Linearität der Methode bzw. der einzusetzenden Proteinmenge wurde die Enzymaktivität bei Verwendung ansteigender Gesamtproteinmengen eines N2a WT-Lysates und einer konstanten Substratkonzentration von $10\mu\text{M}$ gemessen. Wie in Abb. 9A gezeigt, nimmt die Steigung der Fluoreszenz über die Zeit mit zunehmender Gesamtproteinmenge im Bereich von $0-75\mu\text{g}$ linear zu ($R^2=0,940$). Für die IDE-Aktivitätsmessung wurde die einzusetzende Gesamtproteinmenge daher auf $50\mu\text{g}$ festgelegt.

A

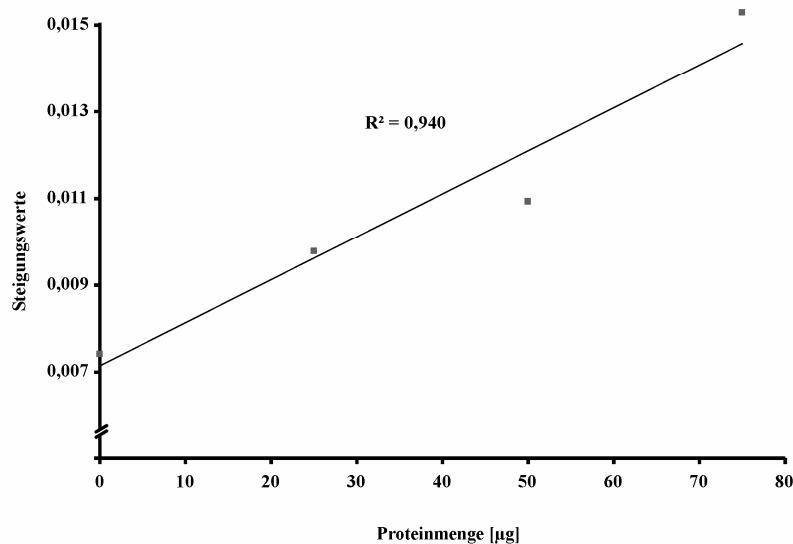
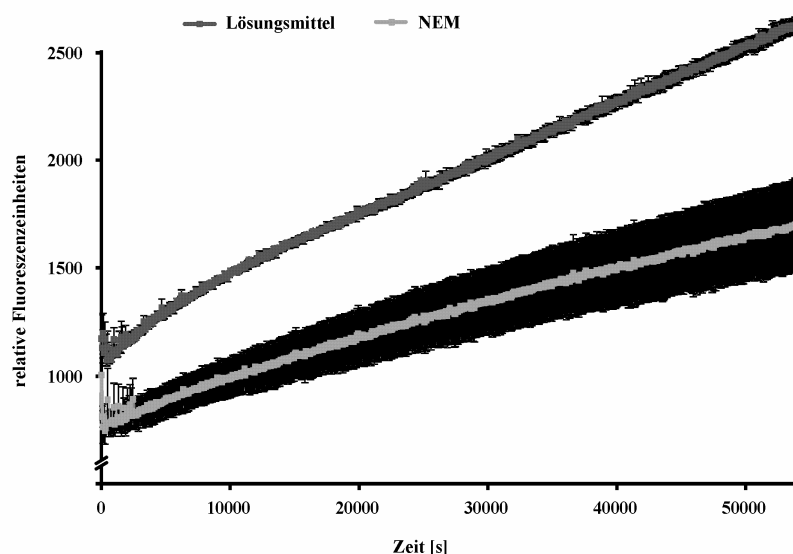


Abb. 9: Linearität und Spezifität der IDE-Aktivitätsmessung

(A) Überprüfung der Linearität der IDE-Aktivitätsmessung durch Einsetzen steigender Gesamtproteinmengen eines N2a WT-Lysates bei konstanter Substratkonzentration von $10\mu\text{M}$. Dargestellt sind die Steigungswerte der Fluoreszenz über die Zeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtproteinmenge. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

(B) Überprüfung der Spezifität der IDE-Aktivitätsmessung durch Messung der IDE-Aktivität in einem N2a WT-Lysat nach Zugabe von 1mM des IDE-Inhibitors NEM oder des entsprechenden Lösungsmittels Ethanol ($n = 4$). Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. N2a WT = N2a Wildtyp.

B



Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurde die IDE-Aktivität in N2a WT-Lysat in Anwesenheit von 1mM des IDE-Inhibitors NEM (IC₅₀: 220µM (Leissring et al., 2010)) bestimmt. Die Kinetik dieser IDE-Aktivitätsmessung ist in Abb. 9B dargestellt. Zu Beginn der Kinetik ist eine hohe Standardabweichung festzustellen, die möglicherweise durch eine unzureichende Durchmischung und Entgasung der Proben nach Messungsbeginn zu erklären ist. Durch die Auswertung der Steigung der entstandenen Fluoreszenz über den gesamten Messverlauf ergibt sich eine signifikante Reduktion der IDE-Enzymaktivität auf 58,9% (\pm 6,9%, $p = 0,006$) in Anwesenheit von 1mM NEM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 9B). Es ist daher davon auszugehen, dass 41,1% des Substrats spezifisch von IDE umgesetzt wird.

4.2 EINFLUSS DER APP-PROZESSIERUNG AUF DAS A β -DEGRADIERENDE ENZYM NEPRILYSIN

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden in *Frontiers in Aging Neuroscience* publiziert:

Grimm, M.O.*, **Mett, J.***, Stahlmann, C.P., Grosgen, S., Hauptenthal, V.J., Blumel, T., Hundsdorfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7, 77.

* *equally contributed*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, geht ein Großteil der A β -degradierenden Enzymaktivität im Gehirn von Ratten und Mäusen von NEP aus (Iwata et al., 2000; Iwata et al., 2001). Eine mögliche Regulation der NEP-Genexpression durch die bei der APP-Prozessierung freigesetzte AICD-Domäne wird in der Literatur seit einigen Jahren kontrovers diskutiert (Chen und Selkoe, 2007; Hebert et al., 2006; Pardossi-Piquard et al., 2005; Pardossi-Piquard et al., 2007). Um den Einfluss der APP-Prozessierung bzw. der dabei freigesetzten Prozessierungsprodukte auf NEP zu untersuchen, wurden die Genexpression, der Proteingehalt sowie die enzymatische Aktivität von NEP in einer Vielzahl von Zellkultur- und Mausmodellen analysiert. Hierbei konnten auch Erkenntnisse über die der AICD-abhängigen transkriptionellen Regulation von NEP zugrunde liegenden Mechanismen gewonnen werden.

4.2.1 EINFLUSS VON PRESENILIN AUF NEP

Die Proteine PS1 bzw. PS2 bilden das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes. Die Untersuchung des Einflusses der γ -Sekretase auf NEP erfolgte unter Verwendung von PS1/2-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF PS1/2 -/-), welche durch den kombinierten Gen-Knockout beider Proteine keine funktionsfähige γ -Sekretase besitzen (Herreman et al., 2000). In diesen Zellen wurden die Genexpression (3.2.1.5), der Proteingehalt (3.2.3.5, 3.2.3.8-3.2.3.10) und die enzymatische Aktivität (3.2.3.13.2) von NEP quantitativ bestimmt. Als Kontrollzellen wurden stabil mit PS1 retransfizierte MEF PS1/2 -/- (MEF PS1res) verwendet, in denen die γ -Sekretase-Aktivität im Vergleich zu MEF WT zu 49,8% (\pm 7,3%, $p = 0,004$) (Abb. 10B) wiederhergestellt ist.

Wie in Abb. 10A dargestellt, weisen die PS1/2-defizienten Zellen im Vergleich zu MEF PS1res eine signifikant auf 71,6% ($\pm 6,4\%$, $p \leq 0,001$) verringerte Genexpression von NEP auf. In MEF PS1/2 $-/-$ ist auch ein signifikant auf 26,2% ($\pm 3,5\%$, $p \leq 0,001$) reduzierter NEP-Proteingehalt sowie eine daraus resultierende Reduktion der NEP-Enzymaktivität auf 66,6% ($\pm 1,9\%$, $p \leq 0,001$) im Vergleich zu MEF PS1res zu verzeichnen (Abb. 10A). Die verschieden ($p \leq 0,001$) stark ausgeprägten Effekte auf die Genexpression und den Proteingehalt von NEP könnten durch die unterschiedliche Aufarbeitung der Zellen zur Bestimmung der Genexpression und des Proteinspiegels sowie auf mögliche Unterschiede in der Translationseffizienz, der Proteinstabilität oder des Proteintransports zurückzuführen sein. Des Weiteren könnte die Unspezifität der NEP-Aktivitätsmessung (Abb. 8B) eine Erklärung für die verschieden ($p \leq 0,001$) stark ausgeprägten Effekte der PS-Defizienz auf den Proteingehalt und die Enzymaktivität von NEP darstellen.

A

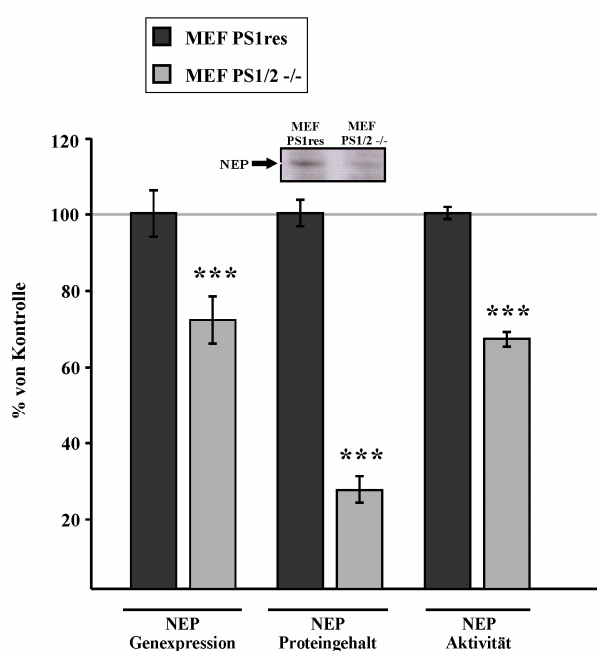


Abb. 10: Einfluss der Presenilin-Genexpression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR ($n = 15$), des NEP-Proteingehalts mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ab951 ($n = 5$) und der NEP-Enzymaktivität ($n = 10$) in MEF PS1/2 $-/-$ und MEF PS1res.

(B) γ -Sekretase-Aktivität in Membranpräparationen von MEF WT und MEF PS1res. Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit.

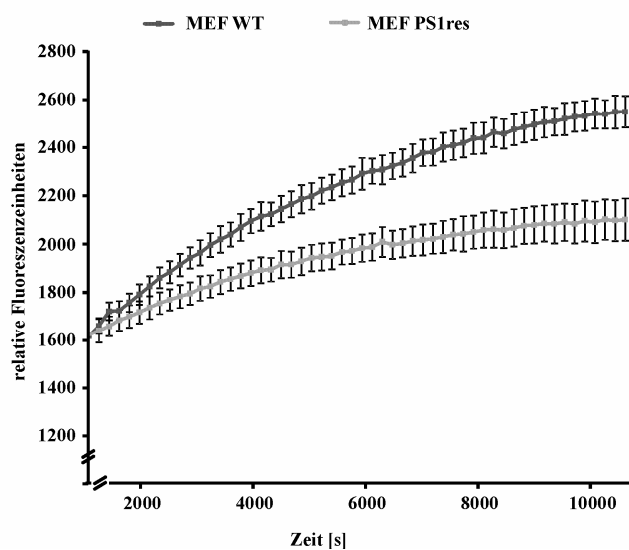
Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

MEF PS1/2 $-/-$ = PS1- und PS2-defiziente embryonale Mausfibroblasten; MEF PS1res = mit Wildtyp-PS1 retransfizierter MEF PS1/2 $-/-$ Zellklon, MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

B



Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der γ -Sekretase-Aktivität auf NEP wurden MEF PS1/2 $-/-$ analysiert, die mit PS1 retransfiziert wurden, welches die FAD-Mutation T354I enthält (MEF PS1-T354I) (Rogaeva et al., 2001). Bei dieser Mutation handelt es sich um eine sogenannte *loss of function*-Mutation, die zu einer verminderten Aktivität der γ -Sekretase führt (Grimm et al., 2014a). Als Kontrollzellen wurden die mit Wildtyp-PS1 retransfizierten MEF PS1res verwendet.

Wie in Abb. 11A gezeigt, führt die T354I-Mutation in PS1 zu einer auf 64,0% (\pm 4,4%, $p = 0,0012$) reduzierten NEP-Genexpression sowie zu einer auf 50,0% (\pm 5,6%, $p \leq 0,001$) verminderten NEP-Enzymaktivität. Aus der Überprüfung der γ -Sekretase-Aktivität ergab sich für MEF PS1-T354I eine im Vergleich zu MEF PS1res auf 75,2% (\pm 2,4%, $p \leq 0,001$) reduzierte Aktivität des Enzymkomplexes (Abb. 11B). Die Reduktion der Genexpression und Enzymaktivität von NEP in den MEF PS1-T354I-Zellen ist daher wahrscheinlich auf eine mutationsbedingte Verringerung der γ -Sekretase-Aktivität zurückzuführen.

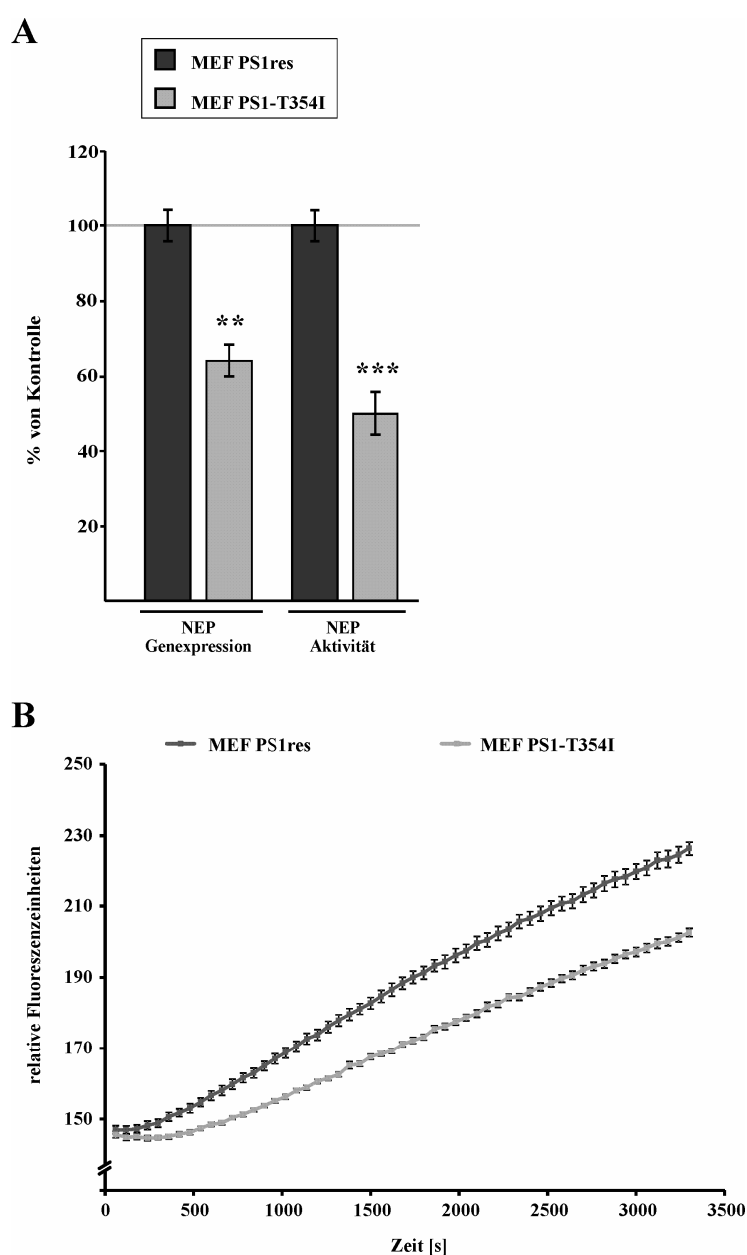


Abb. 11: Einfluss der FAD PS1-Mutation T354I auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR ($n = 3$) und der NEP-Enzymaktivität ($n = 7$) in MEF PS1-T354I im Vergleich zu MEF PS1res.

(B) γ -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF PS1-T354I- und MEF PS1res-Zellen ($n = 10$). Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (\pm 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

MEF PS1res = mit Wildtyp-PS1 retransfizierter MEF PS1/2 $-/-$ Zellklon; MEF PS1-T354I = mit PS1-T354I retransfizierter MEF PS1/2 $-/-$ Zellklon. (Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

4.2.2 EINFLUSS DER APP-PROTEINFAMILIE AUF NEP

Bislang wurden mehr als 90 durch den γ -Sekretase-Komplex prozessierte Substrate identifiziert (Hemming et al., 2008). Um zu überprüfen, ob die in 4.2.1 gezeigten PS-abhängigen Effekte auf NEP auf die Prozessierung von APP und seinen Homologen zurückzuführen sind, wurde die Genexpression (3.2.1.5), der Proteingehalt (3.2.3.5, 3.2.3.8-3.2.3.10) und die Enzymaktivität (3.2.3.13.2) von NEP in APP/APLP2-defizienten MEF bestimmt (MEF APP/APLP2 $-/-$). Da sich die Genexpression von APLP1 auf Neuronen beschränkt (Lorent et al., 1995; Slunt et al., 1994; Thinakaran, 1995), liegt bei dieser Zelllinie eine Defizienz für alle Mitglieder der APP-Proteinfamilie vor.

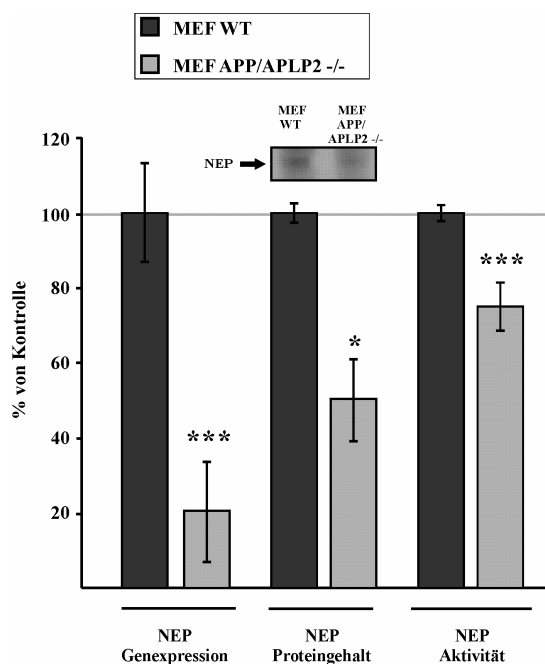


Abb. 12: Einfluss der APP- und APLP2-Genexpression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR ($n = 5$), des NEP-Proteingehalts mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ab951 ($n = 5$) und der NEP-Enzymaktivität ($n = 15$) in MEF APP/APLP2 $-/-$ und MEF WT-Zellen.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten; MEF APP/APLP2 $-/-$ = APP- und APLP2-defiziente embryonale Mausfibroblasten.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Im Vergleich zu MEF WT-Zellen ist die Genexpression von NEP in MEF APP/APLP2 $-/-$ auf 20,4% ($\pm 13,3\%$, $p \leq 0,001$) reduziert. In den APP/APLP2-defizienten Zellen ist des Weiteren eine Reduktion des NEP-Proteingehalts auf 50,4% ($\pm 10,9\%$, $p = 0,012$) sowie der NEP-Enzymaktivität auf 74,9% ($\pm 6,4\%$, $p \leq 0,001$) nachzuweisen (Abb. 12). Ähnlich wie bei dem Vergleich von MEF PS1/2 $-/-$ zu MEF PS1res (Abb. 10A) unterscheiden sich die Effektstärken bei Betrachtung der Genexpression, des Proteingehalts und der Enzymaktivität von NEP voneinander, wobei der Unterschied der Effektstärke zwischen der Genexpression und der Enzymaktivität signifikant ist ($p \leq 0,001$). Dies kann verschiedene Gründe haben, wie bereits in 4.2.1 beschrieben.

Auffallend ist außerdem, dass die Effekte der APP/APLP2-Defizienz auf die Genexpression von NEP signifikant ($p \leq 0,001$) stärker ausgeprägt sind als die in Abb. 10 dargestellten Effekte der PS1/2-Defizienz. Diese unterschiedlichen Effektstärken können durch die Verwendung von verschiedenen Kontrollzelllinien für die APP/APLP2- und PS1/2-defizienten Zellen erklärt werden. Während MEF APP/APLP2 $-/-$ mit MEF WT verglichen wurde, dienten MEF PS1res-Zellen, in denen die Aktivität der γ -Sekretase im Vergleich zu MEF WT nur zu 49,8% wiederhergestellt ist (Abb. 10B), als Kontrollzelllinie für MEF PS1/2 $-/-$ (5.1.2).

Im Fall einer transkriptionellen Regulation von NEP durch die γ -Sekretase-abhängige APP-Prozessierung wäre davon auszugehen, dass sich eine Verringerung der γ -Sekretase-Aktivität in MEF WT-Zellen auf die NEP-Genexpression auswirkt, in APP/APLP2-defizienten MEF-Zellen aber hingegen keinen Effekt hat. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der pharmakologischen γ -Sekretase-Inhibition auf die NEP-Genexpression in MEF WT und MEF APP/APLP2^{-/-} betrachtet. Hierzu wurden die entsprechenden Zelllinien vor der RNS-Isolation (3.2.1.3) und anschließenden RT-PCR (3.2.1.5) über einen Zeitraum von 24Std mit γ -Sekretase-Inhibitor X (2 μ M, IC₅₀: 48nM für A β 40-Produktion, 67nM für A β 42-Produktion (Shearman et al., 2000)) bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt (3.2.2.5.2).

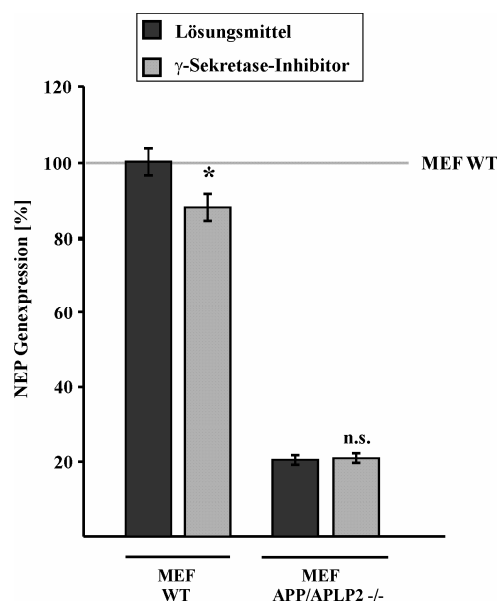


Abb. 13: Einfluss der γ -Sekretase-Inhibition auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR in MEF APP/APLP2^{-/-} (n = 4) und MEF WT-Zellen (n = 4) nach Inhibition der γ -Sekretase. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100% wurde der FCS-Gehalt des Kulturmediums auf 1% reduziert und die Zellen über einen Zeitraum von 24Std mit 2 μ M γ -Sekretase-Inhibitor X bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt bevor die Isolation der RNS erfolgte. Dargestellt ist jeweils die NEP-Genexpression im Vergleich zu MEF WT. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * p \leq 0,05).

MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten; MEF APP/APLP2^{-/-} = APP- und APLP2-defiziente embryonale Mausfibroblasten. (Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Während die Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität in MEF WT-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der NEP Expression auf 87,8% (\pm 3,6%, p = 0,015) führt, ist in den mit γ -Sekretase-Inhibitor behandelten MEF APP/APLP2^{-/-} keine signifikante Veränderung der NEP-Genexpression festzustellen (p = 0,73). In Relation zu MEF WT beträgt sie in den mit DMSO behandelten MEF APP/APLP2^{-/-} 20,4%, in den mit γ -Sekretase-Inhibitor behandelten MEF APP/APLP2^{-/-} 20,8% (\pm 1,3%) (Abb. 13). Diese Ergebnisse deuten auf eine transkriptionelle Regulation von NEP durch ein γ -Sekretase-abhängiges APP-Prozessierungsprodukt hin.

4.2.3 EINFLUSS VON A β AUF NEP

Um den möglichen Einfluss von A β auf die Genexpression von NEP zu untersuchen, wurden PS1/2- und APP/APLP2-defiziente MEF, die kein endogenes A β produzieren können, mit synthetischen A β 40/42-Peptiden über einen Zeitraum von 9 Tagen inkubiert. Hierbei wurde das A β 40/42-enhaltende Zellkulturmedium im 12Std-Rhythmus gewechselt (3.2.2.5.1). Das Ergebnis der anschließenden Analyse der NEP-Genexpression mittels RT-PCR (3.2.1.5) ist in Abb. 14 gezeigt.

Trotz der effizienten zellulären Aufnahme der supplementierten A β -Peptide unter den gewählten Konditionen (Abb. 14B) liegt kein signifikanter Unterschied in der NEP-Genexpression zwischen den mit A β 40/42 und den mit Lösungsmittel behandelten Zellen vor. In Relation zu der Kontroll-Zelllinie MEF PS1res beträgt die NEP-Genexpression in den mit Lösungsmittel behandelten MEF PS1/2^{-/-} 71,6%, in

den mit A β 40/42 inkubierten Zellen 80,2% (\pm 9,9%, $p = 0,43$). In MEF APP/APLP2 $-/-$ konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt der supplementierten A β 40/42-Peptide auf die NEP-Genexpression festgestellt werden. Im Vergleich zu MEF WT beträgt diese in den mit Lösungsmittel inkubierten Zellen 20,4%, in den mit A β 40/42 inkubierten Zellen 18,8% (\pm 2,5%, $p = 0,94$) (Abb. 14A). Diese Ergebnisse zeigen, dass A β keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der Genexpression von NEP zukommt.

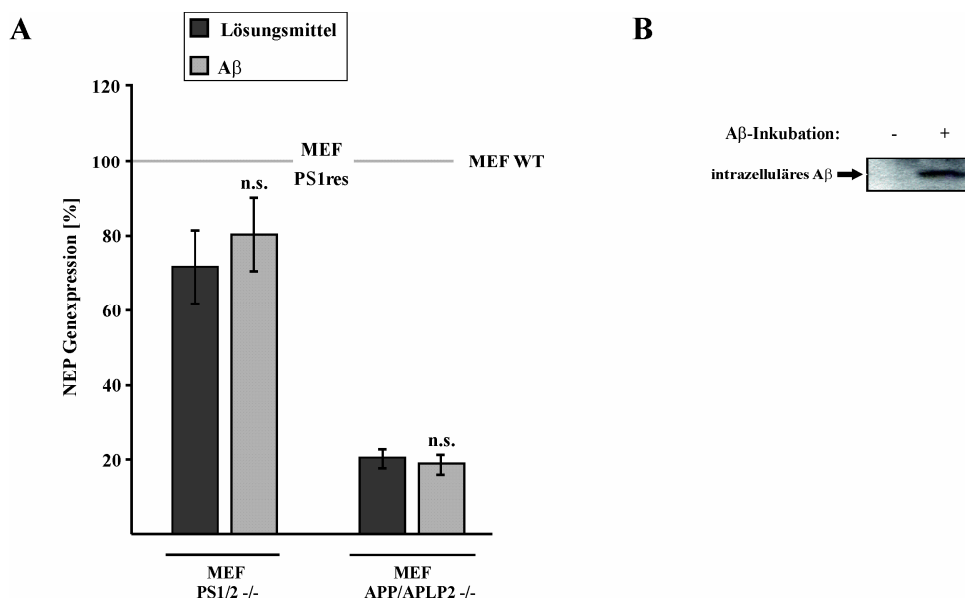


Abb. 14: Einfluss der A β -Supplementierung auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR in MEF PS1/2 $-/-$ ($n = 3$) und MEF APP/APLP2 $-/-$ ($n = 3$) nach Inkubation mit synthetischen A β -Peptiden bzw. Wasser. Dargestellt ist die NEP-Genexpression im Vergleich zu der jeweiligen Kontroll-Zelllinie (MEF PS1res für MEF PS1/2 $-/-$, MEF WT für MEF APP/APLP2 $-/-$).

(B) Überprüfung der Aufnahme der supplementierten A β -Peptide durch MEF APP/APLP2 $-/-$. Nach Inkubation der Zellen mit synthetischen A β -Peptiden bzw. Wasser wurde das aufgenommene humane A β in den Zelllysaten mittels Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 nachgewiesen.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen mit 40ng/ml A β 40 und 4ng/ml A β 42 oder dem Lösungsmittel Wasser behandelt.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

MEF PS1/2 $-/-$ = PS1- und PS2-defiziente embryonale Mausfibroblasten; MEF PS1res = mit Wildtyp-PS1 retransfizierter MEF PS1/2 $-/-$ Zellklon; MEF APP/APLP2 $-/-$ = APP- und APLP2-defiziente embryonale Mausfibroblasten; MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2015a, Abb. B modifiziert nach Robinson et al., 2014)

4.2.4 EINFLUSS VON AICD AUF NEP

Im Folgenden wurde der Einfluss eines weiteren γ -Sekretase-abhängigen APP-Prozessierungsprodukts, AICD, auf die Genregulation von NEP untersucht. Hierzu wurde die Genexpression, der Proteingehalt und die Aktivität von NEP in einer MEF-Zelllinie analysiert, welche eine Defizienz für die letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus aufweist (MEF APP Δ CT15). Diese Zelllinie stammt von einer Maus, bei der der endogene APP-Genlocus durch ein modifiziertes APP-Allel ersetzt wurde, welches für die C-terminal um 15 Aminosäuren verkürzte APP-Deletionsvariante kodiert. Das modifizierte APP-Allel steht hierbei unter Kontrolle des endogenen chromosomalen APP-Promotors (Ring et al., 2007).

Des Weiteren wurde in Analogie zur der A β -Supplementierung zu PS1/2- bzw. APP/APLP2-defizienten Zellen die Auswirkung der AICD-Supplementierung auf NEP in MEF APP Δ CT15 untersucht.

4.2.4.1 Einfluss des APP C-Terminus auf NEP

Zur Bestimmung des Einflusses des APP C-Terminus auf NEP wurden MEF APP Δ CT15, die nur ein C-terminal verkürztes APP-Konstrukt exprimieren (Ring et al., 2007), hinsichtlich der Genexpression (3.2.1.5), des Proteingehalts (3.2.3.5, 3.2.3.8-3.2.3.10) und der Enzymaktivität (3.2.3.13.2) von NEP sowie der Gesamt-A β 40-Degradation (3.2.3.12) untersucht. Da der in MEF APP Δ CT15 deletierte APP-Bereich die Konsensussequenz YENPTY beinhaltet, welche für die Interaktion mit Adapterproteinen wie u.a. Fe65 bedeutend ist (Abb. 2A) (Borg et al., 1996), verfügt diese Zelllinie über keine funktionelle AICD-Domäne.

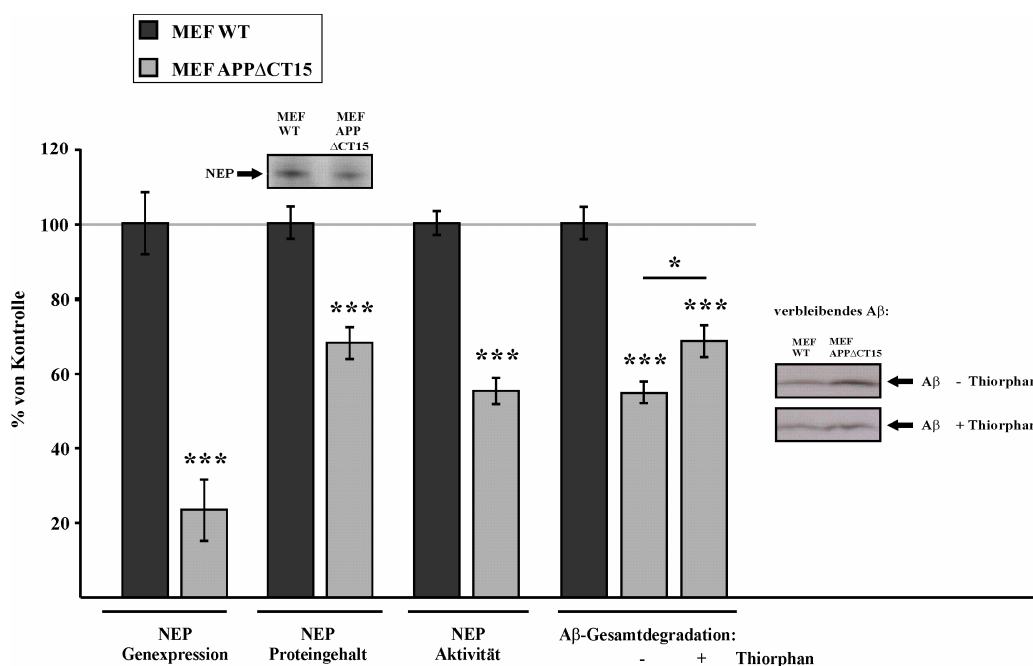


Abb. 15: Einfluss des APP C-Terminus auf NEP und die A β -Gesamtdegradation in embryonalen Mausfibroblasten
Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR (n = 8), des NEP-Proteingehalts mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ab951 (n = 7), der NEP-Enzymaktivität (n = 10) und der A β 40-Gesamtdegradation (n = 5) in MEF APP Δ CT15 und MEF WT. Zur Messung der Gesamt-A β -Degradation wurden die Lysate der Zellen mit synthetischem humanen A β 40 supplementiert und das nach 1Std verbleibende humane A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 quantitativ bestimmt. Die A β -Degradation wurde durch Kehrwertbildung des verbleibenden humanen A β 40 berechnet. Zur Einschätzung des Anteils von NEP an der Gesamt-A β -Degradation wurde zusätzlich die Gesamt-A β 40-Degradation in MEF APP Δ CT15-Lysaten in Anwesenheit des NEP-Inhibitors Thiorphan (50 μ M) bestimmt.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (\pm 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p \leq 0,05; *** p \leq 0,001).

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

In MEF APP Δ CT15 konnte im Vergleich zu MEF WT eine signifikante Reduktion der NEP-Genexpression auf 23,4% (\pm 8,1%, p \leq 0,001) nachgewiesen werden, wobei die Effektstärke vergleichbar (p = 1,000) mit der in Abb. 12 dargestellten Reduktion der NEP-Genexpression auf 20,4% in APP/APLP2-defizienten Zellen ist. In den MEF APP Δ CT15-Zellen liegt auch eine signifikante Reduktion des NEP-Proteingehalts (68,0% \pm 4,1%, p \leq 0,001) sowie der NEP-Enzymaktivität (55,3% \pm 3,4%, p \leq 0,001) vor. Letzteres wirkt sich auf die Gesamt-A β -degradierende Aktivität in den Zellen aus. Die in den Lysaten von MEF APP Δ CT15-Zellen vorhandene A β -degradierende Enzymaktivität ist im Vergleich zu MEF WT-Zellen signifikant auf 54,7% (\pm 2,7%, p \leq 0,001) reduziert. In Anwesenheit des NEP-Inhibitors Thiorphan ist dieser Effekt signifikant (p = 0,02) schwächer ausgeprägt (68,5 \pm 4,1%, p \leq 0,001) (Abb.

15), was eine Beteiligung der verringerten NEP-Aktivität an der Reduktion des A β -Abbaus in APP Δ CT15-Zellen bestätigt.

4.2.4.2 Einfluss der AICD-Supplementierung auf NEP

Es ist bekannt, dass die Deletion des C-terminalen Bereichs von APP auch Auswirkungen auf den intrazellulären Transport von APP und die Produktion von A β hat (Kouchi et al., 1998). Die verringerte A β -Produktion in den MEF APP Δ CT15-Zellen ist wahrscheinlich auch darauf zurückzuführen, dass die Genexpression von BACE1 durch AICD gesteigert wird (von Rotz et al., 2004). Um dies sowie eine klonale Heterogenität als Ursache für die Effekte der Deletion des APP C Terminus auf NEP (Abb. 15) auszuschließen, wurden MEF APP Δ CT15 mit synthetischen AICD-Peptiden supplementiert. Im Fall einer AICD-vermittelten transkriptionellen Regulation von NEP sollte die AICD-Supplementierung zu einer Annäherung der in diesen Zellen vorhandenen NEP-Genexpression an das Expressionsniveau in WT-Zellen führen. Da die verwendeten verkürzten AICD-Peptide den letzten 20 C-terminalen Aminosäuren von APP entsprechen, beinhalten sie das für die Interaktion mit Adapterproteinen bzw. die Translokation in den Nukleus bedeutende YENPTY-Motiv (Borg et al., 1996) (Abb. 2A). Die Inkubation der Zellen mit den synthetischen AICD-Peptiden erfolgte zum einen lipofektionsbasiert über einen kurzen Zeitraum von 12Std und zum anderen über einen längeren Zeitraum von 9 Tagen (3.2.2.5.1). Bei der Langzeit-AICD-Inkubation wurde das Inkubationsmedium aufgrund der in der Literatur beschriebenen schnellen AICD-Degradation (Cupers et al., 2001) im 12Std-Rhythmus gewechselt.

Zunächst wurde die Aufnahme des synthetischen AICDs in MEF APP Δ CT15 unter Verwendung eines FITC-markierten analogen Peptides überprüft. Das genaue Vorgehen zur Analyse der FITC-AICD-Aufnahme ist in 3.2.3.14 beschrieben. Im Fall einer effizienten Aufnahme des Peptides sollte eine fluorometrische Detektion des FITC-Signals in den Lysaten der inkubierten Zellen möglich sein. Wie in Abb. 16A gezeigt, ist eine effiziente Aufnahme des exogenen FITC-markierten AICDs für beide Inkubationsvarianten festzustellen. Im Fall der lipofektionsbasierten Kurzzeit-Inkubation ist in den Lysaten der mit FITC-AICD behandelten Zellen eine 2,8-fache (\pm 0,1-fache, $p \leq 0,001$) Erhöhung des FITC-Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen nachweisbar. Nach Langzeit-Inkubation mit FITC-AICD ist das gemessene Fluoreszenzsignal 18-fach (\pm 5,1-fach, $p = 0,03$) gesteigert (Abb. 16A). Die Langzeitinkubation der Zellen mit FITC-AICD hat demnach eine signifikant ($p = 0,012$) stärkere Aufnahme der Peptide als die FITC-AICD-Kurzzeitinkubation zur Folge.

Aufgrund einer möglichen Zytotoxizität verkürzter AICD-Peptide (Lu et al., 2000; Passer et al., 2000) wurden die Viabilität und der Gesamtproteingehalt der MEF APP Δ CT15-Zellen nach Inkubation mit AICD-Peptiden bestimmt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch Messung der LDH-Aktivität in dem Kulturmedium der behandelten Zellen. Das zytosolische Enzym LDH wird im Fall von gestörter Membranintegrität in Folge von Nekrose von den Zellen freigesetzt. Die Zytotoxizität wurde relativ zur Positivkontrolle, dem Zellkulturmedium von abgetöteten Zellen, ermittelt. 0% Zytotoxizität wurde gleichgesetzt mit 100% Zellviabilität. Die genaue Vorgehensweise ist in 3.2.2.6 beschrieben. Der Gesamt-Proteingehalt der Zellen wurde mittels BCA-Test (3.2.3.6) ermittelt.

Da die Supplementierung der MEF APP Δ CT15-Zellen mit AICD im Vergleich zu dem Lösungsmittel weder eine Veränderung der Viabilität ($99,98\% \pm 0,11\%$, $p = 0,86$) noch des Gesamt-Proteingehalts ($101,5\% \pm 0,87\%$, $p = 0,33$) (Abb. 16B) der Zellen bewirkt, kann eine zytotoxische Wirkung der AICD-Peptide ausgeschlossen werden.

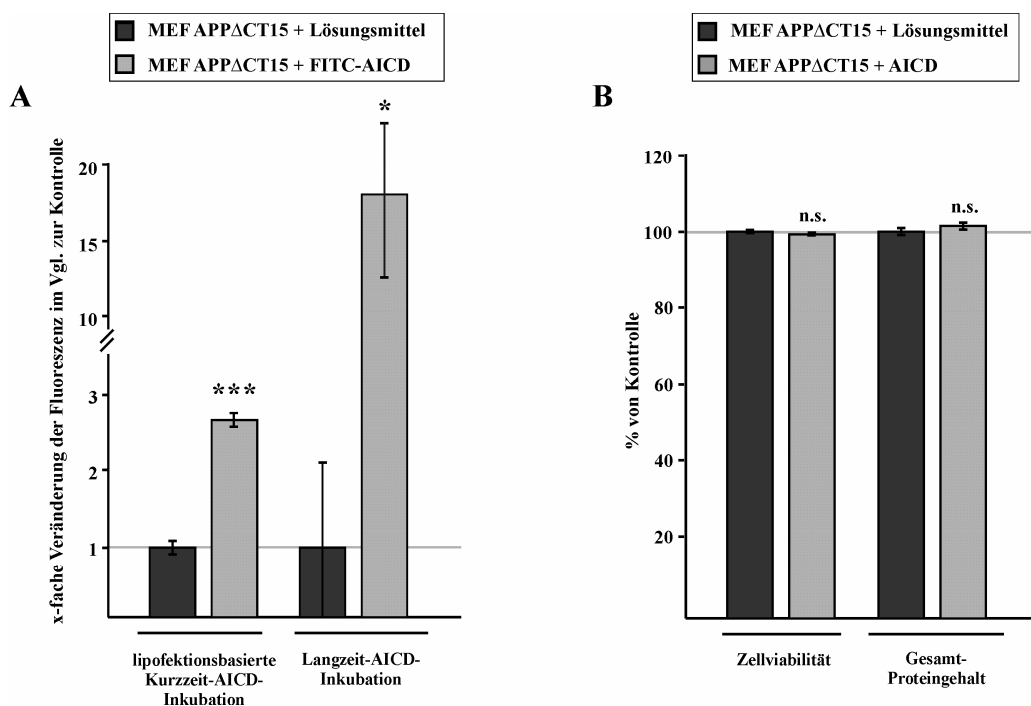


Abb. 16: Aufnahme supplementierter AICD-Peptide in embryonale Mausfibroblasten und Einfluss auf die Zellviabilität

(A) Die Inkubation von MEF APPΔCT15 mit FITC-markierten AICD-Peptiden erfolgte lipofektionsbasiert über einen Zeitraum von 12Std (2,5μM FITC-AICD) oder über 9Tage (2μM FITC-AICD), als Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser (Lösungsmittel) behandelt. Nach Ende der Inkubation wurde die Aufnahme der FITC-AICD-Peptide durch Messung des FITC-Fluoreszenzsignals in den Lysaten der inkubierten Zellen überprüft (lipofektionsbasierte Kurzzeit-AICD-Inkubation: n = 3; Langzeit-AICD-Inkubation: n = 3).

(B) Viabilität und Gesamt-Proteingehalt der MEF APPΔCT15-Zellen nach lipofektionsbasierter, 12-stündiger Inkubation mit 2,5μM AICD oder Wasser (Lösungsmittel). Die Viabilität der Zellen wurde nach Ermittlung der Zytotoxizität mittels LDH-Test berechnet (n = 5), der Gesamt-Proteingehalt der Zellen wurde durch BCA-Test aus den Zelllysaten ermittelt (n = 5).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001).

MEF APPΔCT15 = embryonale Mausfibroblasten mit Deletion des APP C-Terminus.

(Abb. A und B modifiziert nach nach Grimm et al., 2015a)

Anschließend wurde der Effekt der lipofektionsbasierten Kurzzeit- und der Langzeit-AICD-Supplementierung auf NEP in den MEF APPΔCT15-Zellen untersucht. Hierzu wurden die mit AICD-Peptiden behandelten Zellen mit den mit Lösungsmittel behandelten Zellen verglichen und das jeweilige NEP-Genexpressions- bzw. -Enzymaktivitätsniveau in Relation zu dem in MEF WT-Zellen gesetzt.

Die Supplementierung von MEF APPΔCT15 mit AICD-Peptiden hat für beide Inkubationsvarianten eine Erhöhung der Genexpression und Enzymaktivität von NEP zur Folge. Die lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation resultiert in einer statistisch nicht signifikanten Erhöhung der NEP-Expression auf 143,6% (± 29,8%, p = 0,193), was einer partiellen Annäherung um 13,3% an das NEP-Genexpressionsniveau in MEF WT entspricht. Im Fall der Langzeit-AICD-Inkubation ist eine signifikante Zunahme der NEP-Genexpression auf 168,0% (± 18,7%, p = 0,002) im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen und somit eine Annäherung der NEP-Expression von 20,8% an den entsprechenden Wildtyp zu verzeichnen (Abb. 17A). Die gesteigerte NEP-Genexpression nach AICD-Supplementierung resultiert für beide AICD-Inkubationsvarianten auch in einer signifikant erhöhten NEP-Enzymaktivität (lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation: 115,8% ± 5,5%, p = 0,014, entsprechend 19,8% Annäherung an das WT-Niveau; Langzeitinkubation: 120,4% ± 4,9%, p = 0,008, entsprechend 25,5% Annäherung an das WT-Niveau) (Abb. 17B).

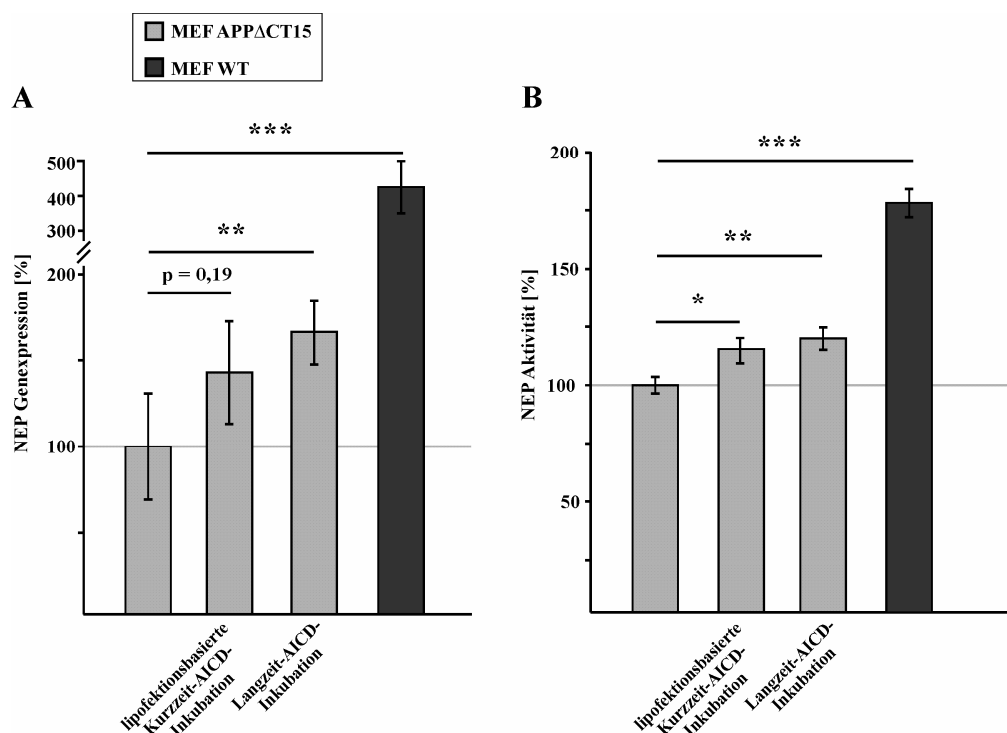


Abb. 17: Einfluss der AICD-Supplementierung auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR (A) und der NEP-Aktivität (B) in MEF APP Δ CT15 nach Inkubation mit AICD bzw. dem Lösungsmittel Wasser. Die Inkubation der Zellen mit AICD-Peptiden erfolgte lipofektionsbasiert über einen Zeitraum von 12Std (2,5 μ M AICD) (NEP-Genexpression: n = 4; NEP-Aktivität: n = 17) oder über 9Tage (2 μ M AICD) (NEP-Genexpression: n = 10; NEP-Aktivität: n = 10). Zusätzlich ist das Genexpressions- und Enzymsaktivitätsniveau von NEP in MEF WT eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001).

MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten; MEF APP Δ CT15 = embryonale Mausfibroblasten mit Deletion des APP C-Terminus.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

4.2.4.3 Einfluss der AICD50-Expression auf NEP

Die Steigerung der NEP-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen durch Supplementierung von AICD wurde nochmals durch einen genetischen Versuchsansatz verifiziert. Hierzu wurde die NEP-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen bestimmt (3.2.1.5), welche zuvor transient mit einem für die letzten 50 Aminosäuren des APP C-Terminus (AICD50, C50) kodierenden Plasmid transfiziert wurden (3.2.2.3). AICD50 entspricht dem infolge des ϵ -Schnitts generierten AICDs (Abb. 2A) (Gu et al., 2001; Yu et al., 2001).

Durch die transiente Transfektion von MEF APP Δ CT15 mit einem für C50 kodierenden Plasmid konnte eine Erhöhung der NEP-Genexpression auf 201,9% (\pm 21,4%, p = 0,009) und somit eine partielle Annäherung von 31,2% an das Genexpressionsniveau von NEP in MEF WT-Zellen erzielt werden (Abb. 18).

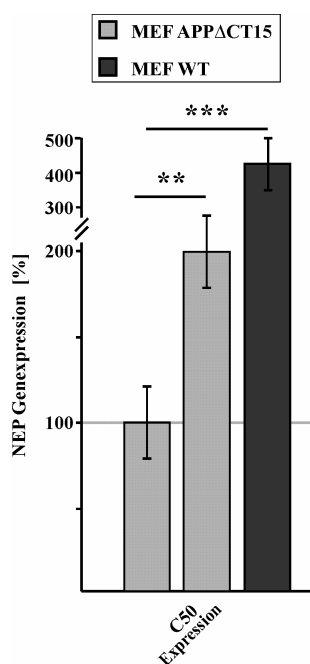


Abb. 18: Einfluss der C50-Expression auf NEP in embryonalen Mausfibroblasten

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen nach transientser Transfektion mit einem für die letzten 50 Aminosäuren des APP C-Terminus (C50) kodierenden Plasmid im Vergleich zu dem entsprechenden Kontrollplasmid (n = 3). Die Isolation der RNS erfolgte 48Std nach der transienten Transfektion. Zusätzlich ist das Genexpressionsniveau von NEP in MEF WT eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

MEF WT = Wildtyp embryonale Mausfibroblasten; MEF APP Δ CT15 = embryonale Mausfibroblasten mit Deletion des APP C-Terminus.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

4.2.5 MECHANISMEN DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION VON NEP DURCH AICD

Die in 4.2.4 dargestellten Daten belegen eindeutig eine AICD-abhängige Regulation der NEP-Genexpression. Laut Literatur sind allerdings nicht alle AICD-Spezies in der Lage, die Expression anderer Gene zu regulieren. Vor allem die amyloidogene, β - und γ -Sekretase-abhängige APP-Prozessierung in intrazellulären azidischen Kompartimenten scheint, wie von Belyaev et al. postuliert (Belyaev et al., 2010), für die Entstehung transkriptionell aktiver AICD-Peptide verantwortlich zu sein (Abb. 76).

4.2.5.1 Einfluss der APP^{swe}-Mutation auf NEP

Um den Einfluss einer gesteigerten amyloidogenen APP-Prozessierung auf NEP zu überprüfen, wurde die Genexpression (3.2.1.5) und Aktivität (3.2.3.13.2) von NEP in SH-SY5Y APP^{swe}-Zellen analysiert. Die in dieser Zelllinie vorhandene FAD *swedish*-Doppelmutation in APP (Abb. 2A) bewirkt eine verstärkte amyloidogene APP-Prozessierung (Citron et al., 1992; Felsenstein et al., 1994). Falls das transkriptionell aktive AICD primär bei diesem APP-Prozessierungsweg entsteht, wäre in den SH-SY5Y APP^{swe}-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-APP überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen ein stimulierender Effekt auf NEP zu erwarten.

In den SH-SY5Y APP^{swe}-Zellen ist im Vergleich zu SH-SY5Y APP WT-Zellen eine signifikant auf 127,5% ($\pm 3,3\%$, $p \leq 0,001$) gesteigerte NEP-Enzymaktivität sowie eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der NEP-Genexpression auf 139,6% ($\pm 52,3$, $p = 0,49$) nachweisbar (Abb. 19). Die hohe Standardabweichung bei Bestimmung der NEP-Genexpression ist auf die geringe Stichprobenanzahl zurückzuführen. Aufgrund des signifikanten Unterschieds der NEP-Enzymaktivität zwischen SH-SY5Y APP^{swe} und SH-SY5Y APP WT wurde auf eine Wiederholung der Genexpressionsbestimmung verzichtet.

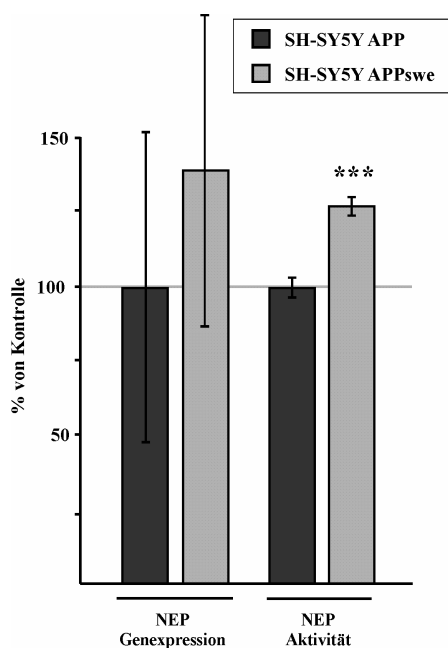


Abb. 19: Einfluss der FAD APPswe-Mutation auf NEP in SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR ($n = 3$) und der NEP-Enzymaktivität ($n = 15$) in SH-SY5Y APPswe und SH-SY5Y APP.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y APP = Wildtyp-APP überexprimierende SH-SY5Y-Zellen; SH-SY5Y APPswe = APPswe (K670N/M671L) überexprimierende SH-SY5Y-Zellen.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

4.2.5.2 Einfluss der α - und β -Sekretase geschnittenen C-terminalen APP-Fragmente auf NEP

Um den Einfluss der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung auf NEP weiter zu analysieren, wurden SH-SY5Y-Zellen verwendet, welche die α - bzw. β -Sekretase geschnittenen C-terminalen APP-Fragmente α -CTF bzw. β -CTF überexprimieren. Die beiden Zelllinien wurden hinsichtlich der Genexpression (3.2.1.5) und Enzymaktivität (3.2.3.13.2) von NEP im Vergleich zu SH-SY5Y WT untersucht.

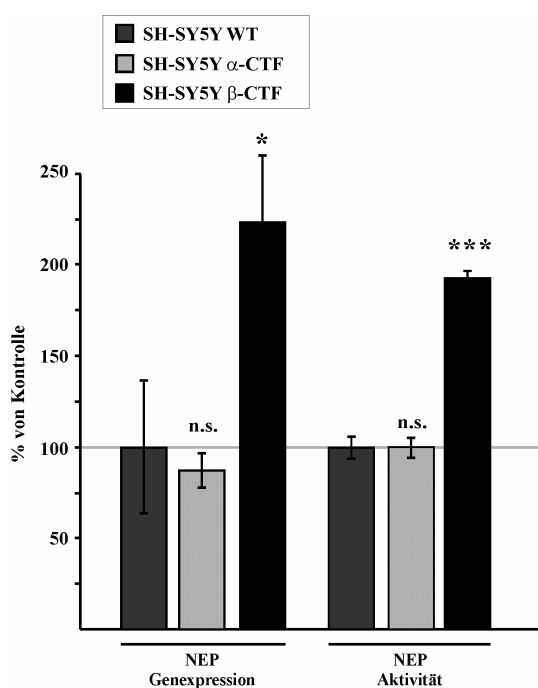


Abb. 20: Einfluss der α - und β -CTF-Expression auf NEP in SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR ($n = 3$) und der NEP-Enzymaktivität ($n = 8$) in SH-SY5Y α -CTF-, SH-SY5Y β -CTF- und SH-SY5Y WT- Zellen.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp, SH-SY5Y α -CTF = α -CTF-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen, SH-SY5Y β -CTF = β -CTF-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Während die Überexpression von α -CTF keine Auswirkungen auf NEP hat (NEP-Expression: $86,9\% \pm 9,5\%$, $p = 0,241$; NEP-Aktivität: $100,3\% \pm 6,0\%$, $p = 0,967$), resultiert die Überexpression von β -CTF in einer signifikant auf $223,5\% (\pm 36,3\%, p = 0,027)$ erhöhten NEP-Genexpression sowie in einer signifikant auf $192,5\% (\pm 3,9\%, p \leq 0,001)$ gesteigerten Aktivität des Enzyms (Abb. 20). Diese Daten belegen, dass ausschließlich das bei der amyloidogenen APP-Prozessierung entstehende AICD eine stimulierende Wirkung auf NEP besitzt.

4.2.5.3 Einfluss der pharmakologischen α -, β - und γ -Sekretase-Inhibition auf NEP

Da der Einsatz von β - und γ -Sekretase-Inhibitoren als therapeutisches Konzept zur Behandlung von AD diskutiert wird (Ghosh und Osswald, 2014; Golde et al., 2013), wurde die Auswirkung der pharmakologischen Inhibition der einzelnen Sekretasen (3.2.2.5.2) auf die NEP-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen analysiert (3.2.1.5). Hierzu wurden SH-SY5Y WT-Zellen vor der Analyse der NEP-Genexpression 24Std lang mit dem α -Sekretase-Inhibitor GM6001 ($5\mu\text{M}$, IC_{50} : 1-8,1nM für verschiedene Mitglieder der ADAM-Proteinfamilie (Oh et al., 2004)), dem β -Sekretase-Inhibitor IV (500nM , IC_{50} : 15nM (Stachel et al., 2004)) bzw. dem γ -Sekretase-Inhibitor X ($2\mu\text{M}$, IC_{50} : 48nM für $\text{A}\beta_{40}$ -Produktion, 67nM für $\text{A}\beta_{42}$ -Produktion (Shearman et al., 2000)) inkubiert. Als Kontrollen wurden mit Lösungsmittel behandelte SH-SY5Y WT-Zellen verwendet.

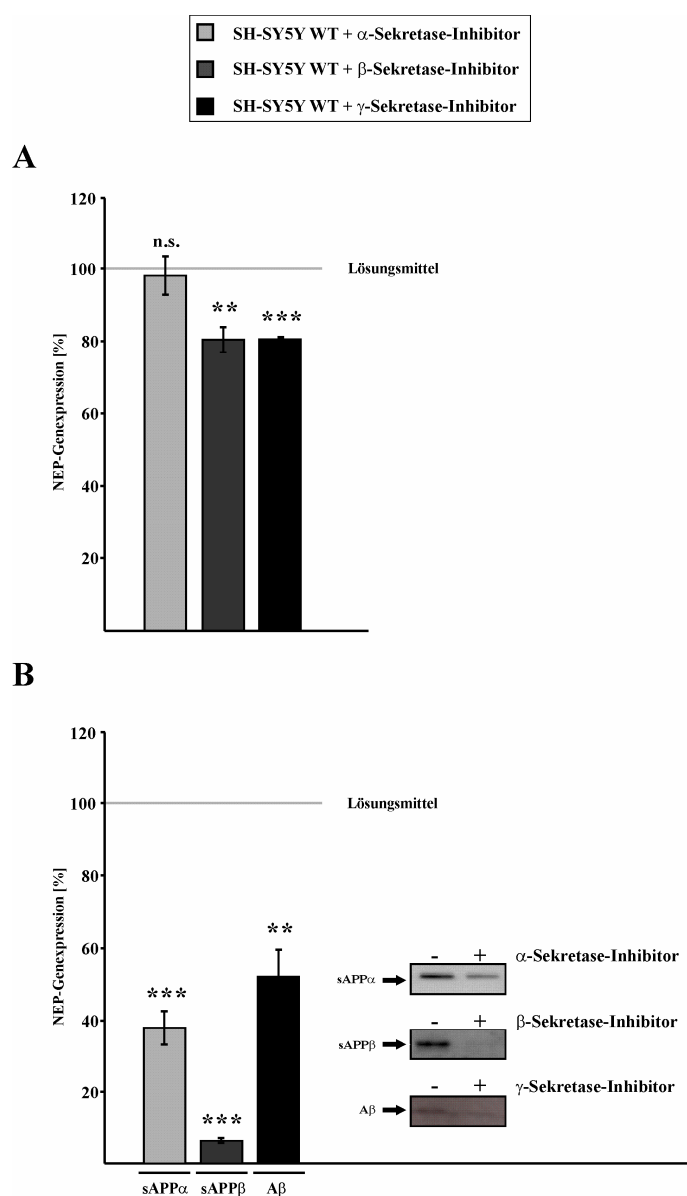


Abb. 21: Einfluss der α -, β - und γ -Sekretase-Inhibition auf NEP in SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y WT-Zellen wurden über 24Std mit α ($5\mu\text{M}$)-, β (500nM)- oder γ ($2\mu\text{M}$)-Sekretase-Inhibitor inkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Volumen DMSO (Lösungsmittel) behandelt.

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression in SH-SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit Sekretase-Inhibitoren bzw. DMSO mittels RT-PCR (α -Sekretase-Inhibitor: $n = 6$; β -Sekretase-Inhibitor: $n = 3$; γ -Sekretase-Inhibitor: $n = 3$).

(B) Überprüfung der Wirksamkeit der Sekretase-Inhibitoren durch Bestimmung des sAPP α -, sAPP β - bzw. A β -Gehalts im Kulturmedium der behandelten Zellen mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung der Antikörper W02 und Mbs492139 (sAPP α : $n = 5$; sAPP β : $n = 5$; A β : $n = 4$).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Die α -Sekretase-Inhibition in SH-SY5Y WT-Zellen hat keinen Einfluss auf die Genexpression von NEP ($98,3\% \pm 5,4\%$, $p = 0,764$). Im Gegensatz dazu führt die pharmakologische Inhibition der β -Sekretase zu einer signifikanten Verringerung der NEP-Genexpression auf $80,6\% (\pm 3,5\%, p = 0,005)$. In einer nahezu identischen ($p = 1,000$) Reduktion der NEP-Genexpression resultiert die Behandlung der Zellen mit γ -Sekretase-Inhibitor X ($80,7\% \pm 0,6\%$, $p \leq 0,001$) (Abb. 21A). Die Wirksamkeit der Inhibitoren wurde durch Analyse der sAPP α -, sAPP β - und A β -Spiegel im Zellkulturmedium der behandelten Zellen überprüft (3.2.3.7-3.2.3.10). Der Gehalt an sAPP α ist in den mit α -Sekretase-Inhibitor behandelten Zellen auf $38,1\% (\pm 4,5\%, p \leq 0,001)$ reduziert, die Inhibition der β -Sekretase führt zu einer Reduktion des sAPP β -Gehalts auf $6,3\% (\pm 0,7\%, p \leq 0,001)$. Die Wirksamkeit des γ -Sekretase-Inhibitors konnte durch eine Reduktion des A β -Gehalts auf $52,2\% (\pm 7,5\%, p = 0,004)$ nachgewiesen werden (Abb. 21B).

4.2.5.4 Einfluss von IDE auf NEP

Die in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten Daten zeigen, dass ausschließlich das durch die amyloidogene APP-Prozessierung entstandene AICD eine stimulierende Wirkung auf die NEP-Genexpression aufweist. Im Folgenden sollte die Ursache der transkriptionellen Inaktivität des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung produzierten AICDs untersucht werden. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass u.a. das zytosolisch lokalisierte Enzym IDE für die schnelle AICD-Degradation verantwortlich ist (Belyaev et al., 2010; Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003). Diese resultiert in einer kurzen Halbwertszeit des Peptids von etwa 5min (Cupers et al., 2001). Um zu analysieren, ob die transkriptionelle Inaktivität des von α -CTFs stammenden AICDs auf eine Degradation durch IDE zurückzuführen ist, wurde die NEP-Genexpression in α -CTF-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen mit normaler und reduzierter IDE-Enzymaktivität untersucht (3.2.1.5). Hierzu wurden mit Kontrollplasmid transfizierte SH-SY5Y WT-Zellen bzw. SH-SY5Y IDE-Knockdown-Zellen transient mit einem für α -CTF kodierenden Plasmid transfiziert (3.2.2.3).

Wie in Abb. 22A dargestellt, resultiert die Reduktion der IDE-Genexpression auf $75,9\% (\pm 10,1\%, p = 0,029)$ (Abb. 22B) in einer auf $157,2\% (\pm 12,2\%, p \leq 0,001)$ gesteigerten NEP-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen mit transienter Expression von α -CTF (Abb. 22A). Diese Daten unterstützen das Modell, dass IDE für den schnellen Abbau des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung freigesetzten AICDs und daher für dessen transkriptionelle Inaktivität verantwortlich ist (Belyaev et al., 2010; Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003).

Das in Abb. 22A gezeigte Ergebnis wurde nochmals durch Inkubation von SH-SY5Y α -CTF-Zellen mit Insulin, die zu einer kompetitiven Inhibition von IDE führen sollte, verifiziert (3.2.2.5.2).

Auch die Behandlung von SH-SY5Y α -CTF-Zellen mit $10\mu\text{M}$ Insulin hat eine Erhöhung der NEP-Genexpression zur Folge, sie beträgt $195,2\% (\pm 6,9\%, p \leq 0,001)$ (Abb. 23A). Wie in Abb. 23B dargestellt, ist die IDE-Enzymaktivität in SH-SY5Y-Zellen unter diesen Konditionen auf $63,1\% (\pm 2,1\%, p = 0,0018)$ verringert. Dies bestätigt die in Abb. 22A gezeigten Daten und die These, dass das bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung entstehende AICD aufgrund seines Abbaus durch IDE transkriptionell inaktiv ist.

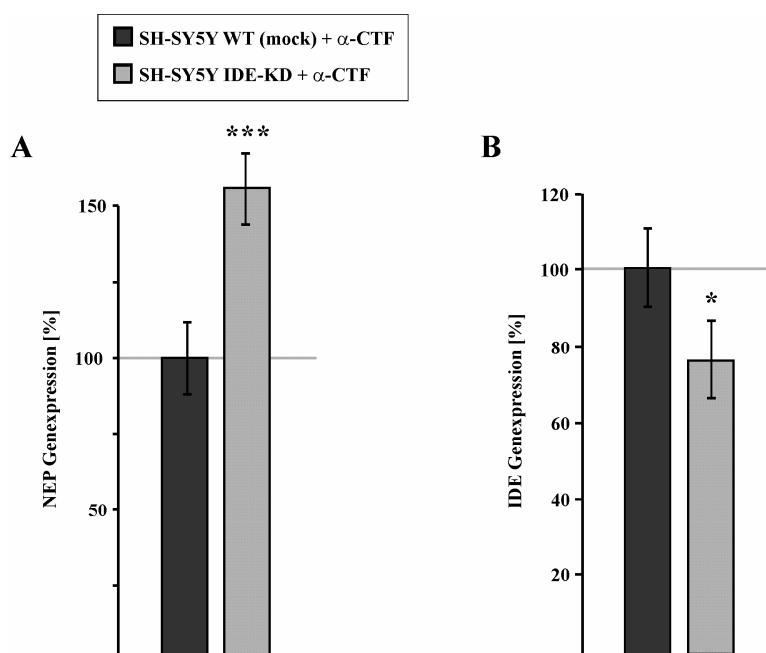


Abb. 22: Einfluss des IDE-Knockdowns auf NEP in α -CTF-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR in SH-SY5Y WT (mock) und SH-SY5Y IDE-KD nach transients Transfektion mit einem für α -CTF kodierenden Plasmid (n = 10).

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 80% transient transfiziert. Die Isolation der RNS erfolgte 48Std nach der Transfektion.

(B) Überprüfung der IDE-Knockdown-Effizienz in SH-SY5Y IDE-KD + α -CTF bzw. SH-SY5Y WT (mock) + α -CTF (n = 9) mittels RT-PCR.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT (mock) + α -CTF = mit Kontrollplasmid transfizierte SH-SY5Y Wildtyp-Zellen mit transienter Expression von α -CTF, SH-SY5Y IDE-KD + α -CTF = SH-SY5Y IDE-Knockdown-Zellen mit transienter Expression von α -CTF.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

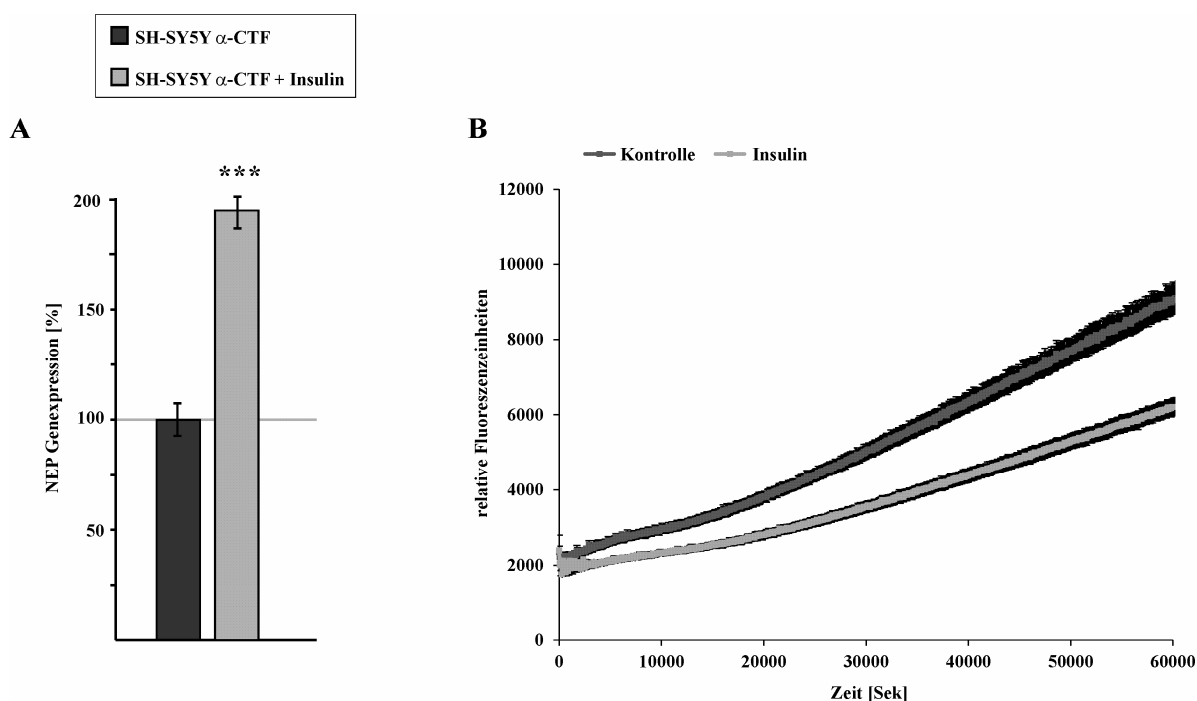


Abb. 23: Einfluss der pharmakologischen IDE-Inhibition auf NEP in α -CTF überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR in SH-SY5Y α -CTF nach Inkubation mit 10 μ M Insulin bzw. Wasser (Lösungsmittel) über 48Std (n = 3).

(B) IDE-Enzymaktivität in SH-SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit 10 μ M Insulin bzw. Wasser (Lösungsmittel) über 48Std (n = 3).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

SH-SY5Y α -CTF = α -CTF-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen; SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

4.2.5.5 Einfluss von Fe65 auf NEP

Im Gegensatz zu dem bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung freigesetzten AICD scheint das von β -CTF stammende AICD eine erhöhte Stabilität aufzuweisen. Es ist bekannt, dass die Bindung von AICD an das Adapterprotein Fe65 zu einer erhöhten Stabilität des Peptids führt (Kimberly et al., 2001). Dem allgemein favorisierten Modell zufolge transloziert der AICD/Fe65-Komplex in den Nukleus und bildet dort zusammen mit Tip60 den transkriptionell aktiven AFT-Komplex (Cao und Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004). Alternativ dazu kann AICD auch Fe65-unabhängig durch die Interaktion mit JIP1 in den Nukleus gelangen und dort zusammen mit Tip60 den genregulatorisch aktiven AJT-Komplex bilden (Scheinfeld et al., 2003; von Rotz et al., 2004). Um zu überprüfen, ob Fe65 bzw. der AFT-Komplex an der transkriptionellen Regulation von NEP durch AICD beteiligt ist, wurde die NEP-Genexpression (3.2.1.5) und -Enzymaktivität (3.2.3.13.2) in SH-SY5Y Fe65-Knockdown-Zellen untersucht.

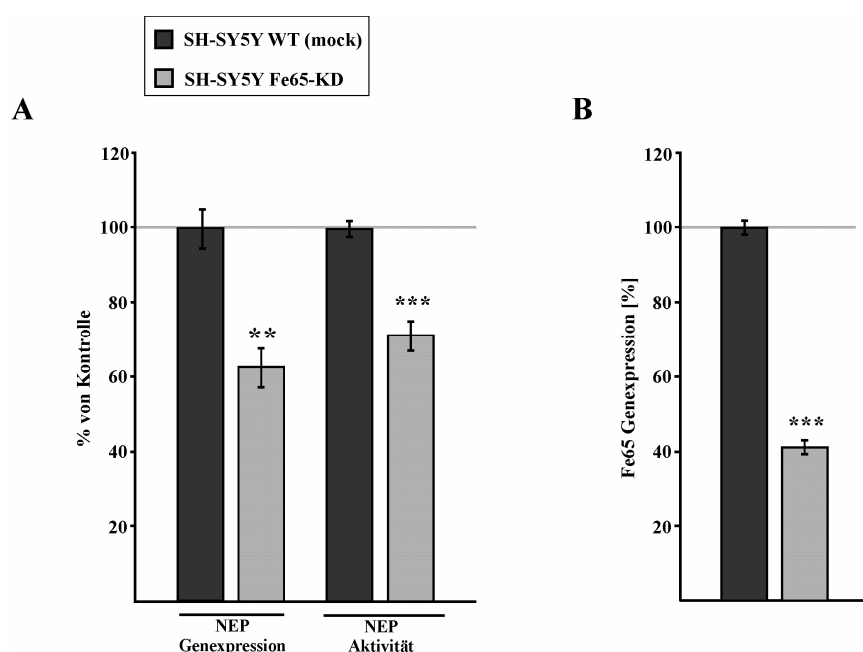


Abb. 24: Einfluss des Fe65-Knockdowns auf NEP in SH-SY5Y-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression mittels RT-PCR (n = 3) und der NEP-Enzymaktivität (n = 10) in SH-SY5Y Fe65-KD bzw. SH-SY5Y WT (mock).

(B) Überprüfung der Fe65-Knockdown-Effizienz in SH-SY5Y Fe65-KD-Zellen mittels RT-PCR (n = 3).

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte SH-SY5Y Wildtyp-Zellen, SH-SY5Y Fe65-KD = SH-SY5Y Fe65-Knockdown-Zellen.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Die Reduktion der Fe65-Genexpression auf 41,2% ($\pm 1,9\%$, $p \leq 0,001$) (Abb. 24B) resultiert in einer signifikant verminderten NEP-Genexpression (63,0% $\pm 5,1\%$, $p = 0,002$) und -Enzymaktivität (71,5% $\pm 4,0\%$, $p \leq 0,001$) (Abb. 24A). Dies bestätigt eine Beteiligung des Adapterproteins Fe65 an der transkriptionellen Regulation von NEP durch AICD.

4.2.6 ANALYSE DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION VON NEP DURCH AICD IN MURINEM HIRNGEWEBE

Die in 4.2.1-4.2.5 dargestellten Daten belegen eine AICD-abhängige Genregulation von NEP in verschiedenen Zellkulturmodellen. Diese Ergebnisse sollten anschließend auch *in vivo* unter Verwendung mehrerer transgener Mausmodelle (Tab. 6) bestätigt werden.

4.2.6.1 Einfluss der APP-Proteinfamilie auf NEP *in vivo*

Zunächst wurde die NEP-Genexpression in dem Hirngewebe von APP- und APLP2-Einzel-Knockout-Mäusen (APP $-/-$ bzw. APLP2 $-/-$) sowie von Tieren mit kombinierter Defizienz für die beiden Proteine (APP/ APLP2 $-/-$) analysiert (3.2.1.5).

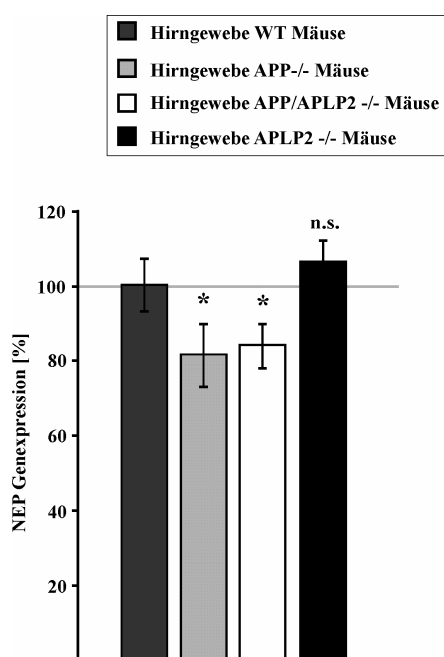


Abb. 25: Einfluss von APP und APLP2 auf NEP in murinem Hirngewebe
Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression im Hirngewebe von APP $-/-$ (n = 7), APP/APLP2 $-/-$ (n = 12) und APLP2 $-/-$ (n = 12) Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen mittels RT-PCR.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$).

WT = Wildtyp-Mäuse, APP $-/-$ = APP-Knockout-Mäuse, APP/APLP2 $-/-$ = APP/APLP2-Doppelknockout-Mäuse, APLP2 $-/-$ = APLP2-Knockout-Mäuse. (Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Während im Hirngewebe von APP-Einzel- und APP/APLP2-Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikante, nahezu identische ($p = 1,000$) Reduktion der NEP-Genexpression auf 81,3% ($\pm 8,5\%$, $p = 0,049$) bzw. 83,8% ($\pm 6,1\%$, $p = 0,015$) vorliegt, ist im Hirngewebe von APLP2-Einzelknockout-Mäusen keine signifikante Veränderung der NEP-Genexpression festzustellen (106,2% $\pm 6,1\%$, $p = 0,317$) (Abb. 25). Diese Ergebnisse belegen eine Funktion von APP, nicht aber von APLP2, bei der Genregulation von NEP und bestätigen die in Abb. 12 dargestellten Daten aus APP-/APLP2-defizienten MEF-Zellen *in vivo*.

4.2.6.2 Einfluss des APP C-Terminus auf NEP *in vivo*

Der Einfluss des APP C-Terminus auf die NEP-Genexpression *in vivo* wurde unter Verwendung des Hirngewebes von Mäusen analysiert (3.2.1.5), die nur ein C-terminal um 15 Aminosäuren verkürztes APP-Konstrukt (APP Δ CT15) exprimieren. Bei diesen Tieren wurde der endogene APP-Genlocus durch ein modifiziertes APP-Allel, welches unter Kontrolle des endogenen chromosomalen APP-Promotors steht, ersetzt (Ring et al., 2007).

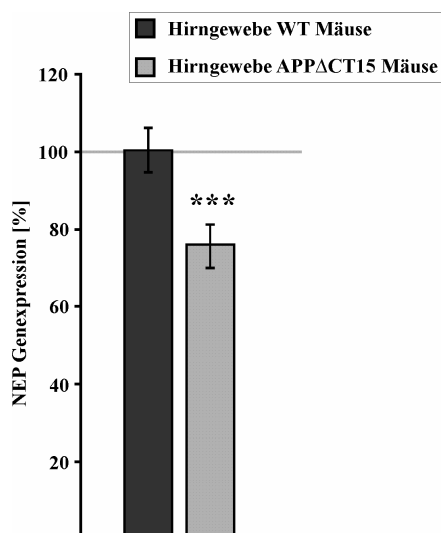


Abb. 26: Einfluss des APP C-Terminus auf NEP in murinem Hirngewebe

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression im Hirngewebe von APPΔCT15-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen mittels RT-PCR (n = 15). Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) p ≤ 0,001).

WT = Wildtyp-Mäuse, APPΔCT15 = Mäuse mit Deletion des APP C-Terminus.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist die Genexpression von NEP im Hirngewebe des APPΔCT15-Mausmodells signifikant auf 75,8% (± 5,7%, p ≤ 0,001) reduziert (Abb. 26), was die *in vivo*-Relevanz der in Abb. 15 dargestellten, aus MEF APPΔCT15-Zellen gewonnenen Daten, bestätigt.

4.2.6.3 Einfluss von FAD APP- und PS1-Mutationen auf NEP *in vivo*

Die NEP-Genexpression wurde auch im Hirngewebe zweier unterschiedlicher FAD-Mausmodelle untersucht (3.2.1.5). Hierbei handelt es sich um transgene Tiere, welche die bereits beschriebene APP^{sw}-Mutation alleine oder in Kombination mit der PS1ΔExon9-Mutation tragen. Die FAD-Mutation PS1ΔExon9 führt zu einer reduzierten γ-Sekretase-Aktivität und einer verringerten AICD-Freisetzung (Bentahir et al., 2006).

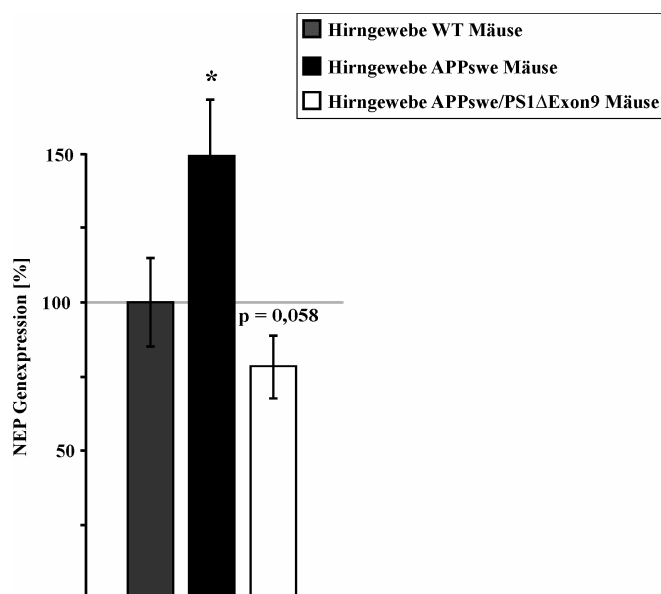


Abb. 27: Einfluss der FAD-Mutationen APP^{sw} und APP^{sw}/PS1ΔExon9 auf die NEP-Genexpression in murinem Hirngewebe

Quantitative Bestimmung der NEP-Genexpression im Hirngewebe von APP^{sw}- (n = 15) und APP^{sw}/PS1ΔExon9- (n = 9) Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen mittels RT-PCR.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p ≤ 0,05).

WT = Wildtyp-Mäuse, APP^{sw} = Mäuse mit der APPswedish-Doppelmutation (K670N/M671L), APP^{sw}/PS1ΔExon9 = Mäuse mit der APPswedish-Doppelmutation (K670N/ M671L) und Deletion des Exons 9 von PS1.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2015a)

Die Expression von APP_{swe} und die damit einhergehende verstärkte amyloidogene APP-Prozessierung (Citron et al., 1992; Felsenstein et al., 1994) führt *in vivo*, wie auch in SH-SY5Y-Zellen (Abb. 19), zu einer signifikant auf 149,5% (\pm 19,4%, $p = 0,016$) gesteigerten NEP-Genexpression (Abb. 27). Dieses Ergebnis belegt, dass auch in murinem Hirngewebe eine β -Sekretase-abhängige Regulation von NEP vorliegt. Im Gegensatz zu APP_{swe}-Mäusen weisen Mäuse mit kombinierter Expression von APP_{swe} und PS1 Δ Exon9 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine tendenziell verringerte NEP-Genexpression ($78,6\% \pm 10,5\%$, $p = 0,058$) auf (Abb. 27). Der Effekt der APP_{swe}-Mutation auf NEP wird im Hirngewebe dieser Tiere demnach infolge der reduzierten γ -Sekretase-Aktivität vollständig aufgehoben bzw. nahezu revertiert. Die NEP-Genexpression wird somit auch *in vivo* sowohl β - als auch γ -Sekretase-abhängig reguliert.

4.3 EINFLUSS DER MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN EPA UND DHA AUF DIE A β -DEGRADATION

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden in *Biochemistry and Cell Biology* publiziert:

Grimm, M.O*, **Mett, J.***, Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Blumel, T., Stotzel, H., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid-beta by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 534-542.

* *equally contributed*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind mit der AD-Pathologie einhergehende Veränderungen der zerebralen Lipidzusammensetzung bekannt, wobei u.a. die Phospholipid- und Fettsäurekomposition deutliche Veränderungen aufweist (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016). So konnte beispielsweise eine Reduktion der PUFAs EPA und DHA im *post mortem* Hirngewebe und auch im Serum bzw. Plasma von AD-Patienten nachgewiesen werden (Conquer et al., 2000) (Soderberg et al., 1991) (Tully et al., 2003). DHA zählt zu den am häufigsten im Hirngewebe vorkommenden PUFAs, sie macht etwa 8% des Hirntrockengewichts aus (Musket et al., 2006; Sastry, 1985). Der Gehalt von EPA im Hirnparenchym ist typischerweise 200-300-fach geringer als der DHA-Gehalt (Chen et al., 2009). Aufgrund der in verschiedenen Studien festgestellten negativen Korrelation zwischen der Aufnahme dieser Fettsäuren und dem AD-/Demenzrisiko bzw. dem Fortschritt der Erkrankung (Barberger-Gateau et al., 2007; Freund-Levi et al., 2006; Kalmijn et al., 1997; Laitinen et al., 2006; Morris et al., 2003), sollte im Folgenden der Einfluss von EPA und DHA auf die A β -Degradation analysiert werden.

Als Zellkulturmodell für die Untersuchungen wurde die murine Neuroblastom-Zelllinie N2a gewählt (4.1.1). Da diese Fettsäuren nach ihrer Zufuhr mit der Nahrung im Hirngewebe in Phospholipide integriert werden (Sarda et al., 1991), erfolgte die Supplementierung der N2a-Zellen mit EPA und DHA durch Zugabe von 10 μ M PC20:5 bzw. PC22:6 in das Kulturmedium. Als Kontrollen wurden die ebenfalls in PC gebundenen gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge (PC20:0 bzw. PC22:0) verwendet (Tab. 10), was die Untersuchung des alleinigen Effekts der in den Fettsäureketten vorhandenen Doppelbindungen ermöglichte. Die Verwendung von Phospholipiden gleicher Kettenlänge als Kontrolle hat im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle zusätzlich den Vorteil, dass die Nährstoffzufuhr der mit EPA- bzw. DHA inkubierten Zellen und der Kontrollzellen während der Inkubation vergleichbar ist.

Da die PC-Konzentration in humanem Hirngewebe schätzungsweise 23,8mM beträgt, ist davon auszugehen, dass die verwendete finale Konzentration der Phospholipide von 10 μ M im Zellkulturmedium keinesfalls höher als die physiologische zerebrale PC-Konzentration ist. Die Abschätzung der PC-Konzentration in humanem Hirngewebe basiert auf folgender Rechnung:

Betrachtet man die Mittelwerte für die graue und weiße Substanz von humanem Hirngewebe macht PC etwa 8,6% des Trockengewichts aus, das mittlere Molekulargewicht der im Hirngewebe vorkommenden PC-Spezies beträgt 768g/Mol (O'Brien und Sampson, 1965). Unter der Annahme, dass 100g Hirntrockengewicht 100ml entspricht, ergibt sich eine PC-Konzentration von 112mM im Hirntrockengewicht. Da das Trockengewicht von Hirngewebe etwa 21,25% des Nassgewichts ausmacht, ist von einer PC-Konzentration von 23,8mM im Gesamtgewicht von humanem Hirngewebe auszugehen.

4.3.1 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Zur Analyse des Einflusses von EPA und DHA auf die A β -Degradation war zunächst die Etablierung eines Zellkulturmodells erforderlich. Wie in 3.2.2.5.3 beschrieben, wurden N2a-Zellen über einen Zeitraum von 18Std (bzw. 24Std für die Messung der Gesamt-A β -Degradation) mit 10 μ M PC20:5 oder PC20:0 bzw. 10 μ M PC22:6 oder PC22:0 in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1%) inkubiert. Die Überprüfung der Viabilität der mit PC inkubierten Zellen erfolgte mittels LDH-Test (3.2.2.6).

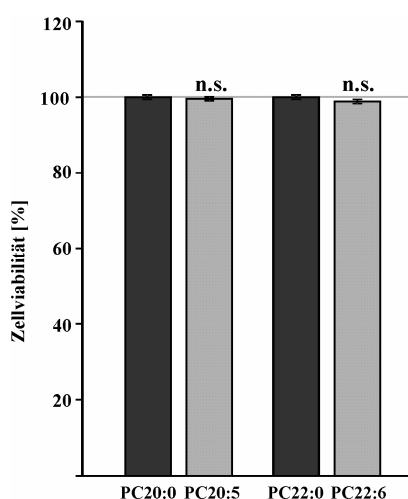


Abb. 28: Einfluss von EPA und DHA auf die Viabilität von N2a-Zellen

Bestimmung der Viabilität von N2a WT (mock)-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit 10 μ M PC20:5 bzw. PC22:6 oder den Kontroll-Lipiden PC20:0 bzw. PC22:0 in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) (n = 3). Die Viabilität der Zellen wurde nach Ermittlung der Zytotoxizität mittels LDH-Test berechnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

Weder PC20:5 noch PC22:6 weisen im Vergleich zu PC20:0 bzw. PC22:0 eine deutliche Zytotoxizität auf. Die festgestellten Unterschiede in der Zellviabilität betragen weniger als 1,5% und sind statistisch nicht signifikant (PC20:5: 99,54% \pm 0,51%, p = 0,59; PC22:6: 98,84% \pm 0,59%, p = 0,21) (Abb. 28).

4.3.2 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE A β -GESAMTDEGRADATION

Zur Untersuchung des Einflusses von PC-Spezies mit variablen Fettsäuren auf die Gesamtdegradation von A β 40 wurde wie in 3.2.3.12 beschrieben vorgegangen. Demnach wurden N2a-Zellen 18Std lang mit 10 μ M PC und anschließend 6Std mit 10 μ M PC in Kombination mit 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert (3.2.2.5.3). Die bei der anschließenden Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) erhaltene Signalintensität des verbleibenden humanen A β 40 korreliert negativ mit der in den Zellen vorhandenen A β -degradierenden Aktivität. Im Folgenden wurde die Gesamt-A β -Degradation unter Einfluss von PC20:5 im Vergleich zu PC20:0 bzw. von PC22:6 im Vergleich zu PC22:0 betrachtet.

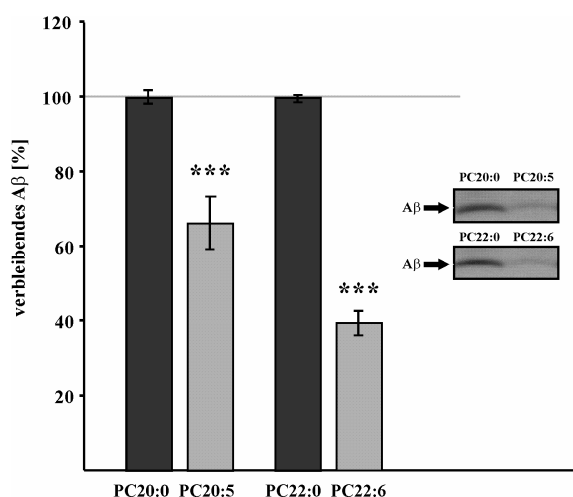


Abb. 29: Einfluss von EPA und DHA auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit PC20:5 bzw. PC22:6 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolllipiden PC20:0 bzw. PC22:0 (PC20:5 n = 9; PC 22:6 n = 11). Die Zellen wurden 18Std mit 10μM PC und anschließend 6Std mit 10μM PC + 0,5μg/ml humanem Aβ40 in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels Post Hoc-Test ermittelt (*** p ≤ 0,001).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

Nach Inkubation der N2a-Zellen mit PC20:5 im Vergleich zu PC20:0 ist eine signifikante Reduktion des verbleibenden humanen Aβ40 auf 66,4% (± 7,1%, p ≤ 0,001) zu verzeichnen. In den mit PC22:6 behandelten Zellen liegt eine Verringerung der verbleibenden synthetischen Aβ40-Peptide auf 39,5% (± 3,2%, p ≤ 0,001) vor (Abb. 29). Diese Daten belegen, dass die PUFAs EPA und DHA im Vergleich zu den korrespondierenden gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge stimulierende Effekte auf die Aβ-Degradation haben.

Bei IDE handelt es sich um das Haupt-Aβ-degradierende Enzym im Kulturmedium von vielen neuronalen und mikroglialen Zellkulturen (Farris et al., 2003; Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). Um zu überprüfen, ob die in Abb. 29 dargestellten Effekte von EPA und DHA auf die Gesamt-Aβ-Degradation auf einer Stimulation von IDE beruhen, wurde das Experiment unter Verwendung von IDE-Knockdown-Zellen wiederholt. Hierzu wurde zunächst durch Transfektion mit IDE-shRNS-Plasmiden (Tab. 18) eine stabile N2a IDE-Knockdown-Zelllinie generiert (3.2.2.4). Mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) wurde die Knockdown-Effizienz in den hergestellten N2a IDE-Knockdown-Zellen überprüft. Des Weiteren wurden diese Zellen hinsichtlich der Gesamt-Aβ-Degradation mit den mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen verglichen.

Für die mit IDE-shRNS-Plasmid 3 (Tab. 18) transfizierten N2a-Zellen konnte mit 86,9% die stärkste Reduktion des IDE-Proteingehalts nachgewiesen werden (IDE-Proteingehalt in N2a IDE-Knockdown: 13,1% ± 5,4%; p ≤ 0,001) (Abb. 30A). Die Gesamt-Aβ-Degradation ist in diesen Zellen aufgrund des stark reduzierten IDE-Proteinspiegels im Vergleich zu den mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen ebenfalls signifikant (p ≤ 0,001) verringert. Nach sechsständiger Inkubation auf den Kontrollzellen sind noch 18,8% (± 1,9%) der zugegeben humanen Aβ40-Peptide nachweisbar, bei Verwendung der N2a IDE-Knockdown-Zellen hingegen 66,7% (± 2,6%) (Abb. 30B).

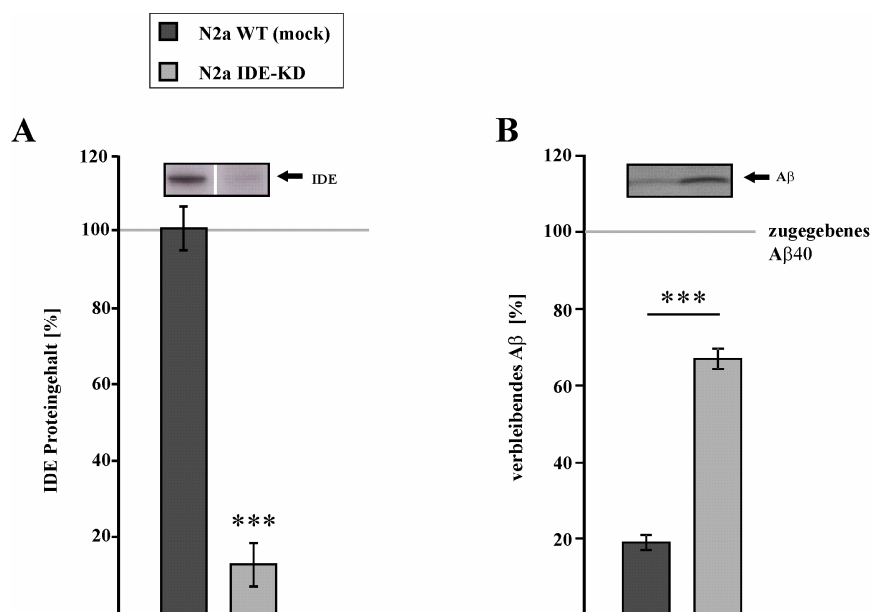


Abb. 30: Knockdown-Effizienz und Gesamt-Aβ-Degradation in stabilen N2a IDE-Knockdown-Zellen

Quantitative Bestimmung des (A) IDE-Proteingehalts mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ST1120 (n = 3) und der (B) Gesamt-Aβ-Degradation (n = 3) in N2a WT (mock)- und N2a IDE-KD-Zellen. Zur Messung der Gesamt-Aβ-Degradation wurde 0,5μg/ml humanes Aβ40 in FCS-reduziertem Kulturmedium (DMEM/ 0,1% FCS) 6Std lang auf den Zellen inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet bzw. mit humanem Aβ40 inkubiert.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) p ≤ 0,001).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen, N2a IDE-KD = N2a IDE-Knockdown-Zellen. (Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2015b; Abb. B modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Anschließend wurde die Gesamt-Aβ-Degradation in den N2a IDE-Knockdown-Zellen unter Einfluss von PC20:5 bzw. PC22:6 im Vergleich zu PC20:0 bzw. PC22:0 analysiert (3.2.3.12). Die Zellen wurden hierfür ebenfalls 18Std lang mit den Phospholipiden (10μM) und anschließend 6Std mit den jeweiligen PC-Spezies und 0,5μg/ml humanem Aβ40 inkubiert (3.2.2.5.3). Die Quantifizierung des im Kulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 ist in Abb. 31 dargestellt.

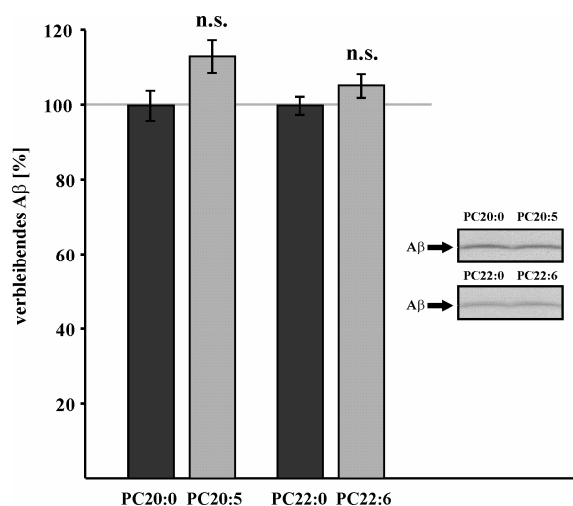


Abb. 31: Einfluss von EPA und DHA auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation in N2a IDE-KD nach Inkubation mit PC20:5 bzw. PC22:6 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolllipiden PC20:0 bzw. PC22:0 (PC20:5 n = 6; PC 22:6 n = 9). Die Zellen wurden 18Std mit 10μM PC und anschließend 6Std mit 10μM PC + 0,5μg/ml humanem Aβ40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels Post Hoc-Test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

N2a IDE KD = N2a IDE-Knockdown-Zellen.

Bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen sind die in Abb. 29 gezeigten stimulierenden Effekte von PC20:5 und PC22:6 auf die A β -Degradation nicht festzustellen. Der Gehalt des verbleibenden humanen A β 40 beträgt im Vergleich zu dem jeweiligen Kontrolllipid nach Inkubation mit PC20:5 113,1% (\pm 4,4%, $p = 0,67$) und nach Behandlung der Zellen mit PC22:6 105,4% (\pm 3,0%, $p = 0,92$) (Abb. 31).

Da sich die Effektstärken von PC20:5 und PC22:6 auf die A β -Degradation bei Verwendung von N2a Kontroll- und N2a IDE-Knockdown-Zellen signifikant voneinander unterscheiden (PC20:5: $p \leq 0,001$; PC22:6: $p \leq 0,001$), ist davon auszugehen, dass die Veränderungen im A β -Abbau unter Einfluss dieser Lipide auf eine Stimulation von IDE zurückzuführen sind. Im Folgenden wurden die dem zugrunde liegenden Mechanismen auf der Ebene der Genexpression, des Proteingehalts und der Enzymaktivität von IDE analysiert.

4.3.3 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE TRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON IDE

4.3.3.1 Einfluss von EPA und DHA auf die IDE-Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses von EPA und DHA auf die IDE-Genexpression wurden N2a-Zellen 18Std lang mit 10 μ M PC20:5, PC22:6 oder den entsprechenden Kontrolllipiden inkubiert (3.2.2.5.3). Die quantitative Bestimmung der IDE-Genexpression erfolgte anschließend mittels RT-PCR (3.2.1.5).

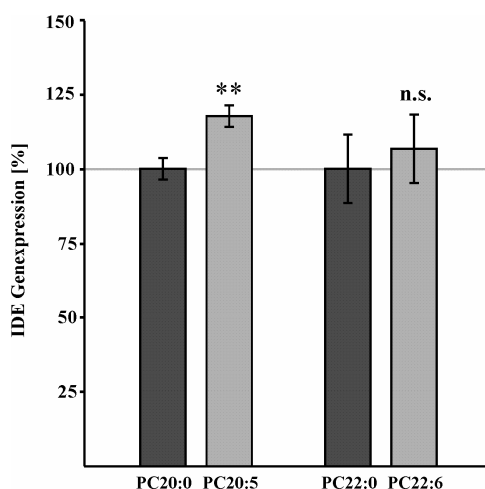


Abb. 32: Einfluss von EPA und DHA auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der IDE-Genexpression in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit PC20:5 ($n = 4$), PC22:6 ($n = 7$) und den jeweiligen Kontrolllipiden PC20:0 bzw. PC22:0. Die Zellen wurden vor der RNS-Isolation über einen Zeitraum von 18Std mit 10 μ M PC inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen. (Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Wie in Abb. 32 gezeigt, führt die Inkubation der N2a-Zellen mit PC20:5 im Vergleich zu PC20:0 zu einer signifikant auf 117,6% (\pm 3,6%, $p = 0,003$) erhöhten IDE-Genexpression. Im Gegensatz dazu hat PC22:6 keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression von IDE (106,7% \pm 11,4%, $p = 0,57$) (Abb. 32).

4.3.3.2 Einfluss von EPA auf die IDE-Promotoraktivität

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Genexpression von IDE nach Inkubation mit PC20:5 (Abb. 32) auf eine erhöhte Aktivität des IDE-Promotors zurückzuführen ist, erfolgte im Anschluss die Messung der IDE-Promotoraktivität unter Einfluss von PC20:5 und dem Kontrolllipid PC20:0. Hierzu wurden N2a WT-Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben transient mit einem Reporterplasmid transfiziert, welches das für die *Gaussia*-Luciferase kodierende Gen unter Kontrolle des IDE-Promotors sowie das für SEAP kodierende Gen unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors beinhaltet. Die Zellen wurden anschließend 18Std lang mit PC20:5 bzw. PC20:0 inkubiert (3.2.2.5.3). Die *Gaussia*-Luciferase- und

SEAP-Aktivität im Kulturmedium der inkubierten Zellen wurde anschließend luminometrisch bestimmt. Zum Ausgleich von möglichen Schwankungen in der Transfektionseffizienz wurde für jede Probe der Messwert der *Gaussia*-Luciferase-Aktivität auf den der SEAP-Aktivität normiert (3.2.1.6).

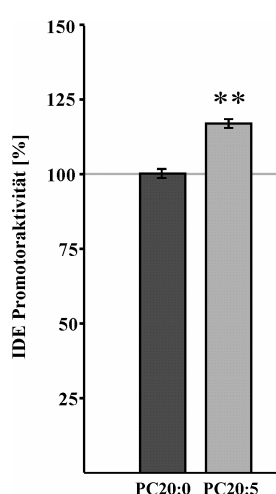


Abb. 33: Einfluss von EPA auf die IDE-Promotoraktivität in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der IDE-Promotoraktivität in N2a WT-Zellen nach Inkubation mit PC20:5 und PC20:0 mittels Luciferase-Assay ($n = 3$). Die Zellen wurden transient mit einem IDE-Reporterplasmid (Expression der *Gaussia*-Luciferase unter Kontrolle des IDE-Promotors, konstitutive Expression von SEAP) transfiziert und anschließend über einen Zeitraum von 18Std mit $10\mu\text{M}$ PC20:5 bzw. PC20:0 inkubiert. Dargestellt ist die auf die SEAP-Aktivität normierte *Gaussia*-Luciferase-Aktivität im Kulturmedium der inkubierten Zellen.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$).

N2a WT = N2a Wildtyp-Zellen.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Die Behandlung der N2a-Zellen mit PC20:5 resultiert im Vergleich zu PC20:0 in einer signifikant auf 116,7% ($\pm 1,4\%$, $p = 0,003$) gesteigerten Aktivität des IDE-Promotors (Abb. 33), was die in Abb. 32 dargestellte Erhöhung der IDE-Genexpression auf 117,6% unter Einfluss von PC20:5 erklärt (Effektstärke von EPA auf Genexpression/ Promotoraktivität von IDE: $p = 0,996$). Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse eine Aktivierung des IDE-Promotors durch EPA und eine daraus resultierende Steigerung der IDE-Genexpression.

4.3.4 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE SEKRETION VON IDE

4.3.4.1 Einfluss von EPA und DHA auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteingehalt

Es ist bekannt, dass IDE von mikroglialen und neuronalen Zellkulturen sezerniert wird (Farris et al., 2003; Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). Daher wurde nicht nur der intrazelluläre, sondern auch der extrazelluläre IDE-Proteinspiegel unter Einfluss von EPA und DHA analysiert. Hierzu wurde der IDE-Proteingehalt in den Lysaten und im Kulturmedium von N2a-Zellen nach Inkubation mit PC20:5, PC22:6 bzw. den entsprechenden Kontrolllipiden mittels Western Blot-Analyse bestimmt (3.2.2.5.3; 3.2.3.8-3.2.3.10). Eine Veränderung im Verhältnis zwischen intra- und extrazellulär lokalisiertem IDE würde für eine Beeinflussung der IDE-Sekretion durch EPA bzw. DHA sprechen.

Im Vergleich zu PC20:0 führt die Behandlung der Zellen mit PC20:5 zu einem statistisch nicht signifikant auf 134,6% ($\pm 22,1\%$, $p = 0,26$) gesteigerten extrazellulären IDE-Gehalt und einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären IDEs auf 116,5% ($\pm 3,6\%$, $p = 0,05$). Daraus ergibt sich keine signifikante Veränderung im Verhältnis zwischen extra- und intrazellulär lokalisierten IDE unter Einfluss von EPA ($109,5\% \pm 18,9\%$, $p = 0,77$) (Abb. 34A). Die signifikante Erhöhung des IDE-Proteingehalts in den Lysaten der Zellen nach Inkubation mit EPA ist wahrscheinlich auf die gesteigerte IDE-Genexpression auf 117,6% ($\pm 3,6\%$, $p = 0,003$) unter Einfluss dieser Fettsäure (Abb. 32) zurückzuführen (Effektstärke von EPA auf Genexpression/ intrazellulären Proteingehalt von IDE: $p = 1,000$).

Unter Einfluss von DHA liegt hingegen eine signifikante Erhöhung des extrazellulären IDEs auf 128,3% ($\pm 5,6\%$, $p = 0,01$) bei gleichzeitiger tendenzieller Reduktion des intrazellulären IDEs auf 79,3% ($\pm 7,7\%$, $p = 0,09$) vor. Dies resultiert in einer signifikanten Erhöhung des Verhältnisses zwischen extra- und intrazellulärem IDE-Proteingehalt nach Inkubation mit DHA (161,5% $\pm 12,2\%$, $p = 0,03$) (Abb. 34B), was auf eine gesteigerte IDE-Sekretion in Anwesenheit dieser Fettsäure schließen lässt.

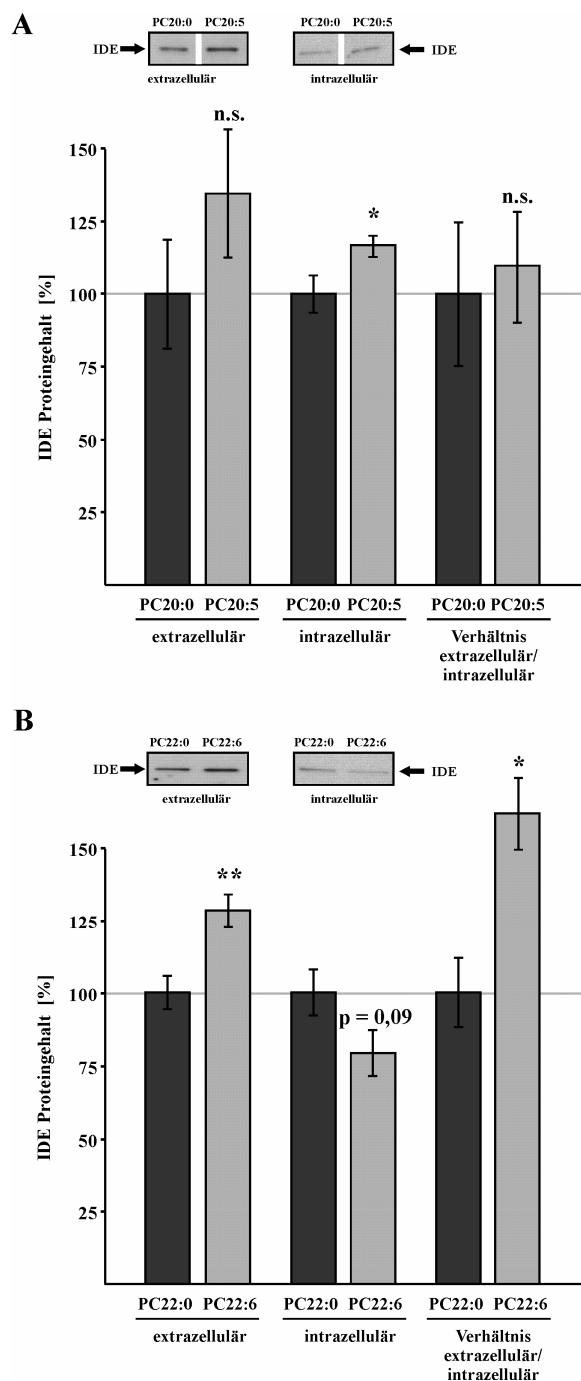


Abb. 34: Einfluss von EPA und DHA auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung des IDE-Proteingehalts in den Lysaten und im Kulturmedium von N2a WT (mock)-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit (A) 10 μ M PC20:5 (IDE intrazellulär: n = 6; IDE extrazellulär: n = 6) und (B) 10 μ M PC22:6 (IDE intrazellulär: n = 5; IDE extrazellulär: n = 6) und der entsprechenden Kontrolllipide mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ST1120. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen dem extra- und intrazellulären IDE-Gehalt berechnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

4.3.4.2 Einfluss von DHA auf die exosomale IDE-Sekretion

Es konnte gezeigt werden, dass IDE u.a. in N2a-Zellen Exosomen-vermittelt in den Extrazellulärraum sezerniert wird (Bulloj et al., 2010; Tamboli et al., 2010). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Erhöhung der IDE-Sekretion und die gesteigerte A β -Degradation unter Einfluss von DHA (Abb. 29, Abb. 34B) auf eine gesteigerte Exosomen-Sekretion zurückzuführen sind. Hierzu wurde die Gesamtdegradation von A β nach Behandlung der Zellen mit PC22:6 im Vergleich zu PC22:0 in Anwesenheit des Exosomen-Inhibitors GW4869 bzw. dem Lösungsmittel DMSO betrachtet. Bei GW4869 handelt es sich um einen Inhibitor der nSMase, welcher in der Literatur häufig zur Inhibition der Exosomen-Freisetzung eingesetzt wird (Li et al., 2013; Trajkovic et al., 2008). Neben der verringerten Sekretion von Exosomen ist bei Verwendung von GW4869 daher auch von einem erhöhten Verhältnis von Sphingomyelin zu Ceramid in den Zellen auszugehen (5.2.4).

Die Zellen wurden zunächst 18Std lang mit PC22:0/DMSO, PC22:6/DMSO, PC22:0/GW4869 oder PC22:6/GW4869 (3.2.2.5.2, 3.2.2.5.3) und anschließend über 6Std mit den entsprechenden Substanzen in Kombination mit 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert (3.2.3.12). Die Quantifizierung des nach 6Std verbleibenden humanen A β 40 ist in Abb. 35A dargestellt.

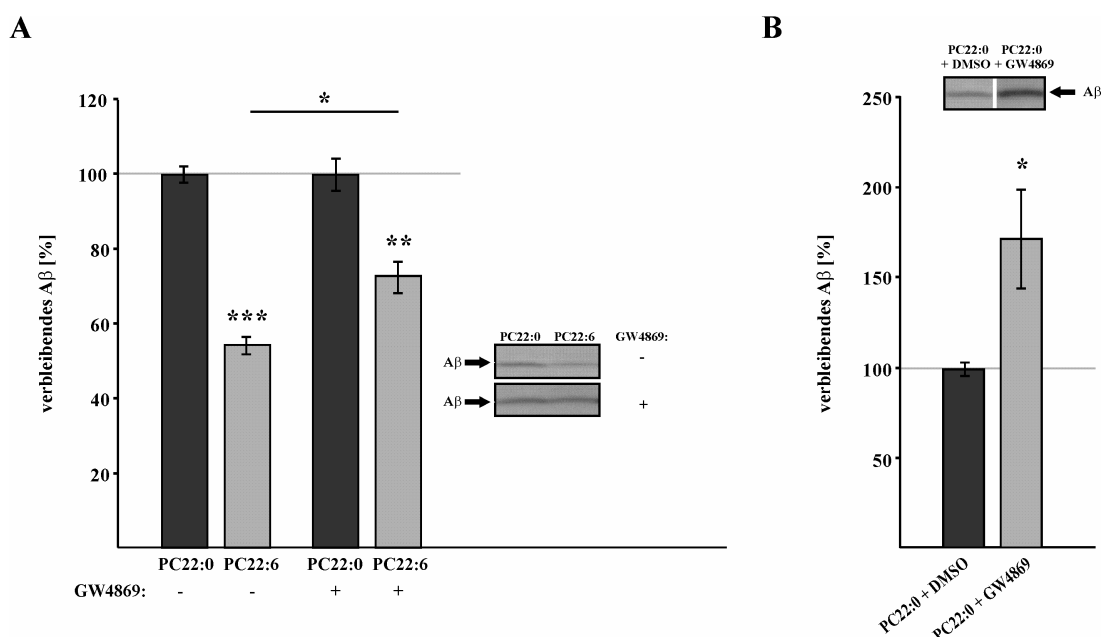


Abb. 35: A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen unter Einfluss von DHA nach Exosomen-Inhibition

(A) Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT (mock) nach Inkubation mit 10 μ M PC22:6 im Vergleich zu PC22:0 in Anwesenheit des Exosomen-Inhibitors GW4869 oder des Lösungsmittels DMSO (n = 3).

(B) Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT (mock) nach Inkubation mit 10 μ M PC22:0 in Kombination mit GW4869 oder dem Lösungsmittels DMSO (n = 5).

Die Zellen wurden über 18Std mit den oben genannten Substanzen und anschließend 6Std lang mit diesen in Kombination mit 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels Post Hoc-Test (A) oder zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test (B) ermittelt (* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Wie erwartet, führt die Inkubation der N2a-Zellen mit PC22:6 im Vergleich zu PC22:0 in Anwesenheit von DMSO zu einer signifikanten Reduktion des verbleibenden humanen A β 40 auf 54,5% (\pm 2,2%, $p \leq 0,001$). In Anwesenheit des Exosomen-Inhibitors GW4869 ist dieser Effekt ebenfalls feststellbar, die Reduktion der synthetischen humanen A β 40-Peptide ist nach Inkubation mit PC22:6/GW4869 im Vergleich zu PC22:0/GW4869 jedoch signifikant ($p = 0,035$) geringer ausgeprägt (verbleibendes humanes A β : 72,7% \pm 4,3%, $p = 0,004$) (Abb. 35A).

Die Überprüfung des Effekts von GW4869 auf die Gesamt-A β -Degradation ergab, dass in Anwesenheit dieses Inhibitors ein signifikant reduzierter Abbau der supplementierten A β -Peptide vorliegt. Nach Inkubation der Zellen mit PC22:0 und 20 μ M GW4869 ist im Vergleich zu PC22:0 und DMSO eine signifikante Erhöhung des verbleibenden humanen A β 40 auf 172,4% (\pm 27,5%, $p = 0,03$) zu verzeichnen, was wahrscheinlich auf die bekannte verringerte Exosomen-Sekretion in Anwesenheit von GW4869 und die damit einhergehende reduzierte Sekretion von IDE zurückzuführen ist (Abb. 35B).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der stimulierende Effekt von DHA auf die A β -Gesamtdegradation zumindest teilweise auf einer verstärkten exosomalen Sekretion von IDE basiert.

4.3.5 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE IDE-AKTIVITÄT

4.3.5.1 Direkter Effekt von EPA und DHA auf die Aktivität von rekombinantem IDE

Zur Untersuchung des direkten Effekts von EPA und DHA auf die IDE-Enzymaktivität wurde rekombinantes humanes IDE 15min lang mit 10 μ M PC20:5, PC22:6 oder den jeweiligen Kontrolllipiden *in vitro* inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrats und die Messung der IDE-Enzymaktivität unter Einfluss der verschiedenen Lipide (3.2.3.13.5).

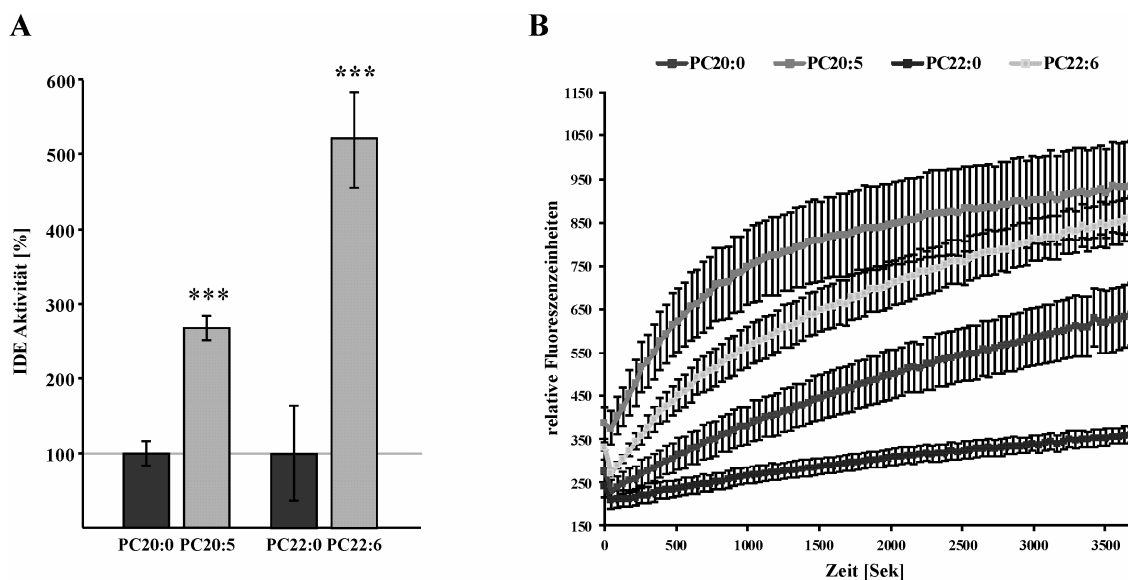


Abb. 36: Einfluss von EPA und DHA auf die Enzymaktivität von rekombinantem IDE

Enzymaktivität von rekombinantem IDE nach *in vitro*-Inkubation mit 10 μ M PC20:5, PC22:6 und den Kontrolllipiden PC20:0 und PC22:0 ($n = 6$). Rekombinantes humanes IDE wurde 15min lang mit 10 μ M PC *in vitro* vorinkubiert bevor die Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH und die Messung der Fluoreszenz erfolgte.

(A) Quantitative Bestimmung der Steigung der Fluoreszenz über den gesamten Messbereich.

(B) Kinetischer Verlauf der IDE-Enzymaktivität unter Einfluss von PC20:0, PC20:5, PC22:0 und PC22:6.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanz wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

(Abb. A modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Wie in Abb. 36 dargestellt, ist eine Steigerung der IDE-Enzymaktivität durch EPA und DHA festzustellen. Nach *in vitro*-Inkubation mit PC20:5 ist die IDE-Enzymaktivität im Vergleich zu PC20:0 signifikant auf 268,2% ($\pm 16,3\%$, $p \leq 0,001$) erhöht. In Anwesenheit von PC22:6 ist die Aktivität des Enzyms im Vergleich zu PC22:0 signifikant auf 520,8% ($\pm 63,7\%$, $p \leq 0,001$) gesteigert.

4.3.5.2 Bindung von EPA und DHA an rekombinantes IDE

Die in 4.3.5.1 nachgewiesene Beeinflussung der IDE-Enzymaktivität durch PC20:5 und PC22:6 könnte auf eine direkte Interaktion zwischen den Lipiden bzw. den Fettsäuren und dem Enzym oder dem Substrat hindeuten. Mittels Ko-Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse wurden die Bindungseigenschaften der verwendeten Lipide zu IDE analysiert. Hierzu wurde rekombinantes humanes IDE 15min lang mit Mischungen von PC20:5 und PC20:0 (jeweils $10\mu\text{M}$) bzw. von PC22:6 und PC22:0 (jeweils $10\mu\text{M}$) inkubiert. Nach Immunpräzipitation von IDE wurde das Verhältnis der ko-immunpräzipitierten Lipide mittels Massenspektrometrie bestimmt (3.2.4.2, 3.2.4.3.2). Da eine unspezifische Bindung der Lipide an die Protein-G-Sepharose wahrscheinlich ist, wurde das Experiment auch ohne rekombinantes IDE durchgeführt. Das in diesen Proben gemessene PC20:5/PC20:0- bzw. PC22:6/PC22:0-Verhältnis wurde als Hintergrundsignal auf 100% gesetzt.

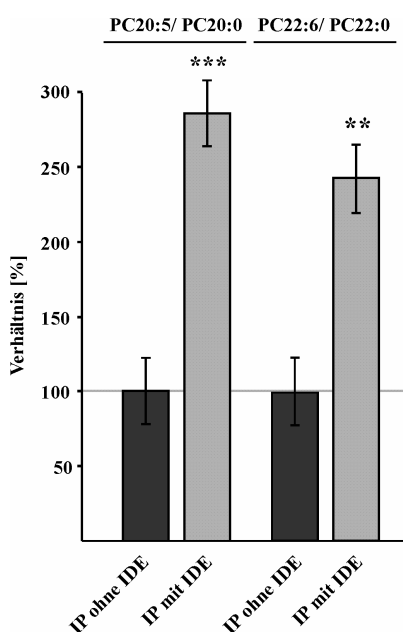


Abb. 37: Bindung von EPA und DHA an rekombinantes IDE

Quantitative Bestimmung des Verhältnisses von PC20:5 zu PC20:0 und von PC22:6 zu PC22:0 nach Ko-Immunpräzipitation (IP) mit rekombinantem IDE ($n = 4$). Rekombinantes humanes IDE wurde 15min lang mit Mischungen von PC20:5 und PC20:0 (jeweils $10\mu\text{M}$) bzw. von PC22:6 und PC22:0 (jeweils $10\mu\text{M}$) *in vitro*-inkubiert. Mittels Massenspektrometrie wurde das Verhältnis des ko-immunpräzipitierten PC20:5 bzw. PC22:6 zu PC20:0 bzw. PC22:0 ermittelt. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Lipidverhältnisse nach Ko-Immunpräzipitation in Abwesenheit von rekombinantem IDE verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2016b)

Wie in Abb. 37 gezeigt, ist das PC20:5/PC20:0- und das PC22:6/22:0-Verhältnis nach Ko-Immunpräzipitation mit IDE signifikant auf 285,7% ($\pm 22,1\%$, $p \leq 0,001$) bzw. auf 242,9% ($\pm 22,5\%$, $p = 0,004$) erhöht. Diese Daten belegen eine höhere Bindungsaffinität von EPA und DHA zu IDE als die in PC20:0 bzw. PC22:0 enthaltenen gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge. Als Ursache für die Steigerung der IDE-Enzymaktivität unter Einfluss von PC20:5 und PC22:6 (Abb. 36) kann demnach wahrscheinlich eine direkte Bindung von EPA und DHA an das Enzym angesehen werden. Da das PC20:5/PC20:0- und das PC22:6/22:0-Verhältnis nach Ko-Immunpräzipitation mit IDE vergleichbar ($p = 0,632$) stark erhöht ist (Abb. 37), sich der direkte Effekt von PC20:5 und PC22:6 auf die IDE-Enzymaktivität (Abb. 36) allerdings signifikant ($p \leq 0,001$) voneinander unterscheidet, ist davon auszugehen, dass der veränderten Enzymaktivität von IDE in Anwesenheit von PC20:5 bzw. PC22:6 zusätzlich weitere Mechanismen zugrunde liegen müssen (5.2.4).

4.4 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE A β -DEGRADATION

Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind Bestandteil eines Manuskripts, welches derzeit für die Publikation vorbereitet wird:

Grimm, M.O*., **Mett, J.*** et al. The effect of lauric acid and myristic acid in coconut oil on A β -homeostasis in Alzheimer's disease. *Manuscript in preparation.*

* *equally contributed*

Neben dem Sättigungsgrad können Fettsäuren auch in der Länge ihrer Kohlenstoffketten variieren. Der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf AD-relevante Mechanismen bzw. das AD-Risiko wurde bislang nicht umfassend analysiert. In einigen Studien konnte jedoch eine Beeinflussung der Sekretase-Aktivität durch die Länge der in Phospholipiden gebundenen Fettsäuren nachgewiesen werden (Grimm et al., 2013a; Holmes et al., 2012).

Im Folgenden wurde der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Degradation untersucht. In Analogie zu der Analyse des Effekts von EPA und DHA auf den enzymatischen A β -Abbau (4.3) wurden hierzu N2a-Zellen mit unterschiedlichen PC-Spezies inkubiert. Hierbei variierte die Länge der in PC gebundenen Fettsäuren und betrug zwischen 10 und 24 Kohlenstoffatomen (Tab. 10). Die Effekte der einzelnen Fettsäuren wurden mit Palmitinsäure (16:0), die zusammen mit Stearinsäure (18:0) und Ölsäure (18:1) zu den am häufigsten im Hirngewebe vorkommenden Fettsäuren zählt (Sastri, 1985), verglichen. Im Anschluss an die Untersuchungen im Zellkulturmodell wurde der Effekt von MCFAs auf die A β -Degradation auch *in vivo* in einem Tiermodell analysiert. Da Kokosnussöl eine charakteristische Fettsäurekomposition mit einem besonders hohen Gehalt an den MCFAs Laurinsäure (12:0) und Myristinsäure (14:0) aufweist (Tab. 7), wurden hierzu APP- und PS1-transgene Mäuse (APP^{swe}/PS1 Δ Exon9) über zehn Wochen mit einer kokosnussölreichen Diät bzw. einer Kontrolldiät gefüttert (3.1.4.2).

4.4.1 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE ZELLVIABILITÄT

Um den Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Degradation zu analysieren, war zunächst die Etablierung eines Zellkulturmodells erforderlich. Hierzu wurden N2a-Zellen über einen Zeitraum von 18Std mit den PC-Spezies unterschiedlicher Fettsäure-Kettenlänge (10 μ M) inkubiert (3.2.2.5.3). Die Viabilität der Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen PC-Spezies wurde nach Ermittlung der Zytotoxizität mittels LDH-Test berechnet (3.2.2.6).

Wie in Abb. 38 und Tab. 27 dargestellt, hat die Fettsäure-Kettenlänge keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen.

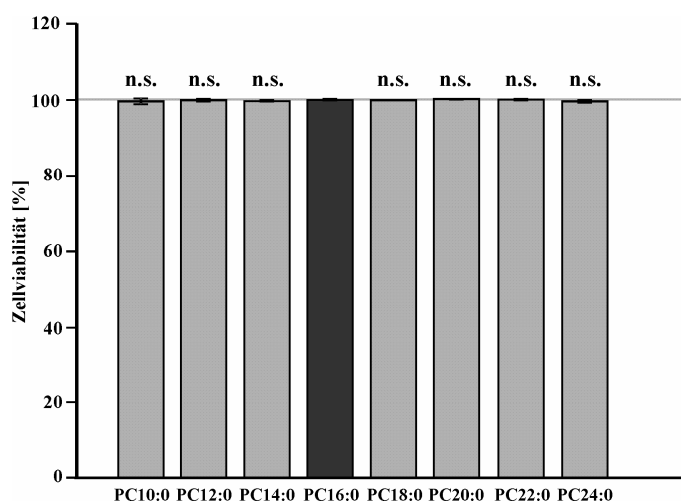


Abb. 38: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Viabilität von N2a-Zellen

Bestimmung der Viabilität von N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit 10 μ M PC10:0 - PC24:0 über einen Zeitraum von 18Std. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. Die Viabilität der Zellen wurde nach Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH-Test berechnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

Tab. 27: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Viabilität von N2a-Zellen

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Zellviabilität [% von PC16:0] | 99,6 | 99,9 | 99,7 | 99,9 | 100,2 | 99,6 | 100,1 |
| StabwM [%] | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,05 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,61 | 0,76 | 0,32 | 0,60 | 0,44 | 0,31 | 0,83 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

4.4.2 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE A β -GESAMTDEGRADATION

Der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Gesamtdegradation wurde wie in 3.2.3.12 beschrieben untersucht. Nach 18-stündiger Vorinkubation der N2a-Zellen mit 10 μ M PC10:0 – PC24:0 wurden die Zellen über einen Zeitraum von 6Std mit den entsprechenden PC-Spezies (10 μ M) in Kombination mit 0,5 μ g/ml synthetischem, humanem A β 40 inkubiert (3.2.2.5.3). Das Ergebnis der quantitativen Bestimmung der nach dieser Zeit verbleibenden humanen A β 40-Peptide in Abhängigkeit von der Fettsäure-Kettenlänge ist in Abb. 39A dargestellt.

Aus der Quantifizierung des verbleibenden humanen A β 40 ergibt sich im Vergleich zu PC16:0 ein signifikanter, stimulierender Effekt von MCFAs (PC10:0 - PC14:0) sowie eine inhibierende Wirkung der in PC22:0 und PC24:0 enthaltenen langkettigen Fettsäuren (engl. long chain fatty acids, LCFAs) auf den A β 40-Abbau. Nach Inkubation mit PC20:0 liegt ebenfalls eine Reduktion der A β -Degradation vor, der Effekt ist allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 39A, Tab. 28). Da PC16:0 aufgrund dessen, dass Palmitinsäure (16:0) zu den häufigsten im Hirngewebe vorkommenden gesättigten Fettsäuren zählt (Sastry, 1985), willkürlich als Kontrolllipid ausgewählt wurde, wurde auch die Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der A β -Degradation berechnet. Wie in Abb. 39B dargestellt, ergibt sich aus den Daten eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Menge des verbleibenden humanen A β 40 und der Kettenlänge der in PC enthaltenen Fettsäuren ($R^2 = 0,76$; $p = 0,005$).

A

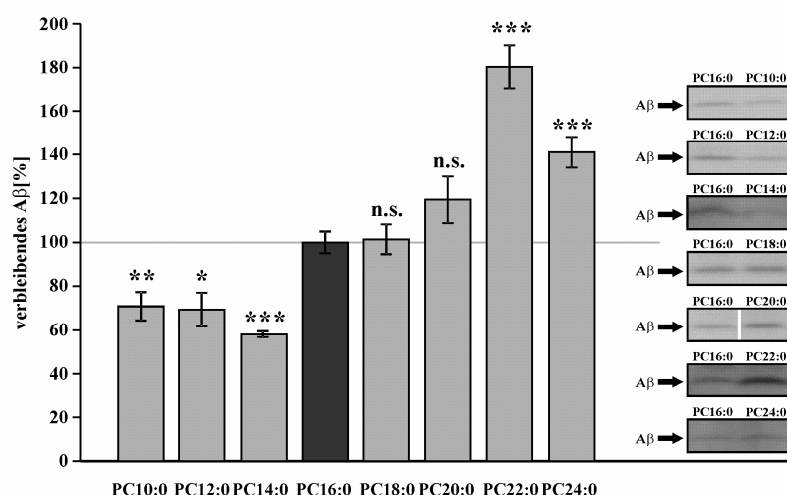


Abb. 39: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit 10μM PC10:0 – PC24:0. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. Die Zellen wurden 18Std mit 10μM PC und anschließend 6Std mit 10μM PC + 0,5μg/ml humanem Aβ40 inkubiert.

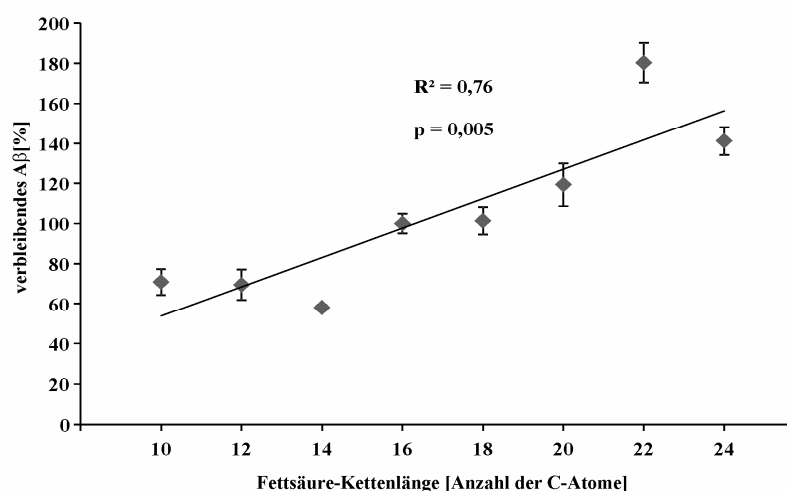
(A) Quantifizierung des verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

(B) Korrelation zwischen dem verbleibenden humanen Aβ40 und der Länge der in PC gebundenen Fettsäuren. $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, $p =$ Signifikanz der Korrelation.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

B



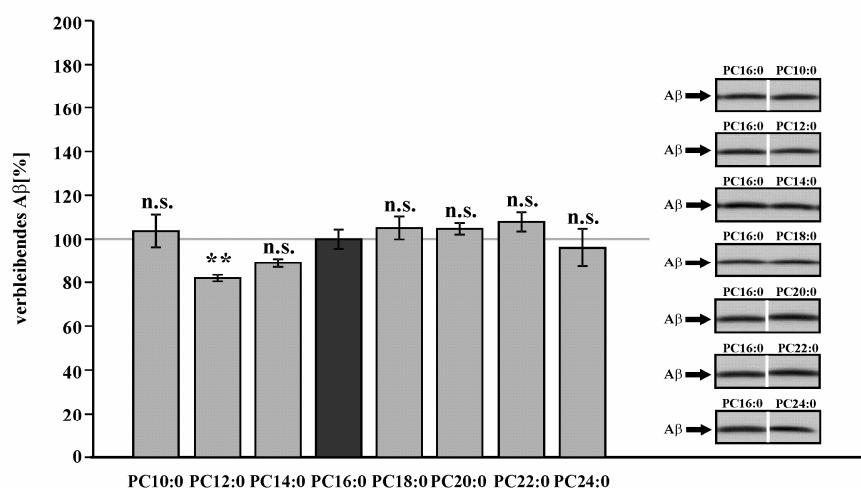
Tab. 28: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a-Zellen

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|---------------------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------------|
| verbleibendes Aβ [% von PC16:0] | 70,9 | 69,5 | 58,0 | 101,4 | 119,4 | 180,3 | 141,2 |
| StabwM [%] | 6,5 | 7,7 | 1,4 | 6,8 | 10,7 | 9,9 | 7,0 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,01 | 0,03 | $\leq 0,001$ | 0,87 | 0,20 | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ |
| n-Zahl | 5 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 6 |

Um zu überprüfen, ob eine Beeinflussung von IDE durch die Kettenlänge der Fettsäuren vorliegt, wurde die Analyse der Aβ40-Gesamtdegradation in Abhängigkeit von der Fettsäure-Kettenlänge wie oben beschrieben unter Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen (Abb. 30) wiederholt.

Bei der Inkubation von N2a IDE-Knockdown-Zellen zeigt im Vergleich zu PC16:0 nur PC12:0 einen signifikanten Effekt auf das verbleibende Aβ40, in Anwesenheit dieser PC-Spezies ist das humane Aβ40 signifikant auf 81,9% ($\pm 1,5\%$, $p = 0,01$) reduziert (Abb. 40A, Tab. 29). Wie in Abb. 40B dargestellt, konnte bei dieser Zelllinie keine Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der Aβ-Degradation festgestellt werden ($R^2 = 0,17$; $p = 0,31$).

A



B

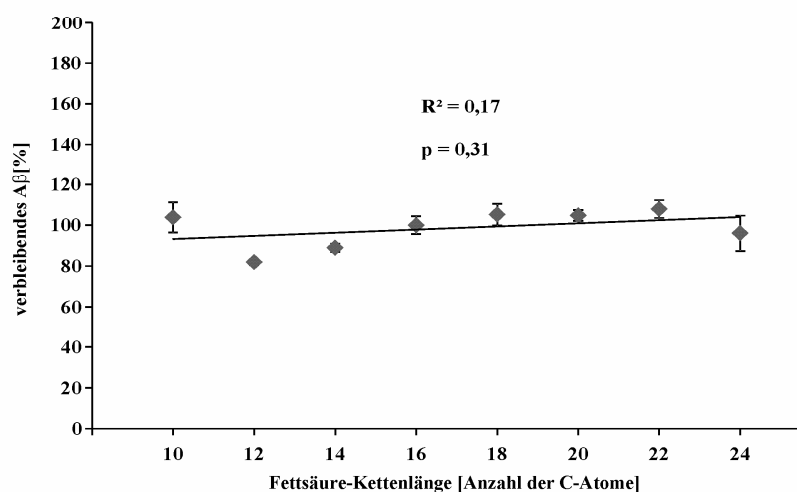


Abb. 40: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation in N2a IDE-KD nach Inkubation mit 10μM PC10:0 – PC24:0. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. Die Zellen wurden 18Std mit 10μM PC und anschließend 6Std mit 10μM PC + 0,5μg/ml humanem Aβ40 inkubiert. (A) Quantifizierung des verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** p ≤ 0,01).

(B) Korrelation zwischen dem verbleibenden humanen Aβ40 und der Länge der in PC gebundenen Fettsäuren. R² = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, p = Signifikanz der Korrelation. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. N2a IDE KD= N2a IDE-Knockdown-Zellen.

Tab. 29: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen

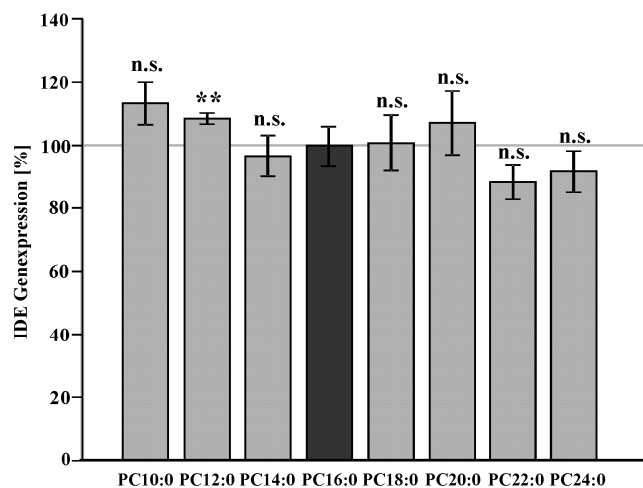
| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| verbleibendes Aβ [% von PC16:0] | 103,8 | 81,9 | 89,0 | 105,2 | 104,8 | 108,0 | 96,0 |
| StabwM [%] | 7,4 | 1,5 | 2,0 | 5,2 | 2,6 | 4,4 | 8,7 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,69 | 0,01 | 0,06 | 0,48 | 0,38 | 0,25 | 0,71 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Diese Daten deuten darauf hin, dass die beobachteten Fettsäure-Kettenlänge-abhängigen Effekte auf den Aβ40-Abbau auf eine Veränderung der IDE-Aktivität zurückzuführen sind. Im Folgenden wurde daher der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Genexpression, den Proteinspiegel und die Aktivität von IDE analysiert.

4.4.3 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE IDE-GENEXPRESSION

Die Kettenlänge-abhängige Auswirkung der in PC enthaltenen Fettsäuren auf die Genexpression von IDE wurde mittels RT-PCR (3.2.1.5) nach Inkubation der N2a-Zellen mit PC10:0 – PC24:0 untersucht (3.2.2.5.3).

A



B

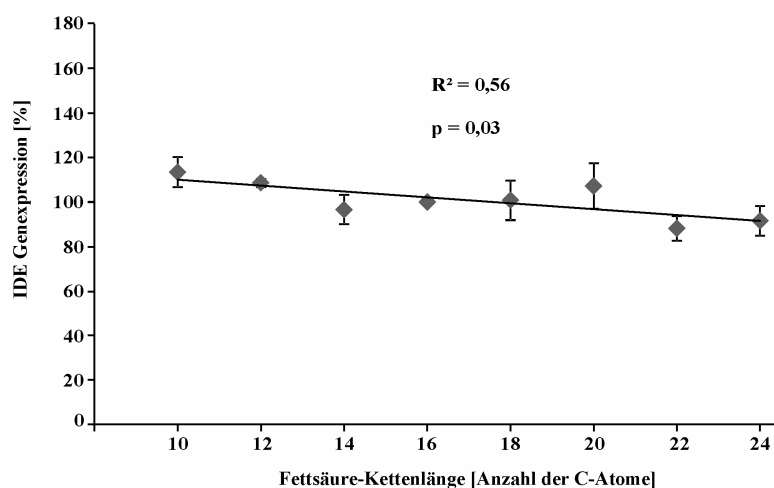


Abb. 41: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der IDE-Genexpression in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit PC10:0 – PC24:0. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. Die Zellen wurden vor der RNS-Isolation über einen Zeitraum von 18Std mit 10 μ M PC inkubiert.

(A) IDE-Genexpression in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit 10 μ M PC10:0 – PC24:0 mittels RT-PCR. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$).

(B) Korrelation zwischen der IDE-Genexpression und der Länge der in PC gebundenen Fettsäuren. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, p = Signifikanz der Korrelation.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

Tab. 30: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression in N2a-Zellen

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| IDE-Expression [% von PC16:0] | 113,3 | 108,5 | 96,6 | 100,7 | 107,1 | 88,2 | 91,6 |
| StabwM [%] | 6,7 | 1,8 | 6,5 | 8,9 | 10,2 | 5,4 | 6,6 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,09 | 0,003 | 0,61 | 0,94 | 0,51 | 0,07 | 0,25 |
| n-Zahl | 4 | 4 | 7 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Die Genexpression von IDE ist nach Inkubation mit PC12:0 signifikant erhöht ($108,5\% \pm 1,8\%$, $p = 0,003$). Während die Supplementierung von PC10:0 ebenfalls zu einer tendenziell gesteigerten IDE-Genexpression führt ($113,3\% \pm 6,7\%$, $p = 0,09$), ist diese nach Behandlung der Zellen mit PC22:0 tendenziell reduziert ($88,2\% \pm 5,4\%$, $p = 0,07$). Die Effekte von PC10:0 und PC22:0 sind allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 41A, Tab. 30).

Wie in Abb. 41B dargestellt, besteht eine schwache, aber dennoch signifikante ($p = 0,03$) Korrelation zwischen der Genexpression von IDE und der Fettsäure-Kettenlänge. Die einzelnen Fettsäuren bewirken allerdings nur geringe und meist nicht signifikante Veränderungen der IDE-Genexpression, weshalb davon auszugehen ist, dass die Fettsäure-Kettenlänge-abhängigen Effekte auf die A β -Gesamtdegradation (Abb. 39) nur bedingt auf eine Beeinflussung der Genexpression von IDE zurückzuführen sind.

4.4.4 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE SEKRETION VON IDE

Neben der Genexpression könnte sich die Fettsäure-Kettenlänge auch auf den IDE-Proteingehalt durch Veränderungen der Proteininstabilität oder von Protein-Transportprozessen auswirken. Um dies zu untersuchen, wurde mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) der IDE-Proteingehalt im Zellkulturmedium (3.2.3.2) und in den Lysaten (3.2.3.4) von N2a-Zellen nach Inkubation mit PC-Spezies unterschiedlicher Fettsäure-Kettenlänge (3.2.2.5.3) bestimmt.

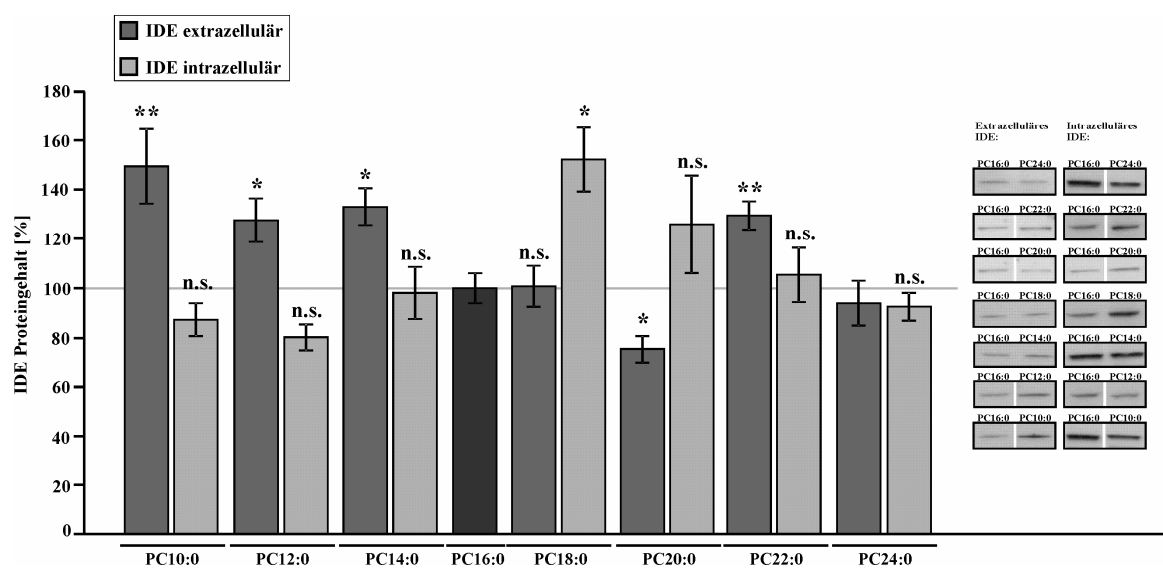


Abb. 42: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen
Quantitative Bestimmung des IDE-Proteingehalts in den Lysaten und im Kulturmedium von N2a WT (mock)-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit $10\mu\text{M}$ PC10:0 – PC24:0 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ST1120. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen.

Tab. 31: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Extrazellulärer IDE-Gehalt [% von PC16:0] | 149,5 | 127,6 | 133,0 | 100,8 | 75,3 | 129,4 | 94,0 |
| StabwM [%] | 15,2 | 8,9 | 7,5 | 8,2 | 5,5 | 5,7 | 9,0 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,94 | 0,03 | 0,01 | 0,60 |
| n-Zahl | 6 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| Intrazellulärer IDE-Gehalt [% von PC16:0] | 87,4 | 80,3 | 98,1 | 152,2 | 125,9 | 105,4 | 92,6 |
| StabwM [%] | 6,6 | 10,0 | 10,4 | 13,0 | 19,8 | 10,9 | 5,5 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,19 | 0,17 | 0,88 | 0,04 | 0,32 | 0,68 | 0,37 |
| n-Zahl | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| Quotient extrazellulärer/ intrazellulärer IDE-Gehalt | 1,71 | 1,59 | 1,36 | 0,66 | 0,60 | 1,23 | 1,02 |

Im Vergleich zu PC16:0 bewirken PC-Spezies mit MCFAs (PC10:0-PC14:0) einen signifikanten Anstieg des im Kulturmedium der Zellen vorhandenen IDE-Proteingehalts. Gleichzeitig ist eine statistisch nicht signifikante Reduktion des intrazellulär lokalisierten IDEs unter Einfluss von PC10:0 und PC12:0 zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigen LCFAs keinen einheitlichen Effekt auf die intra- und extrazellulären IDE-Spiegel. Die Inkubation mit PC18:0 und PC20:0 resultiert in einem gesteigerten intrazellulären IDE-Gehalt, der Gehalt an extrazellulär lokalisiertem IDE ist nach Inkubation mit PC18:0 unverändert und im Fall von PC20:0 signifikant reduziert. Die Behandlung der Zellen mit PC22:0 führt zu einer signifikanten Erhöhung des extrazellulären IDEs bei unverändertem intrazellulärem IDE-Proteinspiegel. Unter Einfluss von PC24:0 ist weder der intra- noch der extrazelluläre IDE-Proteingehalt signifikant verändert (Abb. 42, Tab. 31).

Zur besseren Einschätzung des Effekts der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Sekretion wurde der Quotient aus dem extrazellulären und dem intrazellulären IDE-Proteingehalt nach Behandlung der Zellen mit PC-Spezies unterschiedlicher Fettsäure-Kettenlänge gebildet. Im Bereich einer Fettsäure-Kettenlänge von 10 bis 20 Kohlenstoffatomen nimmt das Verhältnis zwischen extra- und intrazellulärem IDE-Proteingehalt stetig ab (Tab. 31), was auf eine Steigerung der IDE-Sekretion mit abnehmender Fettsäure-Kettenlänge hinweist.

Im Folgenden wurde überprüft, ob diese Effekte IDE-spezifisch sind oder ob generell eine Beeinflussung der Proteinsekretion durch die Fettsäure-Kettenlänge vorliegt. Hierzu wurden N2a-Zellen transient mit einem für SEAP kodierenden Plasmid transfiziert (3.2.2.3) und anschließend mit PC-Spezies unterschiedlicher Fettsäure-Kettenlänge inkubiert (3.2.2.5.3). Bei der SEAP handelt es sich um die verkürzte Form der alkalischen Phosphatase, die von den Zellen aufgrund des fehlenden Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers über den klassischen Sekretionsweg in sekretorischen Vesikeln sezerniert wird. Zur Messung der SEAP-Aktivität im Kulturmedium der behandelten Zellen wurde wie in 3.2.2.7 beschrieben vorgegangen.

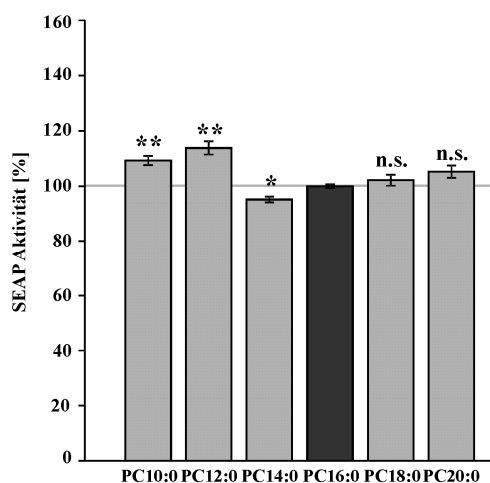


Abb. 43: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der SEAP-Aktivität im Kulturmedium von N2a WT-Zellen nach transienter Transfektion mit einem für SEAP kodierenden Plasmid und 18-stündiger Inkubation mit 10µM PC10:0 - PC20:0. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. Die SEAP-Aktivität im Kulturmedium der inkubierten Zellen wurde mittels SEAP-Aktivitätsassay ermittelt.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

N2a WT = N2a Wildtyp-Zellen.

Tab. 32: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Kulturmedium von N2a-Zellen

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| SEAP-Aktivität [% von PC16:0] | 109,2 | 113,8 | 95,1 | 102,2 | 105,3 |
| StabwM [%] | 1,7 | 2,4 | 1,0 | 2,0 | 2,2 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,01 | 0,01 | 0,04 | 0,36 | 0,08 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Wie in Abb. 43 und Tab. 32 dargestellt, wird auch die SEAP-Sekretion leicht durch die Fettsäure-Kettenlänge beeinflusst. Nach Behandlung der Zellen mit PC10:0 und PC12:0 ist im Vergleich zu PC16:0 eine signifikant auf 109,2% ($\pm 1,7\%$, $p = 0,01$) bzw. 113,8% ($\pm 2,4\%$, $p = 0,01$) gesteigerte SEAP-Aktivität im Kulturmedium der Zellen nachweisbar. PC14:0 bewirkt eine leichte Reduktion der SEAP-Aktivität, PC18:0 und PC20:0 haben im Vergleich zu PC16:0 hingegen keinen Effekt auf die Sekretion der SEAP.

Um die Auswirkungen der Fettsäure-Kettenlänge auf die Proteinsekretion über das TGN und die IDE-spezifische Proteinsekretion besser vergleichen zu können, wurden die Korrelationen zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und des Quotienten aus extrazellulärem und intrazellulärem IDE-Proteingehalt bzw. der extrazellulären SEAP-Aktivität berechnet.

Im Bereich von PC10:0 bis PC20:0 liegt eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und dem Quotienten aus extra- und intrazellulärem IDE-Gehalt vor ($R^2 = 0,97$; $p \leq 0,001$) (Abb. 44A). Trotz des signifikanten Effekts einzelner PC-Spezies auf die SEAP-Sekretion (Abb. 43) konnte hingegen keine Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der Sekretion von SEAP festgestellt werden ($R^2 = 0,16$; $p = 0,43$) (Abb. 44A). Eine Abnahme der Fettsäure-Kettenlänge bewirkt demzufolge eine spezifische Steigerung der Sekretion von IDE.

Wie in Abb. 44B dargestellt, korreliert der für PC10:0 bis PC20:0 berechnete Quotient aus extra- und intrazellulärem IDE-Gehalt des Weiteren negativ mit der in Abb. 39A gezeigten Menge des verbleibenden humanen A β 40 bei Bestimmung der Gesamt-A β -Degradation in N2a-Zellen ($R^2 = 0,78$; $p = 0,02$).

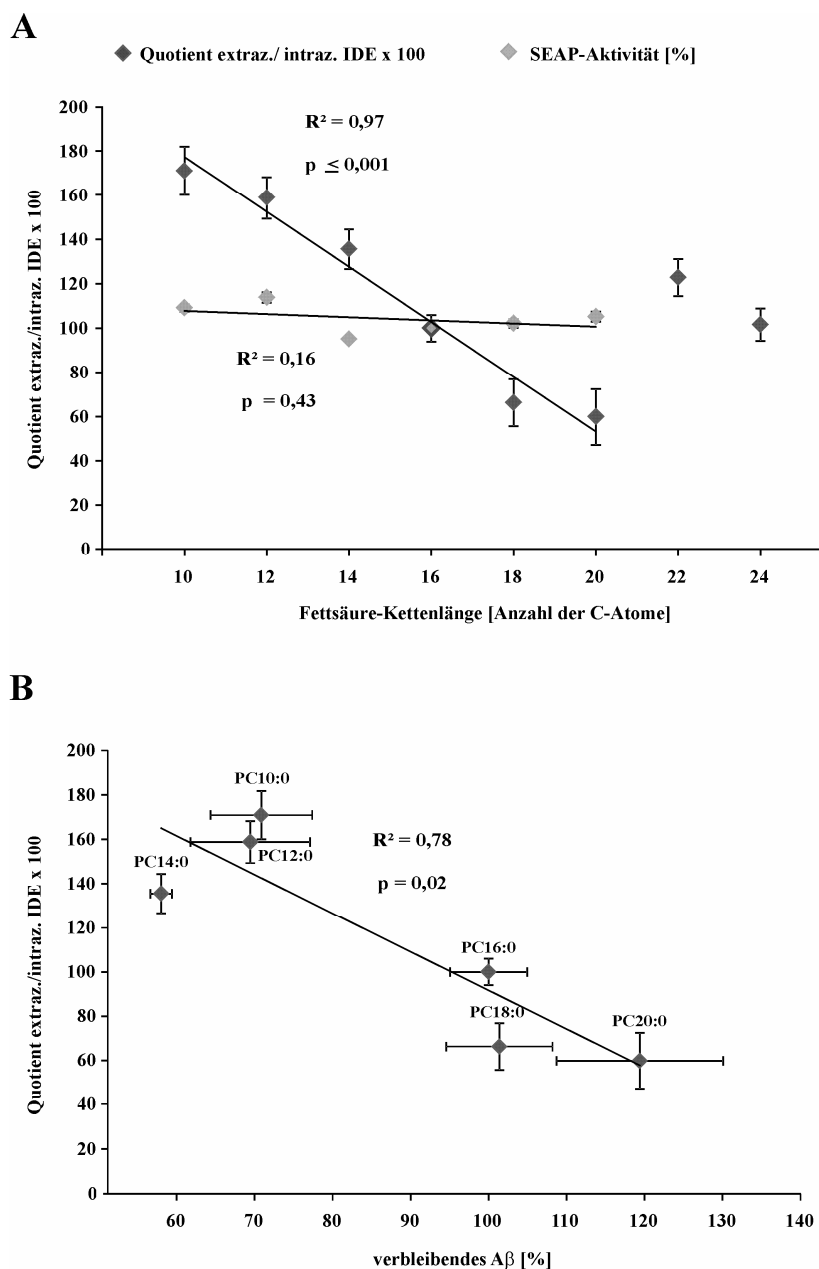


Abb. 44: Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der IDE-Sekretion bzw. der Gesamt-Aβ-Degradation in N2a-Zellen

(A) Korrelation der Fettsäure-Kettenlänge der verwendeten PC-Spezies mit dem Quotienten aus extra- und intrazellulärem IDE-Proteingehalt bzw. mit der extrazellulären SEAP-Aktivität im Bereich von PC10:0 – PC20:0. Zusätzlich ist das Verhältnis aus extra- und intrazellulärem IDE-Proteingehalt für PC22:0 und PC24:0 eingetragen.

(B) Korrelation zwischen dem Quotienten aus extra- und intrazellulärem IDE-Proteingehalt und des bei der Bestimmung der Gesamt-Aβ-Degradation verbleibenden humanen Aβ40 im Bereich von PC10:0 – PC20:0.

Die Fehlerbalken zeigen jeweils die mittlere Standardabweichung. Die vertikalen Fehlerindikatoren zeigen den Mittelwert der Standardabweichung des extra- und intrazellulären IDE-Proteingehalts.

R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, p = Signifikanz der Korrelation.

Obwohl eine signifikante Korrelation nicht mit einer Kausalität gleichgesetzt werden darf, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die positive Wirkung der MCFAs in PC10:0 bis PC14:0 bzw. der leicht inhibierende Einfluss von PC20:0 auf die Gesamt-Aβ-Degradation auf einer mit steigender Fettsäure-Kettenlänge stetig abnehmenden IDE-Sekretion basieren könnte. Der Inhibition der Aβ-Degradation unter Einfluss von PC22:0 und PC24:0 (Abb. 39 A, Tab. 28) scheint allerdings ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der direkte Effekt der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Enzymaktivität analysiert.

4.4.5 EINFLUSS DER FETTSÄURE-KETTENLÄNGE AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT VON REKOMBINANTEM IDE

Zur Untersuchung des direkten Effekts der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Aktivität wurde rekombinantes humanes IDE vor der Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH 15min lang *in vitro* mit PC unterschiedlicher Fettsäure-Kettenlänge vorinkubiert. Das genaue Vorgehen ist in 3.2.3.13.5 beschrieben.

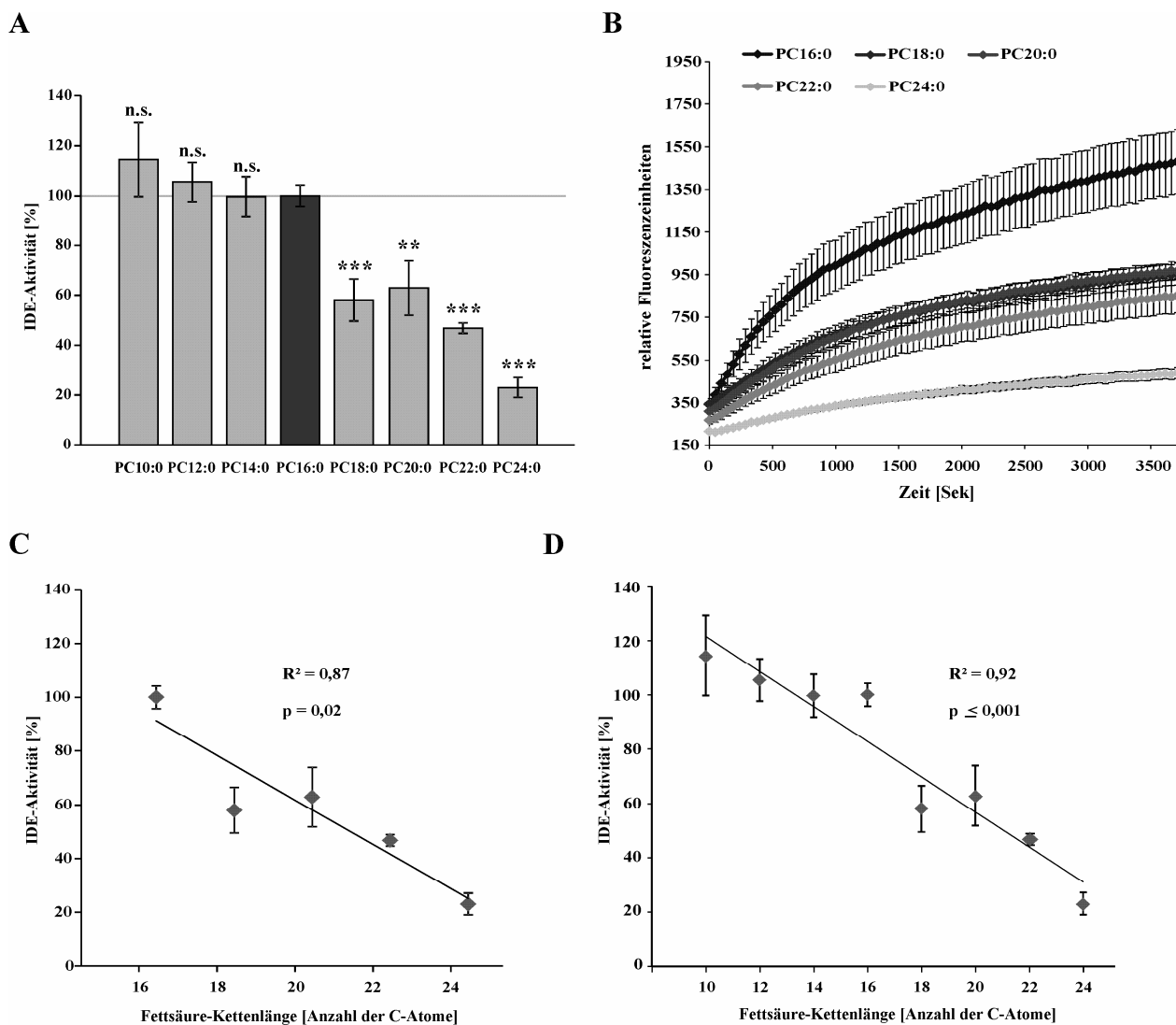


Abb. 45: Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Enzymaktivität

Enzymaktivität von rekombinatem IDE nach *in vitro*-Inkubation mit 10 μ M PC10:0 - PC24:0. Rekombinantes humanes IDE wurde 15min lang mit 10 μ M PC *in vitro* vorinkubiert bevor die Zugabe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH und die Messung der Fluoreszenz erfolgte. Als Kontrolllipid wurde PC16:0 verwendet. (A) Quantitative Bestimmung der Steigung der Fluoreszenz über den gesamten Messbereich. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (B) Kinetischer Verlauf der IDE-Enzymaktivität unter Einfluss von PC16:0 – 24:0. (C) Korrelation zwischen der IDE-Enzymaktivität und der Fettsäure-Kettenlänge im Bereich von PC16:0 – PC24:0. (D) Korrelation zwischen der IDE-Enzymaktivität und der Fettsäure-Kettenlänge im Bereich von PC10:0 – PC24:0. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, p = Signifikanz der Korrelation.

Tab. 33: Statistik des Einflusses der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aktivität von rekombinantem IDE

| | PC10:0 | PC12:0 | PC14:0 | PC18:0 | PC20:0 | PC22:0 | PC24:0 |
|------------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|
| IDE-Aktivität [% von PC16:0] | 114,5 | 105,5 | 99,7 | 58,0 | 62,9 | 46,7 | 23,0 |
| StabwM [%] | 14,8 | 7,8 | 7,9 | 8,5 | 11,0 | 2,1 | 4,0 |
| Signifikanz [zu PC16:0] | 0,37 | 0,55 | 0,97 | ≤ 0,001 | 0,01 | ≤ 0,001 | ≤ 0,001 |
| n-Zahl | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

Während MCFAs im Vergleich zu dem Kontrolllipid PC16:0 keinen statistisch signifikanten Effekt auf die IDE-Aktivität haben, weisen alle PC-Spezies mit LCFAs eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des Enzyms auf. Die stärksten Effekte haben hierbei PC22:0 und PC24:0, die im Vergleich zu PC16:0 eine signifikante Reduktion der IDE-Enzymaktivität auf 46,7% bzw. 23,0% bewirken (Abb. 45A + B, Tab. 33). Wie in Abb. 45C dargestellt, besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der IDE-Aktivität im Bereich von PC16:0 bis PC24:0 ($R^2 = 0,87$; $p = 0,02$). Trotz des statistisch nicht signifikanten Effekts von PC10:0, PC12:0 und PC14:0 auf die IDE-Enzymaktivität bei Vergleich mit PC16:0 kann auch bei Inklusion der MCFAs eine signifikante Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der IDE-Enzymaktivität festgestellt werden ($R^2 = 0,92$; $p \leq 0,001$) (Abb. 45 D). Der direkte, inhibierende Effekt von LCFAs auf die IDE-Aktivität stellt eine mögliche Erklärung für die verringerte A β -Gesamtdegradation unter Einfluss von PC22:0 und PC24:0 (Abb. 39A, Tab. 28) dar.

4.4.6 EINFLUSS EINER MIT MITTELKETTIGEN FETTSÄUREN ANGEREICHERTEN DIÄT AUF DIE A β -DEGRADATION IM APPSWE/PS1 Δ EXON9-MAUSMODELL

In den vorherigen Abschnitten konnte eine positive Beeinflussung der A β -Degradation durch MCFAs in einem Zellkulturmodell gezeigt werden. Der diesen Effekten zugrunde liegende Mechanismus stellt eine verstärkte Sekretion von IDE in den Extrazellulärraum dar, welche zu einer gesteigerten Degradation der extrazellulär lokalisierten A β -Peptide führt.

Um die Relevanz dieses Mechanismus auch *in vivo* zu überprüfen, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Heikki Tanila (Kuopio, Finnland) eine Fütterungsstudie durchgeführt. Hierbei wurden neun acht Wochen alte APPSwe/PS1 Δ E9-Mäuse über einen Zeitraum von zehn Wochen mit Kokosnussöl-angereichertem Futtermittel gefüttert. Da Kokosnussöl einen hohen Anteil an MCFAs aufweist (Tab. 7), sollte die kokosnussölreiche Diät zu einem erhöhten Gehalt dieser Fettsäuren im Körper der Tiere führen. Eine zweite Gruppe von neun Mäusen erhielt als Vergleichsdiät ein isokalorisches, mit Sonnenblumenöl angereichertes Futtermittel, welches über einen hohen Anteil an Ölsäure (18:1) verfügt. Die genaue Diätzusammensetzung und die Vorgehensweise des Fütterungsexperiments sind in 3.1.4.2 beschrieben. Nach der Tötung der Tiere wurden für die folgenden Analysen das Hirngewebe sowie das Serum verwendet.

4.4.6.1 Überprüfung der Aufnahme und Metabolisierung mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussölreichen Diät durch APPSwe/PS1 Δ Exon9-Mäuse

Bei Laurinsäure (12:0) und Myristinsäure (14:0) handelt es sich um die am häufigsten in Kokosnussöl vorkommenden Fettsäuren (Tab. 7). Zur Überprüfung der Aufnahme dieser Fettsäuren aus der mit Kokosnussöl angereicherten Diät wurden die frontalen Kortizes und das Serum der entsprechend gefütterten Tiere mittels Massenspektrometrie auf den Gehalt an Laurinsäure (12:0) und Myristinsäure (14:0) hin untersucht (3.2.4.3.1). Als Kontrollen dienten die mit der Vergleichsdiät gefütterten Tiere. In

den Proben wurde der Gehalt von PCaa30:0, Lyso-PCa12:0, Lyso-PCa14:0 sowie der Carnitine C12:0 und C14:0 bestimmt. PCaa30:0 repräsentiert u.a. PC-Spezies, in denen Glycerin mit Laurin (12:0)- bzw. Myristinsäure (14:0) in Kombination mit den am häufigsten vorkommenden Fettsäuren Palmitin (16:0)- und Stearinsäure (18:0) (Berg et al., 2002; Sastry, 1985) verestert ist. Lyso-PCa12:0 und Lyso-PCa14:0 werden nach der Hydrolyse der Fettsäuren durch die Aktivität von Phospholipasen aus den entsprechenden PC-Spezies gebildet. Die Carnitine C12:0 und C14:0 entstehen während des Transports der Fettsäuren in die Mitochondrien, wo deren Abbau durch die β -Oxidation stattfindet. Da das Hirnmaterial stark limitierend war, wurden für die Analysen die Homogenate der frontalen Kortizes von jeweils drei Tieren aus einer Gruppe vereinigt. Als Kontrolle wurden die Proben auch auf ihren Palmitinsäure (16:0)- und Stearinsäure (18:0)-Gehalt hin untersucht, welcher von der Kokosnussöl angereicherten Diät nicht beeinflusst sein sollte.

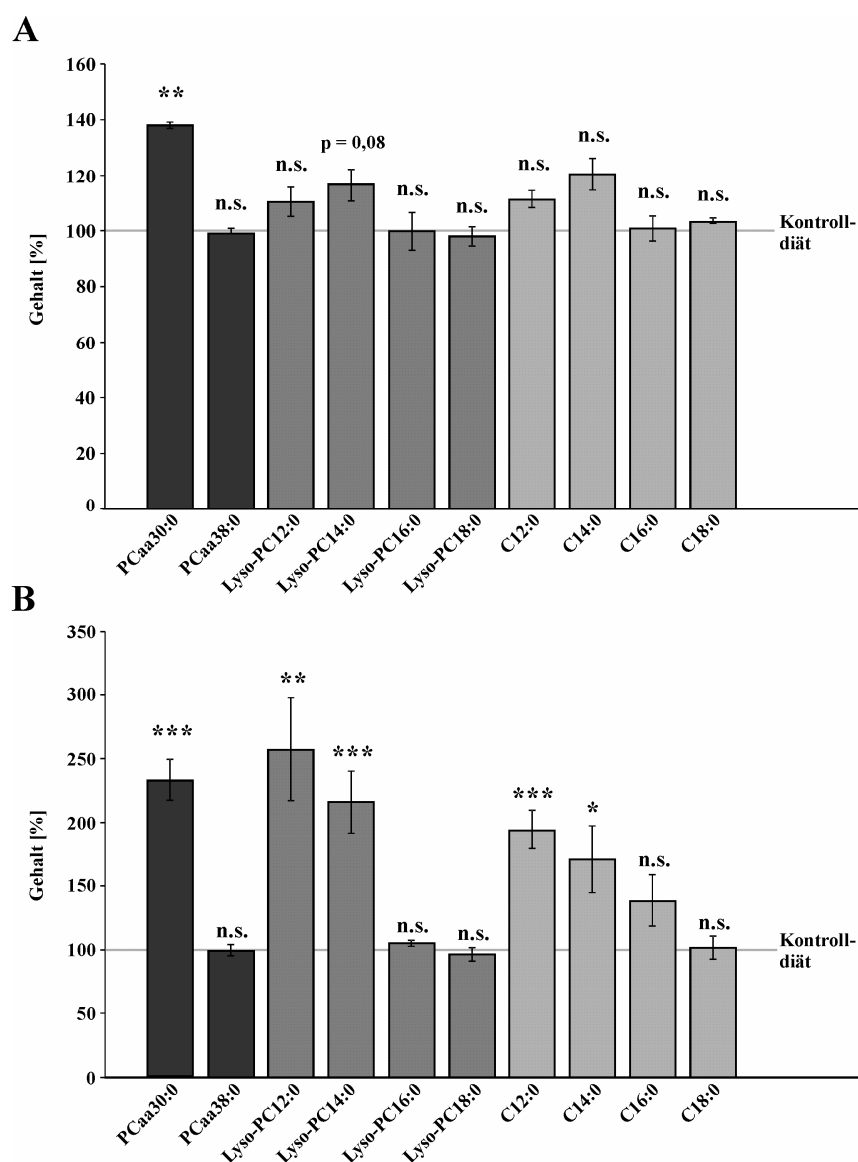


Abb. 46: Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussölreichen Diät in das Hirngewebe und das Serum von APPsw/PS1 Δ Exon9-Mäusen

Quantitative Bestimmung von PCaa30:0, Lyso-PCa12:0, Lyso-PCa14:0 und der Carnitine C12:0 bzw. C14:0 im (A) frontalen Kortex (n = 3, vereinigte Homogenate der frontalen Kortizes von jeweils drei Tieren) und (B) Serum (n = 5) von APPsw/PS1 Δ Exon9-Mäusen nach Verabreichung einer mit Kokosnussöl angereicherten Diät im Vergleich zur Kontrolldiät mittels Massenspektrometrie. Zusätzlich ist der Gehalt von PCaa38:0, Lyso-PCa16:0, Lyso-PCa18:0 und der Carnitine C16:0 bzw. C18:0 dargestellt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von zehn Wochen mit einer mit Kokosnuss- oder Sonnenblumenöl angereicherten Diät gefüttert.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

APPsw/PS1 Δ Exon9-Mäuse = Mäuse mit kombinierter Expression von APP mit der „swedish“-Doppelmutation (APPsw, K670N/M671L) und PS1 mit Deletion des Exons 9 (PS1 Δ E9).

Tab. 34: Statistik der Aufnahme mittelkettiger Fettsäuren aus einer kokosnussölreichen Diät in das Hirngewebe und das Serum von APP^{swe}/PS1 Δ Exon9-Mäusen

| | PCaa30:0 | Lyso-PCa12:0 | Lyso-PCa14:0 | Carnitin C12:0 | Carnitin C14:0 |
|--|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Gehalt im frontalen Kortex [% von Kontrolle] | 138,0 | 110,4 | 116,6 | 111,2 | 120,4 |
| StabwM [%] | 1,2 | 5,2 | 5,7 | 3,1 | 5,8 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,004 | 0,51 | 0,08 | 0,13 | 0,18 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Gehalt im Serum [% von Kontrolle] | 232,0 | 256,9 | 216,11 | 194,0 | 170,7 |
| StabwM [%] | 16,0 | 40,2 | 24,3 | 15,3 | 26,4 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | $\leq 0,001$ | 0,007 | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | 0,05 |
| n-Zahl | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | PCaa38:0 | Lyso-PCa16:0 | Lyso-PCa18:0 | Carnitin C16:0 | Carnitin C18:0 |
| Gehalt im frontalen Kortex [% von Kontrolle] | 98,9 | 99,8 | 98,0 | 100,8 | 103,2 |
| StabwM [%] | 1,8 | 6,7 | 3,5 | 4,5 | 1,0 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,88 | 0,98 | 0,77 | 0,94 | 0,76 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Gehalt im Serum [% von Kontrolle] | 99,1 | 105,1 | 96,5 | 138,1 | 101,5 |
| StabwM [%] | 4,3 | 2,3 | 5,3 | 20,1 | 9,1 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,87 | 0,22 | 0,60 | 0,19 | 0,93 |
| n-Zahl | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

Nach der Supplementierung von Kokosnussöl ist im frontalen Kortex der Tiere ein erhöhter Gehalt an PCaa30:0, Lyso-PCa12:0, Lyso-PCa14:0, Carnitin C12:0 und Carnitin C14:0 festzustellen, wobei jedoch nur der Effekt auf PCaa30:0 statistisch signifikant ist. Im Serum der Tiere liegt nach Verabreichung der kokosnussölreichen Diät ein signifikant gesteigerter Gehalt an PCaa30:0, Lyso-PCa12:0, Lyso-PCa14:0, Carnitin C12:0 und Carnitin C14:0 vor. Im Gegensatz dazu hat die mit Kokosnussöl angereicherte Diät im Vergleich zur Kontrolldiät keinen Einfluss auf den PCaa38:0-, Lyso-PCa16:0-, Lyso-PCa18:0-, Carnitin C16:0- und Carnitin C18:0-Spiegel im frontalen Kortex. Auch im Serum der Tiere sind diese Lipidspezies unverändert (Abb. 46, Tab. 34).

Insgesamt ist also sowohl im Hirngewebe als auch im Serum der Mäuse nach Supplementierung von Kokosnussöl ein tendenziell erhöhter Gehalt der untersuchten Laurinsäure (12:0)- bzw. Myristinsäure (14:0)-enthaltenden Lipidspezies nachzuweisen. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt der betrachteten Palmitin (16:0)- und Stearinsäure (18:0)-enthaltenden Lipide im Hirngewebe und im Serum der Tiere weitestgehend unverändert. Aufgrund dieser Daten ist von einer effizienten und spezifischen Aufnahme von MCFAs aus dem mit Kokosnussöl angereicherten Futtermittel durch die APP^{swe}/PS1 Δ Exon9-Mäuse sowie von einer effizienten Metabolisierung der Fettsäuren auszugehen.

4.4.6.2 Einfluss einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten Diät auf den Gehalt an löslichem A β im Gehirn von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen

Da die Messung der IDE-Sekretion im Hirngewebe der mit Kokosnussöl-angereicherter Diät gefütterten Tiere experimentell nicht möglich war, sollte an dieser Stelle analysiert werden, ob sich die kokosnussölreiche Diät *in vivo* auf den Gehalt an löslichem A β im Gehirn der entsprechend gefütterten Tiere auswirkt. Hierzu wurde der A β 40- und A β 42-Gehalt im frontalen Kortex der mit Kokosnuss- bzw. Sonnenblumenöl angereicherter Diät gefütterten APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäuse mittels A β 40- bzw. A β 42-ELISA quantitativ bestimmt (3.2.3.11). Da das Hirnmaterial der einzelnen Tiere nicht ausreichend für diese Methode war, wurden die Homogenate der frontalen Kortizes von jeweils 3 Tieren aus einer Gruppe vereinigt.

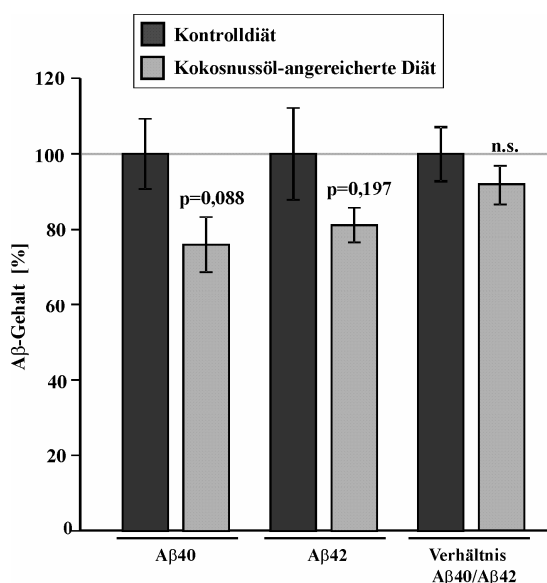


Abb. 47: Einfluss einer kokosnussölreichen Diät auf den Gehalt an löslichem A β 40 und A β 42 im frontalen Kortex von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen

Quantitative Bestimmung des A β 40- und A β 42-Gehalts und des A β 40/A β 42-Verhältnisses im frontalen Kortex der mit kokosnussölreicher Diät oder Kontrolldiät gefütterten APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäuse mittels ELISA (n = 3, vereinigte Homogenate der frontalen Kortizes von jeweils 3 Tieren). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von zehn Wochen mit einer mit Kokosnuss- oder Sonnenblumenöl angereicherten Diät gefüttert. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäuse = Mäuse mit kombinierter Expression von APP mit der „swedish“-Doppelmutation (APPswe, K670N/M671L) und PS1 mit Deletion des Exons 9 (PS1 Δ E9).

Die mit Kokosnussöl angereicherte Diät bewirkt im Vergleich zur Kontrolldiät eine tendenzielle Reduktion des Gehalts an löslichem A β 40 auf 76,1% (\pm 7,3%, p = 0,088) sowie eine statistisch nicht signifikante Verringerung des Gehalts an löslichem A β 42 auf 81,2% (\pm 4,6%, p = 0,197) im frontalen Kortex der APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäuse. Das Verhältnis zwischen A β 40 und A β 42 ist infolge der mit Kokosnussöl angereicherten Diät im Vergleich zur Kontrolldiät nicht verändert (Abb. 47).

4.4.6.3 Einfluss einer mit mittelkettigen Fettsäuren angereicherten Diät auf die IDE-Enzymaktivität im Serum von APPswe/PS1 Δ Exon9-Mäusen

Wie in Abb. 42 dargestellt, stimulieren MCFAs in N2a-Zellen die Sekretion von IDE in den Extrazellulärraum. IDE ist als sezerniertes Protein auch in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Serum von Menschen nachweisbar (Liu et al., 2012; Qiu et al., 1998). Im Folgenden wurde der Einfluss der kokosnussölreichen Diät auf die IDE-Aktivität im Serum des APPswe/PS1 Δ Exon9-Mausmodells analysiert (3.2.3.13.4). Wie von Liu et al. unter Verwendung des gleichen Substrats und humanem Serum festgestellt, ist die hierbei gemessene Substratumsetzung überwiegend auf die enzymatische Aktivität von IDE und ACE zurückzuführen (Liu et al., 2012). Aus diesem Grund wurde von den einzelnen Messwerten die nach Zugabe des IDE-Inhibitors NEM (IC₅₀: 220 μ M (Leissring et al., 2010)) gemessene durchschnittliche Unspezifität subtrahiert. Falls auch *in vivo* eine Stimulation der IDE-Sekretion durch

MCFAs vorliegt, wäre nach Verabreichung der kokosnussölreichen Diät von einer gesteigerten IDE-Aktivität im Serum der Tiere auszugehen.

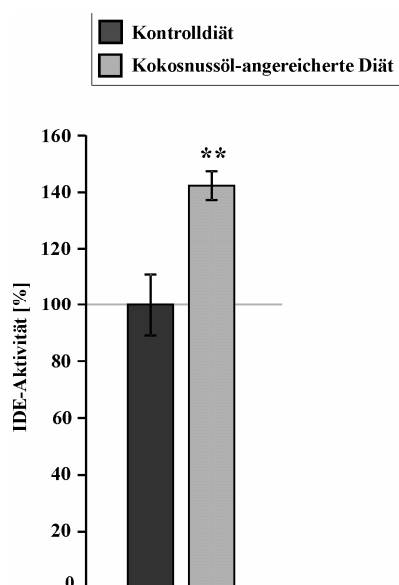


Abb. 48: Einfluss einer kokosnussölreichen Diät auf die IDE-Aktivität im Serum von APPswe/PS1ΔExon9-Mäusen

Quantitative Bestimmung der IDE-Enzymaktivität im Serum der mit Kokosnussöl angereicherter Diät oder Kontrolldiät gefütterten APPswe/PS1ΔExon9-Mäuse (n = 7). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von zehn Wochen mit einer mit Kokosnuss- oder Sonnenblumenöl angereicherten Diät gefüttert. Dargestellt ist die IDE-Aktivität nach Normierung der einzelnen Messwerte auf den Proteingehalt des Serums und Subtraktion der nach Zugabe von 1mM NEM gemessenen unspezifischen Umsetzung des Substrats.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** p ≤ 0,01).

Die kokosnussölreiche Diät führt im Vergleich zur Kontrolldiät zu einer signifikant auf 142,4% (± 5,0%, p = 0,004) erhöhten IDE-Enzymaktivität im Serum der APPswe/PS1ΔExon9-Mäuse (Abb. 48), was möglicherweise auf eine gesteigerte Sekretion von IDE in den Extrazellulärraum hindeutet.

4.4.7 VERÄNDERUNG DES GEHALTS VON MITTELKETTIGEN FETTSÄUREN IN VON DER ALZHEIMER KRANKHEIT BETROFFENEM HIRNGEWEBE

In 4.4.2-4.4.6 konnte gezeigt werden, dass sich MCFAs positiv auf die IDE-abhängige Aβ-Degradation auswirken und die Supplementierung von MCFAs zu einem tendentiell reduzierten Aβ40-Gehalt sowie zu einer statistisch nicht signifikanten Reduktion des Aβ42-Spiegels im Hirngewebe des APPswe/PS1ΔE9-Mausmodells führt. Wie bereits erwähnt, sind vielfältige Veränderungen der zerebralen Lipid- und Fettsäure-Komposition in *post mortem* AD-Hirngewebe beschrieben worden (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016; Rothhaar et al., 2012). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob auch der Gehalt von MCFAs im Hirngewebe von AD-Patienten bzw. dem 5xFAD-Mausmodell, bei dem es typischerweise ab einem Alter von sechs Wochen zu einer zerebralen Ablagerung von Aβ-Peptiden (Oakley et al., 2006) kommt, Veränderungen aufweist.

Hierzu wurde mittels Massenspektrometrie der Gehalt von PCaa24:0, PCaa26:0, PCaa28:0, PCaa28:1 und PCaa30:0 in dem frontalen Kortex von 156 AD-Patienten und 71 Kontrollpersonen (Tab. 9, Anhang) untersucht. Die analysierten PCaa-Spezies repräsentieren PC-Spezies, in denen Glycerin mit den häufig natürlich vorkommenden Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Ölsäure (18:1) (Berg et al., 2002; Sastry, 1985) in Kombination mit MCFAs verestert ist. Zusätzlich wurde der Gehalt des häufig vorkommenden PCaa38:0 in den entsprechenden Proben gemessen.

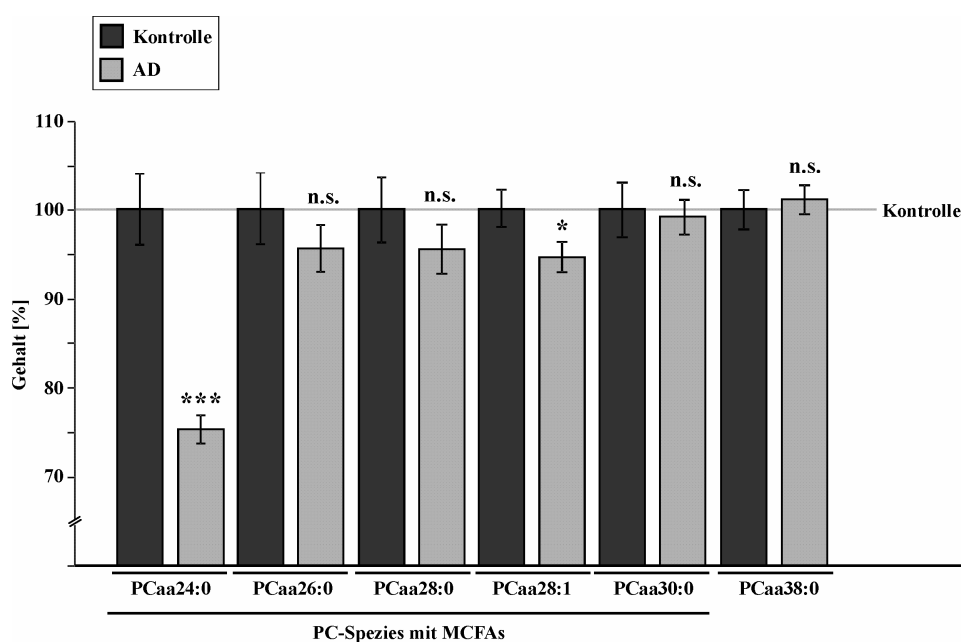


Abb. 49: Gehalt von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren in humanem post mortem AD-Hirngewebe

Quantitative Bestimmung von PCaa24:0, PCaa26:0, PCaa28:0, PCaa28:1, PCaa30:0 und PCaa38:0 im frontalen Kortex von AD-Patienten (n = 156) im Vergleich zu Kontrollpersonen (n = 71) mittels Massenspektrometrie.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Tab. 35: Statistik des Gehalts von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren in humanem post mortem AD-Hirngewebe

| | PCaa24:0 | PCaa26:0 | PCaa28:0 | PCaa28:1 | PCaa30:0 | PCaa38:0 |
|--|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Gehalt im frontalen Kortex [% von Kontrolle] | 75,3 | 95,6 | 95,5 | 94,6 | 99,2 | 101,1 |
| StabwM [%] | 1,6 | 2,6 | 2,7 | 1,7 | 2,0 | 1,6 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | $\leq 0,001$ | 0,36 | 0,33 | 0,05 | 0,82 | 0,69 |
| n-Zahl | 156 | 156 | 156 | 156 | 156 | 156 |

In humanem *post mortem* AD-Hirngewebe liegt im Vergleich zu Kontrollgewebe eine Reduktion von PC-Spezies mit MCFAs vor. Der Gehalt von PCaa24:0 und PCaa28:1 ist im frontalen Kortex von AD-Patienten signifikant auf 75,3% ($\pm 1,6\%$, $p \leq 0,001$) bzw. 94,6% ($\pm 1,7\%$, $p = 0,05$) reduziert. Auch für PCaa26:0 und PCaa28:0 ist eine leichte, statistisch aber nicht signifikante Reduktion im frontalen Kortex von AD-Patienten auf 95,6% ($\pm 2,6\%$, $p = 0,36$) bzw. 95,5% ($\pm 2,7\%$, $p = 0,33$) zu verzeichnen. Der Gehalt von PCaa30:0 und PCaa38:0 ist in AD-Hirngewebe im Vergleich zu dem Hirngewebe von Kontrollpersonen hingegen nicht verändert ($99,2\% \pm 2,0\%$, $p = 0,82$ bzw. $101,1\% \pm 1,6\%$, $p = 0,69$) (Abb. 49, Tab. 35).

Bei den Spendern des humanen *post mortem* AD-Hirngewebes handelt es sich um Personen, die von der sporadischen Form von AD, LOAD, betroffen waren. Um zu überprüfen, ob der zerebrale Gehalt von MCFAs auch bei einer genetisch bedingten Form der Erkrankung verändert ist, wurde der Gehalt von PCaa24:0, PCaa26:0, PCaa28:1 und PCaa30:0 sowie des häufig vorkommenden PCaa38:0 im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen analysiert. Für die Untersuchungen wurde jeweils eine Hemisphäre ohne Cerebellum von acht Wochen alten, männlichen Tieren verwendet.

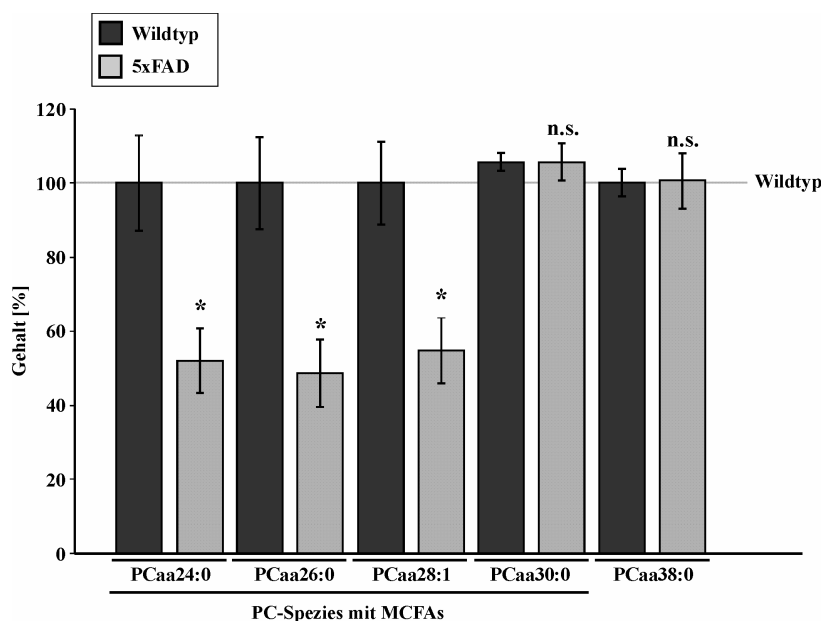


Abb. 50: Gehalt von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells

Quantitative Bestimmung von PCaa24:0, PCaa26:0, PCaa28:1, PCaa30:0 und PCaa38:0 im Hirngewebe (Hemisphäre ohne Cerebellum) von 5xFAD-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (n = 4) mittels Massenspektrometrie.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$).

5xFAD-Mäuse = Mäuse mit kombinierter Expression fünf verschiedener FAD-APP- und -PS1-Mutationen (APP K670N/M671, APP I716V, APP V717I, PS1 M146L und PS1 L286V).

Tab. 36: Statistik des Gehalts von Phosphatidylcholinen mit mittelkettigen Fettsäuren im Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen

| | PCaa24:0 | PCaa26:0 | PCaa28:1 | PCaa30:0 | PCaa38:0 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| Gehalt im Hirngewebe [% von Kontrolle] | 52,1 | 48,7 | 54,8 | 105,7 | 100,6 |
| StabwM [%] | 17,3 | 9,1 | 8,9 | 5,1 | 7,5 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,36 | 0,95 |
| n-Zahl | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Wie in Abb. 50 und Tab. 36 dargestellt, liegt im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells ebenfalls eine Reduktion der MCFA-enthaltenden PC-Spezies vor. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist im Hirngewebe der 5xFAD-Mäuse eine signifikante Reduktion von PCaa24:0 auf 52,1% ($\pm 17,3\%$, $p = 0,02$), von PCaa26:0 auf 48,7% ($\pm 9,1\%$, $p = 0,02$) und von PCaa28:1 auf 54,8% ($\pm 8,9\%$, $p = 0,02$) festzustellen. Der Gehalt von PCaa30:0 und PCaa38:0 ist hingegen im Hirngewebe der 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert (105,7% $\pm 5,1\%$, $p = 0,36$ und 100,6% $\pm 7,5\%$, $p = 0,95$).

4.5 EINFLUSS DER BEI DER ALZHEIMER-KRANKHEIT VERÄNDERTEN ZEREBRALEN LIPIDKOMPOSITION AUF DIE A β -DEGRADATION

Die Lipidkomposition des *post mortem* Hirngewebes von AD-Patienten weist starke Veränderungen auf. Im Hirnparenchym von AD-Patienten wurde u.a. ein veränderter Gehalt von bestimmten Phospholipiden, Cholesterin, Ceramid, Sphingomyelin, Sulfatiden und Gangliosiden beschrieben (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016). In 4.4.7 konnte außerdem gezeigt werden, dass der Gehalt von MCFAs sowohl in humanem *post mortem* AD-Hirngewebe als auch im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells reduziert ist (Abb. 49, Abb. 50). Bislang ist unklar, ob diese Modifikationen der Lipidkomposition Folgen der AD-Pathologie darstellen oder als Ursache der Erkrankung anzusehen sind. Im Rahmen dieses Projekts wurde der mögliche kausale Zusammenhang zwischen der AD-Pathogenese und der veränderten zerebralen Lipidzusammensetzung untersucht. Da eine verringerte A β -Beseitigung seit Längerem als Ursache für LOAD diskutiert wird (Hama und Saido, 2005; Saido, 1998), wurde die A β -Degradation in N2a-Zellen unter dem Einfluss von Lipidextrakten aus von AD betroffenen und gesundem Hirngewebe analysiert. Die in AD-Hirngewebe reduzierten MCFAs wirken sich beispielsweise positiv auf die IDE-abhängige A β -Degradation aus (4.4), weshalb auch ein Einfluss von Lipidextrakten aus AD-Hirngewebe auf den Abbau von A β -Peptiden denkbar ist.

Für die Untersuchungen wurde das Hirngewebe von jeweils drei AD-Patienten und Kontrollpersonen sowie von jeweils drei acht Wochen alten, männlichen 5xFAD- und Wildtyp-Mäusen verwendet. Zur Herstellung der Lipidextrakte wurde wie in 3.2.4.1 beschrieben vorgegangen, in Tab. 8 ist eine Übersicht über das verwendete humane Hirngewebe gegeben. Die extrahierten Lipide wurden in einer finalen Konzentration von 5 μ M auf den Zellen inkubiert, wobei der Inkubations-Rhythmus in Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung variierte (3.2.2.5.4).

4.5.1 EINFLUSS VON LIPIDEXTRAKTEN AUS VON DER ALZHEIMER KRANKHEIT BETROFFENEM HIRNGEWEBE AUF DIE ZELLVIALITÄT

Zur Überprüfung der Inkubationsbedingungen wurde zunächst die Viabilität von N2a-Zellen nach 18-stündiger Inkubation (3.2.2.5.4) mit den zerebralen Lipidextrakten ermittelt. Hierzu wurde mittels LDH-Test zunächst die Zytotoxizität bestimmt, woraus die Viabilität der Zellen berechnet wurde (3.2.2.6). Für dieses Experiment wurden die einzelnen Lipidextrakte der jeweiligen Gruppen in gleichen Anteilen zu Lipidextrakt-Gemischen vereinigt.

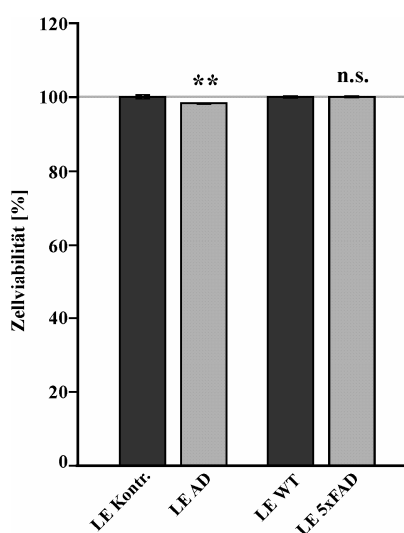


Abb. 51: Viabilität von N2a-Zellen nach Inkubation mit Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe

Bestimmung der Viabilität von N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit einem Lipidextrakt-Gemisch aus drei humanen AD- bzw. Kontrollhirnen und aus dem Hirngewebe von drei 5xFAD- bzw. WT-Mäusen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 18Std mit den Lipidextrakten in einer finalen Konzentration von 5 μ M inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde nach Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH-Test berechnet (n = 4).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant, ** p \leq 0,01).

LE Kontr. = Lipidextrakt aus humanem Kontroll-Hirngewebe, LE AD = Lipidextrakt aus humanem AD-Hirngewebe, LE WT = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen, LE 5xFAD = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5x FAD-Mäusen.

Wie in Abb. 51 dargestellt, bewirkt der Lipidextrakt aus humanen *post mortem* AD-Hirnen im Vergleich zu dem aus Kontrollhirnen eine leichte, aber signifikante Reduktion der Zellviabilität ($98,2\% \pm 0,5\%$, $p = 0,01$). Die Viabilität der N2a-Zellen ist hingegen durch die Inkubation mit Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen im Vergleich zu dem aus Wildtyp-Mäusen nicht beeinflusst ($100,0\% \pm 0,2\%$, $p = 0,94$) (Abb. 51).

4.5.2 EINFLUSS VON LIPIDEXTRAKTEN AUS VON DER ALZHEIMER KRANKHEIT BETROFFENEM HIRNGEWEBE AUF DIE A β -DEGRADATION

Die Untersuchung der A β -Degradation in N2a-Zellen unter Einfluss der unterschiedlichen Lipidextrakte erfolgte wie in 3.2.3.12 beschrieben. Die Zellen wurden zunächst für 16Std mit den einzelnen Lipidextrakten in einer finalen Konzentration von $5\mu\text{M}$ und anschließend mit diesen in Kombination mit $0,5\mu\text{g/ml}$ humanem A β 40 inkubiert (3.2.2.5.4). Das verbleibende humane A β 40 wurde anschließend durch Western Blot-Analyse quantifiziert (3.2.3.8-3.2.3.10).

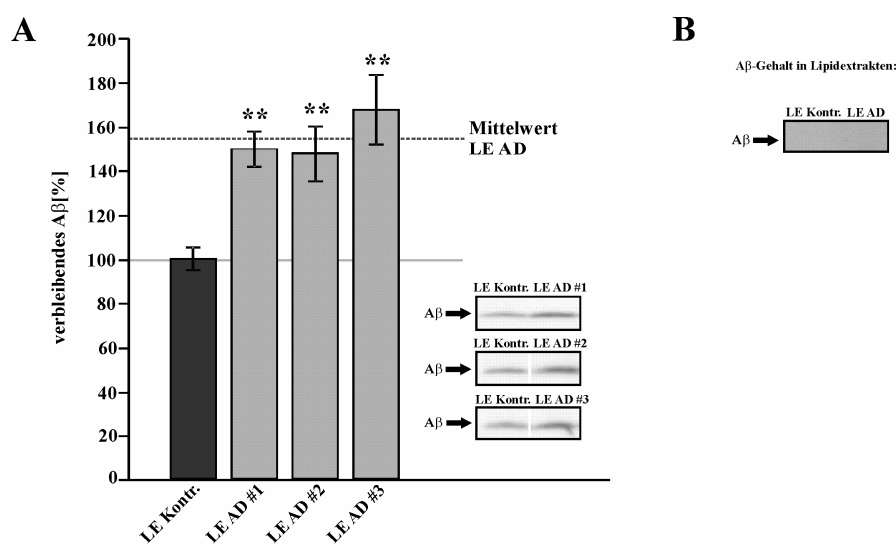


Abb. 52: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem humanem Hirngewebe auf die A β -Degradation in N2a-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit Lipidextrakten aus humanen AD- und Kontrollhirnen. Die Zellen wurden 18Std mit $5\mu\text{M}$ Lipidextrakt und anschließend 6Std mit $5\mu\text{M}$ Lipidextrakt + $0,5\mu\text{g/ml}$ humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 ($n = 4$). Die mittlere Effekttärke der Lipidextrakte aus AD-Hirnen ist durch eine unterbrochene Linie eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$).

(B) Überprüfung des A β -Gehalts in zerebralen Lipidextrakten. Die Überprüfung des A β -Gehalts in Zellkulturmedium, welches mit den Lipidextrakt-Gemischen aus jeweils drei humanen AD- bzw. Kontrollhirnen ($10\mu\text{M}$) supplementiert wurde, erfolgte mittels Immunpräzipitation und Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen, LE Kontr. = Lipidextrakt aus Kontroll-Hirngewebe, LE AD = Lipidextrakt aus AD-Hirngewebe.

Nach Inkubation der N2a-Zellen mit den Lipidextrakten aus allen untersuchten humanen *post mortem* AD-Hirnen ist eine signifikante Erhöhung des verbleibenden humanen A β 40 festzustellen (Abb. 52A), die nicht durch eine Verunreinigung der Lipidextrakte durch A β -Peptide erklärt werden kann (Abb. 52B). Im Vergleich zu den Lipidextrakten aus Kontroll-Hirngewebe bewirken die Lipidextrakte aus AD-Hirngewebe eine durchschnittliche Erhöhung des verbleibenden A β 40 auf $154,7\%$ (AD #1: $149,5\% \pm$

8,2%, $p = 0,002$; AD #2: $147,4\% \pm 12,6\%$, $p = 0,01$; AD #3: $167,3\% \pm 15,6\%$, $p = 0,006$) (Abb. 52A) und somit eine Verringerung der A β -Gesamtdegradation. Die Verringerung des A β -Abbaus unter Einfluss der zerebralen Lipidextrakte aus *post mortem* AD-Hirngewebe deutet darauf hin, dass die veränderte zerebrale Lipidkomposition bei AD-Patienten möglicherweise eine Ursache der A β -Akkumulation und somit der Erkrankung darstellen könnte.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Lipidextrakte aus dem Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die A β -Degradation besitzen. Das Vorgehen hierbei war identisch zu der oben beschriebenen Messung der A β -Gesamtdegradation unter Einfluss der Lipidextrakte aus humanem Hirngewebe.

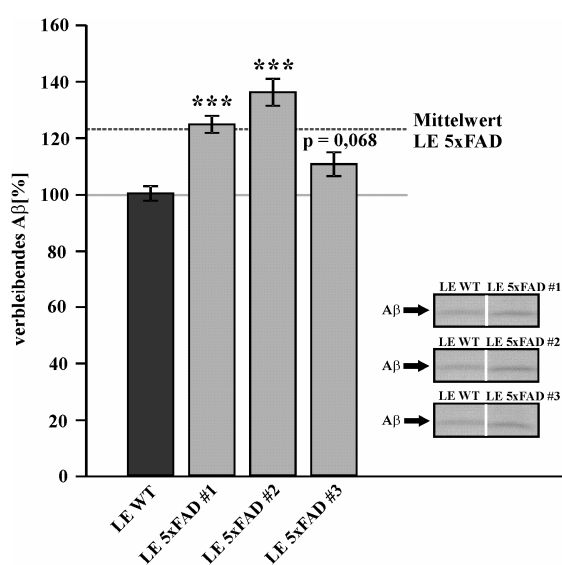


Abb. 53: Einfluss von Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen auf die A β -Degradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT (mock)-Zellen nach Inkubation mit Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von 5xFAD- und WT-Mäusen. Die Zellen wurden 18Std mit $5\mu\text{M}$ Lipidextrakt und anschließend 6Std mit $5\mu\text{M}$ Lipidextrakt + $0,5\mu\text{g/ml}$ humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 ($n = 5$). Die mittlere Effektstärke der Lipidextrakte aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen ist durch eine unterbrochene Linie eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen, LE WT = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen, LE 5xFAD = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen.

Die Behandlung der N2a-Zellen mit Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen hat im Vergleich zu Lipidextrakten aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen ebenfalls eine Erhöhung des verbleibenden humanen A β 40 und somit eine reduzierte A β -Degradation zur Folge. Hierbei sind die Effekte der Lipidextrakte aus zwei der untersuchten 5xFAD-Maushirne statistisch signifikant, der Effekt des Lipidextraktes aus dem dritten 5xFAD-Maushirn liegt an der Signifikanzgrenze ($p = 0,068$). Im Durchschnitt ist das verbleibende A β 40 unter Einfluss der zerebralen Lipidextrakte von 5xFAD-Mäusen auf $123,5\%$ gesteigert (5xFAD #1: $124,4\% \pm 3,0\%$, $p \leq 0,001$; 5xFAD #2: $135,8\% \pm 4,7\%$, $p \leq 0,001$; 5xFAD #3: $110,3\% \pm 4,2\%$, $p = 0,068$) (Abb. 53).

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Gesamt-A β -Degradation unter Einfluss der Lipidextrakte aus humanem AD- bzw. murinem 5xFAD-Hirngewebe auf einer Beeinflussung von IDE beruht, wurde die Auswirkung der entsprechenden Lipidextrakte auf den A β -Abbau in N2a IDE-Knockdown-Zellen (Abb. 30) betrachtet. Für die Inkubation der Zellen wurden die einzelnen Lipidextrakte der jeweiligen Gruppen in gleichen Anteilen zu Lipidextrakt-Gemischen vereinigt.

Bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen sind die Effekte der Lipidextrakte aus humanem AD- und murinem 5xFAD-Hirngewebe signifikant schwächer ausgeprägt als bei Verwendung der Kontrollzellen (Effektstärke humane AD-Lipidextrakte auf Gesamt-A β -Degradation in N2a WT (mock)/ in N2a IDE-KD: $p \leq 0,001$; Effektstärke 5xFAD-Lipidextrakte auf Gesamt-A β -Degradation in N2a WT

(mock)/ in N2a IDE-KD: $p \leq 0,001$) (Abb. 52A, Abb. 53, Abb. 54). Im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Lipidextrakten führt der Lipidextrakt aus humanen AD-Hirnen bzw. aus 5xFAD-Maushirnen zu einer leichten Erhöhung des verbleibenden humanen A β 40 auf 108,7% ($\pm 2,5\%$, $p = 0,09$) (Abb. 54A) bzw. auf 105,1% ($\pm 1,6\%$, $p = 0,04$) (Abb. 54B).

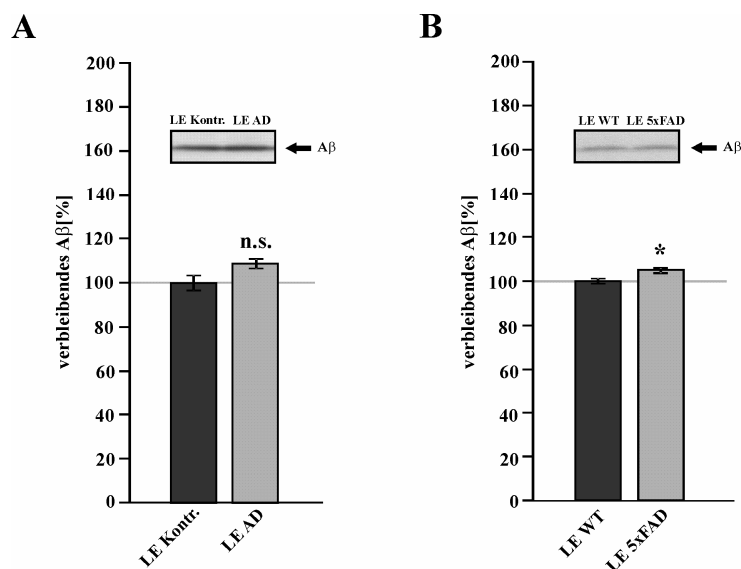


Abb. 54: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf die A β -Degradation in N2a IDE-Knockdown-Zellen

Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a IDE-KD nach Inkubation mit Lipidextrakt-Gemischen aus (A) drei humanen AD- bzw. Kontrollhirnen und (B) aus dem Hirngewebe von drei 5xFAD- bzw. WT-Mäusen. Die Zellen wurden 18Std mit 5 μ M Lipidextrakt und anschließend 6Std mit 5 μ M Lipidextrakt + 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 (jeweils $n = 5$).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

N2a IDE KD = N2a IDE-Knockdown-Zellen, LE Kontr. = Lipidextrakt aus Kontroll-Hirngewebe, LE AD = Lipidextrakt aus AD-Hirngewebe, LE WT = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen, LE 5xFAD = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen.

Die Effekte der Lipidextrakte aus humanen *post mortem* AD-Hirngewebe und dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen auf die A β -Gesamtdegradation sind demnach wahrscheinlich auf eine Beeinflussung von IDE zurückzuführen. Daher wurde anschließend eine mögliche Wirkung dieser Lipidextrakte auf die IDE-Sekretion betrachtet.

4.5.3 EINFLUSS VON LIPIDEXTRAKTEN AUS VON DER ALZHEIMER KRANKHEIT BETROFFENEM HIRNGEWEBE AUF DIE IDE-SEKRETION

Zur Untersuchung des Einflusses der Lipidextrakte aus AD- bzw. 5xFAD-Hirngewebe auf den IDE-Transport wurde der extra- und intrazelluläre IDE-Proteingehalt in N2a-Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden Lipidextrakten mittels Western Blot analysiert (3.2.3.8-3.2.3.10). Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 18Std mit Gemischen aus den einzelnen Lipidextrakten der jeweiligen Gruppen behandelt (3.2.2.5.4).

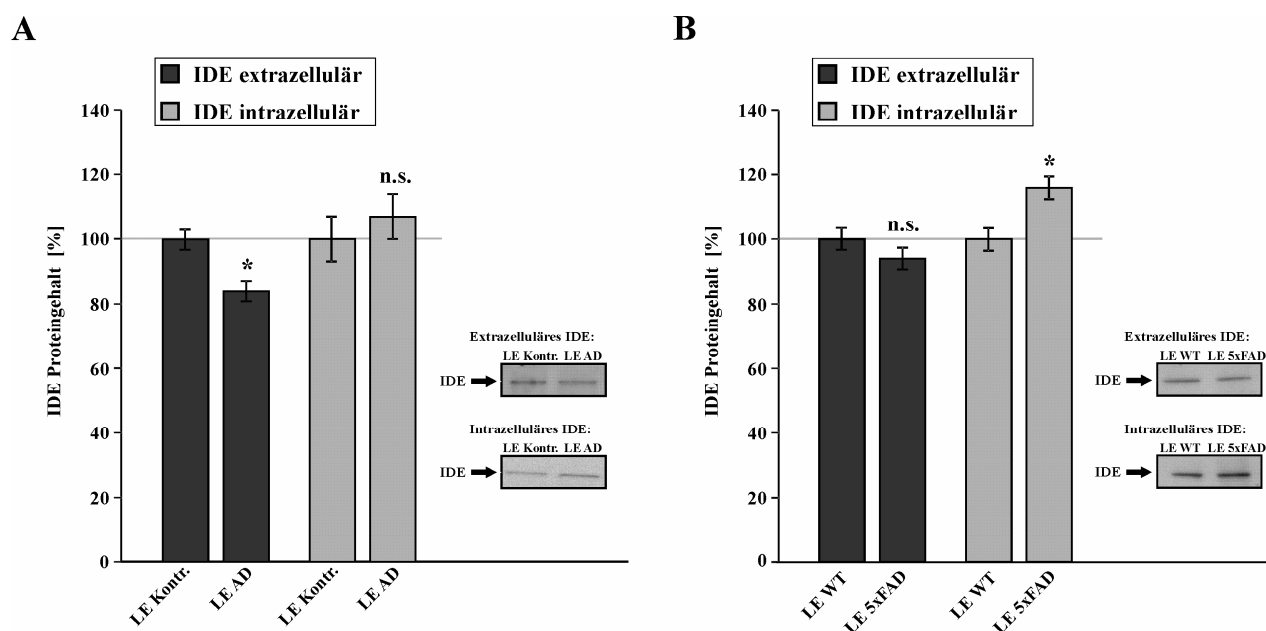


Abb. 55: Einfluss von Lipidextrakten aus von der Alzheimer Krankheit betroffenem Hirngewebe auf den intra- und extrazellulären IDE-Proteinspiegel in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung des IDE-Proteingehalts in den Lysaten und im Kulturmedium von N2a WT (mock)-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit Lipidextrakt-Gemischen (5µM) aus **(A)** drei humanen AD- bzw. Kontrollhirnen (IDE extrazellulär: n = 3; IDE intrazellulär: n = 5) und **(B)** aus dem Hirngewebe von drei 5xFAD- bzw. WT-Mäusen (IDE extrazellulär: n = 4; IDE intrazellulär: n = 4) mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ST1120.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant, * p ≤ 0,05).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen; LE Kontr. = Lipidextrakt aus Kontroll-Hirngewebe, LE AD = Lipidextrakt aus AD-Hirngewebe, LE WT = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von Wildtyp-Mäusen, LE 5xFAD = Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen.

Im Vergleich zu dem Lipidextrakt aus humanen Kontrollhirnen führt die Behandlung der Zellen mit dem Lipidextraktgemisch aus humanen *post mortem* AD-Hirnen zu einer signifikanten Reduktion des Gehalts an extrazellulärem IDE auf 83,9% (± 3,1%, p = 0,02) sowie zu einem leicht, statistisch nicht signifikant gesteigertem Gehalt an intrazellulärem IDE (106,9% ± 7,0%, p = 0,50) (Abb. 55A). Das Verhältnis von extra- zu intrazellulär lokalisiertem IDE unter Einfluss der Lipidextrakte aus humanen AD-Hirnen beträgt demnach 0,78. Ähnliche Tendenzen ergeben sich nach Behandlung der Zellen mit Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen. Im Vergleich zu den zerebralen Lipidextrakten von Wildtyp-Mäusen bewirken diese eine leichte, nicht signifikante Reduktion des extrazellulären IDE-Proteinspiegels auf 94,0% (± 3,4%, p = 0,25) in Kombination mit einer signifikanten Erhöhung des Gehalts von intrazellulärem IDE auf 115,9% (± 3,5%, p = 0,02) (Abb. 55B). Der Quotient aus extrazellulärem und intrazellulärem IDE-Gehalt ist somit auch nach Inkubation mit dem Lipidextrakt aus dem Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen verringert und beträgt 0,81.

Diese Ergebnisse weisen auf eine reduzierte IDE-Sekretion nach Inkubation mit Lipidextrakten aus humanem *post mortem* AD- bzw. aus murinem 5xFAD-Hirngewebe hin.

4.6 IM RAHMEN VON KOOPERATIONEN GENERIERTE ERGEBNISSE ZU WEITEREN PROJEKTEN

In dem folgenden Kapitel sind Ergebnisse dargestellt, die von mir im Rahmen von Kooperationen generiert und teilweise bereits publiziert wurden. Die Bedeutung der Daten für das jeweilige Projekt ist kurz erläutert.

4.6.1 EINFLUSS VON VITAMIN D₃ AUF DIE APP-PROZESSIERUNG UND A β -DEGRADATION

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten wurden in *Neurodegenerative Diseases* publiziert:

Grimm, M.O.*, Lehmann, J.*, **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Grosgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases* 13, 75-81.

* *equally contributed*

Bei älteren Menschen liegt häufig ein reduzierter Vitamin D₃-Spiegel vor und verschiedene Studien deuten auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Vitamin D₃-Status und einem erhöhten AD-Risiko hin (Annweiler und Beauchet, 2011). In dieser Studie wurde der Einfluss von Vitamin D₃ auf die molekularen Mechanismen von AD untersucht. Hierzu wurde die APP-Prozessierung und die A β -Degradation im Hirngewebe von Mäusen mit Vitamin D₃-Hypovitaminose sowie in N2a-Zellen nach Supplementierung von 100nM Calcidiol (25(OH)D₃) betrachtet. 25(OH)D₃ stellt die Speicherform des Vitamin D₃ dar und wird nach dessen Hydroxylierung in der Leber gebildet (Tuohimaa et al., 2009).

Im Hirngewebe von Mäusen mit einem durchschnittlich um 23% reduzierten zerebralen 25(OH)D₃-Gehalt konnte von mir in Zusammenarbeit mit Johannes Lehmann mittels A β -ELISA (3.2.3.11) eine signifikante Erhöhung des A β 40- und A β 42-Spiegels auf 110,0% (\pm 1,4%, $p = 0,006$) bzw. 112,8% (\pm 2,2%, $p = 0,014$) nachgewiesen werden (Abb. 56A). Umgekehrt führt die etwa 13-fache Erhöhung des 25(OH)D₃-Gehalts von N2a-Zellen durch vierwöchige Inkubation mit 100nM 25(OH)D₃ zu einer signifikanten Reduktion des Gesamt-A β -Gehalts auf 87,1% (\pm 3,6%, $p = 0,036$) wie mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse demonstriert werden konnte (3.2.3.7-3.2.3.10) (Abb. 56B).

Im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D₃-Spiegel konnte ich des Weiteren mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) einen signifikant auf 115,8% (\pm 4,6%, $p = 0,028$) erhöhten Proteinspiegel der β -Sekretase BACE1 nachweisen (Abb. 57).

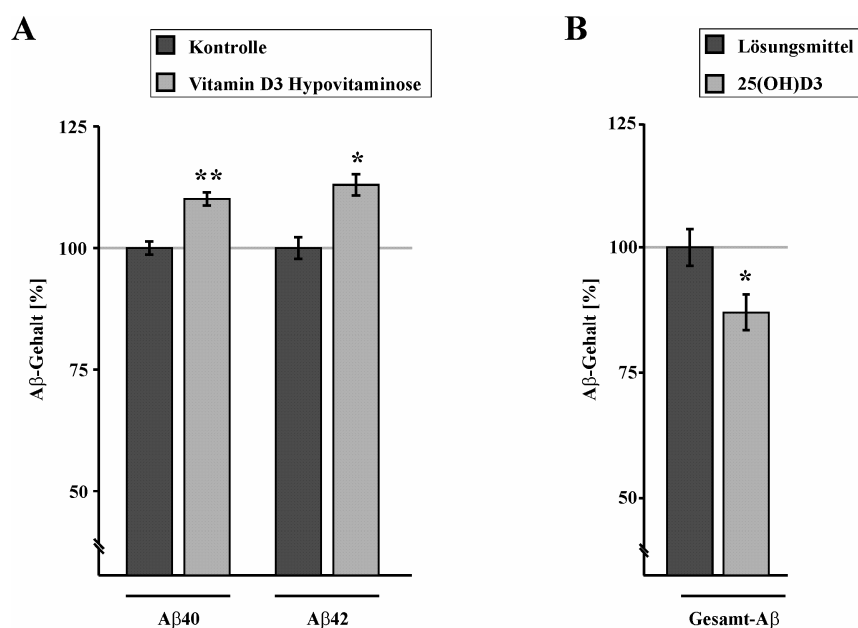


Abb. 56: Einfluss von 25(OH)D₃ auf den Aβ-Gehalt in murinem Hirngewebe und N2a-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung des Aβ40- und Aβ42-Gehalts im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D₃-Spiegel und Kontrolltieren mittels ELISA (n=6).

(B) Quantitative Bestimmung des Gesamt-Aβ-Gehalts im Kulturmedium von N2a WT-Zellen nach Langzeit-Inkubation mit 25(OH)D₃ mittels Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers WO2 (n=5). Die Zellen wurden vier Wochen lang mit 100nM 25(OH)D₃ behandelt und 48Std vor dem Experiment transient mit einem für humanes APP₆₉₅-kodierenden Plasmid transfiziert.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

N2a WT= N2a Wildtyp-Zellen.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2014b)

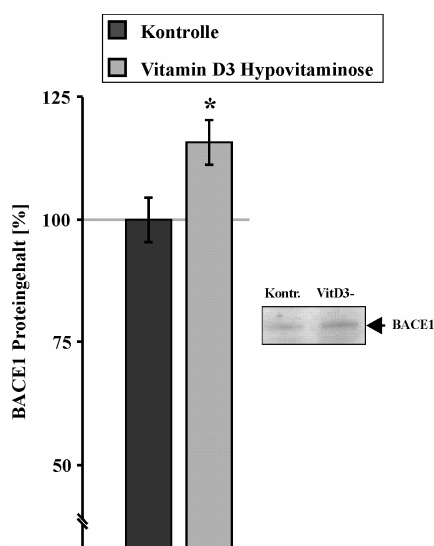


Abb. 57: Einfluss von 25(OH)D₃ auf den BACE1-Proteinspiegel in murinem Hirngewebe

Quantitative Bestimmung des BACE1-Proteingehalts im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D₃-Spiegel mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers PC529 (n=8).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p ≤ 0,05).

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2014b)

Weitere Experimente ergaben auch einen Einfluss von 25(OH)D₃ auf NEP. Im Hirngewebe von Mäusen mit Vitamin D₃-Hypovitaminose konnte ich durch Messung der NEP-Aktivität (3.2.3.13.2) eine signifikant auf 93,8% (± 1,3%, p = 0,003) reduzierte Aktivität des Enzyms feststellen (Abb. 58A). Die Supplementierung von N2a-Zellen mit 25(OH)D₃ führt hingegen zu einer signifikant auf 109,4% (± 2,6%, p = 0,032) gesteigerten NEP-Aktivität (Abb. 58B).

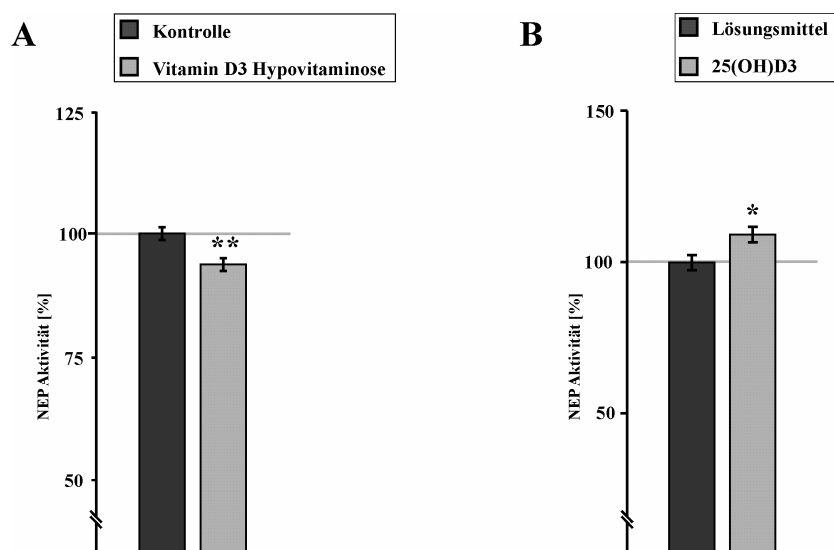


Abb. 58: Einfluss von 25(OH)D₃ auf die NEP-Enzymaktivität in murinem Hirngewebe und N2a-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung der NEP-Aktivität im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D₃-Spiegel und Kontrolltieren (n = 10).

(B) Quantitative Bestimmung der NEP-Aktivität in N2a WT-Zellen nach Langzeit-Inkubation mit 25(OH)D₃ (n = 5). Die Zellen wurden 4 Wochen lang mit 100nM 25(OH)D₃ behandelt.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2014b)

Die Kernaussage dieser Studie ist, dass eine Vitamin D₃-Hypovitaminose ein Risikofaktor für AD darstellt und dass die Supplementierung von Vitamin D₃ ein präventives Potential hinsichtlich AD besitzt. Die von mir generierten Daten belegen eine Steigerung des zerebralen A β -Gehalts bei Vitamin D₃-Mangel *in vivo*, welche auf einen erhöhten Proteingehalt von BACE1 und einer reduzierten NEP-Aktivität zurückzuführen ist. In einem Zellkulturmodell konnte ich außerdem demonstrieren, dass die Supplementierung von Vitamin D₃ umgekehrt in einer Reduktion des A β -Spiegels infolge einer gesteigerten NEP-Enzymaktivität resultiert, was das präventive Potential einer Vitamin D₃-Supplementierung hinsichtlich AD verdeutlicht.

4.6.2 EINFLUSS OXIDIERTER DHA-SPEZIES UND LIPIDPEROXIDATIONSPRODUKTEN AUF DIE AMYLOIDOGENE APP-PROZESSIERUNG

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten wurden in *Neurodegenerative Diseases* publiziert:

Grimm, M.O.*, Hauptenthal, V.J.*, **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Blumel, T., Mylonas, N.T., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016). Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegenerative diseases* 16, 44-54.

* *equally contributed*

Die mehrfach ungesättigte Fettsäure DHA konnte vielfach *in vitro* und in AD-Mausmodellen mit einer Reduktion des zerebralen A β -Spiegels in Verbindung gebracht werden (Green et al., 2007; Grimm et al., 2011c; Lim et al., 2005; Perez et al., 2010). Die Ergebnislage epidemiologischer und klinischer Studien, die sich mit einem Zusammenhang zwischen der DHA-Aufnahme und dem AD-Risiko bzw. dem Fortschreiten der Erkrankung beschäftigen, ist jedoch inhomogen (Barberger-Gateau et al., 2002; Kalmijn

et al., 1997; Kalmijn et al., 2004; Morris et al., 2003; van Gelder et al., 2007). Da DHA wie die meisten PUFAs sehr oxidationsanfällig ist (Catala, 2009; Fam et al., 2002; Gao et al., 2006), sollte in dieser Studie der Einfluss von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die APP-Prozessierung untersucht werden. Hierzu wurden SH-SY5Y-Zellen mit fünf verschiedenen DHA-Derivaten und den Lipidperoxidationsprodukten von ω 3- und ω 6-Fettsäuren, HNE (4-Hydroxy-Nonenal) und HHE (4-Hydroxy-Hexenal) inkubiert.

Zunächst wurde von mir in Zusammenarbeit mit Viola Haupenthal mittels LDH-Test (3.2.2.6) die Zytotoxizität der verwendeten Lipide (2 μ M) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. Sie beträgt für alle inkubierten Substanzen weniger als 2% (Abb. 59, Tab. 37).

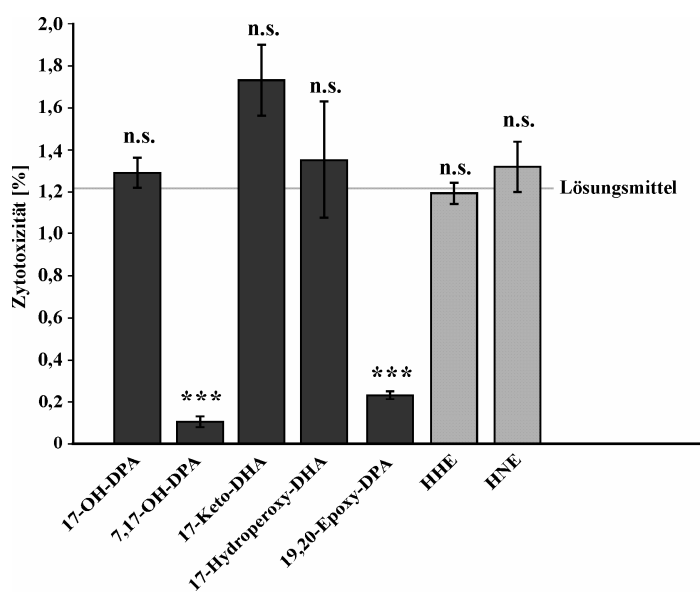


Abb. 59: Zytotoxizität von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten

Quantitative Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf SH-SY5Y WT-Zellen mittels LDH-Test. Die Zellen wurden vor der Bestimmung der Zytotoxizität über einen Zeitraum von 24Std mit den entsprechenden Lipiden in einer finalen Konzentration von 2 μ M bzw. dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Dargestellt ist die gemessene Zytotoxizität in Relation zur Positivkontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t- test ermittelt (n.s. nicht signifikant; *** $p \leq 0,001$). SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

Tab. 37: Statistik der Zytotoxizität von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten

| | 17-OH-DHA | 7,17-OH-DPA | 17-Keto-DHA | 17-Hydroperoxy-DHA | 19,20-Epoxy-DPA | HHE | HNE |
|--|-----------|--------------|-------------|--------------------|-----------------|------|------|
| Zytotoxizität [% von Positivkontrolle] | 1,2 | 0,1 | 1,7 | 1,3 | 0,2 | 1,2 | 1,3 |
| StabwM [%] | 0,1 | 0,02 | 0,2 | 0,3 | 0,02 | 0,1 | 0,1 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | 0,59 | $\leq 0,001$ | 0,07 | 0,69 | $\leq 0,001$ | 0,83 | 0,56 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

In SH-SY5Y-Zellen liegt unter Einfluss der meisten untersuchten oxidierten Lipidspezies eine signifikante Steigerung der β - und γ -Sekretase-Aktivität vor, die in einer verstärkten Sekretion von A β -Peptiden resultiert. Zur weiteren Analyse der Mechanismen, die zu der erhöhten β - und γ -Sekretase-Aktivität führen, wurde von mir mittels RT-PCR (3.2.1.5) die Genexpression von BACE1 sowie den Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes in SH-SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit einer Mischung der oxidierten Lipidspezies (2 μ M) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Behandlung der Zellen mit den oxidierten Lipiden im Vergleich zu Ethanol zu einer gesteigerten Genexpression einzelner Bestandteile des γ -Sekretase-Enzymkomplexes (Mittelwert: 122,5%) sowie von BACE1 (146,3% \pm 5,3%, $p \leq 0,001$) führt (Abb. 60, Tab. 38).

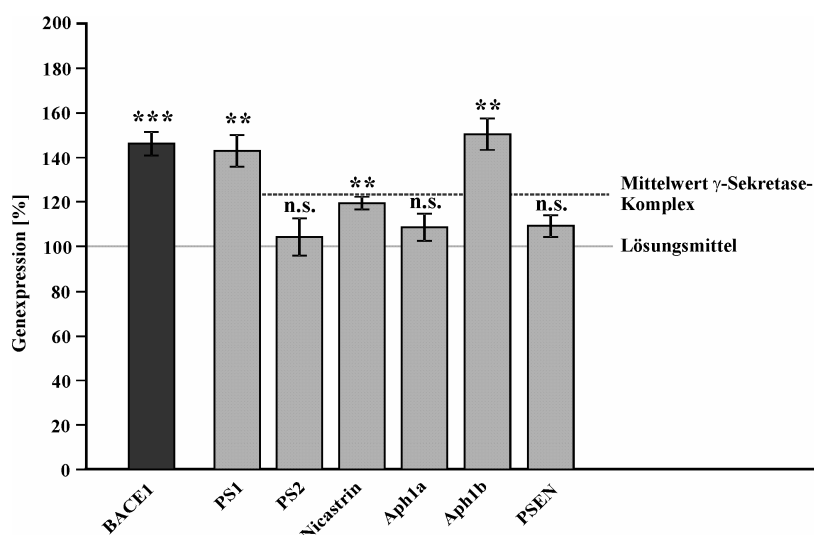


Abb. 60: Einfluss von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die Genexpression der β - und γ -Sekretase-Komponenten in SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung der Genexpression der Bestandteile der β - und γ -Sekretase in SH-SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit oxidierten Lipidspezies mittels RT-PCR. Die Zellen wurden vor der RNA-Isolation über einen Zeitraum von 24Std mit einer Mischung der oxidierten Lipidspezies (2 μ M) oder dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Die mittlere Effektstärke auf die Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes ist durch eine unterbrochene Linie eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2016a)

Tab. 38: Statistik des Einflusses von oxidierten DHA-Spezies und Lipidperoxidationsprodukten auf die Genexpression der β - und γ -Sekretase-Komponenten in SH-SY5Y-Zellen

| | BACE1 | PS1 | PS2 | Nicastrin | Aph1a | Aph1b | PSEN |
|-------------------------------|--------------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|
| Genexpression [% von Ethanol] | 146,3 | 143,1 | 104,2 | 119,3 | 108,5 | 150,5 | 109,1 |
| StabwM [%] | 5,3 | 7,1 | 8,3 | 2,9 | 6,1 | 7,0 | 4,9 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | $\leq 0,001$ | 0,004 | 0,64 | 0,003 | 0,24 | 0,002 | 0,13 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Zusammenfassend konnte in dieser Studie demonstriert werden, dass die amyloidogene APP-Prozessierung und somit die A β -Produktion in SH-SY5Y-Zellen in Anwesenheit von oxidierten DHA-Spezies, HHE und HNE gesteigert ist. Die Aktivität der β -Sekretase wird u.a. direkt durch die oxidierten Lipide stimuliert. Ich konnte nachweisen, dass die erhöhte γ -Sekretase-Aktivität unter Einfluss der oxidierten Lipidspezies auf einer gesteigerten Genexpression von Bestandteilen des γ -Sekretase-Enzymkomplexes basiert. Zudem ist auch die Genexpression von BACE1 signifikant erhöht. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass DHA bei einer Supplementierung vor Oxidation geschützt werden sollte und erklären möglicherweise auch die widersprüchlichen Ergebnisse von klinischen Studien, die den Einfluss von DHA auf die AD-Pathogenese untersuchen.

4.6.3 EINFLUSS VON α -, γ - UND δ -TOCOPHEROL AUF DIE APP-PROZESSIERUNG UND A β -DEGRADATION

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten wurden in *The Journal of Nutrition, Health & Aging* publiziert:

Grimm, M.O.*, Stahlmann, C.P.*, **Mett, J.**, Hauptenthal, V.J., Zimmer, V.C., Lehmann, J., Hundsdorfer, B., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on A β Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19, 646-656.

* *equally contributed*

Tocopherole, welche zur Klasse der E-Vitamine gehören, zeichnen sich durch ihre anti-oxidativen Eigenschaften aus (Kamal-Eldin und Appelqvist, 1996). Da eine gesteigerte Lipidperoxidation und eine Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) im Hirngewebe von AD-Patienten (Butterfield, 2003; Davis, 1996; Parks et al., 2001; Yatin et al., 1998) als Ursache für die AD-Pathogenese diskutiert wird, wurde schon häufig versucht, den Fortschritt der Erkrankung durch die Supplementierung von Vitamin E zu verlangsamen. Die Ergebnisse dieser Studien stellten sich jedoch als sehr inhomogen dar (Crichton et al., 2013; La Fata et al., 2014). In diesem Projekt sollte der Einfluss von Tocopherolen auf die APP-Prozessierung und die A β -Degradation analysiert werden. Hierzu wurden Neuroblastom-Zellen mit 10 μ M α -, γ - und δ -Tocopherol bzw. dem Lösungsmittel Ethanol inkubiert.

Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte eine signifikante, vergleichbar starke Erhöhung des A β -Gehalts im Kulturmedium der Zellen nach Inkubation mit allen Tocopherolen nachgewiesen werden. Daher wurde von mir der Einfluss der Tocopherole auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a-Zellen analysiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 10 μ M Tocopherolen und anschließend 6Std mit Tocopherolen in Kombination mit synthetischem humanen A β 40 behandelt (3.2.3.12). Die quantitative Bestimmung des verbleibenden humanen A β 40 ist in Abb. 61A dargestellt.

Bei Verwendung von N2a Kontroll-Zellen ist der Gehalt der verbleibenden humanen A β 40-Peptide unter Einfluss aller untersuchten Tocopherole im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle erhöht, wobei nur die Effekte von α - und δ -Tocopherol statistisch signifikant sind (Mittelwert Tocopherole: 125,3% \pm 5,1%, $p \leq 0,001$) (Abb. 61A, Tab. 39). In Anwesenheit von Tocopherolen liegt demnach eine verringerte A β -Degradation vor. Bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen kann hingegen nur nach Inkubation mit α -Tocopherol eine signifikante Erhöhung des verbleibenden humanen A β 40 verzeichnet werden (Mittelwert Tocopherole: 104,80% \pm 2,1 %, $p = 0,184$) (Abb. 61B, Tab. 39). Der Unterschied der Effektstärken bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown und N2a WT (mock) ist für δ -Tocopherol statistisch signifikant ($p = 0,011$), für α -Tocopherol jedoch nicht ($p = 1,000$).

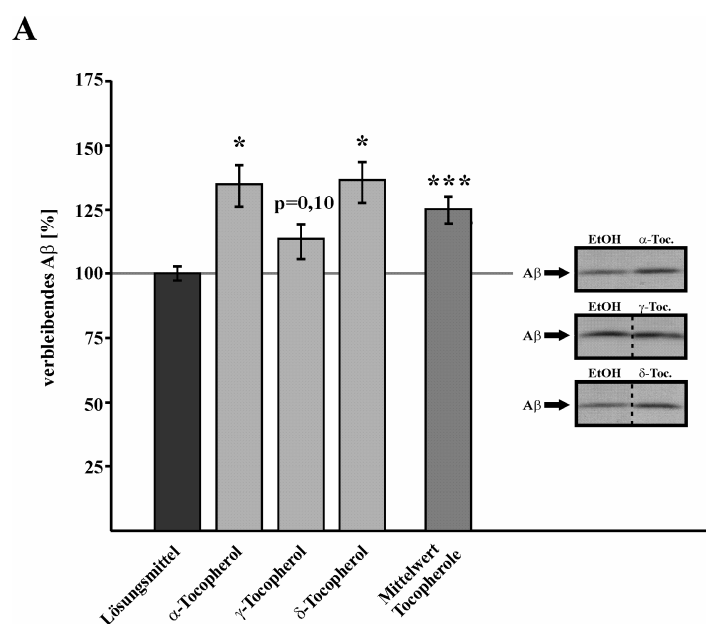


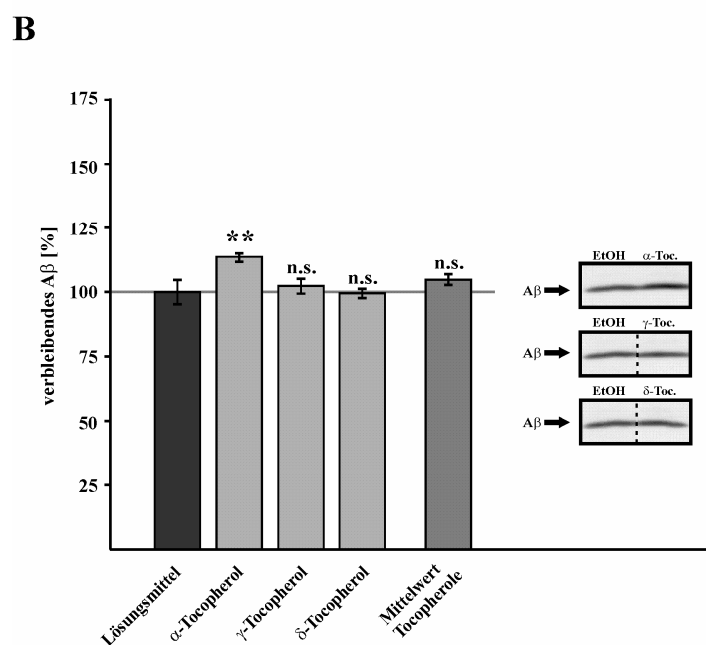
Abb. 61: Einfluss von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in (A) N2a WT (mock) und (B) N2a IDE-KD nach Inkubation mit α -, γ - und δ -Tocopherol. Die Zellen wurden 18Std mit Tocopherolen (10 μ M) oder dem Lösungsmittel Ethanol und anschließend 6Std mit Tocopherolen (10 μ M)/ Ethanol + 1 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen; N2a IDE KD = N2a IDE-Knockdown-Zellen.

(Abb. A und B modifiziert nach Grimm et al., 2015b)



Tab. 39: Statistik des Einflusses von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Gesamtdegradation in N2a-Zellen

| | α -Toc. | γ -Toc. | δ -Toc. | α -Toc. | γ -Toc. | δ -Toc. |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| IDE-Knockdown: | - | - | - | + | + | + |
| verbleibendes A β [% von Ethanol] | 134,9 | 113,4 | 136,6 | 113,7 | 102,4 | 99,6 |
| StabwM [%] | 8,0 | 7,0 | 8,0 | 1,6 | 2,9 | 1,8 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | 0,02 | 0,10 | 0,015 | 0,003 | 0,56 | 0,90 |
| n-Zahl | 4 | 7 | 4 | 4 | 6 | 4 |

Diese Daten belegen, dass α - und δ -Tocopherol einen negativen Effekt auf die IDE-abhängige A β -Degradation haben. Da im Fall von α -Tocopherol auch in IDE-Knockdown-Zellen eine signifikante Reduktion des A β -Abbaus vorliegt, ist davon auszugehen, dass diese Tocopherol-Spezies auch IDE-unabhängige A β -degradierende Mechanismen negativ beeinflusst.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie festgestellt, dass Tocopherole nicht nur protektive Eigenschaften hinsichtlich AD aufweisen, sondern neben ihren anti-oxidativen Eigenschaften auch das Potential haben, den A β -Gehalt durch Stimulation der amyloidogenen APP-Prozessierung zu erhöhen. Ich konnte belegen, dass zusätzlich auch ein verringerter A β -Abbau unter Einfluss von α - und δ -Tocopherolen vorliegt. Bezüglich des Wirkmechanismus wurden Unterschiede zwischen den untersuchten Tocopherol-Spezies festgestellt: Während δ -Tocopherol den stärksten Effekt auf die A β -Produktion aufweist, ist der erhöhte A β -Gehalt unter Einfluss von α -Tocopherol hauptsächlich auf eine reduzierte A β -Degradation zurückzuführen. Folglich sind weitere Studien erforderlich, die das Potential der einzelnen E-Vitamine bei präventiven bzw. therapeutischen Maßnahmen hinsichtlich AD untersuchen.

4.6.4 EINFLUSS DER APP-PROZESSIERUNG AUF DIE GENEXPRESSION VON PGC-1 α

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten wurden in *Aging Cell* publiziert:

Robinson, A., Grosgen, S., **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Haupenthal, V.J., Hundsdorfer, B., Stahlmann, C.P., Slobodskoy, Y., Muller, U.C., Hartmann, T., Stein, R., and Grimm, M.O. (2014). Upregulation of PGC-1 α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13, 263-272.

Eine mitochondriale Dysfunktion konnte bei AD vielfach nachgewiesen werden, die Ursachen hierfür sind allerdings weitestgehend unbekannt (Blass et al., 2000; Riemer und Kins, 2013). Im Rahmen dieses Projekts wurde der Einfluss von PS, APP und der APP-Prozessierungsprodukte A β und AICD auf verschiedene mitochondriale Eigenschaften untersucht. Es wurde festgestellt, dass PS1 in embryonalen Mausfibroblasten einen Einfluss auf den mitochondrialen Energiemetabolismus hat. Des Weiteren wurde mittels SILAC/MS/MS-Analyse und RT-PCR eine PS1-abhängige transkriptionelle Regulation verschiedener mitochondrialer Proteine festgestellt, zu denen neben mehreren ATP-Synthase-Untereinheiten die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) und PGC1 α zählen. Bei PGC1 α handelt es sich um einen transkriptionellen Ko-Aktivator, der Gene der mitochondrialen Biogenese koordiniert reguliert (Lin et al., 2005; Rodgers et al., 2008). Weitere Experimente deuteten auf eine AICD-abhängige Regulation der PGC1 α -Genexpression hin.

Zunächst wurde von mir die PS1-abhängige Regulation von SOD2 mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) unter Verwendung von MEF PS1/2 -/- und MEF PS1^{res} bestätigt. Wie in Abb. 62 dargestellt, ist der SOD2-Proteingehalt in PS-defizienten MEF im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant auf 155,5% (\pm 6,9 %, $p \leq 0,001$) erhöht.

Außerdem konnte ich in Zusammenarbeit mit Christoph Stahlmann mittels Luciferase-Aktivitätsmessung eine Aktivierung des PGC1 α -Promotors durch AICD bestätigen. Hierzu wurden MEF APP Δ CT15-Zellen transient mit dem Reporterplasmid PGL3-PGC1 α -Luc und dem Standardreporterplasmid pRL-CMV kointransfiziert (3.2.2.3) und anschließend lipofektionsbasiert mit synthetischem AICD oder dem Lösungsmittel Wasser inkubiert (3.2.2.5.1). Durch Messung der Luciferase-Aktivitäten (3.2.1.6) ergab sich unter Einfluss von AICD eine Steigerung der PGC1 α -Promotoraktivität auf 144,7% (\pm 9,7%, $p = 0,01$) (Abb. 63).

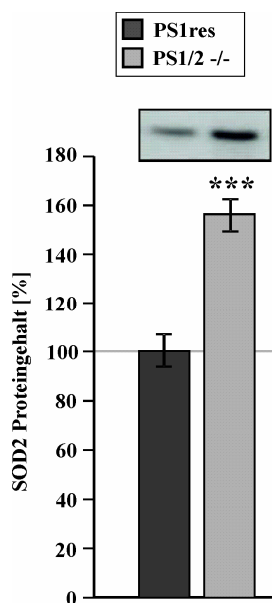


Abb. 62: Einfluss der Presenilin-Genexpression auf SOD2 in embryonalen Mausfibroblasten

Quantitative Bestimmung des SOD2-Proteingehalts in MEF PS1/2 -/- und MEF PS1res mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers ab13533 (n = 5).

Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und bei Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) ($p \leq 0,001$).

MEF PS1/2 -/- = PS1 und PS2 defiziente Mausfibroblasten; MEF PS1res = mit Wildtyp-Presenilin 1 retransfizierter MEF PS1/2 -/- Zellklon.

(Abb. modifiziert nach Robinson et al., 2014)

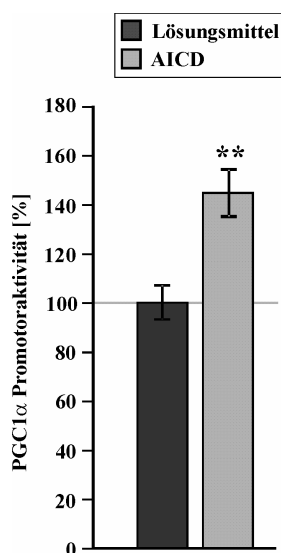


Abb. 63: Einfluss der AICD-Supplementierung auf die PGC1α-Promotoraktivität in embryonalen Mausfibroblasten

Messung der PGC1α-Promotoraktivität in MEF APP Δ CT15 nach Inkubation mit AICD mittels Luciferase-Assay (n = 4). Die Zellen wurden transient mit dem Reporterplasmid PGL3-PGC1 α -Luc (Expression der Firefly-Luciferase unter Kontrolle des PGC1 α -Promotors) und dem Standardreporterplasmid pRL-CMV (konstitutive Expression der *Renilla*-Luciferase) ko-transfiziert und anschließend 90min lang lipofektionsbasiert mit 2,5 μ M AICD oder dem Lösungsmittel Wasser inkubiert. Dargestellt ist die auf die *Gussia*-Luciferase-Aktivität normierte Aktivität der Firefly-Luciferase im Kulturmedium der inkubierten Zellen.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$).

(Abb. modifiziert nach Robinson et al., 2014)

Zusammenfassend konnte in dieser Studie ein Einfluss von PS1 und AICD auf mitochondriale Funktionen belegt werden. PS1 ist demnach an der transkriptionellen Regulation mehrerer Gene beteiligt, welche wichtige mitochondriale Funktionen besitzen. Ich konnte den Effekt von PS1 auf den SOD2-Proteingehalt sowie von AICD auf die Aktivität des PGC1 α -Promotors bestätigen. Aufgrund der Regulation einer Vielzahl von mitochondrial relevanten Genen durch PGC1 α könnten die festgestellten Regulationsmechanismen möglicherweise zu einer mitochondrialen Dysfunktion bei der AD-Pathogenese beitragen.

4.6.5 ERGEBNISSE ZU WEITEREN PROJEKTEN

In diesem Abschnitt werden kurz weitere von mir generierte Daten zu Projekten vorgestellt, die bislang noch nicht publiziert wurden.

4.6.5.1 Einfluss von Amitriptylin und anderer Antidepressiva auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation

Bei diesem Projekt wurde der Einfluss von Amitriptylin und weiterer Antidepressiva (Desipramin, Maprotilin und Fluoxetin) auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation untersucht. Diese Substanzen beeinflussen den Lipidmetabolismus durch Inhibition der aSMase, welche die Umsetzung von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert (Becker et al., 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Antidepressiva in SH-SY5Y-Zellen durch eine Erhöhung des Sphingomyelin/Ceramid-Verhältnisses eine Verschiebung der amyloidogenen zur nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung und somit eine verringerte A β -Sekretion bewirken.

Nach Etablierung einer Methode zur Messung der aSMase-Aktivität (3.2.3.13.7) konnte ich zunächst bestätigen, dass in Anwesenheit aller untersuchten Antidepressiva eine signifikant reduzierte Aktivität der aSMase in SH-SY5Y-Zellen vorliegt. Außerdem wurde von mir mittels aSMase-Aktivitätsmessung die Effizienz des transienten aSMase-Knockdowns in SH-SY5Y WT verifiziert (Abb. 64, Tab. 40), welcher ebenfalls mit einer verringerten A β -Sekretion einhergeht.

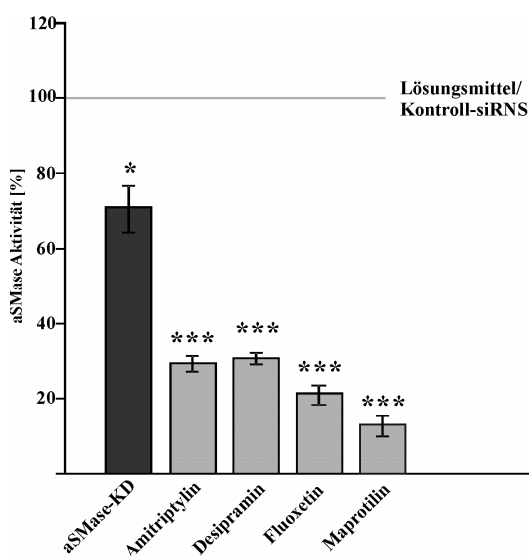


Abb. 64: aSMase-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen nach transientem aSMase-Knockdown und Inkubation mit Antidepressiva

Quantitative Bestimmung der aSMase-Aktivität in SH-SY5Y WT-Zellen nach transientem aSMase-Knockdown (aSMase-KD) und Inkubation mit Antidepressiva. Die Zellen wurden vor dem Experiment über 24Std mit 30 μ M Amitriptylin bzw. 10 μ M Desipramin, Maprotilin, Fluoxetin oder dem Lösungsmittel Wasser behandelt. Die transiente Transfektion der Zellen mit aSMase- bzw. Kontroll-siRNS erfolgte ebenfalls 24Std vor der aSMase-Aktivitätsmessung.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

Tab. 40: Statistik der aSMase-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit Antidepressiva und transientem aSMase-Knockdown

| | aSMase-KD | Amitriptylin | Desipramin | Fluoxetin | Maprotilin |
|------------------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| aSMase-Aktivität [% von Kontrolle] | 71,0 | 29,4 | 30,7 | 21,4 | 13,2 |
| StabwM [%] | 6,2 | 2,0 | 1,6 | 2,6 | 2,8 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | 0,03 | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ |
| n-Zahl | 3 | 5 | 3 | 3 | 3 |

Mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) konnte ich eine Stimulation der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung und eine Reduktion des amyloidogenen APP-Prozessierungsweges unter Einfluss von Amitriptylin bestätigen.

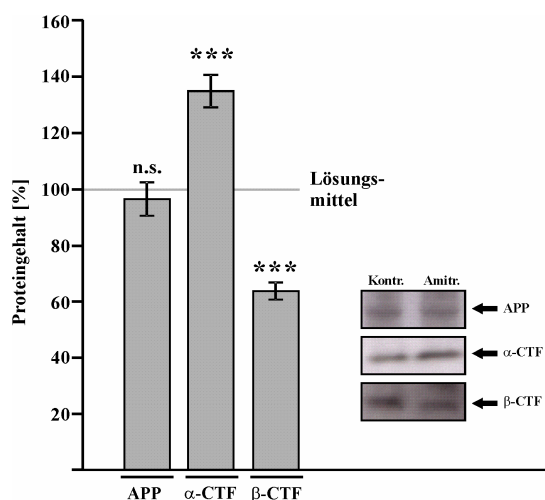


Abb. 65: Einfluss von Amitriptylin auf den Proteingehalt von APP, α -CTF und β -CTF in SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung des APP-, α -CTF- und β -CTF-Gehalts in SH-SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 30 μ M Amitriptylin oder dem Lösungsmittel Wasser mittels Western Blot-Analyse. Die Detektion von APP in SH-SY5Y WT und von β -CTF in SH-SY5Y APP erfolgte unter Verwendung des Antikörpers W02 (APP: n = 15, β -CTF: n = 10). Der Nachweis von α -CTF in SH-SY5Y APP erfolgte durch Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers 2214 (n = 10).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp; SH-SY5Y APP = APP überexprimierende SH-SY5Y-Zellen.

SH-SY5Y APP-Zellen weisen nach Inkubation mit Amitriptylin einen auf 134,9% ($\pm 5,8\%$, $p \leq 0,001$) erhöhten α -CTF- sowie einen auf 63,7% ($\pm 3,1\%$, $p \leq 0,001$) reduzierten β -CTF-Gehalt auf. Der APP-Proteinspiegel in SH-SY5Y WT wird hingegen nicht von Amitriptylin beeinflusst (96,6% $\pm 6,0\%$, $p = 0,69$) (Abb. 65).

Neben der APP-Prozessierung wirkt sich Amitriptylin außerdem auf die A β -Degradation aus. Die Messung des extrazellulären A β -Abbaus (3.2.3.12) ergab eine signifikante Reduktion des verbleibenden A β 40 im Kulturmedium von SH-SY5Y Wildtyp-Zellen nach Amitriptylin-Inkubation (71,1% $\pm 4,2\%$, $p \leq 0,001$) sowie nach transienter Transfektion mit aSMase-siRNS (90,5% $\pm 0,7\%$, $p \leq 0,001$). Nach Zugabe des IDE-Inhibitors NEM (IC₅₀: 220 μ M (Leissring et al., 2010)) ist der Amitriptylin-abhängige Effekt auf das verbleibende A β 40 nicht mehr festzustellen (103,1% $\pm 4,3\%$, $p = 0,62$). Der signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschied des Effekts von Amitriptylin auf die A β -Degradation in An- bzw. Abwesenheit von NEM spricht für eine Steigerung der extrazellulären IDE-Aktivität durch Amitriptylin (Abb. 66).

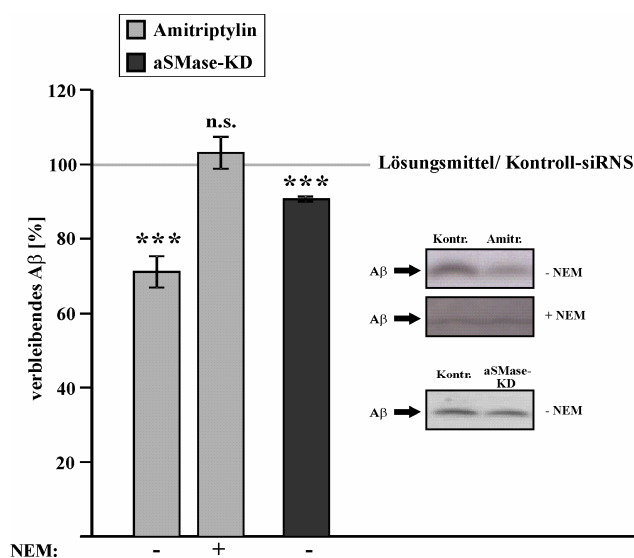


Abb. 66: Einfluss von Amitriptylin und des aSMase-Knockdowns auf die Aβ-Degradation im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation im Kulturmedium von SH-SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit Amitriptylin (n = 12) und transientem aSMase-Knockdown (aSMase-KD) (n = 3). Die Zellen wurden vor dem Experiment über 24Std mit 30μM Amitriptylin oder Wasser behandelt. Die transiente Transfektion der Zellen mit aSMase- bzw. Kontroll-siRNS erfolgte ebenfalls 24Std vor der Messung der Aβ-Degradation. Hierzu wurde das konditionierte Zellkulturmedium mit 0,25μg/ml humanem Aβ40 unter Schütteln über 24Std bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des IDE-unabhängigen Effekts auf die Aβ-Degradation wurde 1mM NEM zugegeben (n = 5). Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; *** p ≤ 0,001).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp.

Insgesamt konnte in dieser Studie eine Reduktion der Aβ-Sekretion durch SH-SY5Y-Zellen unter Einfluss der untersuchten Antidepressiva nachgewiesen werden. Diese basiert auf einer verstärkten nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung und IDE-abhängigen Aβ-Degradation in Kombination mit einer verringerten amyloidogenen APP-Prozessierung. Diese Daten weisen auf ein Potential dieser Wirkstoffe in der AD-Prävention hin.

4.6.5.2 Einfluss von Phytosterinen auf die Aβ-Degradation

Bei Phytosterinen handelt es sich um pflanzliche Cholesterin-Äquivalente, die diesem strukturell sehr ähnlich sind (Piironen et al., 2000; Weihrauch und Gardner, 1978). Wie in Burg et al. publiziert, ist im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen unter Einfluss von Brassicasterin, β-Sitosterin und Campesterin eine Erhöhung des Aβ-Gehalts festzustellen, die weniger stark ausgeprägt ist als unter Einfluss von Cholesterin. Von den untersuchten Phytosterinen ist β-Sitosterin mit der stärksten Erhöhung des Aβ-Gehalts assoziiert. Die Supplementierung von Stigmasterin führt hingegen aufgrund einer verringerten amyloidogenen APP-Prozessierung *in vitro* und *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion des Aβ-Gehalts (Burg et al., 2013).

Im Rahmen dieses Projekts habe ich den Einfluss von β-Sitosterin und Stigmasterin auf die Aβ-Degradation untersucht. Hierzu wurden N2a-Zellen zunächst mit Phytosterinen und anschließend mit Phytosterinen in Kombination mit 1μg/ml humanem Aβ40 inkubiert (3.2.3.12). Die Quantifizierung des nach 16Std verbleibenden humanen Aβ40 ist in Abb. 67 gezeigt.

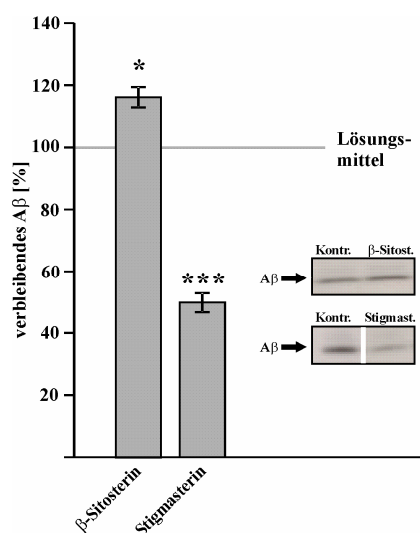


Abb. 67: Einfluss von β-Sitosterin und Stigmasterin auf die Gesamt-Aβ-Degradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der Aβ-Degradation in N2a WT nach Inkubation mit β-Sitosterin und Stigmasterin. Die Zellen wurden 8Std mit Phytosterinen (10μM) oder dem Lösungsmittel Ethanol und anschließend 16Std mit Phytosterinen (10μM)/ Ethanol + 1μg/ml humanem Aβ40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen Aβ40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 (n =5).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (* p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001).

N2a WT = N2a Wildtyp-Zellen.

Wie in Abb. 67 dargestellt, ist eine Reduktion des verbleibenden humanen Aβ40 auf 49,8% ($\pm 3,1\%$, $p \leq 0,001$) und somit eine Steigerung der Aβ-Degradation unter Einfluss von Stigmasterin festzustellen. Im Gegensatz dazu liegt unter Einfluss von β-Sitosterin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ein verringerter Aβ-Abbau vor (verbleibendes Aβ40: 116,1% $\pm 3,3\%$, $p = 0,04$). Die Erhöhung des Aβ-Gehalts im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen nach Inkubation mit β-Sitosterin ist demnach auf eine gesteigerte Aβ-Produktion in Kombination mit einer verringerten Aβ-Degradation zurückzuführen. Im Gegensatz dazu stimuliert Stigmasterin den Aβ-Abbau, was in Kombination mit einer verringerten Aβ-Produktion in einer Reduktion des Gesamt-Aβ-Gehalts resultiert.

4.6.5.3 Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität Aβ-degradierender Enzyme

Bei Plasmalogenen handelt es sich um Phospholipide, in denen die Fettsäuren an der sn1-Position über eine Vinyletherbindung mit dem Glycerin verknüpft sind, während an der sn2-Position meist eine veresterte PUFA vorliegt. Im Hirngewebe von AD-Patienten konnte mehrfach eine Reduktion des Plasmalogen-Gehalts festgestellt werden, welche u.a. auf eine verringerte Plasmalogen-Biosynthese in Anwesenheit eines gesteigerten Aβ-Gehalts zurückzuführen sein könnte (Grimm et al., 2011d; Han et al., 2001; Mett et al., 2016; Rothhaar et al., 2012). In der Studie von Rothhaar et al. konnte gezeigt werden, dass die Plasmalogene PC-PL18:0/18:1, PC-PL18:0/20:4, PC-PL18:0/22:6 und PE-PL18:0/22:6 im Vergleich zu den korrespondierenden Phospholipiden mit zwei veresterten Fettsäuren eine direkte, inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität der γ -Sekretase aufweisen. Da sich die hierbei untersuchten Phospholipid-Spezies nur in der Art der Bindung ihrer Fettsäuren unterscheiden, sind diese Effekte wahrscheinlich auf die in Plasmalogenen vorhandene Vinyletherbindung zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass der gesteigerte zerebrale Aβ-Gehalt in AD-Hirngewebe zu einem reduzierten Plasmalogengehalt führt, welcher wiederum eine gesteigerte γ -Sekretase-Aktivität und somit eine weitere Verstärkung der Aβ-Produktion zur Folge hat (Rothhaar et al., 2012).

Im Rahmen dieses Projekts habe ich den direkten Effekt von Plasmalogenen auf die Aktivität von IDE und NEP im Vergleich zu den entsprechenden Phospholipiden mit zwei veresterten Fettsäuren untersucht. Hierzu wurde die Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH durch die aus SH-SY5Y WT-Lysaten isolierten Enzyme in Anwesenheit der jeweiligen Phospholipide (100μM) bestimmt (3.2.3.13.2, 3.2.3.13.3).

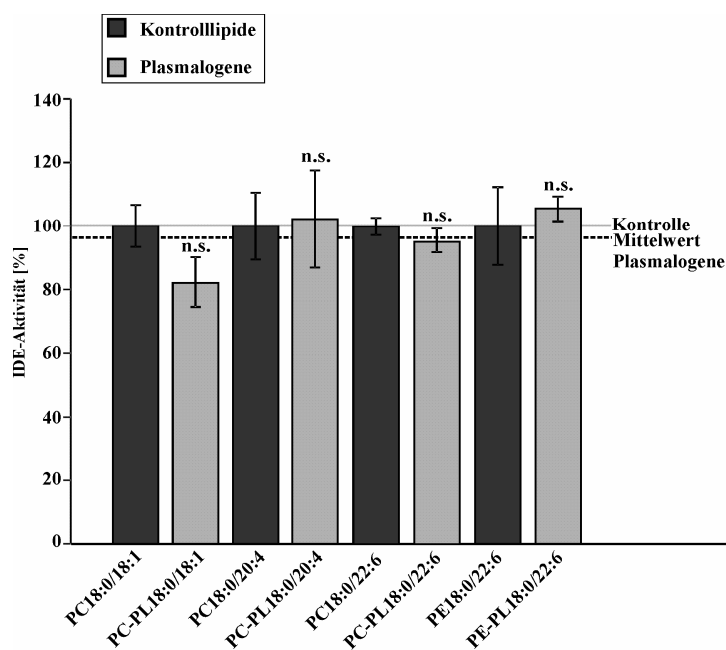


Abb. 68: Einfluss von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von IDE

Quantitative Bestimmung der Enzymaktivität von IDE in Anwesenheit von Plasmalogenen. Die Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH durch das aus SH-SY5Y WT-Lysat isolierte IDE wurde in Anwesenheit von Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden mit zwei veresterten Fettsäuren (100 μ M) gemessen (n =3). Dargestellt ist die quantitative Bestimmung der Steigung der Fluoreszenz über den gesamten Messbereich. Die mittlere Effektstärke der Plasmalogene ist durch eine unterbrochene Linie eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp-Zellen.

Tab. 41: Statistik des Einflusses von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von IDE

| | PC-PL18:0/18:1 | PC-PL18:0/20:4 | PC-PL18:0/22:6 | PE-PL18:0/22:6 |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| IDE-Aktivität [% von Kontrolle] | 82,1 | 102,2 | 95,2 | 105,6 |
| StabwM [%] | 7,8 | 15,3 | 3,7 | 3,9 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,16 | 0,91 | 0,35 | 0,69 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 |

Wie in Abb. 68 und Tab. 41 gezeigt, haben die untersuchten Plasmalogen-Spezies keinen direkten Effekt auf die IDE-Enzymaktivität. Diese ist in Anwesenheit von PC-PL18:0/18:1 im Vergleich zu PC18:0/18:1 reduziert, der Effekt ist statistisch aber nicht signifikant (82,1% \pm 7,8%, p = 0,16). Auch die anderen untersuchten Plasmalogen-Spezies haben im Vergleich zu den Kontrolllipiden keinen signifikanten direkten Effekt auf die Aktivität des Enzyms.

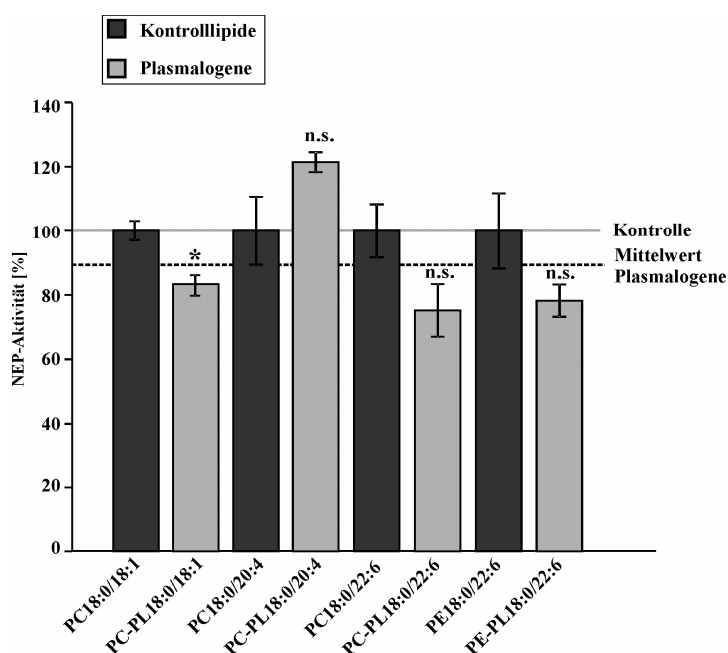


Abb. 69: Einfluss von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von NEP

Quantitative Bestimmung der Enzymaktivität von NEP in Anwesenheit von Plasmalogenen. Die Umsetzung des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH durch das aus SH-SY5Y WT-Lysat isolierte NEP wurde in Anwesenheit von Plasmalogenen bzw. den entsprechenden Phospholipiden mit zwei veresterten Fettsäuren (100 μ M) gemessen (n =3). Dargestellt ist die quantitative Bestimmung der Steigung der Fluoreszenz über den gesamten Messbereich. Die mittlere Effektstärke der Plasmalogene ist durch eine unterbrochene Linie eingezeichnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant, * p \leq 0,05).

SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp-Zellen.

Tab. 42: Statistik des Einflusses von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von NEP

| | PC-PL18:0/18:1 | PC-PL18:0/20:4 | PC-PL18:0/22:6 | PE-PL18:0/22:6 |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| NEP-Aktivität [% von Kontrolle] | 83,3 | 121,5 | 75,2 | 78,3 |
| StabwM [%] | 3,1 | 3,1 | 8,1 | 5,0 |
| Signifikanz [zu Kontrolle] | 0,02 | 0,12 | 0,10 | 0,17 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 | 3 |

Die NEP-Enzymaktivität ist in Anwesenheit von PC-PL18:0/18:1 im Vergleich zu PC18:0/18:1 signifikant verringert ($83,3\% \pm 3,1\%$, $p = 0,02$). Einen ähnlichen, statistisch allerdings nicht signifikanten Effekt auf die NEP-Enzymaktivität haben PC-PL18:0/22.6 und PE-PL18:0/22:6 ($75,2\% \pm 8,1\%$, $p = 0,10$ bzw. $78,3\% \pm 5,0\%$, $p = 0,17$). Im Gegensatz dazu ist die NEP-Enzymaktivität in Anwesenheit von PC-PL18:0/20:4 im Vergleich zu PC18:0/20:4 gesteigert, wobei dieser Effekt ebenfalls statistisch nicht signifikant ist ($121,5\% \pm 3,1\%$, $p = 0,12$) (Abb. 69, Tab. 42).

Die untersuchten Plasmalogen-Spezies haben im Vergleich zu den entsprechenden Phospholipiden mit zwei veresterten Fettsäuren somit keine bzw. keine einheitlichen direkten Effekte auf die Enzymaktivität von NEP und IDE.

4.6.5.4 Untersuchung der bidirektionalen Wechselwirkung zwischen Sulfatiden und der APP-Prozessierung

Sulfatide sind 3-O-Sulfogalaktosylceramide, deren Synthese ausgehend von Ceramid durch die Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) und die Gal3St1 katalysiert wird (Han, 2010). In der Literatur ist eine erhebliche Reduktion des Sulfatidgehalts im Hirngewebe von AD-Patienten beschrieben (Bandaru et al., 2009; Gottfries et al., 1996; Han et al., 2002). In dieser Studie sollte der Einfluss der APP-Prozessierung auf den Sulfatid-Metabolismus und umgekehrt die Wirkung von Sulfatiden auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation untersucht werden.

In vorhergehenden Experimenten wurde eine dosisabhängige Reduktion des Gesamt-A β -Gehalts im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen nach Sulfatid-Inkubation festgestellt. Des Weiteren deuteten die Daten aus einer Vielzahl von Zellkulturmodellen auf eine Reduktion der Gal3St1-Expression und somit der Sulfatid-Biosynthese durch AICD hin.

Ich habe den Einfluss der Sulfatid-Supplementierung auf den A β 40- und A β 42-Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen untersucht. Außerdem wurde von mir die Auswirkung des Knockdowns der Arylsulfatase A (ARSA), einem Enzym des Sulfatid-Katabolismus, auf den Gesamt-A β -Spiegel im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen analysiert. Das genaue Vorgehen zur Bestimmung des Gesamt-A β -, A β 40- bzw. A β 42-Gehalts ist in 3.2.3.7-3.2.3.10 beschrieben.

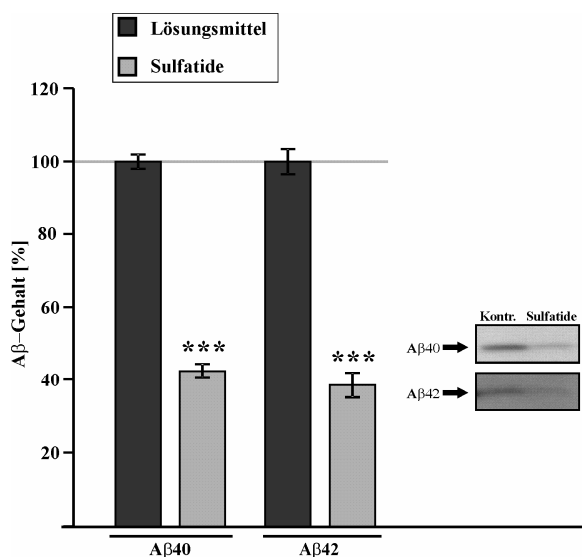


Abb. 70: Einfluss von Sulfatiden auf den Aβ40- und Aβ42-Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung des Aβ40- und Aβ42-Spiegels im Kulturmedium von SH-SY5Y APP mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02. Die Zellen wurden vor den Experimenten über 24Std mit 20μM Sulfatidextrakt oder dem Lösungsmittel Ethanol inkubiert. Die Immunpräzipitation von Aβ40 erfolgte unter Verwendung des Antikörpers G210 (n = 3), für die Immunpräzipitation von Aβ42 wurde der Antikörper G211 verwendet (n = 3).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

SH-SY5Y APP = APP überexprimierende SH-SY5Y-Zellen.

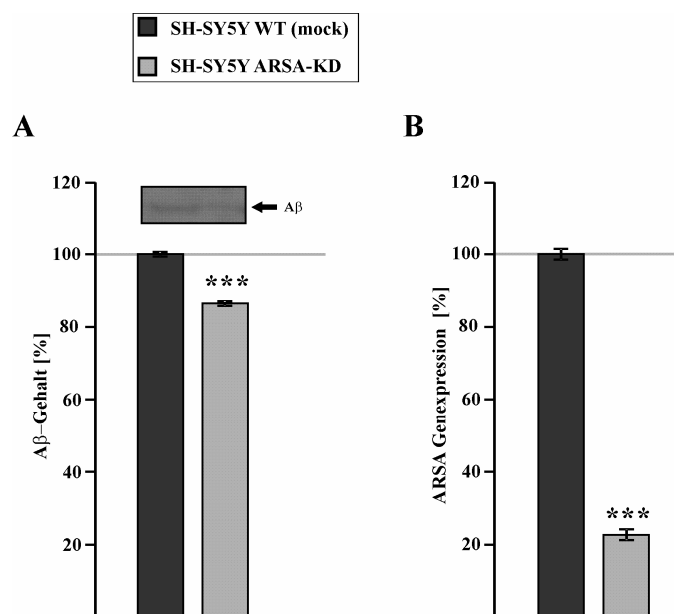


Abb. 71: Einfluss des ARSA-Knockdowns auf den Aβ-Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen

(A) Quantitative Bestimmung des Aβ-Spiegels im Kulturmedium von SH-SY5Y ARSA-KD und SH-SY5Y WT (mock) mittels Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 (n = 3).

(B) Überprüfung der ARSA-Knockdown-Effizienz in SH-SY5Y ARSA-KD-Zellen mittels RT-PCR (n = 3). Die Zellen wurden vor den Experimenten vergleichbar oft passagiert (± 3 Passagen) und nach Erreichen einer Konfluenz von 100% verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (***) $p \leq 0,001$.

SH-SY5Y WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte SH-SY5Y-Zellen, SH-SY5Y ARSA-KD = SH-SY5Y ARSA-Knockdown-Zellen.

Im Kulturmedium von SH-SY5Y APP ist nach 24-stündiger Inkubation mit 20μM Sulfatidextrakt eine Reduktion des Aβ40- und Aβ42-Gehalts auf 42,4% ($\pm 1,9\%$, $p \leq 0,001$) bzw. 38,5% ($\pm 3,4\%$, $p \leq 0,001$) nachzuweisen (Abb. 70). Damit übereinstimmend liegt eine signifikante Reduktion des Aβ-Gehalts auf 86,5% ($\pm 0,62\%$, $p \leq 0,001$) im Kulturmedium von SH-SY5Y ARSA-Knockdown-Zellen (ARSA-Genexpression: 22,7% $\pm 1,5\%$, $p \leq 0,001$; Abb. 71B) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen vor (Abb. 71A). Diese Ergebnisse bestätigen eine Reduktion der Aβ-Sekretion bei gesteigertem zellulären Sulfatidgehalt.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Sulfatid-Supplementierung auf die Aβ-Degradation in N2a- und SH-SY5Y WT-Zellen untersucht (3.2.3.12). Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Sulfatidextrakt (20μM) und anschließend mit 20μM Sulfatidextrakt in Kombination mit 0,5μg/ml humanem Aβ40 inkubiert. Die Quantifizierung des verbleibenden humanen Aβ40 ist in Abb. 72 dargestellt.

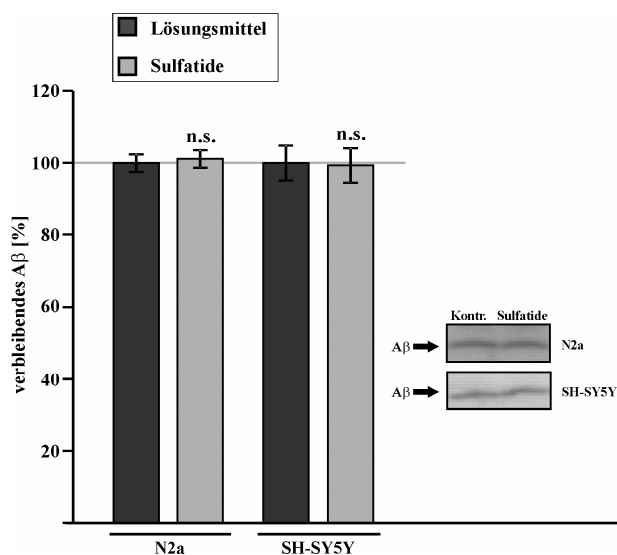


Abb. 72: Einfluss von Sulfatiden auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a- und SH-SY5Y-Zellen

Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT und SH-SY5Y WT nach Inkubation mit Sulfatidextrakt. Die N2a-Zellen wurden 16Std mit Sulfatidextrakt (20 μ M) oder dem Lösungsmittel Ethanol und anschließend 6Std mit Sulfatidextrakt (20 μ M)/ Ethanol + 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Die SH-SY5Y WT-Zellen wurden nach 16-stündiger Vorinkubation mit 20 μ M Sulfatidextrakt über 8Std mit 20 μ M Sulfatidextrakt und 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Dargestellt ist die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02 (N2a WT: n = 10; SH-SY5Y WT: n = 7).

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant).

N2a WT = N2a Wildtyp-Zellen, SH-SY5Y WT = SH-SY5Y-Wildtyp-Zellen.

Die Supplementierung von Sulfatiden beeinflusst die A β -Degradation weder in N2a- noch in SH-SY5Y-Zellen (verbleibendes humanes A β 40, N2a WT: 101,2% \pm 2,4%, p = 0,74; verbleibendes humanes A β 40, SH-SY5Y WT: 99,4% \pm 4,8%, p = 0,92) (Abb. 72). Veränderungen im A β -Abbau können somit als Ursache für die starke Reduktion des A β -Gehalts im Kulturmedium von SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit Sulfatidextrakt (Abb. 70) ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen transkriptionellen Regulation der Gal3St1 durch AICD habe ich die Gal3St1-Genexpression in SH-SY5Y WT nach Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT (3.2.2.5.2) mittels RT-PCR (3.2.1.5) analysiert.

Die mit DAPT behandelten Zellen weisen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Kontrollzellen eine signifikant auf 132,1% (\pm 4,8%, p = 0,003) erhöhte Gal3St1-Expression auf (Abb. 73A). Die Reduktion der Gal3St1-Genexpression durch AICD konnte auch mittels Gal3St1-Promotor-Aktivitätsmessung (3.2.1.6) bestätigt werden. Die lipofektionsbasierte Supplementierung von MEF APPACT15 mit AICD-Peptiden (3.2.2.5.1) führt zu einer signifikant verringerten Gal3St1-Promotoraktivität (85,4% \pm 3,5%, p = 0,005) (Abb. 73B).

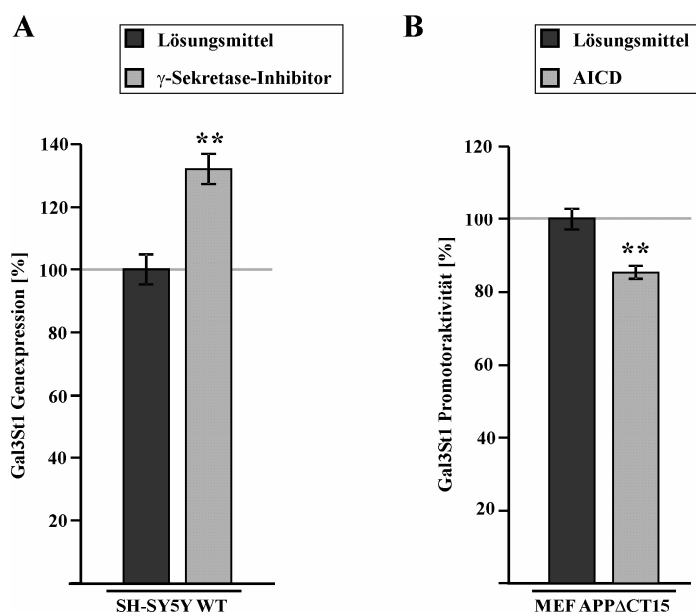


Abb. 73: Einfluss der γ -Sekretase-Inhibition auf die Gal3St1-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen und der AICD-Supplementierung auf die Gal3St1-Promotoraktivität in embryonalen Mausfibroblasten

(A) Quantitative Bestimmung der Gal3St1-Genexpression in SH-SY5Y WT-Zellen mittels RT-PCR nach Inkubation mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT ($n = 3$). Die Zellen wurden vor der RNS-Isolation über einen Zeitraum von 72Std mit 2,5 μ M DAPT oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt.

(B) Quantitative Bestimmung der Gal3St1-Promotoraktivität in MEF APP Δ CT15 nach Supplementierung von AICD mittels Luciferase-Assay ($n = 4$). Die Zellen wurden transient mit einem Gal3St1-Reporterplasmid (Expression der *Gaussia*-Luciferase unter Kontrolle des Gal3St1-Promotors, konstitutive Expression von SEAP) transfiziert und anschließend 30min lang lipofektionsbasiert mit AICD-Peptiden (2,5 μ M) oder dem Lösungsmittel Wasser inkubiert. Dargestellt ist die *Gaussia*-Luciferase-Aktivität im Kulturmedium der Zellen.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (** $p \leq 0,01$). SH-SY5Y WT = SH-SY5Y Wildtyp-Zellen, MEF APP Δ CT15 = embryonale Mausfibroblasten mit Deletion des APP C-Terminus.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieses Projekts ein bidirektionaler Zusammenhang zwischen der APP-Prozessierung und des Sulfatid-Metabolismus festgestellt. Ein erhöhter zellulärer Sulfatidgehalt bewirkt demnach eine starke Reduktion der sekretierten A β -Peptide. Als Ursache hierfür wurde in weiteren Experimenten eine verringerte amyloidogene APP-Prozessierung identifiziert. Umgekehrt wird die Sulfatid-Biosynthese durch AICD inhibiert.

4.6.5.5 Einfluss von Gangliosiden und Gangliosidvorläufern auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation

Die Gruppe der Ganglioside umfasst glykosylierte Sphingolipide, die vielfach mit der AD-Pathogenese in Verbindung gebracht wurden. Die Glukosylceramid-Synthase (GCS) katalysiert den ersten Schritt der Gangliosid-Biosynthese durch Addition von Glukose an Ceramid, wobei Glukosylceramid (GluCer) entsteht. Durch weitere Additionsreaktionen wird aus GluCer zunächst Laktosylceramid (LakCer) und im Folgenden die Gruppe der Ganglioside synthetisiert (Ariga et al., 2008). Es konnte eine gesteigerte GCS-Aktivität in Abwesenheit von APP und PS nachgewiesen werden, was auf eine Regulation der Gangliosid *de novo*-Synthese durch die APP-Prozessierung hindeutet (Grimm et al., 2014a). Im Folgenden wurde umgekehrt die Beeinflussung der APP-Prozessierung und der A β -Degradation durch die Gangliosidvorläufer GluCer und LakCer sowie durch Gesamt-Gangliosidextrakt untersucht. Hierzu wurden SH-SY5Y- und N2a-Zellen mit den entsprechenden Lipiden inkubiert.

Der Gehalt von A β , sAPP β und sAPP α im Kulturmedium der inkubierten SH-SY5Y APP-Zellen wurde von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsdörfer mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) bestimmt, A β wurde zuvor immunpräzipitiert (3.2.3.7).

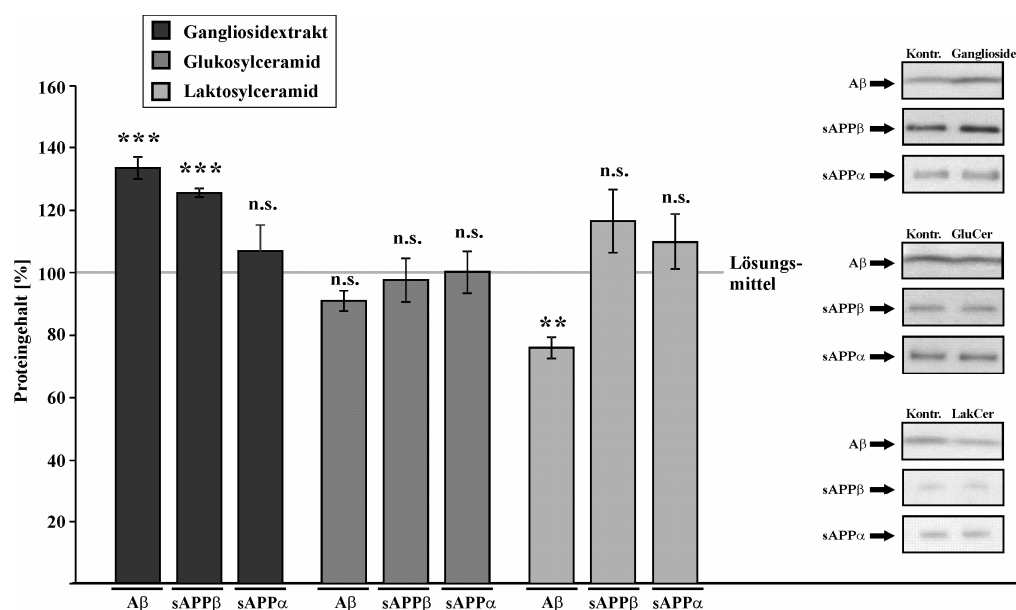


Abb. 74: Einfluss von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf den Proteingehalt von A β , sAPP β und sAPP α im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen

Quantitative Bestimmung des A β -, sAPP β - und sAPP α -Gehalts im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 μ M Gangliosidextrakt, 100 μ M GluCer, 100 μ M LakCer oder dem Lösungsmittel Ethanol mittels Western Blot-Analyse. Zur Bestimmung des A β -Gehalts wurde zunächst eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper W02 durchgeführt. Die Detektion von A β und sAPP α erfolgte unter Verwendung des Antikörpers W02, für den Nachweis von sAPP β wurde der Antikörper Mbs492139 verwendet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

SH-SY5Y APP = APP-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen.

Tab. 43: Statistik des Einflusses von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf den Proteingehalt von A β , sAPP β und sAPP α im Kulturmedium von SH-SY5Y APP-Zellen

| | Gangliosidextrakt | Glukosylceramid | Laktosylceramid |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| A β -Gehalt [% von Ethanol] | 133,5 | 90,1 | 76,1 |
| StabwM [%] | 3,5 | 3,2 | 3,4 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | $\leq 0,001$ | 0,12 | 0,002 |
| n-Zahl | 4 | 3 | 3 |
| sAPP β -Gehalt [% von Ethanol] | 125,6 | 97,6 | 116,7 |
| StabwM [%] | 1,4 | 6,9 | 10,0 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | $\leq 0,001$ | 0,82 | 0,303 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 |
| sAPP α -Gehalt [% von Ethanol] | 107,2 | 100,2 | 110,0 |
| StabwM [%] | 8,2 | 6,8 | 8,9 |
| Signifikanz [zu Ethanol] | 0,57 | 0,99 | 0,45 |
| n-Zahl | 3 | 3 | 3 |

Nach Inkubation mit Gangliosidextrakt wurde ein signifikant erhöhter Gehalt an A β und sAPP β festgestellt, was auf eine gesteigerte amyloidogene APP-Prozessierung hindeutet. Im Gegensatz dazu bewirkt GluCer keine signifikante Veränderung des A β -Spiegels, nach Inkubation mit LakCer ist dieser signifikant reduziert. Der Gehalt an sAPP α und sAPP β ist unter Einfluss von GluCer und LakCer unverändert (Abb. 74, Tab. 43).

Der unveränderte sAPP α - und sAPP β -Gehalt unter Einfluss von LakCer könnte darauf hindeuten, dass der Reduktion des A β -Gehalts nach Inkubation mit diesem Lipid ein anderer Mechanismus als eine veränderte APP-Prozessierung zugrunde liegt. Daher wurde von mir der Effekt von Gangliosidextrakt, GluCer und LakCer auf die A β -Degradation analysiert. Hierzu wurden N2a-Zellen zunächst mit den einzelnen Lipiden und anschließend mit den jeweiligen Lipiden in Kombination mit 0,5 μ g/ml synthetischem A β 40 inkubiert (3.2.3.12). Das verbleibende humane A β 40 wurde anschließend mittels Western Blot-Analyse (3.2.3.8-3.2.3.10) quantitativ bestimmt.

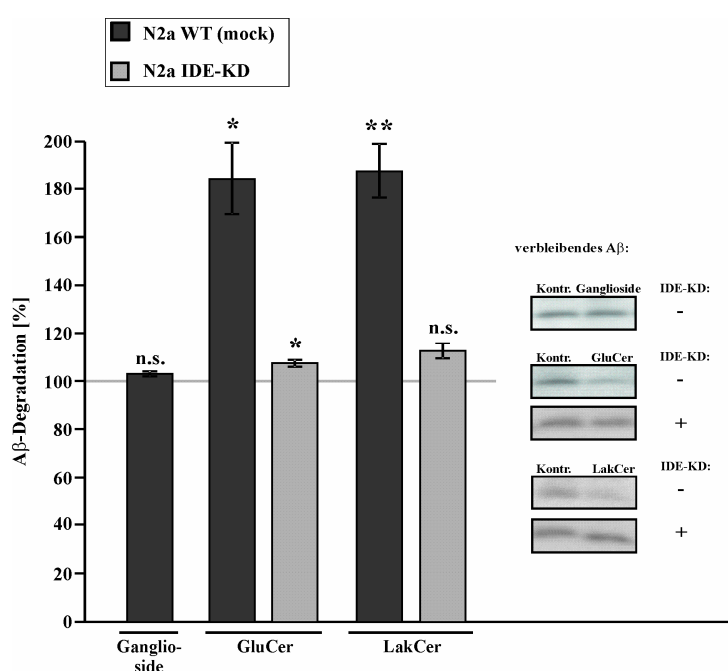


Abb. 75: Einfluss von Gangliosidextrakt, Glukosylceramid und Laktosylceramid auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a-Zellen

Quantitative Bestimmung der A β -Degradation in N2a WT (mock) und N2a IDE-KD nach Inkubation mit Gangliosidextrakt (N2a WT (mock): n = 4), Glukosylceramid (N2a WT (mock): n = 6; N2a IDE-KD: n = 3) und Laktosylceramid (N2a WT (mock): n = 6; N2a IDE-KD: n = 3). Die Zellen wurden 18Std mit Gangliosidextrakt (50 μ M), Glukosylceramid (GluCer) (100 μ M), Laktosylceramid (LakCer) (100 μ M) oder dem Lösungsmittel Ethanol und anschließend 6Std mit den jeweiligen Lipiden/Ethanol + 0,5 μ g/ml humanem A β 40 inkubiert. Die Quantifizierung des in dem Zellkulturmedium verbleibenden humanen A β 40 erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers W02. Die A β -Degradation wurde durch Kehrwertbildung des verbleibenden humanen A β 40 berechnet.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-test ermittelt (n.s. nicht signifikant; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01).

N2a WT (mock) = mit Kontrollplasmid transfizierte N2a Wildtyp-Zellen; N2a IDE KD = N2a IDE-Knockdown-Zellen.

Wie in Abb. 75 dargestellt, hat die Inkubation der Zellen mit Gangliosidextrakt keinen Einfluss auf den A β -Abbau (102,9% \pm 1,1%, p = 0,12). Im Gegensatz dazu ist die A β -Degradation nach Behandlung von N2a WT (mock)-Zellen mit GluCer und LakCer signifikant auf 184,5% (\pm 15,0%, p = 0,02) bzw. 187,7% (\pm 11,3%, p = 0,002) gesteigert. Da diese Effekte bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen weniger stark ausgeprägt sind (p \leq 0,001) (GluCer: 107,3% \pm 1,5%, p = 0,03; LakCer: 112,5% \pm 3,2%, p = 0,06), ist davon auszugehen, dass unter Einfluss der Gangliosidvorläufer eine Steigerung der IDE-abhängigen A β -Degradation vorliegt (Abb. 75).

Im Rahmen dieses Projekts wurde also eine Stimulation der A β -Produktion durch Gangliosidextrakt festgestellt. Die Gangliosid-Vorläufer GluCer und LakCer bewirken hingegen eine Steigerung der IDE-abhängigen A β -Degradation, die jedoch nur im Fall von LakCer zu einem signifikant reduzierten A β -Gehalt im Kulturmedium der entsprechend behandelten SH-SY5Y APP-Zellen führt. Die Inhibition der GM3-Synthase, welche die Synthese von Gangliosiden aus LakCer katalysiert, würde folglich durch Reduktion des Gangliosidgehalts und gleichzeitiger Akkumulation von LakCer zu einem verringerten A β -Gehalt führen. Diese These konnte von Dr. Benjamin Hundsdörfer in weiteren Experimenten unter Verwendung von GM3-Synthase-Knockdown-Zellen bestätigt werden. Die GM3-Synthase könnte somit ein molekularer Angriffspunkt bei der AD-Therapie darstellen.

4.6.6 ZUSAMMENFASSUNG DER BETEILIGUNGEN AN KOOPERATIONSPROJEKTEN

In Tab. 44 ist eine Übersicht über meine Beteiligung an den einzelnen Kooperationsprojekten gegeben.

Tab. 44: Beteiligungen an Kooperationsprojekten

| Projekt (Publikation), Abschnitt | Abb. in dieser Arbeit/ in Publikation | Beteiligung |
|---|---|---|
| Plasmalogens Inhibit APP Processing by Directly Affecting γ -Secretase Activity in Alzheimer's Disease (Rothhaar et al., 2012), 4.6.5.3 | Abb. 68 | - direkter Effekt von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von IDE |
| | Abb. 69 | - direkter Effekt von Plasmalogenen auf die Enzymaktivität von NEP |
| | | - <i>in vitro</i> -Inkubationen von Plasmalogenen |
| Plant Sterols the Better Cholesterol in Alzheimer's Disease? A Mechanical Study (Burg et al., 2013), 4.6.5.2 | Abb. 67 | - A β -Gesamtdegradation in N2a WT-Zellen unter Einfluss von β -Sitosterin und Stigmasterin |
| | | - Inkubation von Zellen mit Phytosterinen |
| Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP (Robinson et al., 2014), 4.6.4 | Abb. 62/ 1e Abb. 63/ 3c | - SOD2-Proteingehalt in MEF PS1/2 -/- und MEF PS1res |
| | | - PGC1 α -Promotoraktivität in MEF APPACT15 nach Inkubation mit AICD |
| PS Dependent APP Cleavage Regulates Glucosylceramide Synthase and is Affected in Alzheimer's Disease (Grimm et al., 2014a), 4.6.5.5 | Abb. 74 | - A β -, sAPP α - und sAPP β -Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y APP unter Einfluss von Glukosylceramid, Laktosylceramid und Gangliosidextrakt |
| | Abb. 75 | - A β -Gesamtdegradation in N2a WT (mock) und N2a IDE-KD unter Einfluss von Glukosylceramid, Laktosylceramid und Gangliosidextrakt |
| | | - Inkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten |
| Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease (Grimm et al., 2014b), 4.6.1 | Abb. 56/ 1b Abb. 56/ 1d Abb. 57/ 2c Abb. 58/ 3a Abb. 58/ 3b | - A β 40- und A β 42-Gehalt im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D $_3$ -Spiegel und Kontrolltieren |
| | | - Gesamt-A β -Gehalt im Kulturmedium von APP-überexprimierenden N2a Zellen nach Langzeit-Inkubation mit 25(OH)D $_3$ |
| | | - BACE1-Proteingehalt im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D $_3$ -Spiegel und Kontrolltieren |
| | | - NEP-Enzymaktivität im Hirngewebe von Mäusen mit verringertem 25(OH)D $_3$ -Spiegel und Kontrolltieren |
| | | - NEP-Enzymaktivität in N2a WT-Zellen nach Langzeit-Inkubation mit 25(OH)D $_3$ |

| Projekt (Publikation), Abschnitt | Abb. in dieser Arbeit/ in Publikation | Beteiligung |
|---|---|---|
| Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of α -, γ - and δ - Tocopherol on A β -Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells (Grimm et al., 2015b), 4.6.3 | Abb. 61A/ 4a Abb. 61B/ 4b Abb. 30A/ 4c | - A β -Gesamtdegradation in N2a WT (mock) nach Inkubation mit α , γ - und δ -Tocopherol - A β -Gesamtdegradation in N2a IDE-Knockdown nach Inkubation mit α -, γ - und δ -Tocopherol - IDE-Proteingehalt in N2a WT (mock) und N2a IDE-Knockdown |
| Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing (Grimm et al., 2016a), 4.6.2 | Abb. 59 Abb. 60/ 2d | - Zytotoxizität von oxidierten Lipidspezies auf SH-SY5Y WT - Genexpression der Bestandteile der β - und γ -Sekretase in SH- SY5Y WT-Zellen nach Inkubation mit oxidierten Lipidspezies |
| Amitriptyline and other antidepressants decrease amyloidogenic processing of the Alzheimer's amyloid precursor protein by affecting sphingolipid homeostasis via acid Sphingomyelinases, 4.6.5.1 | Abb. 64 Abb. 65 Abb. 66 | - aSMase-Aktivität in SH-SY5Y WT nach aSMase-Knockdown und Inkubation mit Antidepressiva - APP-, α -CTF- und β -CTF-Gehalt in SH-SY5Y WT bzw. SH- SY5Y APP nach Inkubation mit Amitriptylin - A β -Gesamtdegradation im Kulturmedium von SH-SY5Y WT nach Inkubation mit Amitriptylin und aSMase-Knockdown |
| Bidirectional Link between sulfatide homeostasis and processing of the Alzheimer's amyloid precursor protein, 4.6.5.4 | Abb. 70 Abb. 71 Abb. 72 Abb. 73A Abb. 73B | - A β 40- und A β 42-Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y APP nach Inkubation mit Sulfatidextrakt - A β -Gehalt im Kulturmedium von SH-SY5Y ARSA-KD - A β -Gesamtdegradation in N2a WT und SH-SY5Y WT nach Inkubation mit Sulfatidextrakt - Gal3St1-Genexpression in SH-SY5Y WT nach Inkubation mit γ - Sekretase-Inhibitor - Gal3St1-Promotoraktivität in MEF APPACT15 nach Inkubation mit AICD |

5 DISKUSSION

5.1 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON NEPRILYSIN DURCH AICD

5.1.1 GENREGULATORISCHE FUNKTION VON AICD

Infolge der sequentiellen proteolytischen Prozessierung des Vorläuferproteins APP kommt es zur Freisetzung mehrerer Produkte, zu denen A β -Peptide sowie das zytosolisch vorliegende AICD zählen. Die verstärkte Produktion von A β 42 und die daraus resultierende Akkumulation bzw. Aggregation des Peptids im Hirngewebe wird als Ursache der AD-Pathogenese angesehen (Hardy und Selkoe, 2002; Hardy und Higgins, 1992).

Für AICD wird eine Funktion bei der transkriptionellen Regulation zahlreicher Gene wie u.a. der für APP, BACE1, NEP, p53, GSK3 β , LRP1, SPT, AGPS, GD3S und PGC1 α kodierenden Gene diskutiert (Grimm et al., 2011b; Grimm et al., 2011d; Grimm et al., 2012c; Grimm et al., 2013b; Liu et al., 2007; Robinson et al., 2014). Bereits bei dem ersten experimentellen Nachweis von AICD wurde die große Ähnlichkeit des Peptids zu NICD erkannt (Passer et al., 2000), welches bei der proteolytischen Prozessierung des TypI-Transmembran-Rezeptors Notch freigesetzt wird. Nach seiner Reifung und Aktivierung durch die Bindung von DSL (Delta, Serrate/Jagged)-Liganden wird das heterodimere Notch-Rezeptor-Molekül zunächst an der S2-Position durch Mitglieder der ADAM-Proteinfamilie geschnitten, wodurch es zur Freisetzung der extrazellulären Domäne und zur Entstehung des membranständigen Fragments NEXT (engl. notch extracellular truncation) kommt (Mumm et al., 2000). Ähnlich wie die C-terminalen Fragmente von APP wird NEXT anschließend innerhalb der Transmembrandomäne durch den γ -Sekretase-Komplex prozessiert (De Strooper et al., 1999; Sastre et al., 2001). Infolge dieses S3-Schnitts kommt es zur Freisetzung von NICD in das Zytosol und zur anschließenden Importin α -abhängigen Translokation des Peptids in den Nukleus (Huenniger et al., 2010). Durch die Interaktion mit CSL (CBF1-SU(H)-LAG1)-Transkriptionsfaktoren (Hsieh et al., 1996; Schroeter et al., 1998) ist NICD in der Lage, die Transkription zahlreicher Zielgene zu regulieren (Borggreffe und Oswald, 2009; Wang et al., 2015a).

Aufgrund der auffälligen Homologie zwischen der Prozessierung von APP- und des Notch-Rezeptors wurde eine mögliche analoge genregulatorische Funktion von AICD untersucht. Die Bildung des transkriptionell aktiven AFT-Komplexes aus AICD, dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 wurde erstmals von Cao und Südhof nachgewiesen (Cao und Südhof, 2001). In späteren Studien konnte die Existenz der AFT-Komplexe bestätigt und deren nukleäre Lokalisation innerhalb sogenannter *transcription factories* (Jackson et al., 1993) demonstriert werden (Cao und Südhof, 2001; Konietzko et al., 2010; von Rotz et al., 2004). Das Protein MED12, ein Bestandteil des eukaryotischen Mediator-Komplexes, wurde schließlich als Bindeglied zwischen den AFT-Komplexen und des DNA-abhängigen RNA-Polymerase II-Kernkomplexes identifiziert (Xu et al., 2011).

Die Translokation von AICD in den Zellkern kann durch zahlreiche weitere Adapterproteine beeinflusst werden. Die Bildung der AICD/Fe65-Komplexe wird beispielsweise durch dimere 14-3-3 γ -Proteine, die gleichzeitig an das VTPEER-Motiv von AICD und an Fe65 binden, gesteigert (Sumioka et al., 2005). Die Bindung von AICD an MINT1/X11 α resultiert hingegen in einer verstärkten Degradation des Peptids im Zytosol und somit in einer reduzierten Translokation von AICD in den Nukleus (von Rotz et al., 2004). Der Transport von AICD in den Zellkern wird ebenfalls negativ durch das Ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 beeinflusst, dessen Interaktion mit AICD zu einer reduzierten Bildung der AICD/Fe65-Komplexe führt (Lee et al., 2008).

In der Literatur werden jedoch auch alternative Modelle zu der AICD- bzw. APP-abhängigen Genregulation diskutiert (Muller et al., 2008). Zu diesen zählen u.a. der unabhängige Transport von AICD und Fe65 in den Zellkern (Nakaya und Suzuki, 2006) sowie die AICD-unabhängige transkriptionelle Regulation von Zielgenen durch Fe65/Tip60. Dem zweiten Modell zufolge wird Fe65 durch die Bindung an den C-Terminus von APP aktiviert, infolge des γ -Sekretase-Schnitts gemeinsam mit AICD in das Zytosol freigesetzt und in den Zellkern transportiert, wo es einen transkriptionell aktiven Komplex mit Tip60 bildet während AICD schnell im Zytosol abgebaut wird (Cao und Sudhof, 2004). Gegen dieses Modell spricht allerdings der bereits erwähnte Nachweis von AICD/Fe65- bzw. von AFT-Komplexen im Nukleus (Cao und Sudhof, 2001; Chang et al., 2006; Konietzko et al., 2010; von Rotz et al., 2004).

Neben AFT-Komplexen konnten auch AJT-Komplexe, die aus der alternativen JIP1-vermittelten Translokation von AICD in den Zellkern und der anschließenden Bindung des AICD/JIP1-Komplexes an Tip60 resultieren, im Nukleus nachgewiesen werden (Scheinfeld et al., 2003; von Rotz et al., 2004). Alternativ zu Tip60 kann der Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 mit AICD/Fe65 interagieren und an die Promotorregionen von AICD-regulierten Genen binden (Kim et al., 2003; Zambrano et al., 1998).

Die Ergebnisse zweier Studien deuten darauf hin, dass es sich bei dem infolge der amyloidogenen APP-Prozessierung entstehenden AICDs um die genregulatorisch aktive Form des Peptids handelt (Belyaev et al., 2010; Goodger et al., 2009). Nach einem kontrovers diskutierten, von Belyaev et al. postulierten Modell (Abb. 76) ist dies auf die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden alternativen APP-Prozessierungswege und der schnellen Degradation von AICD im Zytosol zurückzuführen. Diesem Modell zufolge kann das durch die Aktivität der β - und γ -Sekretase in azidischen intrazellulären Kompartimenten freigesetzte AICD zusammen mit Fe65 in den Zellkern translozieren, während das durch die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung an der Zelloberfläche gebildete AICD aufgrund der größeren Distanz zum Nukleus und dem damit einhergehenden verstärkten Abbau durch IDE nicht in den Zellkern gelangt (Belyaev et al., 2010). In Abb. 76 ist das allgemein favorisierte Modell zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen durch AICD und die daran beteiligten Adapterproteine gezeigt.

Trotz der allgemein anerkannten Funktion von NICD bei der transkriptionellen Regulation zahlreicher Gene (Borggreve und Oswald, 2009), wird die Rolle von AICD bei der Genregulation in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine direkte Interaktion des Peptids mit regulatorischen *cis*-wirkenden Elementen bzw. eine Promotor-Aktivierung durch AICD wurde nur für wenige potentielle Zielgene, zu denen u.a. NEP zählt, belegt (Alves da Costa et al., 2006; Baek et al., 2002; Belyaev et al., 2009; Liu et al., 2007). Des Weiteren konnte die AICD-abhängige Regulation von zuvor postulierten Zielgenen wie u.a. NEP mehrfach durch andere Arbeitsgruppen nicht validiert werden (Hebert et al., 2006; Muller et al., 2007; Waldron et al., 2008) (Tab. 45). Die Inhomogenität der Ergebnisse verschiedener Studien ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich bei AICD um ein sehr instabiles Peptid mit einer kurzen Halbwertszeit von wenigen Minuten handelt (Cupers et al., 2001) und dass sich verschiedene AICD-Spezies erheblich in ihrem genregulatorischen Potenzial unterscheiden.

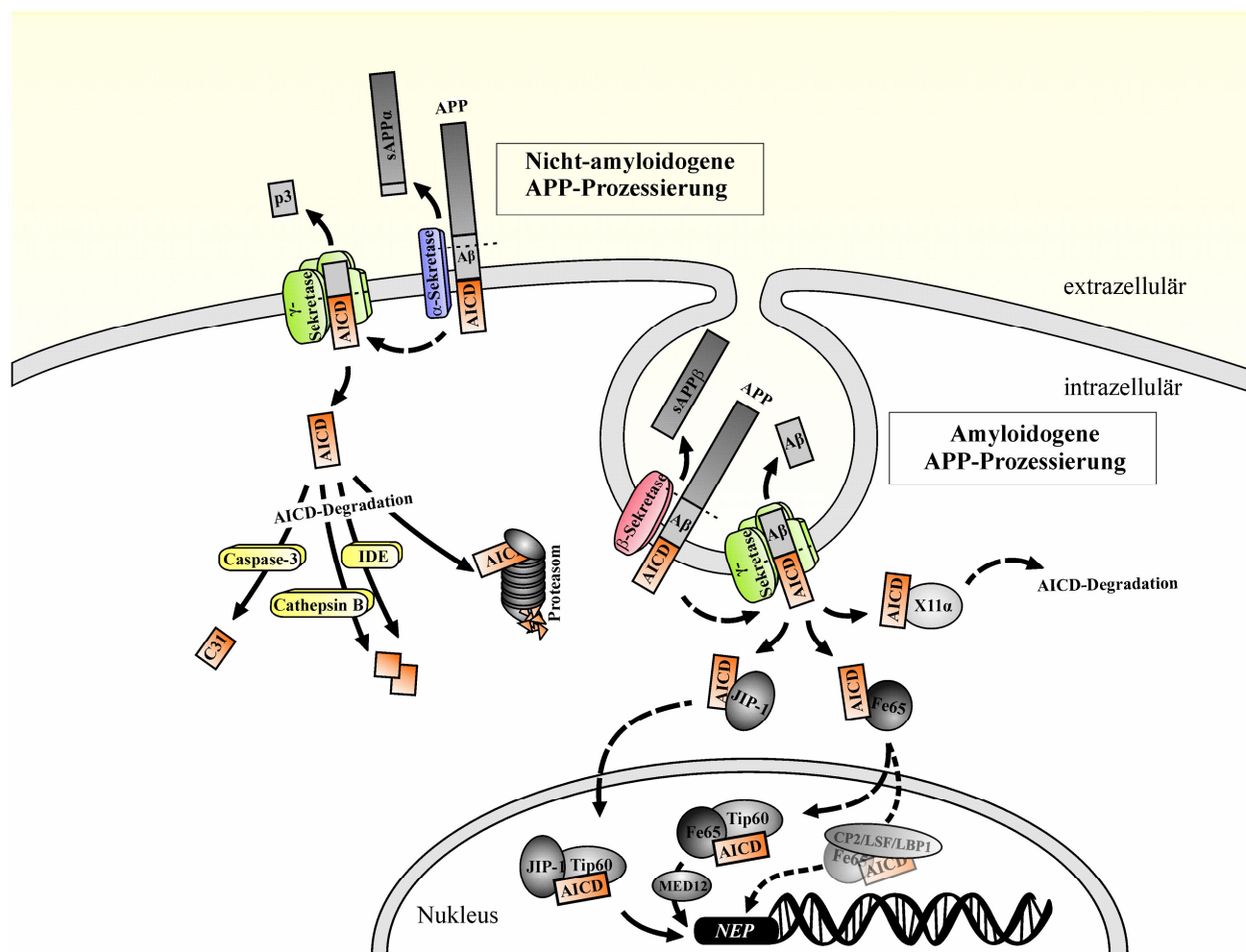


Abb. 76: Modell zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen durch AICD

Das infolge der amyloidogenen APP-Prozessierung generierte AICD kann nach Bindung an die Adapterproteine Fe65 oder JIP-1 in den Zellkern translozieren und dort gemeinsam mit Tip60 die transkriptionell aktiven AFT- bzw. AJT-Komplexe bilden. Alternativ zu Tip60 ist auch eine Interaktion des AICD/Fe65-Komplexes an den Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 möglich. Dem von Belyaev et al. postulierten Modell zufolge (Belyaev et al., 2010) ist das durch die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung an der Plasmamembran entstandene AICD hingegen aufgrund seiner schnellen Degradation im Zytosol transkriptionell inaktiv.

(Abb. modifiziert nach Grimm et al., 2013b)

Die AICD-abhängige transkriptionelle Regulation von NEP wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Vielzahl unterschiedlicher Modelle analysiert. Im Gegensatz zu den meisten früheren Studien, die sich mit einer möglichen Regulation der NEP-Genexpression durch AICD beschäftigen (Tab. 45), wurde die AICD-vermittelte NEP-Regulation hierbei *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung vieler verschiedener Modellsysteme auf Genexpressions-, Protein- und Enzymaktivitätsebene analysiert. Die verwendeten Zellkulturmodelle wurden durch genetische und pharmakologische Methoden generiert und beinhalten sowohl überexprimierende Zelllinien als auch Zelllinien, die eine Defizienz für verschiedene Proteine wie beispielsweise PS oder APP aufweisen. Zusätzlich wurde erstmals der Einfluss der Deletion des C-terminalen Bereichs von APP (APPΔCT15) auf NEP in MEF-Zellen und im Hirngewebe von Mäusen untersucht. Die Supplementierung der Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten erfolgte ebenfalls nicht nur genetisch durch Transfektion mit entsprechenden Plasmiden, sondern auch durch die Inkubation mit synthetischen Aβ- und AICD-Peptiden. Des Weiteren wurde die Ursache für die unterschiedliche transkriptionelle Aktivität der verschiedenen AICD-Spezies analysiert.

Tab. 45: Übersicht der Studien und Ergebnisse zur AICD-abhängigen transkriptionellen Regulation von NEP

grau: Ergebnisse früherer Studien, schwarz: im Rahmen dieser Arbeit generierte Ergebnisse

↓ = reduziert, ↑ = erhöht, - = unverändert, Δ = defizient, A = Enzymaktivität, E= Genexpression, embr. = embryonal, P = Proteingehalt, KD = Knockdown, n.s. = nicht signifikant

| Analysierte Zellen/ Mausmodelle | Effekte auf NEP verzeichnet | keine Effekte auf NEP verzeichnet |
|--|--|--|
| Presenilin-Defizienz: | | |
| MEF ΔPS1ΔPS2 | E↓ (Abb. 10) P↓ (Abb. 10) A↓ (Abb. 10) E↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) P↓ (Chen und Selkoe, 2007) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | E- (Huysseune et al., 2009) P- (Hebert et al., 2006) |
| | E↑/P↑/A↑ nach Retransfektion mit PS1, PS2, PS1+PS2, AICD50, AICD59, AICD50/59+Fe65+Tip60 (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- nach Retransfektion mit PS1 (Chen und Selkoe, 2007) |
| BD8 ΔPS1ΔPS2 | P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- (Chen und Selkoe, 2007) |
| | E↑/P↑/A↑ nach Retransfektion mit AICD50, AICD59 (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- nach Retransfektion mit PS1, PS2, AICD60+Fe65+Tip60 (Chen und Selkoe, 2007) |
| Maushirn ΔPS1ΔPS2 (konditionell) | P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| embr.Maushirn ΔPS1 | | P- (Hebert et al., 2006) |
| Maushirn ΔPS1 | | A- (Pardossi-Piquard et al., 2005) |
| γ-Sekretase-Inhibition: | | |
| in MEF WT | E↓ (γ-Sekretase-Inhibitor X) (Abb. 13) A↓ (versch. γ-Sekretase-Inhibitoren) (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- (DAPT und γ-Sekretase-Inhibitor X) (Hebert et al., 2006) P- (DAPT) (Chen und Selkoe, 2007) |
| in SH-SY5Y WT | E↓ (γ-Sekretase-Inhibitor X) (Abb. 21) | |
| in TSM1-Neuronen | A↓ (DFK167) (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| in Primärneuronen | A↓ (DFK167) (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| in Hela WT, cos7 WT und N2a WT | | P- (DAPT und γ-Sekretase-Inhibitor X) (Hebert et al., 2006) |
| in BD8 WT und HEK293T WT | | P- (Compound E) (Chen und Selkoe, 2007) |
| in NB7 und SK-N-SH | E↓ (DAPT) (Xu et al., 2011) | |
| PS1-FAD-Mutationen: | | |
| MEF PS1-T354I | E↓ (Abb. 11) A↓ (Abb. 11) | |
| Maushirn APPswe/PS1ΔE9 | E↓ (n.s) (Abb. 27) (PS1ΔE9 kompensiert die Effekte der APPswe-Mutation, s.unten) | |

| Analysierte Zellen/ Mausmodelle | Effekte auf NEP verzeichnet | keine Effekte auf NEP verzeichnet |
|---|--|---|
| Defizienz der APP-Proteinfamilie: | | |
| MEF | E↓ (Abb. 12) | P- (Hebert et al., 2006) |
| ΔAPPΔAPLP2 | P↓ (Abb. 12) A↓ (Abb. 12) E↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- (Huysseune et al., 2009) |
| | E↑/P↑/A↑ nach Retransfektion mit ALID1, ALID2, AICD50 (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| MEF | E↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | E- (Huysseune et al., 2009) |
| ΔAPP | P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | P- (Huysseune et al., 2009) |
| | E↑/P↑/A↑ nach Retransfektion mit APP (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| MEF | E↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| ΔAPLP2 | P↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| | E↑/P↑/A↑ nach Retransfektion mit APLP2 (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| APP-KD in NB7 | E↓ (Belyaev et al., 2009) | |
| APP-KD in SK-N-SH | E↓ (Xu et al., 2011) | |
| Maushirn | E↓ (Abb. 25) | |
| ΔAPPΔAPLP2 | A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| embr. Maushirn | | E- (Hebert et al., 2006) |
| ΔAPPΔAPLP2 | | P- (Hebert et al., 2006) |
| Maushirn | E↓ (Abb. 25) | P- (Chen und Selkoe, 2007) |
| ΔAPP | A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | A- (Chen und Selkoe, 2007) |
| Maushirn | | E- (Abb. 25) |
| ΔAPLP2 | | P- (Chen und Selkoe, 2007) A- (Chen und Selkoe, 2007) |
| APP-FAD-Mutationen: | | |
| SH-SY5Y | E↑ (n.s.) (Abb. 19) | |
| APP ^{swe} | A↑ (Abb. 19) E↑ (Belyaev et al., 2010) | |
| Maushirn | E↑ (Abb. 27) | |
| APP ^{swe} | | |
| Defizienz des APP C-Terminus: | | |
| MEF | E↓ (Abb. 15) | |
| APPΔCT15 | P↓ (Abb. 15) A↓ (Abb. 15) | |
| | E↑/A↑ nach Inkubation mit AICD-Peptiden (Abb. 17) und AICD50-Expression (Abb. 18) | |
| Maushirn | E↓ (Abb. 26) | |
| APPΔCT15 | | |
| Einfluss der α-Sekretase: | | |
| Inhibition in SH-SY5Y | | E- (GM6001) (Abb. 21) E- (TAPI-2) (Belyaev et al., 2010) |
| SH-SY5Y α-CTF | | E- (Abb. 20) A- (Abb. 20) |
| SH-SY5Y α-CTF mit reduzierter IDE-Aktivität | E↑ nach IDE-KD (Abb. 22) E↑ nach IDE-Inhibition (Abb. 23) | |

| Analysierte Zellen/ Mausmodelle | Effekte auf NEP verzeichnet | keine Effekte auf NEP verzeichnet |
|---|---|-----------------------------------|
| Einfluss der β-Sekretase: | | |
| Inhibition in SH-SY5Y | E↓ (β -Sekretase-Inhibitor IX) (Abb. 21) E↓ (β -Sekretase-Inhibitor IX) (Belyaev et al., 2010) | |
| SH-SY5Y β -CTF | E↑ (Abb. 20) A↑ (Abb. 20) | |
| Einfluss von Fe65 (+AICD): | | |
| MEF $\Delta p97Fe65$ | E↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) A↓ (Pardossi-Piquard et al., 2005) | |
| SH-SY5Y Fe65-KD | E↓ (Abb. 24) A↓ (Abb. 24) | |
| HEK293 Fe65 + AICD-Akkumulation | | E- (Waldron et al., 2008) |
| SHEP-SF + induzierte Expression von AICD + Fe65 | | E- (Muller et al., 2007) |
| Maushirn + Fe65 (\pm) AICD-Überexpression | P↑ (Pardossi-Piquard et al., 2007) | |

5.1.2 EINFLUSS DER APP-PROTEINFAMILIE, DER γ -SEKRETASE UND AICD AUF NEP

Zur Untersuchung des Einflusses der APP-Prozessierung auf die A β -degradierende Protease NEP wurde die Genexpression, der Proteingehalt und die Aktivität des Enzyms in Mausfibroblasten untersucht, die eine Defizienz für die katalytische Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes (MEF PS1/2 $-/-$) (Herreman et al., 2000) bzw. für die gesamte APP-Proteinfamilie (MEF APP/APLP2 $-/-$) aufweisen. Da sich die Genexpression von APLP1 auf Neuronen beschränkt (Lorent et al., 1995; Slunt et al., 1994; Thinakaran, 1995), liegt in MEF APP/APLP2 $-/-$ eine Defizienz für alle Mitglieder der APP-Proteinfamilie vor. In beiden Zelllinien kommt es aufgrund der genetischen Modifikationen nicht zur Entstehung bestimmter APP-Prozessierungsprodukte.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Pardossi-Piquard et al. (Pardossi-Piquard et al., 2005) zeigen beide Zelllinien eine signifikante, allerdings z.T. verschieden stark ausgeprägte Reduktion von NEP auf Genexpressions-, Protein- und Enzymaktivitätsebene (Effektstärke Genexpression/ Proteingehalt in MEF PS1/2 $-/-$: $p \leq 0,001$; Effektstärke Proteingehalt/ Enzymaktivität in MEF PS1/2 $-/-$: $p \leq 0,001$; Effektstärke Genexpression/ Enzymaktivität in MEF APP/APLP2 $-/-$: $p \leq 0,001$) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 10A, Abb. 12). Die unterschiedlich stark ausgeprägten Effekte auf die NEP-Genexpression und den NEP-Proteingehalt sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass für die Genexpressionsanalysen Gesamtlysate, für die Bestimmung des Proteingehalts jedoch Membranproteinpräparationen verwendet wurden. Zusätzlich könnten Veränderungen in der Stabilität des Proteins, der Translationseffizienz oder dem intrazellulären Transport von NEP Ursachen für die abweichenden Effektstärken zwischen der Genexpression und des Proteinspiegels darstellen. Die Unterschiede der Effektstärken zwischen dem Proteingehalt und der Enzymaktivität werden möglicherweise durch die Unspezifität der NEP-Aktivitätsmessung hervorgerufen (Abb. 8B). Des Weiteren ist der Effekt auf die NEP-Genexpression in MEF APP/APLP2 $-/-$ stärker ($p \leq 0,001$) ausgeprägt als in MEF PS1/2 $-/-$, was auf der Verwendung unterschiedlicher Kontrollzelllinien für die

APP/APLP2- und PS1/2-defizienten Zellen basieren könnte. Die APP/APLP2-defizienten Zellen wurden mit MEF WT verglichen, während MEF PS1/2 $-/-$ in Relation zu einem mit PS1 retransfizierten MEF PS1/2 $-/-$ Zellklon (MEF PS1res) betrachtet wurde. MEF PS1res weist folglich eine Defizienz für PS2 auf. Wie in Abb. 10B dargestellt, ist die Aktivität der γ -Sekretase in MEF PS1res im Vergleich zu MEF WT nur etwa zur Hälfte wiederhergestellt, was die geringeren Effektstärken bei Verwendung dieser Zelllinie als Kontrollzelllinie erklärt. Trotz der variierenden Ausprägung der einzelnen Effekte wurde eine deutliche, hoch signifikante Reduktion von NEP auf der Ebene der mRNA, des Proteingehalts und der Enzymaktivität in PS1/2- und APP/APLP2-defizienten Mausfibroblasten festgestellt. Vergleichbare Effekte sind in der Literatur auch für PS1/2-defiziente murine embryonale Stammzellen (Pardossi-Piquard et al., 2005) sowie für NB7- und SK-N-SH-Zellen nach APP-Knockdown (Belyaev et al., 2009; Xu et al., 2011) beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Publikationen keine Veränderung der NEP-Genexpression bzw. des Proteingehalts von NEP in PS1/PS2- und APP/APLP2-defizienten Mausfibroblasten verzeichnet (Hebert et al., 2006; Huyseune et al., 2009) (Tab. 45). Mögliche Gründe für die inhomogene Literaturlage werden in 5.1.4 diskutiert.

Die in PS1/PS2-defizienten Mausfibroblasten generierten Daten wurden nochmals unter Verwendung von Zellen mit reduzierter γ -Sekretase-Aktivität verifiziert. Hierzu wurde das Enzym in zwei unterschiedlichen Wildtyp-Zelllinien pharmakologisch inhibiert. Außerdem wurde die PS1-*loss of function*-Mutante T354I (Grimm et al., 2014a) in MEF PS1/2 $-/-$ eingebracht und hinsichtlich ihres Einflusses auf NEP mit Wildtyp-PS1 verglichen. Die Behandlung von MEF WT und SH-SY5Y WT mit einem spezifischen γ -Sekretase-Inhibitor hat, wie auch die Expression der PS1-T354I-Mutante, eine Reduktion der NEP-Genexpression zur Folge (Abb. 11A, Abb. 13, Abb. 21). Der Effekt der PS1-T354I-Mutation auf NEP würde auch nach Normierung auf das PS1-Expressionsniveau in MEF PS1-T354I bzw. den Kontrollzellen MEF PS1res erhalten bleiben. Bei Verwendung von MEFs mit einem APP/APLP2-defizienten Hintergrund wirkt sich die γ -Sekretase-Inhibition hingegen nicht auf die Genexpression von NEP aus (Abb. 13). Diese Daten belegen, dass NEP durch ein γ -Sekretase-abhängiges Prozessierungsprodukt der APP-Proteinfamilie reguliert wird. Auch der Einfluss der γ -Sekretase-Inhibition auf NEP wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Pardossi-Piquard et al. und Xu et al. in Analogie zu den Daten der vorliegenden Arbeit deutliche Effekte von γ -Sekretase-Inhibitoren auf NEP in Mausfibroblasten und Neuronen bzw. in NB7- und SK-N-SH-Zellen demonstrieren konnten (Pardossi-Piquard et al., 2005; Xu et al., 2011), wurden diese Effekte in anderen Studien unter Verwendung einer Vielzahl verschiedener Zelllinien und unterschiedlicher γ -Sekretase-Inhibitoren nicht festgestellt (Chen und Selkoe, 2007; Hebert et al., 2006) (Tab. 45). Die divergierenden Ergebnisse der verschiedenen Studien können u.a. auf die Verwendung unterschiedlicher γ -Sekretase-Inhibitoren sowie auf unterschiedlich lange Inkubationszeiten zurückzuführen sein (5.1.4).

Der Einfluss der APP-Proteinfamilie auf die NEP-Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit auch *in vivo* im Hirngewebe von transgenen Mäusen analysiert. Im Gegensatz zu der verwendeten Zelllinie MEF APP/APLP2 $-/-$, die defizient für alle Mitglieder der APP-Proteinfamilie ist, wurden die Effekte von APP und APLP2 hierbei auch separat betrachtet. Die Homologen APLP1 und APLP2 werden in Analogie zu APP durch die α -, β - und γ -Sekretase prozessiert, wodurch es zur Freisetzung der APLP intrazellulären Domänen ALID (engl. amyloid precursor-like protein intracellular domain) 1 und 2 kommt (Eggert et al., 2004; Walsh et al., 2003). Im Hirngewebe von APP-Knockout und APP/APLP2-Doppelknockout-Mäusen zeigt sich eine nahezu identische ($p = 1,000$) Reduktion der NEP-Genexpression, während diese im Hirngewebe von APLP2-Knockout-Tieren unverändert ist (Abb. 25). Diese Ergebnisse belegen zum einen die *in vivo*-Relevanz der NEP-Regulation durch die APP-Proteinfamilie und deuten zum anderen darauf hin, dass APLP2 bei diesem Mechanismus keine signifikante Rolle spielt. Von Chen und Selkoe wurde in Übereinstimmung damit kein Einfluss der APLP2-Defizienz auf den Proteingehalt und die Enzymaktivität

von NEP im Hirngewebe von Mäusen verzeichnet (Chen und Selkoe, 2007). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen resultiert die Defizienz von APLP2 in Mausfibroblasten in der Publikation von Pardossi-Piquard et al. in einer Reduktion der NEP-Genexpression und -Enzymaktivität, welche durch die Retransfektion mit APLP2 aufgehoben werden kann (Pardossi-Piquard et al., 2005). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass von Chen und Selkoe im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit und der Studie von Pardossi-Piquard et al. auch kein Einfluss der APP-Defizienz auf NEP *in vivo* festgestellt wurde (Chen und Selkoe, 2007). Ebenso konnte von Hébert et al. keine Reduktion der NEP-Genexpression im Hirngewebe von APP/APLP2- und APP/ALPL1/APLP2-Knockout-Mausembryonen verzeichnet werden (Hebert et al., 2006) (Tab. 45).

Wie bereits erwähnt, deuten die in 4.2.1, 4.2.2 und Abb. 25 dargestellten Ergebnisse auf eine Regulation der NEP-Genexpression durch ein γ -Sekretase-abhängiges APP-Prozessierungsprodukt hin. Für A β -Peptide wurde, wie auch für AICD, eine nukleäre Lokalisation und eine Assoziation mit genregulatorischen Sequenzen beschrieben (Barucker et al., 2014; Maloney und Lahiri, 2011; Ohya et al., 2005). Daher wurde zunächst der Effekt der A β -Supplementierung zu PS1/2- und APP/APLP2-defizienten Mausfibroblasten auf NEP untersucht. Da diese Zelllinien kein endogenes A β produzieren können, sollte sich die Zugabe von A β 40 und A β 42-Peptiden in einem physiologischen 10:1-Verhältnis (Scheuner et al., 1996) im Fall einer A β -abhängigen NEP-Regulation auf die Expressionsstärke des für NEP kodierenden Gens auswirken. Die Inkubation mit A β 40/42-Peptiden über einen Zeitraum von neun Tagen hat jedoch bei beiden Zelllinien keinen signifikanten Effekt auf die NEP-Genexpression, was gegen eine A β -vermittelte transkriptionelle Regulation von NEP spricht (Abb. 14). Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Pardossi-Piquard et al. überein, die nach Zugabe exogener A β 42-Peptide zu PS-defizienten Zellen keine Veränderungen in der NEP-Aktivität verzeichnen konnten (Pardossi-Piquard et al., 2005). In diesem Zusammenhang sollte jedoch erwähnt werden, dass eine mögliche Regulation der NEP-Genexpression durch andere A β -Spezies wie beispielsweise A β 38 oder N-terminal verkürzte A β -Peptide nicht überprüft wurde.

Zur Analyse des Einflusses von AICD auf NEP wurden zunächst Mausfibroblasten mit Deletion des APP-C-Terminus hinsichtlich der Genexpression, des Proteingehalts, der Aktivität des Enzyms sowie der A β -Gesamtdegradation untersucht. Bei der verwendeten Zelllinie MEF APP Δ CT15 fehlen die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren von APP und somit die für die Interaktion mit Adapterproteinen relevante Konsensussequenz NPXY (Borg et al., 1996; Uhlik et al., 2005). In MEF APP Δ CT15 zeigt sich bei Vergleich mit den korrespondierenden Wildtyp-Zellen eine signifikante Reduktion von NEP auf Genexpressions-, Protein-, und Enzymaktivitätsebene, was auch zu einer verringerten Gesamtdegradation von A β 40 in den Lysaten dieser Zelllinie führt (Abb. 15). Die Tatsache, dass der Effekt auf die A β 40-Gesamtdegradation in Anwesenheit des NEP-Inhibitors Thiorphan signifikant ($p = 0,02$), mit 13,8% aber nur geringfügig schwächer ausgeprägt ist (Abb. 15), deutet auf die Beeinflussung weiterer A β -degradierender Mechanismen durch die Deletion des APP-C-Terminus hin. Eine signifikante Reduktion der NEP-Genexpression infolge der Deletion des APP-C-Terminus wurde ebenfalls *in vivo* im Hirngewebe von Mäusen, welche nur das verkürzte APP Δ CT15-Protein exprimieren, verzeichnet (Abb. 26).

Zur Untersuchung des Effekts von AICD auf NEP wurden MEF APP Δ CT15-Zellen mit synthetischen AICD-Peptiden, bestehend aus den letzten 20 C-terminalen Aminosäuren von APP₆₉₅, oder dem Lösungsmittel Wasser inkubiert. Die Supplementierung der AICD-Peptide erfolgte zum einen über einen längeren Zeitraum von neun Tagen und zum anderen lipofektionsbasiert über 12Std. Beide AICD-Inkubationsvarianten haben eine Steigerung der NEP-Genexpression und -Aktivität zur Folge (Abb. 17).

Die etwas stärker ausgeprägte Annäherung der NEP-Genexpression und –Aktivität an das entsprechende Wildtyp-Niveau bei Langzeit-AICD-Supplementierung ist wahrscheinlich auf die in Abb. 16A gezeigte effizientere ($p = 0,012$) Aufnahme der AICD-Peptide bei dieser Inkubationsvariante zurückzuführen. Der Vergleich der Effekte der AICD-Kurzzeit- und –Langzeitinkubation zeigt aber auch, dass sich die AICD-Langzeitinkubation trotz sechsfach höherer Aufnahme des Peptids mit 24,4% bzw. 4,6% nur geringfügig und statistisch nicht signifikant stärker auf die Genexpression und Enzymaktivität von NEP auswirkt (Abb. 17) (Effektstärke Langzeitinkubation/ lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation von AICD auf NEP-Genexpression: $p = 0,952$; Effektstärke Langzeitinkubation/ lipofektionsbasierte Kurzzeitinkubation von AICD auf NEP-Enzymaktivität: $p = 1,000$). Dies deutet darauf hin, dass die Effektstärken auf NEP nicht linear mit der vorhandenen AICD-Menge korrelieren, sondern dass die maximale Effektstärke asymptotisch gegen einen Grenzwert verläuft. Wie in 5.1.4 beschrieben, ist dies von besonderer Bedeutung bei der Verwendung von stark AICD- bzw. APP- überexprimierenden Systemen und kann unter Umständen zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Die Effekte der AICD-Supplementierung auf die Transkription von NEP konnten auch in einem genetischen Ansatz durch die Expression eines für die letzten 50 Aminosäuren des APP-C-Terminus (AICD50, C50) kodierenden Plasmids in MEF APPACT15 verifiziert werden. AICD50 entspricht einer der physiologisch am häufigsten vorkommenden AICD-Spezies, die infolge des ϵ -Schnitts durch die Aktivität der γ -Sekretase freigesetzt wird (Gu et al., 2001; Pinnix et al., 2013; Yu et al., 2001) (Abb. 2A). Die C50-Expression in MEF APPACT15 führt zu einer signifikant gesteigerten NEP-Genexpression, die einer partiellen Annäherung um 31,2% an das NEP-Genexpressionsniveau in MEF WT entspricht (Abb. 18). Die Tatsache, dass es hierbei trotz Überexpression von AICD50 nur zu einer partiellen Annäherung an das Genexpressionsniveau von NEP in Wildtyp-Zellen kommt, basiert möglicherweise auf der Lokalisation der überexprimierten C50-Peptide in der Nähe der Plasmamembran und ihrer daraus resultierenden schnellen zytosolischen Degradation (5.1.3). In Übereinstimmung mit dem in Abb. 18 dargestellten Ergebnis wurde auch von Pardossi-Piquard et al. eine Steigerung der NEP-Genexpression und –Aktivität nach Expression von AICD50 bzw. AICD59 in PS-defizienten Mausfibroblasten und murinen embryonalen Stammzellen sowie in murinem Hirngewebe nach Ko-Expression von AICD59 und Fe65 festgestellt. Als Ursache hierfür wurde in dieser Studie die Aktivierung des NEP-Promotors durch AICD identifiziert, die auf einer direkten Interaktion des Peptids mit den entsprechenden Promotorsequenzen basiert (Pardossi-Piquard et al., 2005; Pardossi-Piquard et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigen PS-defiziente und Wildtyp murine embryonale Stammzellen sowie HEK-Zellen nach transienter Transfektion mit AICD60, Fe65 und Tip60 keine Veränderungen des NEP-Proteingehalts in der Publikation von Chen und Selkoe (Chen und Selkoe, 2007) (Tab. 45). Ebenso konnte kein Einfluss der induzierbaren Expression von AICD und Fe65 in humanen Neuroblastom-Zellen bzw. der AICD-Akkumulation bei gleichzeitiger Fe65-Überexpression in APP₆₉₅-überexprimierenden HEK-Zellen auf die Transkription verschiedener potentieller AICD-Zielgene inklusive NEP festgestellt werden (Muller et al., 2007; Waldron et al., 2008). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass von Pardossi-Piquard et al. auch eine Stimulation der NEP-Enzymaktivität in APP/APLP2-defizienten Mausfibroblasten nach Retransfektion mit ALID1 und ALID2 erzielt wurde (Pardossi-Piquard et al., 2005) (Tab. 45). In einer anderen Studie wurde die Lokalisation von ALID2 analog zu AICD im Nukleus in Komplexen mit Fe65 und Tip60 nachgewiesen, während ALID1 primär an der Plasmamembran lokalisiert zu sein scheint (Gersbacher et al., 2013).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine AICD-abhängige Regulation von NEP zweifelsfrei *in vitro* und *in vivo* belegt werden (4.2.1-4.2.4, 4.2.6). Da NEP ein wichtiges A β -degradierendes Enzym darstellt (Iwata et al., 2000; Iwata et al., 2001), kann von der Existenz eines Rückkopplungs-Mechanismus zur Regulation des A β -Gehalts ausgegangen werden. Hierbei wird die Halbwertszeit von A β durch ein

zweites bei der amyloidogenen APP-Prozessierung gebildetes Produkt, AICD, reguliert, was zur Vermeidung erhöhter A β -Konzentrationen dienen könnte (Pardossi-Piquard et al., 2005) (Abb. 77). In der Literatur wurde allerdings auch mehrfach eine individuelle Regulation der γ -Sekretase-abhängigen APP-Prozessierung an der ε - und der γ -Schnittstelle und somit eine voneinander unabhängige Bildung von A β - und AICD-Peptiden beschrieben (Chen et al., 2006; He et al., 2010a; Wiley et al., 2007).

5.1.3 MECHANISMEN DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION VON NEP DURCH AICD

Um zu überprüfen, ob das transkriptionell aktive AICD, wie von Belyaev et al. postuliert (Belyaev et al., 2010) (5.1.1, Abb. 76), tatsächlich primär bei dem amyloidogenen APP-Prozessierungsweg generiert wird, wurde der Einfluss der APP_{swe}-Mutation, der Überexpression von α - und β -CTF sowie der pharmakologischen Inhibition der einzelnen Sekretasen auf NEP analysiert. Die Expression der APP_{swe}-Mutante, welche mit einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung einhergeht (Citron et al., 1992; Felsenstein et al., 1994), führt in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu APP-Wildtyp zu einer signifikanten Steigerung der NEP-Enzymaktivität. In SH-SY5Y APP_{swe}-Zellen zeigt sich auch eine erhöhte NEP-Genexpression, die allerdings statistisch nicht signifikant ist (Abb. 19). Die festgestellten Effekte der APP_{swe}-Mutation auf die Genexpression bzw. Enzymaktivität von NEP würden sich nach Normierung auf den APP-Proteingehalt in den verwendeten Zelllinien vergrößern. Eine signifikant gesteigerte Transkription von NEP konnte auch im Hirngewebe des APP_{swe}-Mausmodells im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 27). Diese Ergebnisse belegen eine Stimulation der NEP-Genexpression bei verstärkter amyloidogener APP-Prozessierung *in vitro* und *in vivo*. Im Hirngewebe von Mäusen mit kombinierter Expression der APP_{swe}- und der PS1 Δ Exon9-Mutation ist die Transkription von NEP hingegen nahezu signifikant reduziert (Abb. 27). Die Tatsache, dass der Effekt der APP_{swe}-Mutation auf die NEP-Genexpression durch die γ -Sekretase-*loss of function*-Mutation PS1 Δ Exon9 (Bentahir et al., 2006) aufgehoben wird, belegt, dass die Genexpression von NEP auch *in vivo* sowohl von der β - als auch von der γ -Sekretase-Aktivität beeinflusst wird. Aufgrund dieses Ergebnisses kann sAPP β als das für die gesteigerte NEP-Genexpression im Hirngewebe des APP_{swe}-Mausmodells verantwortliche APP-Prozessierungsprodukt ausgeschlossen werden. Die tendenziell verringerte NEP-Genexpression im Hirngewebe der APP_{swe}/PS1 Δ E9-Mäuse ist somit wahrscheinlich auf die Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität und die damit einhergehende verringerte AICD-Bildung infolge der PS1 Δ Exon9-Mutation (Bentahir et al., 2006) zurückzuführen. Eine Steigerung der NEP-Genexpression durch die Expression von APP_{swe} im Vergleich zu Wildtyp-APP in SH-SY5Y-Zellen wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit auch von Belyaev et al. verzeichnet (Belyaev et al., 2010).

Um die transkriptionelle Aktivität der bei den beiden alternativen APP-Prozessierungswegen gebildeten AICD-Spezies direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Wirkung der α - und β -CTF-Überexpression auf NEP untersucht. In SH-SY5Y β -CTF konnte eine signifikante Erhöhung der NEP-Genexpression und -Enzymaktivität festgestellt werden. Obwohl in den verwendeten SH-SY5Y α -CTF-Zellen eine stärkere ($p \leq 0,001$) Expression des C-terminalen Fragments von APP vorliegt als in den SH-SY5Y β -CTF-Zellen, ist die Genexpression und Enzymaktivität von NEP in SY5Y α -CTF im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Zellen hingegen unverändert (Abb. 20). Damit übereinstimmend führt die pharmakologische Inhibition der β - und γ -Sekretase zu einer nahezu identischen ($p = 1,000$) Reduktion der NEP-Genexpression in SH-SY5Y WT-Zellen, während die Behandlung der Zellen mit einem α -Sekretase-Inhibitor keinen Effekt auf die Transkription von NEP hat (Abb. 21A). In ihrer Gesamtheit belegen diese Daten, dass ausschließlich die amyloidogene APP-Prozessierung zur Produktion genregulatorisch aktiver AICD-Peptide beiträgt. In Analogie zu den in Abb. 21A dargestellten Ergebnissen wurde von Belyaev et al. ebenfalls eine signifikant reduzierte NEP-Genexpression sowie eine

verringerte Interaktion von AICD mit dem NEP-Promotor in SH-SY5Y APP₆₉₅-Zellen nach Behandlung mit β - und γ -Sekretase-, nicht aber mit α -Sekretase-Inhibitor verzeichnet. In dieser Publikation wurde interessanterweise auch festgestellt, dass ausschließlich die Überexpression von APP₆₉₅, nicht aber von APP₇₅₁ und APP₇₇₀, zu einer Stimulation der NEP-Genexpression führt. Die Autoren führen dies auf eine verstärkte amyloidogene Prozessierung von APP₆₉₅ im Vergleich zu den anderen APP-Isoformen zurück (Belyaev et al., 2010; Kametani et al., 1993). Des Weiteren wirkt sich die APP₆₉₅-Überexpression in dieser Studie nur in den neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und N2a, aber nicht in HEK-Zellen auf die Transkription von NEP aus (Belyaev et al., 2010). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die direkte Interaktion von AICD mit dem NEP-Promotor eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie aufweist (Belyaev et al., 2009; Hong et al., 2012).

Um zu überprüfen, ob die transkriptionelle Inaktivität des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung generierten AICDs, wie von Belyaev et al. postuliert (Belyaev et al., 2010), auf einer schnellen zytosolischen Degradation des Peptids durch IDE (Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003) basiert, wurden α -CTF-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen mit reduzierter IDE-Enzymaktivität hinsichtlich der NEP-Genexpression untersucht. Wie in Abb. 22A gezeigt, führt der Knockdown von IDE in α -CTF-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der NEP-Genexpression. Ein ähnlicher Effekt auf die Transkription von NEP wurde durch die Behandlung der SH-SY5Y α -CTF-Zellen mit Insulin erzielt (Abb. 23A). Die Zugabe des alternativen IDE-Substrats Insulin zu den Zellen führt zu einer kompetitiven Inhibition der IDE-Enzymaktivität (Abb. 23B). Diese Daten belegen einen Zusammenhang zwischen IDE und der genregulatorischen Inaktivität des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung an der Zelloberfläche entstandenen AICDs. In Analogie zu den infolge der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung freigesetzten AICD-Peptiden weist wahrscheinlich auch das in MEF APP Δ CT15 überexprimierte C50 eine Lokalisation in der Nähe der Plasmamembran auf. Dies könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass in den C50-exprimierenden MEF APP Δ CT15-Zellen nur eine partielle Annäherung der NEP-Genexpression an das Niveau in Wildtyp-Zellen erzielt werden konnte (Abb. 18). Aufgrund des Einflusses von IDE auf die Genexpression von NEP kann ein weiterer endogener Regulationsmechanismus zur Gewährleistung einer effizienten A β -Degradation postuliert werden. Eine Reduktion der intrazellulären IDE-Aktivität führt den Daten dieser Arbeit zufolge zu einem Anstieg des zellulären AICD-Gehalts, der wiederum in einer gesteigerten Genexpression von NEP und somit in der Aufrechterhaltung der A β -degradierenden Aktivität in den Zellen resultiert (Abb. 77).

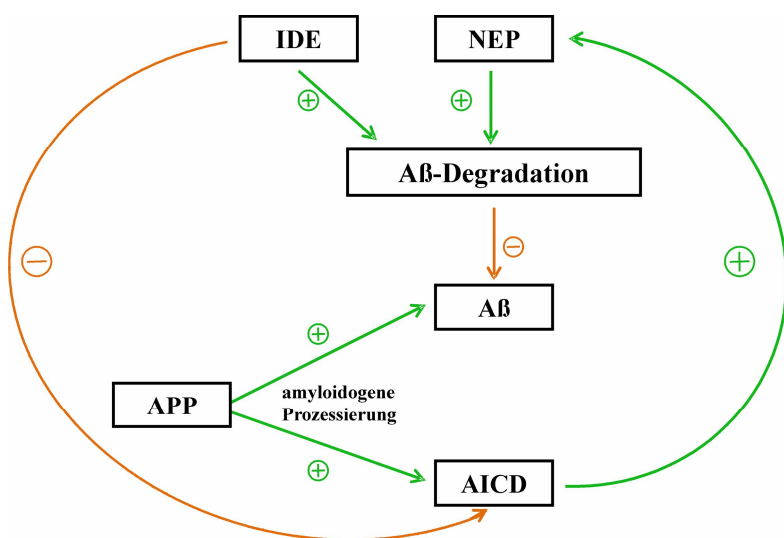


Abb. 77: Modell zur endogenen Regulation der NEP-Genexpression durch AICD

Es kann von zwei endogenen Rückkopplungsmechanismen zur Vermeidung erhöhter $A\beta$ -Konzentrationen ausgegangen werden: Über die transkriptionelle Regulation der NEP-Genexpression beeinflusst AICD als zweites bei der amyloiden APP-Prozessierung gebildetes Produkt die Halbwertszeit von $A\beta$ -Peptiden. Eine gesteigerte amyloide APP-Prozessierung hat demnach neben der gesteigerten $A\beta$ -Produktion auch eine gesteigerte $A\beta$ -Degradation zur Folge. Die NEP-Genexpression wird über AICD auch indirekt durch die Aktivität eines zweiten $A\beta$ -degradierenden Enzyms, IDE, beeinflusst. Zur Aufrechterhaltung einer effizienten $A\beta$ -Degradation kommt es infolge einer reduzierten IDE-Enzymaktivität zu einer gesteigerten zellulären AICD-Konzentration und damit einhergehend zu einer Steigerung der NEP-Genexpression.

Die bei der amyloiden APP-Prozessierung entstandenen AICD-Peptide binden dem Modell von Belyaev et al. zufolge effizienter an Fe65, für das eine stabilisierende Wirkung auf AICD bekannt ist (Kimberly et al., 2001; Kinoshita et al., 2002). In SH-SY5Y Fe65-Knockdown-Zellen wurde eine signifikante Reduktion der NEP-Genexpression und -Enzymaktivität festgestellt (Abb. 24A), was die Rolle von Fe65 bei der Stabilisierung von AICD-Peptiden und deren Translokation in den Zellkern belegt. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde auch von Pardossi-Piquard et al. eine Reduktion der NEP-Genexpression und der NEP-Enzymaktivität in Fe65-defizienten Mausfibroblasten verzeichnet (Pardossi-Piquard et al., 2005). Die Relevanz von Fe65 für die physiologischen Funktionen von APP und seinen Homologen wird auch durch den Phänotyp entsprechender Knockout-Tiere deutlich. Der kombinierte Knockout von zwei Mitgliedern der Fe65-Proteinfamilie (Fe65/ Fe65L1 -/-) führt in Mäusen, wie auch die Deletion von APP und seinen beiden Homologen (APP/ APLP1/ APLP2 -/-), zu einem postnatal letalen Phänotyp, welcher durch eine kortikale Dysplasie gekennzeichnet ist (Guenette et al., 2006; Herms et al., 2004). Dies deutet auf wichtige, überlappende Funktionen der Proteine bzw. Proteinfamilien bei der Entwicklung von Säugetieren hin, die auf der Fe65/AICD-abhängigen Regulation von Zielgenen basieren könnten.

Zusammenfassend konnte das kontrovers diskutierte Modell von Belyaev et al. (Abb. 76), in dem ausschließlich das durch die Aktivität der β - und γ -Sekretase generierte AICD in der Lage ist, die Transkription anderer Gene zu beeinflussen, bestätigt werden. Da die Überexpression von α -CTF in SH-SY5Y-Zellen mit verringerter IDE-Aktivität, nicht aber in den korrespondierenden Kontrollzellen zu einer Stimulation der NEP-Genexpression führt, ist davon auszugehen, dass IDE für die Inaktivierung des von α -CTF stammenden AICDs verantwortlich ist. Auch die wichtige Funktion des Adapterproteins Fe65 bei der AICD-vermittelten transkriptionellen Regulation von Zielgenen konnte am Beispiel von NEP belegt werden.

Die These, dass ausschließlich das bei der amyloiden APP-Prozessierung freigesetzte AICD in der Lage ist, die Transkription von Zielgenen zu regulieren, wird neben den im Rahmen dieser Arbeit und von Belyaev et al. generierten Daten auch von weiteren Publikationen gestützt. Bereits im Zusammenhang mit dem ersten experimentellen Nachweis von AICD wurde festgestellt, dass das Peptid (dort als AID

bezeichnet) ausschließlich in β -CTF- überexprimierenden, nicht aber in α -CTF-überexprimierenden Jurkat-Zellen detektiert werden kann und nach Expression von APP^{swe} im Vergleich zu Wildtyp-APP verstärkt auftritt (Passer et al., 2000). Des Weiteren führt die Verringerung der β -Sekretase-Aktivität bzw. der Endozytose zu einem reduzierten Vorkommen von AICD in nukleären AFT-Komplexen, während die α -Sekretase-Inhibition keinen Einfluss auf die Menge des im Zellkern lokalisierten AICDs hat (Goodger et al., 2009). In einer weiteren Publikation wurde von Flammang et al. ebenfalls demonstriert, dass es hauptsächlich bei der γ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von β -CTF zur Entstehung von AICD-Peptiden kommt. Da die Ergebnisse dieser Studie allerdings durch zellfreie *in vitro*-Experimente generiert wurden, widerspricht dies der These, dass die transkriptionelle Inaktivität des von α -CTF abstammenden AICDs auf der schnellen zytosolischen Degradation des Peptids beruht. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass der γ -Sekretasekomplex generell eine höhere Affinität zu β -CTF als zu α -CTF besitzt, was auf der Existenz einer inhibitorischen Substratdomäne im N-terminalen Bereich von α -CTF (Aminosäure 17-23 der A β -Sequenz) (Tian et al., 2010) beruhen könnte (Flammang et al., 2012). Nach Entfernung der ersten 16 Aminosäuren von A β , entsprechend dem Schnitt der α -Sekretase, ist der inhibitorische Effekt dieser Domäne auf die γ -Sekretase-Aktivität gesteigert, was dazu führen kann, dass α -CTF weniger stark durch die γ -Sekretase prozessiert wird als β -CTF (Flammang et al., 2012; Tian et al., 2010).

5.1.4 MÖGLICHE GRÜNDE FÜR DIE INHOMOGENE LITERATURLAGE

Trotz des Nachweises der physikalischen und funktionellen Interaktion zwischen AICD und den Promotorsequenzen des für NEP kodierenden Gens (Belyaev et al., 2009; Belyaev et al., 2010; Pardossi-Piquard et al., 2005; Xu et al., 2011) wird die AICD-vermittelte transkriptionelle Regulation von NEP kontrovers diskutiert (5.1.1, Tab. 45). Wie bereits erwähnt, sind die widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien wahrscheinlich auf die Instabilität von AICD aufgrund seiner schnellen Degradation durch IDE und andere Enzyme (Cupers et al., 2001; Edbauer et al., 2002; Farris et al., 2003; Gervais et al., 1999; Nunan et al., 2003) sowie auf Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zwischen den verschiedenen AICD-Spezies zurückzuführen. Die Tatsache, dass die Transkription von NEP überwiegend durch das von β -CTF abstammende AICD stimuliert wird (4.2.5.2, 4.2.5.3), kann auf zwei verschiedenen, eventuell synergistisch wirkenden Mechanismen basieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die zytosolische Degradation des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung generierten AICDs durch IDE zu dessen transkriptioneller Inaktivität beiträgt (4.2.5.4). Zusätzlich deuten Ergebnisse von Flammang et al. darauf hin, dass β -CTF im Vergleich zu α -CTF bevorzugt durch die γ -Sekretase prozessiert wird, was in einer stärkeren AICD-Produktion aus dem bei der amyloidogenen APP-Prozessierung entstehenden C-terminalen APP-Fragment resultiert (Flammang et al., 2012). Des Weiteren ist die AICD-vermittelte Regulation von NEP abhängig von der exprimierten APP-Isoform. Nur die Überexpression von APP₆₉₅, der dominantesten APP-Isoform in neuronalen Zellen (Sandbrink et al., 1994a), hat einen stimulierenden Effekt auf die Transkription von NEP (Belyaev et al., 2010). Die Ursache hierfür könnte darin bestehen, dass APP₆₉₅ im Vergleich zu APP₇₅₁ und APP₇₇₀ verstärkt amyloidogen prozessiert wird (Belyaev et al., 2010; Kametani et al., 1993). Die Abhängigkeit der AICD-vermittelten NEP-Regulation von der exprimierten APP-Isoform bzw. des proteolytischen APP-Prozessierungswegs stellt möglicherweise ein Erklärungsansatz für die inhomogene Ergebnislage verschiedener Studien dar, in denen mit unterschiedlichen APP-Konstrukten und Zelllinien gearbeitet wurde. Die mögliche Beteiligung der intrazellulären Domänen von APLP1 und APLP2 an der Regulation von NEP ist weiterhin nicht final geklärt. Obwohl von Pardossi-Piquard et al. ein Einfluss von ALID1 bzw. ALID2 auf NEP gezeigt werden konnte, deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass *in vivo* ausschließlich AICD eine regulatorische Wirkung auf NEP besitzt (4.2.6.1). Aufgrund der starken Überlappung der physiologischen Funktionen von APP, APLP1 und APLP2 ist eine Kompensation der

Deletion eines Mitglieds der Proteinfamilie durch die jeweils anderen Homologen wahrscheinlich (Aydin et al., 2012). Dies könnte eine Erklärung für nicht vorhandene Effekte des APP- bzw. APLP2-Einzelknockouts auf NEP in Mäusen darstellen (Chen und Selkoe, 2007). Die schnelle zytosolische Degradation des Peptids kann bei einer geringen Erhöhung des zellulären AICD-Gehalts zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Da die maximale Effektstärke von AICD auf die NEP-Genexpression asymptotisch gegen einen Grenzwert verläuft, ist davon auszugehen, dass durch die Supplementierung von AICD ab einer gewissen zellulären AICD-Konzentration keine weitere Steigerung der NEP-Genexpression erzielt werden kann (4.2.4.2, 5.1.2). Dies kann vor allem bei der Betrachtung des Effektes eines gesteigerten AICD-Gehalts in Systemen mit einer physiologischen oder sogar gesteigerten APP-Expression (Muller et al., 2007; Waldron et al., 2008) eine Rolle spielen und ebenfalls in falsch-negativen Ergebnissen resultieren. In der Studie von Waldron et al., in der kein Effekt eines erhöhten zellulären AICD-Gehalts auf NEP in HEK APP₆₉₅-Zellen festgestellt werden konnte, stammte das akkumulierte AICD zusätzlich überwiegend von α -CTF ab, welches wie oben beschrieben transkriptionell inaktiv ist (Waldron et al., 2008). Wie in 5.1.2 beschrieben, ist die Literaturlage hinsichtlich der Wirkung der γ -Sekretase-Inhibition auf die Transkription von NEP ebenfalls inhomogen. Die widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien basieren möglicherweise auf Unterschieden in der Art des verwendeten Inhibitors, der eingesetzten Konzentration, der Inkubationsdauer sowie der verwendeten Zelllinien. Bei dem Vergleich der NEP-Genexpression in unterschiedlichen Zelllinien ist auch immer mit einer klonalen Heterogenität zu rechnen, die die Ergebnisse beeinflussen kann. Des Weiteren wurde von Bauer et al. demonstriert, dass die Passageanzahl und die Konfluenz von kultivierten Zellen einen starken Einfluss auf den Proteingehalt und die Enzymaktivität von NEP besitzen kann, was ebenfalls zu den widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Studien bezüglich der AICD-abhängigen transkriptionellen NEP-Regulation beigetragen haben könnte. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Enzymaktivität und der Proteinspiegel von NEP in HEK293-Zellen, nicht aber in Fibroblasten, mit steigender Zellkonfluenz zunehmen. Des Weiteren wurde ein Anstieg des NEP-Proteingehalts und der Aktivität des Enzyms mit zunehmender Anzahl an Passagen in Fibroblasten und HEK293-Zellen verzeichnet (Bauer et al., 2011).

5.1.5 THERAPEUTISCHES POTENZIAL DER AICD-VERMITTELTEN TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION VON NEP BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT

β - und γ -Sekretase-Inhibitoren gelten aufgrund ihres A β -reduzierenden Effekts als potentielle Wirkstoffe zur AD-Therapie und wurden bereits vielfach in klinischen Studien getestet. Hierbei wurde meist eine mangelnde Wirksamkeit oder starke Nebenwirkungen der Substanzen verzeichnet, was zum Abbruch der entsprechenden Studien führte (Godyn et al., 2016; Karran et al., 2011; Mikulca et al., 2014). Neben der Inhibition der Produktion von A β -Peptiden führt die pharmakologische Hemmung der β - und γ -Sekretase auch zu einer Verringerung der NEP-Genexpression (Abb. 21) und somit zu einem reduzierten A β -Abbau, was ein möglicher Grund für die Ineffizienz dieser Wirkstoffe in klinischen Studien darstellen kann.

Während des physiologischen Alterns (Hellstrom-Lindahl et al., 2008; Russo et al., 2005) sowie der AD-Pathogenese wurde mehrfach eine Reduktion der NEP-Genexpression und -Enzymaktivität im Hirngewebe nachgewiesen. Bei AD scheint v.a. in Hirnregionen mit massiver A β -Pathologie wie z.B. dem Hippocampus und dem Kortex ein reduzierter Gehalt des Enzyms vorzuliegen (Carpentier et al., 2002; Miners et al., 2006; Russo et al., 2005; Wang et al., 2005a; Yasojima et al., 2001). Der Gentransfer von NEP führt in verschiedenen AD-Tiermodellen zu einer Reduktion des zerebralen A β -Gehalts und damit einhergehenden verbesserten kognitiven Fähigkeiten (El-Amouri et al., 2008; Guan et al., 2009; Hemming et al., 2007; Iwata et al., 2004; Iwata et al., 2013; Liu et al., 2009; Marr et al., 2003; Poirier et al., 2006; Spencer et al., 2008), was ein mögliches therapeutisches Potenzial des Enzyms bei der Therapie

von AD impliziert. Die AICD-vermittelte Regulation der NEP-Transkription könnte demnach einen pharmakologischen Angriffspunkt für die gezielte Steigerung der Aktivität des Enzyms darstellen. Die NEP-Genexpression wird in Abwesenheit von AICD durch die Bindung von Histon-Deacetylasen (engl. histone deacetylases, HDAC) an den NEP-Promotor inhibiert (Belyaev et al., 2009). Aus diesem Grund konnte *in vitro* und *in vivo* eine Reaktivierung der NEP-Transkription durch das Antiepileptikum Valproinsäure, welches als HDAC-Inhibitor agiert, erzielt werden (Belyaev et al., 2009; Nalivaeva et al., 2012b). Die Behandlung von transgenen Mäusen mit Valproinsäure resultiert des Weiteren in einer Reduktion der A β -Plaque-Bildung sowie einer Verbesserung der kognitiven Leistungen (Kilgore et al., 2010; Qing et al., 2008). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, welcher als Gleevec® bzw. Glivec® vermarktet wird, ist ein weiterer Wirkstoff, der über den AICD-abhängigen Signalweg Einfluss auf die NEP-Genexpression nehmen kann. Mit Gleevec® behandelte Zellen zeigen eine Steigerung des mRNA- und Proteingehalts von NEP, eine Reduktion sekretierter A β -Peptide sowie ein gesteigerter intrazellulärer und nukleärer AICD-Gehalt. Diese Effekte basieren wahrscheinlich auf der Stabilisierung von AICD-Peptiden. Eine mögliche Erklärung hierfür sind Veränderungen in der AICD-Phosphorylierung, die sich auf die Interaktion des Peptids mit Adapterproteinen und somit auf seinen Abbau auswirken (Bauer et al., 2011; Eisele et al., 2007; Kerridge et al., 2014). Die seit Jahren im Rahmen der Behandlung von Epilepsie bzw. malignen Erkrankungen erprobten Wirkstoffe Valproinsäure und Imatinib könnten somit ein therapeutisches Potenzial hinsichtlich AD aufweisen. Dieses wurde für Imatinib bislang noch nicht in klinischen Studien untersucht. Die Behandlung von AD-Patienten mit Valproinsäure führte jedoch in zwei neueren klinischen Studien zu einer gesteigerten Hirnatrophie und möglicherweise zu einem verstärkten Verlust kognitiver Fähigkeiten, was gegen den Einsatz dieses Wirkstoffes in der AD-Therapie spricht (Fleisher et al., 2011; Tariot et al., 2011). Den Daten dieser Arbeit zufolge könnte möglicherweise auch eine pharmakologische Inhibition von IDE zur Erhöhung des intrazellulären AICD-Gehalts und damit einhergehend zur Steigerung der Genexpression von NEP genutzt werden (Abb. 23). Dies ist allerdings nicht sinnvoll, da hierbei zur Steigerung der NEP-vermittelten A β -Degradation mit IDE ein anderes A β -degradierendes Enzym inhibiert werden würde. Außerdem würde die Reduktion der IDE-Enzymaktivität auch zu Veränderungen des Insulinmetabolismus führen. Der festgestellte Zusammenhang zwischen IDE, AICD und NEP stellt eine mögliche Erklärung für das erhöhte AD-Risiko bei Vorliegen von Typ II-Diabetes dar (Arvanitakis et al., 2004; Barbagallo und Dominguez, 2014; Ott et al., 1999). Es ist denkbar, dass es infolge des Insulinmangels bei Diabetes-Patienten zu einem gesteigerten zytosolischen AICD-Abbau durch IDE und somit zu einer verringerten Genexpression von NEP kommt, was wiederum in einer Reduktion der NEP-abhängigen A β -Degradation resultiert (Abb. 77). Umgekehrt kann eine Hyperinsulinämie zu einer kompetitiven Inhibition von IDE und somit ebenfalls zu einer verringerten A β -Degradation führen (Qiu und Folstein, 2006).

Trotz des stimulierenden Effekts auf die Transkription von NEP kann die Steigerung des intrazellulären AICD-Gehalts durch Wirkstoffe wie Imatinib aus verschiedenen Gründen ebenfalls nicht als generell positiv erachtet werden. Wie bereits erwähnt, stimuliert AICD neben der Transkription von NEP auch die Expression mehrerer Gene, die mit neurotoxischen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden. Zu diesen zählen u.a. die für die β -Sekretase BACE1, die Kinase GSK3 β sowie das proapoptische Protein p53 kodierenden Gene (Alves da Costa et al., 2006; Kim et al., 2003; von Rotz et al., 2004). Demnach könnte die Akkumulation von AICD auch eine gesteigerte amyloidogene APP-Prozessierung, eine Hyperphosphorylierung von Tau sowie Apoptose induzieren. In der Literatur wird AICD von einigen Autoren sogar als möglicher Auslöser der AD-Pathogenese diskutiert (Ghosal et al., 2009; Konietzko, 2012; Muller et al., 2008; Nagase und Nakayama, 2014). Dies wird u.a. mit der Ineffizienz unterschiedlicher Therapieansätze zur Reduktion der zerebralen A β -Akkumulation in klinischen Studien und der schlechten Korrelation zwischen der Ablagerung von A β -Peptiden und der Progression von AD

begründet (Abbott, 2008; Golde et al., 2011; Karran et al., 2011; Nagase und Nakayama, 2014). Für eine mögliche Beteiligung des AICD/Fe65-Signalwegs an der Pathogenese von AD spricht auch der gesteigerte Gehalt von AICD in humanem *post mortem* AD-Hirngewebe (Ghosal et al., 2009) und die Tatsache, dass das Peptid mehrfach mit der Induktion bzw. Verstärkung von Apoptose in Verbindung gebracht wurde (Kogel et al., 2012; Nakayama et al., 2008; Ohkawara et al., 2011; Passer et al., 2000). Des Weiteren zeigen AICD- und Fe65-überexprimierende Mäuse charakteristische Merkmale von AD wie u.a. die Hyperphosphorylierung von Tau, kognitive Beeinträchtigungen, Neuroinflammation sowie den Verlust von hippocampalen Neuronen (Ghosal et al., 2009; Ghosal et al., 2010). Um das Potenzial der Stimulation der NEP-Genexpression über den AICD/Fe65-Signalweg bei der AD-Therapie genauer einschätzen zu können, sind aus den oben erläuterten Gründen weitere Studien erforderlich.

5.2 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER FETTSÄUREN AUF DIE A β -DEGRADATION

5.2.1 VIELFALT UND FUNKTIONEN VON FETTSÄUREN

Das Gehirn ist besonders reich an Lipiden und Fettsäuren. Fettsäuren haben als Energiequellen, Signalmoleküle und wesentliche Bestandteile zellulärer Membranen vielfältige Funktionen im zentralen Nervensystem und beeinflussen z.B. die strukturelle Integrität von Membranen, die Expression von Genen, die neuronale Aktivität sowie neuroinflammatorische und apoptotische Prozesse (Hussain et al., 2013; Linscheer und Vergroesen, 1994; O'Brien und Sampson, 1965; Spector und Yorek, 1985). Die biologische Vielfalt von Lipiden basiert vor allem auf der Variation der Fettsäuren, welche v.a. in der Länge und im Sättigungsgrad ihrer Kohlenwasserstoffkette variieren können. Ungesättigte Fettsäuren werden anhand der Position und Anzahl der Doppelbindungen in einfach und mehrfach ungesättigte (engl. mono- bzw. polyunsaturated fatty acids, MUFAs bzw. PUFAs) bzw. in ω 3-, ω 6 und ω 9-Fettsäuren klassifiziert (Hussain et al., 2013). Die Länge und der Sättigungsgrad bestimmen die physikalischen Eigenschaften der Fettsäuren wie beispielsweise ihren Schmelzpunkt. Supplementierte Fettsäuren werden *in vitro* und *in vivo* innerhalb weniger Minuten in die Phospholipide zellulärer Membranen inkorporiert (Igarashi et al., 2013; Mally et al., 2013), wodurch auch die biophysikalischen Eigenschaften der Membranen verändert werden (Cader et al., 1995; Shaikh und Edidin, 2008; Stillwell et al., 2005; Zavodnik et al., 1997).

5.2.2 GLYCEROPHOSPHOLIPIDE

Phospholipide machen 20-25% des Hirn-Trockengewichts aus, sie gehören zu den Hauptbestandteilen biologischer Membranen (Agranoff et al., 1999). Die Klasse der Phospholipide kann in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Sphingophospholipide und die Glycerophospholipide. Glycerophospholipide bestehen aus dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, welcher an der sn1- und sn2-Position mit jeweils einer Fettsäure und an der sn3-Position mit einer Phosphorsäure verestert ist. Durch Bindung eines Alkohols an die Phosphorsäure entsteht ein Phosphosäurediester, der die Kopfgruppe des Lipids bildet. In Abhängigkeit von dem in der Kopfgruppe enthaltenen Alkohol werden Glycerophospholipide in weitere Klassen unterteilt. Die in den Zellmembranen von Säugetierzellen am häufigsten vorkommende Klasse der Phosphatidylcholine (PC) (Kadowaki und Grant, 1995) enthält in ihrer Kopfgruppe den einwertigen Alkohol Cholin (Abb. 78). Aufgrund ihrer polaren Kopfgruppen und der apolaren Fettsäuren sind Phospholipide amphiphile Moleküle, die in wässrigem Milieu Mizellen oder Lipiddoppelschichten bilden, was die chemisch-physikalische Grundlage für die Entstehung biologischer Membranen darstellt (Linscheer und Vergroesen, 1994; Tanford, 1987).

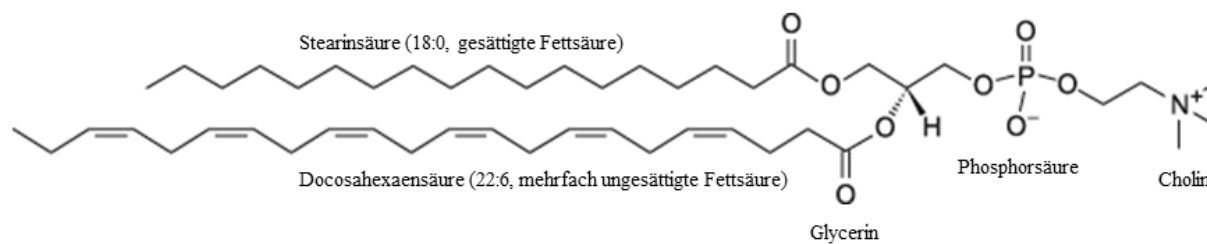


Abb. 78: Schematische Darstellung von Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholin (PC) ist aus Glycerin aufgebaut, welches an der sn1- und sn2-Position Fettsäuren trägt und an der sn3-Position mit der aus Phosphorsäure und Cholin bestehenden Kopfgruppe verestert ist. Die gebundenen Fettsäuren können in ihrer Länge und in ihrem Sättigungsgrad variieren.

(Abb. modifiziert nach Produktbeschreibung 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholin, Avanti Polar Lipids)

In Säugetierzellen wird PC überwiegend durch den sogenannten Kennedy- oder CDP-Reaktionsweg aus Cholin und 1,2-Diacylglycerol gebildet (Cole et al., 2012; Kennedy und Weiss, 1956). Die meisten Fettsäuren können vom menschlichen Körper synthetisiert werden. Bei Linolsäure (18:2) und α -Linolensäure (18:3), die als Ausgangsprodukte der Synthese mehrerer PUFAs dienen, handelt es sich jedoch um essentielle Fettsäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Die Fettsäurekomposition variiert erheblich in unterschiedlichen Lebensmitteln. Einen hohen Gehalt an Linolsäure (18:2) weisen u.a. Distel-, Sonnenblumen- und Traubenkernöl auf, reich an α -Linolensäure (18:3) ist Leinöl (White, 2009). Die PUFAs EPA (20:5) und DHA (22:6) sind in großen Mengen in Fischölen enthalten (Oehlenschläger, 2012; White, 2009). Eine auffällige Fettsäurekomposition weisen außerdem Kokos- und Palmkernfett auf, die besonders reich an MCFAs sind (Neufassung der Leitsätze für Speisefette und -öle, 2011; Fernando et al., 2015). Mit der Nahrung aufgenommenes PC wird größtenteils im proximalen Dünndarm resorbiert. Durch die Aktivität der im Pankreassekret enthaltenen Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase (Phospholipase A₂, PLA₂) wird von dem luminalen PC eine Fettsäure abgespalten, wodurch Lyso-PC entsteht. Anschließend erfolgt die Absorption der freien Fettsäuren sowie des entstandenen Lyso-PCs über die Darmschleimhaut. In geringen Mengen findet auch die Resorption intakter PC-Moleküle über die Mukosa statt. In den Enterozyten erfolgt dann die Resynthese von Phospholipiden, die freien Fettsäuren werden auch zur Synthese von Triglyceriden verwendet. Die Lipide werden in Chylomikronen integriert, die von der Darmmukosa aus über die Lymphbahnen in den Blutkreislauf gelangen (Le Kim und Betzing, 1976; Tso und Fujimoto, 1991; Zierenberg und Grundy, 1982). Die in der Peripherie erneut abgespaltenen Fettsäuren werden in den Zielorganen hauptsächlich zur Integration in Membranen, als Energiespeicher oder als Signalmoleküle verwendet. Da die Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Fettsäuren möglich ist, können mit der Nahrung aufgenommene Fettsäuren die zerebrale Fettsäurekomposition verändern und somit Einfluss auf biochemische Prozesse im Gehirn nehmen (Marteinsdottir et al., 1998; Nguyen et al., 2014; Ouellet et al., 2009; Smith und Nagura, 2001; Spector, 1988). Die Inkorporation aufgenommener Fettsäuren in Membranen verändert deren biophysikalische Eigenschaften wie z.B. die Dicke, Fluidität und die *Lipid raft*-Komposition, was sich auf die Aktivität von membranständigen Enzymen wie den Sekretasen auswirken kann (Cader et al., 1995; Stillwell et al., 2005; Zavodnik et al., 1997). Eine Beeinflussung der Sekretaseaktivität und der A β -Produktion durch freie Fettsäuren und Phospholipide konnte vielfach belegt werden (Grimm et al., 2011c; Grimm et al., 2012a; Grimm et al., 2013a; Holmes et al., 2012; Winkler et al., 2012). Des Weiteren wurde in mehreren epidemiologischen Studien eine Korrelation zwischen der Aufnahme von verschiedenen Fettsäuren und dem Demenz-/AD-Risiko bzw. der Abnahme kognitiver Fähigkeiten nachgewiesen. Zusammenfassend scheint die Zufuhr von einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einem verringerten, die Aufnahme von gesättigten Fettsäuren hingegen mit einem erhöhten AD-Risiko assoziiert zu sein (Mett et al., 2016; Morris und Tangney, 2014).

5.2.3 EPA UND DHA BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT

EPA und DHA zählen zu den ω 3-PUFAs, die mit zahlreichen neuroprotektiven Eigenschaften in Verbindung gebracht werden (5.2.8.1). DHA stellt neben Arachidonsäure (20:4) die am häufigsten in Phospholipide inkorporierte PUFA im Hirngewebe dar und macht etwa 7-8% des zerebralen Gesamt-Fettsäuregewichts aus (Lauritzen et al., 2001; Muskiet et al., 2006). Die Synthese von EPA und DHA erfolgt von der essentiellen α -Linolensäure (18:3) ausgehend. Diese wird zunächst zu Stearidonsäure umgewandelt, welche anschließend zu Eicosatetraensäure verlängert wird. Die Eicosatetraensäure wird dann durch die Aktivität der Δ 5-Desaturase entsättigt, wodurch EPA entsteht. Durch weitere Elongation, Entsättigung und β -Oxidation wird schließlich aus EPA DHA gebildet (Sprecher und Chen, 1999; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015). Da im menschlichen Körper nur ein sehr geringer Anteil der α -Linolensäure zu EPA bzw. DHA metabolisiert wird, muss der Bedarf dieser Fettsäuren größtenteils mit der Aufnahme durch die Nahrung gedeckt werden (Goyens et al., 2005; Hussein et al., 2005; Pawlosky et al., 2001). Aus diesem Grund werden EPA und DHA häufig auch zu den essentiellen Fettsäuren gezählt. Als Lebensmittel mit einem hohen EPA- und DHA-Gehalt sind v.a. fetter Seefisch wie Lachs oder Atlantischer Hering zu nennen (Mann et al., 2010; Oehlenschläger, 2012; Whelan und Rust, 2006). Da EPA und DHA die Blut-Hirn-Schranke überqueren können (Freund Levi et al., 2014; Nguyen et al., 2014; Ouellet et al., 2009), ist eine Veränderung der zerebralen Fettsäurekomposition durch die verstärkte Aufnahme dieser Fettsäuren möglich (Green et al., 2007; Lim et al., 2005; Marteinsdottir et al., 1998). Die Inkorporation von PUFAs in zelluläre Membranen resultiert in einer gesteigerten Fluidität sowie einer reduzierten Dicke der Membranen (Horrocks und Farooqui, 2004; Yang et al., 2011).

Es gibt viele Indikationen für eine wichtige Rolle von ω 3-Fettsäuren bei der Pathogenese von AD. So konnte in mehreren Studien im *post mortem* Hirngewebe sowie im Serum/Plasma von AD-Patienten eine Reduktion des EPA- und DHA- bzw. des Gesamtgehalts von ω 3-Fettsäuren festgestellt werden (Conquer et al., 2000; Soderberg et al., 1991; Tully et al., 2003; Whiley et al., 2014). Gleichzeitig ist die Konzentration von PUFA-Oxidationsprodukten im Hirngewebe von AD-Patienten erhöht, was auf eine gesteigerte Oxidation der Fettsäuren unter den pathologischen Bedingungen hindeuten kann (Grimm et al., 2016a; Markesbery et al., 2005; Montine und Morrow, 2005; Nourooz-Zadeh et al., 1999). Eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten infolge der Supplementierung von EPA und/oder DHA wurde mehrfach bei AD-Patienten (5.2.8.1) und AD-Tiermodellen nachgewiesen (Calon et al., 2004; Hashimoto et al., 2002; Hashimoto et al., 2005; Hashimoto et al., 2009; Hooijmans et al., 2009). Dieser Effekt wird auf eine negative Korrelation zwischen des zerebralen A β -Gehalts bzw. der A β -Plaques-Bildung und der Aufnahme der ω 3-Fettsäuren zurückgeführt (Green et al., 2007; Hashimoto et al., 2008; Hooijmans et al., 2009; Lim et al., 2005; Perez et al., 2010).

DHA führt über einen pleiotropen Wirkmechanismus zu einer reduzierten A β -Produktion. In Anwesenheit von DHA liegt eine direkte Inhibition der β - und γ -Sekretase-Enzymaktivität und somit eine verringerte amyloidogene APP-Prozessierung vor. Gleichzeitig ist die Aktivität der α -Sekretase durch einen gesteigerten zellulären DHA-Gehalt erhöht, was auf eine gesteigerte Proteinstabilität von ADAM17 zurückzuführen ist (Grimm et al., 2011c). Zusätzlich dazu wurde für EPA- und DHA-enthaltende Phospholipide ein direkter stimulierender Effekt auf die Aktivität der α -Sekretase nachgewiesen (Grimm et al., 2013a). DHA wirkt sich außerdem durch Inhibition der HMGCR negativ auf die Cholesterin *de novo*-Synthese aus und bewirkt eine Verschiebung von Cholesterin und PS1 von den *Lipid rafts* zu den *Non-Raft*-Domänen innerhalb der Membran, was sich ebenfalls negativ auf die A β -Produktion auswirkt (Ehehalt et al., 2003; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004). Nach Behandlung von Zellen mit DHA ist zusätzlich die Internalisierung von BACE1 erniedrigt, wodurch die Aktivität des Enzyms und somit die amyloidogene APP-Prozessierung reduziert wird (Carey et al., 2005; Grbovic et al., 2003; Grimm et al., 2011c; Rajendran et al., 2006). Neben der A β -Produktion wird auch die A β -Aggregation und die A β -

induzierte Toxizität bei neuronalen Zellen negativ durch DHA beeinflusst (Hashimoto et al., 2008; Hashimoto et al., 2011; Hossain et al., 2009).

5.2.4 EINFLUSS VON EPA UND DHA AUF DIE A β -DEGRADATION

Während der Einfluss von EPA und DHA auf die A β -Produktion bereits umfangreich *in vitro* und *in vivo* untersucht wurde (5.2.3), ist über ihre Wirkung auf A β -abbauende Mechanismen bislang nur wenig bekannt. Da ein protektives Potenzial dieser Fettsäuren hinsichtlich AD mehrfach nachgewiesen werden konnte (5.2.3, 5.2.8.1) und der zerebrale A β -Gehalt sowohl von der Produktion als auch von dem Katabolismus des Peptids abhängt (Saido, 2013) (Abb. 3), wurde in dieser Arbeit die enzymatische A β -Degradation unter Einfluss von EPA und DHA analysiert. Für die Untersuchungen wurde die Neuroblastom-Zelllinie N2a verwendet. Die Supplementierung der Zellen mit EPA bzw. DHA erfolgte durch die Inkubation mit PC20:5 bzw. PC22:6, da die Fettsäuren nach exogener Zufuhr und Passage der Blut-Hirn-Schranke im Hirngewebe primär in Phospholipide inkorporiert vorliegen (DeGeorge et al., 1991; Farooqui und Horrocks, 2001; Nguyen et al., 2014; Ouellet et al., 2009; Sarda et al., 1991). Um ausschließlich die Effekte der Doppelbindungen auf die A β -Degradation analysieren zu können, wurden PC20:0 bzw. PC22:0 als Kontrolllipide benutzt. Bei allen verwendeten Phospholipiden handelt sich um synthetische PC-Spezies, die an der sn1- und an der sn2-Position identische Fettsäuren tragen. Dies hat den Vorteil, dass die Effekte der einzelnen Fettsäuren besser identifiziert werden können als bei Verwendung von natürlich vorkommenden Phospholipiden, die meist eine ungesättigte Fettsäure in Kombination mit einer gesättigten Fettsäure enthalten.

Nach Behandlung der Zellen mit PC20:5 und PC22:6 ist eine signifikante Reduktion der in das Zellkulturmedium supplementierten, synthetischen A β 40-Peptide festzustellen, was eine gesteigerte A β -Degradation in Anwesenheit von EPA und DHA im Vergleich zu den korrespondierenden gesättigten Fettsäuren belegt (Abb. 29). IDE wird in der Literatur als eines der Haupt-A β -degradierenden Enzyme im Kulturmedium von neuronalen und mikroglialen Zelllinien beschrieben (Farris et al., 2003; Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). Um zu überprüfen, ob dies auch für die verwendeten N2a-Zellen zutrifft, wurde eine stabile N2a IDE-Knockdown (N2a IDE-KD)-Zelllinie generiert (Abb. 30A). Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen ist der Abbau synthetischer A β 40-Peptide in diesen Zellen signifikant reduziert (Abb. 30B), was die hohe Relevanz von IDE bei Betrachtung der A β -Degradation unter den gewählten experimentellen Bedingungen verdeutlicht. Da die oben beschriebenen Effekte von PC20:5 und PC22:6 auf die A β -Gesamtdegradation bei Verwendung von N2a IDE-KD nicht verzeichnet werden konnten (Abb. 31), ist davon auszugehen, dass die Aktivität von IDE durch EPA und DHA beeinflusst wird.

Die Genexpression von IDE ist, wie auch die Aktivität des IDE-Promotors, nach Inkubation der Zellen mit PC20:5 im Vergleich zu PC20:0 signifikant erhöht (Abb. 32, Abb. 33). Diese Daten belegen eine Aktivierung des IDE-Promotors durch EPA. Eine Beeinflussung der Genexpression durch PUFAs wurde in anderen Studien ebenfalls festgestellt. So resultiert die gesteigerte Aufnahme von PUFAs in einer veränderten Expression zahlreicher Gene im Hirngewebe von Ratten (Barcelo-Coblijn et al., 2003; Kitajka et al., 2002). Diese Effekte basieren möglicherweise auf einer Wechselwirkung der Fettsäuren mit Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren. Unter anderem konnte die Aktivierung bzw. gesteigerte Genexpression von Retinoid-X-Rezeptoren (engl. retinoid X receptors, RXRs) und Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (engl. peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) durch EPA, DHA und andere PUFAs nachgewiesen werden. Diese Mechanismen sind teilweise spezifisch für die einzelnen Fettsäuren (Chambrier et al., 2002; de Urquiza et al., 2000; Deckelbaum et al., 2006;

Lengqvist et al., 2004), was erklären kann, weshalb sich EPA, nicht aber DHA, auf die IDE-Genexpression auswirkt (Abb. 32) (5.2.7.1). Trotz des höheren DHA-Gehalts im Hirngewebe (Chen et al., 2009), kann EPA aufgrund seines schnellen Metabolismus als hochpotentes Signalmolekül im zentralen Nervensystem agieren (Song et al., 2016). Transkriptionelle Effekte von EPA können demnach auch durch Metabolite der Fettsäure wie z.B. den Eicosanoiden vermittelt werden, die an eine Vielzahl von Rezeptoren binden und somit Einfluss auf verschiedene zelluläre Signalkaskaden nehmen können (Comba et al., 2011; Dennis und Norris, 2015).

Im Gegensatz zu EPA wirkt sich DHA nicht auf die IDE-Genexpression aus (Abb. 32), sondern fördert die Sekretion des Enzyms in den Extrazellulärraum. Dies wird durch die signifikante Erhöhung des Verhältnisses zwischen dem extra- und intrazellulären IDE-Proteinspiegel nach Behandlung der N2a-Zellen mit PC22:6 deutlich (Abb. 34B) und stellt eine Erklärung für die gesteigerte A β 40-Degradation unter Einfluss dieses Phospholipids (Abb. 29) dar. Es ist bekannt, dass die Sekretion von IDE in verschiedenen Zelllinien zumindest teilweise Exosomen-abhängig erfolgt (Bulloj et al., 2010; Tamboli et al., 2010). Bei Exosomen handelt es sich um sezernierte Vesikel, die einen Durchmesser von 40-100nm aufweisen und infolge der Verschmelzung multivesikulärer Endosomen (engl. multivesicular endosomes, MVEs) mit der Plasmamembran in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Harding et al., 1984; Pan et al., 1985; Raposo und Stoorvogel, 2013) (5.2.7.2). Von Bulloj et al. konnte unter Verwendung von N2a-Zellen demonstriert werden, dass das exosomal sezernierte IDE proteolytisch aktiv ist und dass die Inhibition der Exosomen-Sekretion zu einer signifikanten Erhöhung des Gehalts von endogenen A β -Peptiden im Kulturmedium der Zellen führt (Bulloj et al., 2010). Um zu überprüfen, ob der festgestellte Effekt von DHA auf die IDE-Sekretion (Abb. 34B) abhängig von Exosomen ist, wurde der Einfluss von DHA auf den A β 40-Abbau in Anwesenheit des Exosomen-Inhibitors GW4869 betrachtet. Da es sich bei der Freisetzung von Exosomen um einen Prozess handelt, der stark abhängig von Ceramid ist, werden verschiedene Inhibitoren der nSMase wie u.a. GW4869 zur Reduktion der Exosomen-Freisetzung verwendet (Li et al., 2013; Trajkovic et al., 2008). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bulloj et al. konnte eine deutliche Reduktion der A β -Degradation nach Inkubation der N2a-Zellen mit GW4869 verzeichnet werden (Abb. 35B). Es ist jedoch denkbar, dass die Inhibition der nSMase durch GW4869 aufgrund des veränderten zellulären Ceramid/Sphingomyelin-Verhältnisses zusätzliche, Exosomen-unabhängige Einflüsse auf die A β -Degradation hat. Die signifikant ($p = 0,035$) geringere Effektstärke von PC22:6 auf den A β -Abbau in Anwesenheit von GW4869 im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 35A) deutet darauf hin, dass der erhöhte extrazelluläre IDE-Gehalt infolge der Inkubation der Zellen mit PC22:6 zumindest teilweise auf einer gesteigerten Exosomen-Sekretion basiert. In Übereinstimmung damit konnte in einer anderen Studie eine Stimulation der exosomal Sekretion des Peptidhormons Adiponektin nach Inkubation von Adipozyten mit DHA nachgewiesen werden (DeClercq et al., 2015). Interessanterweise erfolgt die Freisetzung von Adiponektin in diesen Zellen sowohl über das TGN als auch Exosomen-vermittelt (DeClercq et al., 2015), wie es auch die in Abb. 35A gezeigten Daten für IDE implizieren. Wie in 5.2.7.2 erläutert, kann die festgestellte Wirkung von DHA auf die exosomale Sekretion von IDE in N2a-Zellen sowohl auf einer direkten Wirkung der Fettsäure als auch auf indirekten Effekten basieren. In einer Publikation von Hosono et al. wurde ein unveränderter IDE-Proteingehalt im Kortex von APP-transgenen Mäusen nach Supplementierung von DHA beschrieben. Da in dieser Studie Gesamtproteinextrakt aus dem Hirngewebe der Tiere verwendet wurde, was keine Differenzierung zwischen intra- und extrazellulär vorliegendem IDE erlaubt, stellen diese Daten keinen Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dar (Hosono et al., 2015). Von Du et al. wurde hingegen ein signifikant gesteigerter intrazellulärer IDE-Proteingehalt in primären hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit DHA als freie Fettsäure verzeichnet (Du et al., 2010). Die Diskrepanz zwischen diesem Ergebnis und den Daten dieser Arbeit könnte darauf beruhen, dass IDE in Primärneuronen im Gegensatz

zu Mikroglia und anderen Zelltypen nicht sezerniert wird, sondern überwiegend in einer Zell-assoziierten Form vorliegt (Vekrellis et al., 2000).

Zusätzlich zu den Effekten von PC20:5 und PC22:6 auf die Genexpression bzw. den intrazellulären Transport von IDE weisen beide Lipide *in vitro* eine steigernde Wirkung auf die Enzymaktivität von rekombinantem IDE auf (Abb. 36). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich zumindest partiell auf einer direkten Lipid-Enzym-Interaktion, die für PC20:5 bzw. PC22:6 stärker ausgeprägt ist als für die Kontrolllipide PC20:0 bzw. PC22:0 (Abb. 37). Da nach Ko-Immünpräzipitation mit IDE ein vergleichbar ($p = 0,632$) stark erhöhtes PC20:5/PC20:0- bzw. PC22:6/22:0-Verhältnis festgestellt wurde (Abb. 37), sich die direkten Effekte von PC20:5 und PC22:6 auf die IDE-Enzymaktivität aber signifikant ($p \leq 0,001$) voneinander unterscheiden (Abb. 36), ist davon auszugehen, dass weitere Mechanismen zu der veränderten Aktivität des Enzyms in Anwesenheit von PC20:5 bzw. PC22:6 beitragen. Denkbar wäre beispielsweise eine Beeinflussung der Substratverfügbarkeit durch die Lipide. Ein analoger Mechanismus konnte für den Einfluss von A β -Peptiden auf die Enzymaktivität der GD3-Synthase nachgewiesen werden (Grimm et al., 2012c).

Übereinstimmend mit der festgestellten direkten Bindung der Lipide an das Enzym wurde von Hamel et al. die Existenz einer Fettsäure-Bindestelle innerhalb von IDE postuliert (Hamel et al., 2003). Eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität von IDE durch verschiedene Fettsäuren ist auch in der Literatur beschrieben. Wie von Hamel et al. publiziert weisen Palmitinsäure (16:0), Linolsäure (18:2) und DHA eine inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Aktivität von IDE auf (Hamel et al., 2003). In dieser Studie wurde der Umsatz von ^{125}I -Insulin durch das aus Rattenleber isolierte Enzym in Anwesenheit der einzelnen freien Fettsäuren gemessen. Aufgrund dessen, dass die Effekte der Fettsäuren in dieser Studie in Relation zur Lösungsmittelkontrolle betrachtet wurden, in der vorliegenden Arbeit hingegen die korrespondierenden gesättigten Fettsäuren die Kontrollen darstellen, ist ein Vergleich der beobachteten Effekte nicht möglich. Des Weiteren wurde IDE in der Studie von Hamel et al. mit freien Fettsäuren inkubiert, während die *in vitro*-Inkubation des Enzyms im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung der an PC gebundenen Fettsäuren erfolgte. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen zumeist in an Lipoproteine gebundener Form vorliegen, was die Interaktion zwischen den Fettsäuren und IDE und damit den Effekt auf die Aktivität des Enzyms beeinflussen könnte.

Die *in vivo*-Relevanz des Einflusses von EPA und DHA auf den IDE-abhängigen A β -Abbau wurde bislang nicht untersucht. Es ist jedoch denkbar, dass zusätzlich zu der verringerten A β -Produktion die gesteigerte Genexpression von IDE unter Einfluss von EPA, die verstärkte Sekretion des Enzyms bei erhöhtem zellulärem DHA-Gehalt bzw. die direkten Effekte beider Fettsäuren auf die katalytische Aktivität von IDE zu dem reduzierten zerebralen A β -Gehalt in unterschiedlichen Tiermodellen nach Supplementierung dieser PUFAs beitragen (5.2.3). Die A β -Beseitigung könnte außerdem durch eine gesteigerte mikrogliale Phagozytose von A β in Anwesenheit erhöhter EPA- und DHA-Spiegel positiv beeinflusst werden, wie von Hjorth et al. in Mikroglia-Kulturen demonstriert wurde (Hjorth et al., 2013).

5.2.5 MITTELKETTIGE UND LANGKETTIGE FETTSÄUREN BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT

Wie bereits erwähnt, können Fettsäuren neben dem Sättigungsgrad auch in der Länge ihrer Kohlenwasserstoffketten variieren. Im Vergleich zu PUFAs wurde die Relevanz von unterschiedlich langen Fettsäuren auf die molekularen Mechanismen und die Pathogenese von AD bislang allerdings weniger umfassend untersucht.

In einigen Publikationen konnte eine Beeinflussung der Sekretase-Aktivität durch die Fettsäure-Kettenlänge festgestellt werden. Die Aktivität der γ -Sekretase korreliert in einer *in vitro*-Studie von

Holmes et al. positiv mit der Fettsäure-Kettenlänge im Bereich von 14 bis 20 Kohlenstoffatomen, wobei das Verhältnis der generierten A β 42- zu A β 40-Peptiden unter Einfluss längerer Fettsäuren abnimmt (Holmes et al., 2012). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der α -Sekretase durch PC10:0, PC12:0 und PC14:0 gesteigert (Grimm et al., 2013a). Da die Ergebnisse beider Studien in zellfreien Systemen generiert wurden, ist von einer direkten Beeinflussung der Sekretase-Aktivität durch die Fettsäuren auszugehen.

MCFAs, welche v.a. im Kokosnussöl und Palmkernfett vorkommen (Neufassung der Leitsätze für Speisefette und -öle, 2011), haben die Besonderheit, dass sie im Vergleich zu LCFAs in der Leber verstärkt zu Ketonkörpern metabolisiert werden (Lei et al., 2016). Aus diesen kann wiederum Acetyl-CoA gewonnen werden, welches zur Energiegewinnung in den Citratzyklus einfließt (Newman und Verdin, 2014b). In mehreren Studien wurde eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten von Patienten mit MCI oder AD nach gesteigerter Aufnahme von MCFAs bzw. Ketonen festgestellt (5.2.8.2). Die Pathogenese von AD geht mit einer mitochondrialen Dysfunktion einher, wodurch es zu einer verringerten Verwertung von Glukose als Energieträger und somit zu einem zerebralen Hypometabolismus in bestimmten Hirnregionen kommt (de Leon et al., 1983; Friedland et al., 1989; Hoyer, 1992). Die positive Wirkung der Ketone bzw. MCFAs auf die Kognition von MCI- und AD-Patienten wird in der Literatur primär darauf zurückgeführt, dass Ketonkörper im Hirngewebe eine wichtige alternative Energiequelle darstellen und somit den Glukose-Hypometabolismus ausgleichen können (Courchesne-Loyer et al., 2013; Cunnane et al., 2011; Ding et al., 2013). In unterschiedlichen Tiermodellen wirken sich Ketone allerdings auch auf die A β - und Tau-Pathologie aus. So zeigen transgene Mäuse nach Verabreichung einer sogenannten Ketondiät, die sich durch einen geringen Kohlenhydratanteil und einen hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren auszeichnet, bzw. nach Supplementierung von Ketonestern eine signifikante Reduktion des zerebralen A β -Gehalts (Kashiwaya et al., 2013; Van der Auwera et al., 2005). Zusätzlich wurde in der Studie von Kashiwaya et al. auch eine Verringerung des Gehalts von hyperphosphoryliertem Tau im Hirngewebe der Tiere festgestellt (Kashiwaya et al., 2013). Im Hirngewebe von Hunden, denen acht Wochen lang mittelkettige Triglyceride (engl. medium chain triglycerides, MCTs) verabreicht wurden, zeigt sich ebenfalls ein tendenziell reduzierter A β -Gehalt sowie eine Reduktion des APP-Proteinspiegels (Studzinski et al., 2008). Des Weiteren ist die A β -induzierte Toxizität von Neuronen in Anwesenheit von Kokosnussöl und dem Ketonkörper β -Hydroxybutyrat verringert, was auf ein neuroprotektives Potenzial von Kokosnussöl bzw. den bei dem Metabolismus von MCFAs entstehenden Ketonkörpern hindeutet (Kashiwaya et al., 2000; Nafar und Mearow, 2014) (5.2.8.2).

5.2.6 EINFLUSS MITTEL- UND LANGKETTIGER FETTSÄUREN AUF DIE A β -DEGRADATION

Da bislang noch nichts über den Einfluss von MCFAs bzw. Kokosnussöl auf die Beseitigung von A β -Peptiden bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die Wirkung der Fettsäure-Kettenlänge auf die enzymatische A β -Degradation untersucht. In Analogie zur Analyse der A β -Degradation unter Einfluss von EPA und DHA wurde für die Untersuchungen die Neuroblastom-Zelllinie N2a verwendet. Zur Betrachtung Fettsäure-Kettenlänge-abhängiger Effekte wurden die Zellen mit PC10:0-PC24:0 behandelt, wobei es sich bei allen verwendeten Phospholipiden ebenfalls um synthetische PC-Spezies handelt, die identische Fettsäuren an der sn1- und sn2-Position tragen. Die Berechnung aller Effekte erfolgte in Relation zu PC16:0, da Palmitinsäure (16:0) neben Stearinsäure (18:0) und Ölsäure (18:1) zu den am häufigsten im Hirngewebe vorkommenden Fettsäuren zählt (Sastry, 1985). Aufgrund dessen, dass anstelle von PC16:0 beispielsweise auch PC18:0 als Kontrolllipid verwendet werden könnte, wurde für alle Experimente auch die Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und den jeweiligen Effekten berechnet.

Zur Untersuchung der Gesamt-A β -Degradation wurden die Zellen mit den verschiedenen PC-Spezies und anschließend mit synthetischen A β 40-Peptiden in Kombination mit den Lipiden inkubiert. Es zeigt sich eine Abhängigkeit des A β -Abbaus von der Fettsäure-Kettenlänge. In Anwesenheit von PC10:0, PC12:0 und PC14:0 ist das nach 6Std verbleibende exogene A β 40 signifikant reduziert, während es nach Behandlung der Zellen mit PC22:0 und PC24:0 signifikant erhöht ist (Abb. 39A). Daraus ergibt sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und den verbleibenden A β 40-Peptiden (Abb. 39B). Diese Korrelation ist bei Verwendung von N2a IDE-Knockdown-Zellen (Abb. 30) nicht zu verzeichnen (Abb. 40B), was darauf hindeutet, dass eine Beeinflussung der IDE-Aktivität durch die Fettsäure-Kettenlänge, wie auch durch den Sättigungsgrad der Fettsäuren (5.2.4), vorliegt. In N2a IDE-Knockdown-Zellen wirkt sich ausschließlich PC12:0 positiv auf den A β 40-Abbau aus (Abb. 40A), weshalb davon auszugehen ist, dass Laurinsäure (12:0) als Haupt-Fettsäure im Kokosnussöl (Tab. 7) (Fernando et al., 2015), zusätzlich IDE-unabhängige Mechanismen der A β -Degradation positiv beeinflusst.

Die Kettenlänge der Fettsäuren hat nur marginale Effekte auf die Genexpression von IDE. Diese ist nach Inkubation mit PC10:0 und PC12:0 tendenziell bzw. signifikant gesteigert, während die Behandlung der Zellen mit PC22:0 und PC24:0 zu einer tendenziell reduzierten Expression des für IDE kodierenden Gens führt (Abb. 41A). Trotz der relativ geringen (maximal 13,3%) und überwiegend statistisch nicht signifikanten Effekte ergibt sich aus diesen Daten eine schwache ($R^2 = 0,56$), aber dennoch signifikante ($p = 0,03$) negative Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der IDE-Genexpression (Abb. 41B). Interessanterweise ist in der Literatur eine stimulierende Wirkung von MCFAs, wie auch von PUFAs (5.2.4), auf PPAR γ beschrieben. In Anwesenheit von Capryl (8:0)- und Caprinsäure (10:0) ist die Genexpression von PPAR γ erhöht (Liberato et al., 2012), was Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene wie z.B. IDE haben kann (5.2.7.1). Da die festgestellten Effekte der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-Genexpression jedoch nur schwach ausgeprägt sind, müssen der Wirkung der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-abhängige A β 40-Degradation weitere Mechanismen zugrunde liegen.

Das Verhältnis zwischen extrazellulärem und intrazellulärem IDE nimmt mit ansteigender Fettsäure-Kettenlänge im Bereich von PC10:0 bis PC20:0 stetig ab, woraus sich eine starke ($R^2 = 0,97$), signifikante ($p \leq 0,001$) Korrelation zwischen den beiden Parametern ergibt (Abb. 44A). Das Verhältnis zwischen extra- und intrazellulärem IDE korreliert für eine Fettsäure-Kettenlänge von 10 bis 20 Kohlenstoffatomen ebenfalls signifikant ($p = 0,02$) mit dem verbleibenden A β 40 bei Bestimmung der A β -Gesamtdegradation (Abb. 44B), weshalb die Beeinflussung der IDE-Sekretion möglicherweise die Ursache für den veränderten A β -Abbau in Anwesenheit der unterschiedlich langen Fettsäuren darstellt. Im Gegensatz dazu korreliert die SEAP-Sekretion über das TGN nicht mit der Fettsäure-Kettenlänge ($p = 0,43$) (Abb. 44A). Dies lässt darauf schließen, dass spezifisch die Freisetzung von IDE durch die Fettsäure-Kettenlänge beeinflusst wird. Nach Inkubation der Zellen mit PC10:0 und PC12:0 ist jedoch auch die SEAP-Sekretion leicht (9,2 bzw. 13,8%), aber signifikant gesteigert. Wie bereits erwähnt, wird IDE zumindest partiell Exosomen-assoziiert in den Extrazellulärraum sezerniert (Bulloj et al., 2010; Tamboli et al., 2010). Da es sich bei der Exosomen-Sekretion um einen lipidabhängigen Prozess handelt (Llorente et al., 2007; Phuyal et al., 2014; Record et al., 2014; Trajkovic et al., 2008), der den Daten dieser Arbeit zufolge durch PUFAs beeinflusst wird (5.2.4), ist es naheliegend, dass auch die Fettsäure-Kettenlänge eine Wirkung auf die Exosomen-vermittelte Freisetzung von IDE besitzt (5.2.7.2).

Die Effekte der in PC22:0 und PC24:0 enthaltenen LCFAs auf die Gesamt-A β -Degradation (Abb. 39A) können hingegen nicht durch Veränderungen im Transport von IDE in den Extrazellulärraum erklärt werden (Abb. 44A). Als Ursache des reduzierten A β -Abbaus unter Einfluss dieser LCFAs wurde eine

direkte inhibitorische Wirkung der Fettsäuren auf die katalytische Aktivität von IDE identifiziert (Abb. 45A). Im Gegensatz dazu ist für MCFAs kein statistisch signifikanter direkter Effekt auf die Aktivität des Enzyms zu verzeichnen (Abb. 45A). Aus diesen Daten ergibt sich allerdings sowohl im Bereich von PC16:0 bis PC24:0 als auch im Bereich von PC10:0 bis PC24:0 eine signifikante ($p = 0,02$ bzw. $p = 0,0002$) negative Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der Aktivität von rekombinantem IDE in Anwesenheit der entsprechenden PC-Spezies (Abb. 45C, Abb. 45D). In Übereinstimmung damit konnte auch in der bereits erwähnten Studie von Hamel et al. eine Inhibition der IDE-abhängigen Insulindegradation durch freie LCFAs mit 16 bis 20 Kohlenstoffatomen nachgewiesen werden. Für Caprylsäure (8:0) als Beispiel für eine MCFA wurde ebenfalls kein Einfluss auf die IDE-Aktivität festgestellt. In dieser Studie wurden allerdings abgesehen von Palmitin (16:0)- und Stearinsäure (18:0) ungesättigte Fettsäuren verwendet und deren Effekte auf die IDE-Aktivität relativ zur Lösungsmittelkontrolle berechnet (Hamel et al., 2003). Unter Anbetracht der postulierten Fettsäure-Bindestelle innerhalb von IDE (Hamel et al., 2003) und dessen, dass die gesteigerte IDE-Enzymaktivität in Anwesenheit von PC20:5 und PC22:6 wahrscheinlich u.a. auf einer direkten Lipid-Protein-Interaktion beruht (5.2.4), ist für die Beeinflussung der IDE-Aktivität durch die Fettsäure-Kettenlänge ein analoger Mechanismus denkbar.

Die positiven Effekte von MCFAs auf die A β -Degradation und die damit einhergehenden möglichen präventiven Effekte dieser Fettsäuren hinsichtlich der AD-Pathogenese wurden unter Verwendung eines entsprechenden Tiermodells auch *in vivo* analysiert. Hierzu wurde APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäusen, die typischerweise ab einem Alter von sechs Monaten zerebrale A β -Ablagerungen entwickeln (Jankowsky et al., 2004), ein Kokosnussöl-enthaltendes Futtermittel bzw. eine Kontrolldiät verabreicht. Die kokosnussölreiche Diät sollte zu einem erhöhten Gehalt von Laurin- (12:0) und Myristinsäure (14:0) im Körper der Tiere führen (Tab. 7). Die Fütterung erfolgte über zehn Wochen, beginnend ab der achten Lebenswoche der Tiere, was etwa der präklinischen Phase von AD entsprechen sollte. Da im Serum der mit der Kokosnussöl-Diät gefütterten Tiere ein gesteigerter Gehalt von Lyso-PCa12:0 und Lyso-PCa14:0, die durch die Aktivität der PLA₂ aus den entsprechenden PC-Spezies gebildet werden, sowie der während des Transports der Fettsäuren in die Mitochondrien entstehenden Carnitine C12:0 und C14:0 vorliegt, ist von einer effizienten Resorption von Laurin (12:0)- und Myristinsäure (14:0) aus dem Futtermittel sowie von einer effizienten Metabolisierung der Fettsäuren auszugehen. Des Weiteren konnte im Serum der Tiere ein signifikant gesteigerter Gehalt von PCaa30:0 festgestellt werden (Abb. 46B). Da sich die Bezeichnung hierbei auf die Summe der Kohlenstoffatome beider gebundenen Fettsäuren bezieht, repräsentiert PCaa30:0 u.a. PC-Spezies, die Laurin (12:0)- und Myristinsäure (14:0) in Kombination mit den häufig vorkommenden Fettsäuren Stearin- (18:0) bzw. Palmitinsäure (16:0) (Berg et al., 2002; Sastry, 1985) beinhalten. Ein tendenziell gesteigerter Gehalt dieser PC-Spezies sowie der oben genannten Lyso-PC-Spezies und Carnitine ist auch im frontalen Kortex der mit Kokosnussöl-Diät gefütterten Tiere zu verzeichnen. Die Effekte sind allerdings aufgrund der geringeren Probenanzahl mit Ausnahme von PCaa30:0 statistisch nicht signifikant (Abb. 46A). Dennoch weisen diese Daten auf eine Inkorporation der in der kokosnussölreichen Diät enthaltenen MCFAs in das Hirngewebe der Tiere hin. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt von PC38:0 und der Palmitinsäure (16:0)- und Stearinsäure (18:0)-enthaltenden Lyso-PC-Spezies und Carnitine sowohl im Hirngewebe als auch im Serum der Tiere weitestgehend unverändert, was für eine spezifische Aufnahme der MCFAs aus dem kokosnussölreichen Futtermittel spricht (Abb. 46A+B). In Übereinstimmung mit der vermuteten Inkorporation von Laurinsäure (12:0) und Myristinsäure (14:0) in das Hirngewebe nach gesteigerter Aufnahme von Kokosnussöl ist in der Literatur eine Passage der Blut-Hirn-Schranke durch MCFAs beschrieben (Spector, 1988; Wlaz et al., 2012). Infolge der Supplementierung von Kokosnussöl wurde eine tendenzielle Reduktion des A β 40- sowie eine statistisch nicht signifikante Verringerung des A β 42-Gehalts im frontalen Kortex der APP^{swe}/PS1 Δ E9-

Mäuse verzeichnet, was das protektive Potenzial des Öls hinsichtlich der A β -Pathologie verdeutlicht. Diese Effekte sind aufgrund der geringen Probenanzahl statistisch jedoch ebenfalls nicht signifikant (Abb. 47).

Um die *in vivo*-Relevanz des Effekts von MCFAs auf die IDE-Sekretion zu überprüfen, wurde die Aktivität von IDE im Serum der APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäuse nach Supplementierung von Kokosnussöl bestimmt. Infolge der Kokosnussöl-Diät ist diese im Vergleich zu der Kontrolldiät signifikant gesteigert (Abb. 48), was dafür spricht, dass sich MCFAs sowohl in Neuroblastom-Zellen als auch im Blutkreislauf von Mäusen positiv auf die Sekretion von IDE auswirken. Ein vergleichbarer Effekt auf den IDE-Proteingehalt im Serum von Mäusen konnte in einem ähnlichen Versuchsansatz von Tamboli et al. auch für Statine nachgewiesen werden (Tamboli et al., 2010) (5.2.7.2). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Verringerung der A β -Konzentration in der Peripherie der „Peripheral sink“-Hypothese zufolge auch in einer Reduktion des zerebralen A β -Gehalts resultiert. Dieser Hypothese zufolge besteht aufgrund des Transports von A β über die Blut-Hirn-Schranke (2.2.3.1) ein Gleichgewicht zwischen dem A β -Gehalt im Hirngewebe und im Blutkreislauf. Daher führt die Reduktion der A β -Konzentration in der Peripherie zu einem verstärkten Efflux von A β -Peptiden aus dem Hirngewebe (DeMattos et al., 2001; Zhang und Lee, 2011). Die gesteigerte IDE-Enzymaktivität und die damit wahrscheinlich einhergehende Reduktion der A β -Konzentration im Blutkreislauf der mit Kokosnussöl gefütterten Mäuse würde demnach eine Erklärung für die tendenzielle Reduktion des A β 40- und die statistisch nicht signifikante Verringerung des A β 42-Gehalts im frontalen Kortex der Tiere (Abb. 47) darstellen. Es ist jedoch auch möglich, dass sich die Kokosnussöl-Diät analog zu den im Blutkreislauf festgestellten Effekten auch im Hirngewebe positiv auf die Freisetzung von IDE in den Extrazellulärraum auswirkt, was in einer gesteigerten Degradation extrazellulär akkumulierender A β -Peptide resultieren würde. Der tendenziell verringerten Konzentration von A β -Peptiden im Hirngewebe infolge der Supplementierung von Kokosnussöl können allerdings auch viele weitere Mechanismen zugrunde liegen. Zu diesen zählen u.a. die Reduktion der γ - sowie die Steigerung der α -Sekretase-Aktivität durch MCFAs (Grimm et al., 2013a; Holmes et al., 2012), wobei die *in vivo*-Relevanz der in diesen Studien festgestellten Effekte nicht bekannt ist. Die Aufnahme von MCFAs mit der Nahrung geht mit einem schnellen Anstieg der β -Hydroxybutyrat-Konzentration im Blutkreislauf einher (Puchowicz et al., 2007; Rebello et al., 2015; Reger et al., 2004), welches effizient die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Moore et al., 1976; Morris, 2005; Pan et al., 2000; Puchowicz et al., 2007). Demnach könnten die nach Verabreichung der kokosnussölreichen Diät verzeichneten Effekte auf die zerebrale A β -Konzentration bzw. die IDE-Aktivität im Serum neben direkten Einflüssen der MCFAs auch durch den Anstieg des Ketonkörper-Gehalts im Körper der Tiere vermittelt werden. Eine reduzierte A β -Pathologie sowie verbesserte kognitive Fähigkeiten bei AD-Mausmodellen infolge der sogenannten Ketondiät wurden in mehreren Studien beschrieben (Kashiwaya et al., 2013; Van der Auwera et al., 2005; Yin et al., 2016) (5.2.5). Da β -Hydroxybutyrat als HDAC agiert (Newman und Verdin, 2014a; Shimazu et al., 2013), ist außer seiner positiven Wirkung auf den zerebralen Energiemetabolismus auch eine Wirkung auf die Expression von AD-relevanten Genen denkbar. Der genaue Einfluss von Ketonkörpern auf die Generierung und den Katabolismus von A β -Peptiden wurde bislang allerdings nicht umfassend untersucht (Fernando et al., 2015).

In humanem *post mortem* AD-Hirngewebe liegt im Vergleich zu dem Hirngewebe von Kontrollpersonen eine Reduktion von MCFAs vor. Es wurde eine signifikante Reduktion von PCaa24:0 und PCaa28:1 festgestellt, während der Gehalt von PCaa26:0 und PCaa28:0 statistisch nicht signifikant verringert ist (Abb. 49). Diese PCaa-Spezies repräsentieren PC-Spezies, in denen Glycerin mit den häufig natürlich vorkommenden Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Ölsäure (18:1) in Kombination

mit MCFAs verestert ist. Auch im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells liegt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikante Reduktion von PCaa24:0, PCaa26:0 und PCaa28:1 vor (Abb. 50). Unter Anbetracht der bereits diskutierten positiven Effekte der MCFAs auf die A β -Degradation könnte die Verringerung des MCFA-Gehalts in von AD betroffenem Hirngewebe möglicherweise zu einer verringerten A β -Degradation und damit einhergehend zu einer Akkumulation von A β -Peptiden führen. Sowohl im Serum als auch in der Cerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten wurde in früheren Studien ein verringerter A β -Abbau festgestellt (Liu et al., 2012; Mawuenyega et al., 2010). Es ist daher denkbar, dass infolge einer verstärkten Zunahme von Kokosnussöl durch AD-Patienten eine Normalisierung des Gehalts von MCFAs und somit der IDE-abhängigen A β -Degradation erzielt werden kann.

5.2.7 STEIGERUNG DER IDE-ABHÄNGIGEN A β -DEGRADATION DURCH EPA, DHA UND MITTELKETTIGE FETTSÄUREN: MÖGLICHE GEMEINSAME MECHANISMEN

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine gesteigerte IDE-abhängige A β -Degradation in Anwesenheit von EPA, DHA und MCFAs (10:0, 12:0, 14:0) festgestellt, wobei diese Effekte in Relation zu den korrespondierenden gesättigten Fettsäuren bzw. zu Palmitinsäure (16:0) ermittelt wurden. Während sich EPA positiv auf die Genexpression von IDE auswirkt, erhöhen DHA und MCFAs die IDE-Sekretion in den Extrazellulärraum, was in einem gesteigerten Abbau extrazellulär vorliegender A β -Peptide resultiert. MCFAs erhöhen zusätzlich leicht die IDE-Genexpression (5.2.4, 5.2.6). Um die Effekte des Sättigungsgrads bzw. der Kettenlänge der Fettsäuren bestmöglich herausarbeiten zu können, wurden synthetische PC-Spezies verwendet, die identische Fettsäuren an der sn1- und sn2-Position tragen. Unter physiologischen Bedingungen hat PC meistens zwei verschiedene Fettsäuren gebunden und liegt zudem in an Lipoproteine gebundener Form vor.

In der Literatur sind für PUFAs und MCFAs sich teilweise überschneidende Wirkungen auf Transkriptionsfaktoren, die physikalischen Eigenschaften biologischer Membranen sowie den Cholesterinspiegel beschrieben worden. Es ist daher möglich, dass den Effekten dieser Fettsäuren auf IDE identische Mechanismen zugrunde liegen wie in Abb. 79 zusammenfassend dargestellt ist.

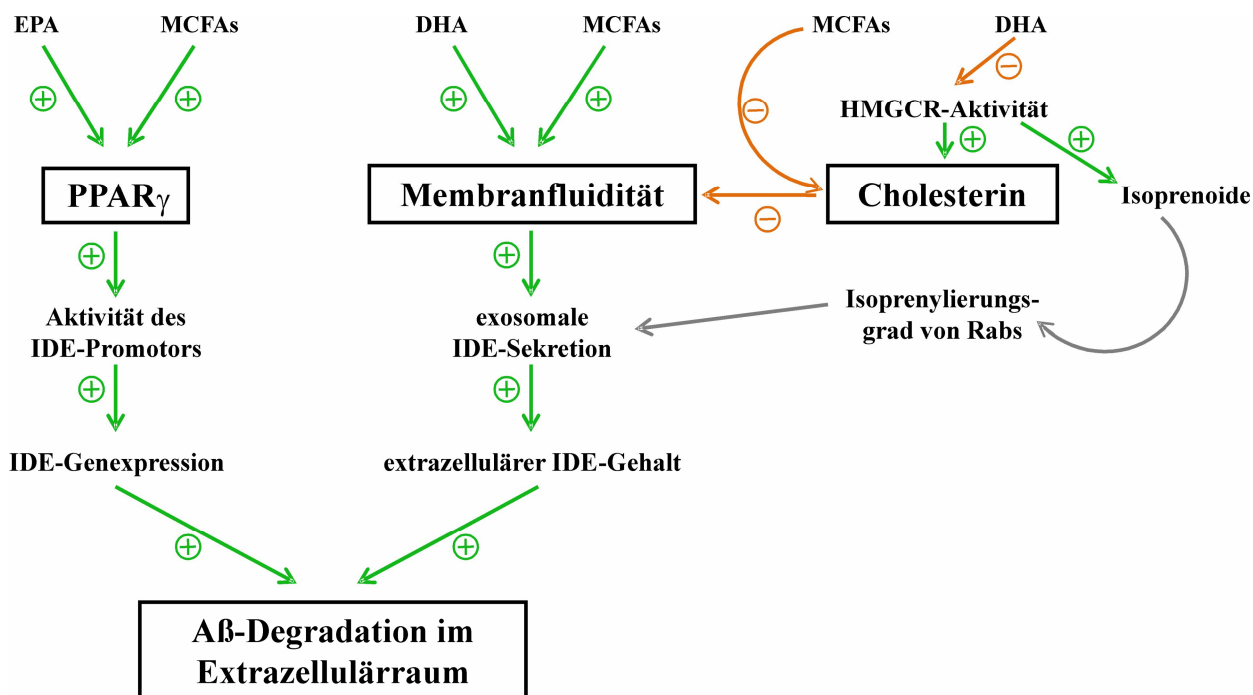


Abb. 79: Mögliche gemeinsame Mechanismen des Einflusses von EPA, DHA und MCFAs auf die IDE-abhängige Aβ-Degradation

EPA und MCFAs steigern möglicherweise die IDE-Genexpression durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR_γ. DHA und MCFAs erhöhen die Membranfluidität, wodurch zu einer gesteigerten exosomalen IDE-Sekretion und somit zu einem erhöhten Gehalt von extrazellulär lokalisiertem IDE kommen kann. Sowohl für DHA als auch für MCFAs ist eine Cholesterin-senkende Wirkung beschrieben, die sich wiederum positiv auf die Membranfluidität auswirkt. In ihrer Gesamtheit können diese Mechanismen zu einer gesteigerten Degradation von Aβ-Peptiden im Extrazellulärraum führen.

5.2.7.1 Einfluss der Fettsäuren auf PPAR-Transkriptionsfaktoren

Sowohl EPA als auch MCFAs stellen endogene Liganden von Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie dar. Für die MCFAs Capryl (8:0)- und Caprinsäure (10:0) wurde eine direkte Bindung an PPAR_γ nachgewiesen, die in einer Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors resultiert. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsaffinität von längeren gesättigten Fettsäuren (> 16 Kohlenstoffatome) an das Protein geringer ausgeprägt (Liberato et al., 2012; Malapaka et al., 2012), was die Abhängigkeit dieser Interaktion von der Fettsäure-Kettenlänge verdeutlicht. EPA interagiert direkt mit PPAR_α, PPAR_γ und PPAR_δ und stimuliert die Genexpression von PPAR_γ (Chambrier et al., 2002; Xu et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Bindung der Fettsäuren zu einer Konformationsänderung innerhalb der PPAR-Moleküle führt, die wiederum Auswirkungen auf deren Interaktion mit Ko-Aktivatoren hat (Deckelbaum et al., 2006). Interessanterweise wurde von Du et al. ein funktionelles PPAR *response element* (PPRE) in der Promotorregion von IDE identifiziert, welches in Primärneuronen durch die Bindung von PPAR_γ aktiviert wird (Du et al., 2009). In Übereinstimmung damit konnte eine gesteigerte Aβ-Degradation in verschiedenen Zelllinien nach Aktivierung von PPAR_γ festgestellt werden, die auf eine Beeinflussung von IDE zurückgeführt werden konnte (Espuny-Camacho et al., 2010). Demnach könnten sowohl die festgestellten Effekte von PC20:5 auf die Genexpression von IDE als auch die leichte negative Korrelation zwischen der IDE-Genexpression und der Fettsäure-Kettenlänge möglicherweise auf einer Fettsäure-abhängigen, PPAR_γ-vermittelten Aktivierung des IDE Promotors beruhen.

5.2.7.2 Einfluss der Fettsäuren auf die Membranfluidität und die Exosomen-Freisetzung

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft von MCFAs und PUFAs ist ihre Fähigkeit, die Membranfluidität zu steigern bzw. den Schmelzpunkt (engl. melting temperature, T_m) der Membran, an dem der Phasenzustand von starr zu flüssig-mobil übergeht, herabzusetzen. Allgemein führen langkettige, gesättigte Fettsäuren zu einem erhöhten T_m , während dieser durch kürzerkettige und ungesättigte Fettsäuren verringert wird. Diese Effekte sind auf eine Reduktion der Van-der-Waals-Bindungskräfte infolge verkürzter Fettsäuren bzw. der geknickten Struktur von PUFAs zurückzuführen (Ibarguren et al., 2014; Yang et al., 2014). Im Gegensatz zu MCFAs und PUFAs bewirkt Cholesterin eine Verdichtung und somit eine Verringerung der Fluidität biologischer Membranen (Cooper, 1978; Daly et al., 2011). Veränderungen der Membranfluidität haben einen starken Einfluss auf zelluläre Transportprozesse, was sich wiederum auf die Lokalisation bzw. Ko-Lokalisation von Proteinen auswirkt. So ist eine gesteigerte Membranfluidität beispielsweise mit einer erniedrigten Endozytose von APP assoziiert. Da die amyloidogene APP-Prozessierung in intrazellulären azidischen Kompartimenten stattfindet (Carey et al., 2005; Grbovic et al., 2003; Rajendran et al., 2006), geht die reduzierte Endozytose von APP mit einer gesteigerten nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung einher (Kojro et al., 2001; Yang et al., 2011) (2.2.2).

Wie bereits beschrieben, wird IDE zumindest partiell Exosomen-vermittelt in den Extrazellulärraum freigesetzt (Bulloy et al., 2010; Tamboli et al., 2010). Bei Exosomen handelt es sich um sezernierte vesikuläre Strukturen endosomal Ursprungs, die von einer Lipiddoppelschicht umschlossen sind und verschiedene Moleküle wie u.a. Proteine, Lipide sowie RNS enthalten. Im Vergleich zur Plasmamembran weisen sie einen gesteigerten Gehalt an Cholesterin, Sphingomyelin, Ceramid und einen reduzierten PC-Gehalt auf (Laulagnier et al., 2004; Trajkovic et al., 2008; Wubbolts et al., 2003). Die Biogenese von Exosomen beinhaltet zuerst die Inkorporation endozytierter Moleküle in intraluminale Vesikel (engl. intraluminal vesicles, ILVs) innerhalb der MVEs. Die MVEs werden anschließend entweder der lysosomalen Degradation zugeführt oder fusionieren mit der Plasmamembran, was zu der Freisetzung der ILVs in Form von Exosomen führt (Harding et al., 1984; Pan et al., 1985; Raposo und Stoorvogel, 2013). In mehreren Studien wurde eine Beeinflussung der Exosomen-Sekretion durch verschiedene Lipide wie u.a. Ceramid und Cholesterin demonstriert (Llorente et al., 2007; Phuyal et al., 2014; Record et al., 2014; Trajkovic et al., 2008). Die exakten Mechanismen der Exosomen-Bildung und -Freisetzung sind Gegenstand aktueller Forschung, weshalb derzeit auch wenig über die genauen Zusammenhänge zwischen der Exosomen-Sekretion und der Lipidhomöostase bekannt ist. Die Tatsache, dass sowohl die Steigerung des zellulären MCFA- und DHA-Gehalts (5.2.4, 5.2.6) als auch die Reduktion des zellulären Cholesterinspiegels (Llorente et al., 2007) in einer Stimulation der IDE- bzw. Exosomen-Sekretion resultiert, könnte darauf hindeuten, dass die exosomale Freisetzung von IDE in den Extrazellulärraum positiv mit der Membranfluidität korreliert. Hierfür spricht auch das Ergebnis, dass sich DHA, welches die Membranfluidität stärker steigert als EPA (Hashimoto et al., 1999; Hashimoto et al., 2006), positiv auf die Exosomen-vermittelte IDE Sekretion auswirkt, während EPA scheinbar keinen Effekt auf diesen Mechanismus hat (5.2.4).

In der bereits erwähnten Studie von Tamboli et al. wurde eine Steigerung der A β -Degradation infolge der erhöhten exosomal IDE-Sekretion in kultivierten Mikrogliazellen und im Blut von Mäusen nach Behandlung mit Statinen nachgewiesen. Verantwortlich für diese Effekte ist wahrscheinlich jedoch nicht die Reduktion des zellulären Cholesteringehalts, sondern die Inhibition der HMGCR-abhängigen Isoprenoid-Biosynthese. Den Autoren zufolge könnten sich Veränderungen im Isoprenylierungsgrad von Rab-Proteinen, die an der Biogenese von MVEs sowie der Freisetzung von Exosomen beteiligt sind (Bulloy et al., 2010; Fader und Colombo, 2006), auf die exosomale IDE-Sekretion auswirken (Tamboli et al., 2010). DHA bewirkt in Analogie zu Statinen eine Inhibition der HMGCR und somit der *de novo*-

Synthese von Cholesterin und Isoprenoiden (Goldstein et al., 2006; Grimm et al., 2011c). Unter Anbetracht dieser Studien ist es denkbar, dass der verzeichnete stimulierende Einfluss von DHA auf die exosomale IDE-Sekretion neben direkten Effekten der Fettsäure auch auf der Inhibition der HMGCR beruhen könnte. Auch für MCFAs bzw. Kokosnussöl wird eine Cholesterin-senkende Wirkung diskutiert (Cox et al., 1998; Fernando et al., 2015; Nevin und Rajamohan, 2004). Es ist allerdings nicht bekannt, ob sich MCFAs ebenfalls direkt auf die Aktivität der HMGCR auswirken.

Da Exosomen auch mit der Freisetzung von A β -Peptiden und Tau in den Extrazellulärraum sowie mit einer gesteigerten A β -Aggregation in Verbindung gebracht wurden (Dinkins et al., 2014; Rajendran et al., 2006; Saman et al., 2012), kann die Stimulation ihrer Sekretion nicht pauschal als positiv bewertet werden. Die Injektion von Exosomen aus kultivierten Neuronen und Neuroblastomzellen in das Gehirn von APP-transgenen Mäusen resultiert allerdings in einer Reduktion des zerebralen A β -Gehalts, was von den Autoren auf eine gesteigerte Phagozytose der Peptide durch Mikroglia zurückgeführt wurde (Yuyama et al., 2014; Yuyama et al., 2015). Die Funktionen dieser Vesikel bei neurodegenerativen und neuroprotektiven Prozessen sind derzeit nicht eindeutig bekannt und variieren wahrscheinlich auch in Abhängigkeit des jeweiligen parentalen Zelltyps (Joshi et al., 2015; Kalani et al., 2014).

5.2.8 THERAPEUTISCHES POTENZIAL VON EPA, DHA UND MITTELKETTIGEN FETTSÄUREN BEI DER ALZHEIMER KRANKHEIT

Wie auch im Fall von NEP, hat sich die gesteigerte Genexpression von IDE in einem AD-Mausmodell als protektiv im Hinblick auf die A β -Pathologie erwiesen. Wie von Leissring et al. publiziert, resultiert die Verdopplung der IDE-Genexpression in Mäusen in einer Reduktion des zerebralen A β -Gehalts, der Bildung von amyloiden Plaques sowie der Sterblichkeitsrate der Tiere (Leissring et al., 2003a). Dies verdeutlicht, dass eine gesteigerte IDE-Aktivität *in vivo* die Progression von AD verzögert und impliziert, dass IDE ein attraktiver molekularer Angriffspunkt für die Entwicklung von therapeutischen und/oder präventiven Maßnahmen hinsichtlich AD darstellen könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit verzeichneten positiven Effekte von EPA, DHA und MCFAs auf die IDE-abhängige A β -Degradation im Extrazellulärraum deuten darauf hin, dass die gesteigerte Zufuhr dieser Fettsäuren möglicherweise zur Verringerung des AD-Risikos bzw. der Progression der Erkrankung führen kann. Die Supplementierung dieser Fettsäuren, die u.a. in Form von Fisch- bzw. Kokosnussöl oder entsprechender Triglyceride erfolgen kann, hat, wie im Folgenden beschrieben, auch vielfältige weitere Einflüsse auf die molekularen Mechanismen von AD.

5.2.8.1 Therapeutisches Potenzial von EPA und DHA bei der Alzheimer Krankheit

Neben ihrer positiven Wirkung auf die A β -Degradation (5.2.4) weisen EPA und DHA weitere neuroprotektive Eigenschaften auf. Wie bereits erwähnt, verringert DHA die Aggregation und Neurotoxizität von A β -Peptiden (Hashimoto et al., 2008; Hashimoto et al., 2011; Hossain et al., 2009) sowie deren Produktion über einen pleiotropen Wirkmechanismus (Grimm et al., 2011c; Grimm et al., 2013a; Holmes et al., 2012; Yang et al., 2011) (5.2.3). DHA steigert die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung über eine Erhöhung der ADAM17-Proteinstabilität und einen direkten Effekt auf die Enzymaktivität der α -Sekretase (Grimm et al., 2011c; Grimm et al., 2013a). DHA weist des Weiteren eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase auf. Zusätzlich wird die Cholesterin *de novo*-Synthese durch die Inhibition der HMGCR in Anwesenheit von DHA reduziert, was ebenfalls die Enzymaktivität der β - und γ -Sekretase erniedrigt (Grimm et al., 2008). Nach der Behandlung von Zellen mit DHA kommt es auch zu einer Verschiebung von Cholesterin und PS1 von den *Lipid raft*-

zu den *Non-Raft*-Domänen sowie zu einer Reduktion der BACE1-Internalisierung. Da die amyloidogene APP-Prozessierung primär in den *Lipid rafts* (Ehehalt et al., 2003; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004) bzw. die β -Sekretase-abhängige APP-Prozessierung in azidischen intrazellulären Kompartimenten wie den Endosomen (Carey et al., 2005; Rajendran et al., 2006) stattfindet, hat beides eine verringerte amyloidogene APP-Prozessierung zur Folge. Insgesamt führt ein gesteigerter zellulärer DHA-Gehalt folglich zu einer gesteigerten nicht-amyloidogenen und einer verringerten amyloidogenen APP-Prozessierung, was in einer Reduktion der A β -Produktion resultiert (Grimm et al., 2011c). Das Zusammenspiel dieser Effekte bewirkt eine Verringerung der zerebralen A β -Pathologie in unterschiedlichen AD-Tiermodellen infolge einer DHA-Supplementierung (Green et al., 2007; Hashimoto et al., 2008; Hooijmans et al., 2009; Lim et al., 2005; Perez et al., 2010).

DHA reduziert mit der Akkumulation von Tau auch das zweite histopathologische Merkmal von AD. Die Supplementierung von DHA bzw. eine fischölsreiche Diät führt zu einer Inhibition der c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-abhängigen Tau-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen sowie im Hirngewebe eines AD-Mausmodells (Green et al., 2007; Ma et al., 2009). EPA und DHA werden außerdem mit anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht (Calder, 2006; Dyall und Michael-Titus, 2008; Zhang et al., 2011). Auch Metabolite von ω 3-Fettsäuren wie die zu den Docosanoiden zählenden Neuroprotektine und Resolvine wirken anti-inflammatorisch und neuroprotektiv (Lukiw et al., 2005; Schwab et al., 2007; Serhan, 2006). Diese Wirkungen von PUFAs und ihren Metaboliten sind im Bezug auf AD von besonderer Bedeutung, da bei der AD-Pathogenese neben der A β - und Tau-Pathologie auch oxidativer Stress und inflammatorische Prozesse zu beobachten sind. Infolge des A β -induzierten oxidativen Stresses kommt es zur gesteigerten Bildung von ROS (Butterfield, 2003; Davis, 1996; Parks et al., 2001; Yatin et al., 1998). Der erhöhte ROS-Gehalt wiederum resultiert u.a. in der Oxidation von Proteinen und Peroxidation von Lipiden (Mohsenzadegan und Mirshafiey, 2012), wobei PUFAs besonders oxidationsanfällig sind (Catala, 2009; Fam et al., 2002; Gao et al., 2006). Die gesteigerte Oxidation von PUFAs unter den pathologischen Bedingungen von AD könnte die Reduktion des Gehalts von ω 3-Fettsäuren (Soderberg et al., 1991; Whiley et al., 2014) und die Erhöhung der Konzentration von PUFA-Oxidationsprodukten im Hirngewebe von AD-Patienten verursachen (Grimm et al., 2016a; Markesbery et al., 2005; Montine und Morrow, 2005; Nourooz-Zadeh et al., 1999) (5.2.3). Eine weitere Konsequenz der Akkumulation oligomerer A β -Peptide bzw. des gesteigerten oxidativen Stresses ist die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, die zu der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies führt (Agostinho et al., 2010; DaRocha-Souto et al., 2011; White et al., 2005). Die Tatsache, dass diese Prozesse eine synaptische Dysfunktion sowie den Verlust von Neuronen, Synapsen und kognitiven Fähigkeiten zur Folge haben können, verdeutlicht das Potenzial anti-oxidativer und anti-inflammatorischer Substanzen wie ω 3-Fettsäuren, die zur Neurodegeneration führenden Kaskaden aufzuhalten bzw. verlangsamen zu können (Agostinho et al., 2010; DaRocha-Souto et al., 2011). Für die Aufrechterhaltung von Gedächtnisfunktionen und kognitiven Fähigkeiten durch EPA und DHA spricht die Feststellung, dass die Supplementierung dieser ω 3-PUFAs die Synapto- und Neurogenese, die synaptische Plastizität, die Langzeit-Potenzierung und die Freisetzung von Neurotransmittern fördert (Cao et al., 2009; Connor et al., 2012; Crupi et al., 2013; Gomez-Pinilla und Tyagi, 2013; Mathieu et al., 2010; Su, 2010). Viele dieser Effekte werden in der Literatur auf die gesteigerte Produktion des Neutrophins BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor) infolge eines erhöhten Gehalts von ω 3-Fettsäuren zurückgeführt, welcher sich positiv auf die Differenzierung und das Überleben von Neuronen auswirkt und einen starken Einfluss auf die Gedächtnisbildung hat (Avraham et al., 2011; Bekinschtein et al., 2008; Blondeau et al., 2009; Venna et al., 2009; Yamada und Nabeshima, 2003). Des Weiteren sind ω 3-Fettsäuren mit einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, die wiederum zu den Haupt-Risikofaktoren für die Entwicklung von

AD zählen (de Bruijn und Ikram, 2014; Newman et al., 2005), assoziiert (Balk et al., 2004; Defilippis et al., 2010; Wang et al., 2004).

Anhand der im vorherigen Absatz beschriebenen vielfältigen Wirkungen von EPA und DHA im zentralen Nervensystem wird deutlich, dass diese Fettsäuren in der Lage sind, in verschiedene Schritte der Kaskaden einzugreifen, die zur Entwicklung von AD führen bzw. beitragen können. Aufgrund ihres pleiotropen Wirkmechanismus könnten ω 3-Fettsäuren wie EPA und DHA daher möglicherweise erfolgreich in der Prävention und Therapie von AD eingesetzt werden.

In Übereinstimmung mit dieser These belegen die Ergebnisse mehrerer epidemiologischer Studien eine negative Korrelation zwischen der Aufnahme von ω 3-Fettsäuren und dem Risiko für AD bzw. der Abnahme kognitiver Fähigkeiten (Barberger-Gateau et al., 2002; Kalmijn et al., 1997; Kalmijn et al., 2004; Morris et al., 2003; van Gelder et al., 2007). Die protektiven Effekte der ω 3-Fettsäuren weisen möglicherweise eine Abhängigkeit von dem ApoE ϵ -Genotyp der behandelten Personen auf (Barberger-Gateau et al., 2007; Huang et al., 2005). In anderen Publikationen wurde hingegen kein Zusammenhang zwischen der Aufnahme dieser Fettsäuren und dem Risiko, an Demenz zu erkranken, festgestellt (Engelhart et al., 2002; Kroger et al., 2009).

Die Ergebnislage klinischer Studien hinsichtlich eines Potenzials von EPA und DHA bei der AD-Therapie ist ebenfalls nicht eindeutig. Während von einigen Autoren kein Einfluss der PUFA-Supplementierung auf die Progression der Erkrankung verzeichnet wurde (Boston et al., 2004; Freund-Levi et al., 2009; Quinn et al., 2010), konnte in anderen Studien eine leichte Reduktion von AD-Markern sowie eine verbesserte Kognition infolge der verstärkten Aufnahme von EPA und/oder DHA bei AD-Patienten erzielt werden. Dieser positive Effekt ist allerdings auf Patienten mit sehr frühen Stadien der Erkrankung beschränkt (Chiu et al., 2008; Freund-Levi et al., 2006; Freund Levi et al., 2014; Kotani et al., 2006). Insgesamt deutet die aktuelle Datenlage daher darauf hin, dass EPA und DHA eher präventive als therapeutische Wirkungen hinsichtlich AD besitzen. Die gesteigerte Zufuhr dieser Fettsäuren in reiner Form oder in Form von Fischöl stellt demnach ein erfolgsversprechender Ansatz zur Prävention der Erkrankung dar. Hierbei muss jedoch die bereits erwähnte extreme Oxidationsanfälligkeit der Fettsäuren bedacht werden (Catala, 2009; Fam et al., 2002; Gao et al., 2006). Bei der Supplementierung von EPA und DHA kann es zur Entstehung ungewünschter Moleküle wie z.B. oxidierten Derivaten der Fettsäuren oder HHE, dem Endprodukt der Lipidperoxidation von ω 3-Fettsäuren (Van Kuijk et al., 1990) kommen. HHE und weitere oxidierte DHA-Derivate wurden wie auch HNE, welches bei der Peroxidation von ω 6-Fettsäuren entsteht (Pryor und Porter, 1990), mit einer gesteigerten amyloidogenen APP-Prozessierung in Verbindung gebracht (Grimm et al., 2016a; Tamagno et al., 2002). Des Weiteren ist die katalytische Aktivität von NEP infolge der Bildung von HNE-Addukten reduziert (Wang et al., 2009). Die Tatsache, dass die inhibierenden Effekte von DHA auf die Sekretion von A β -Peptiden bereits durch einen geringen Anteil oxidiertes DHA-Derivate (1%) revertiert werden, erklärt möglicherweise die inhomogene Ergebnislage klinischer Studien und verdeutlicht die Notwendigkeit der Stabilisierung von ω 3-Fettsäuren bei deren Supplementierung (Grimm et al., 2016a). Dies kann beispielsweise durch die Zugabe natürlicher Antioxidanzien wie Tocopherolen und Curcumin erfolgen (Kamal-Eldin und Yanishlieva, 2002; Maqsood et al., 2012).

5.2.8.2 Therapeutisches Potenzial mittelkettiger Fettsäuren bei der Alzheimer Krankheit

Außer der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Stimulation der IDE-abhängigen A β -Degradation (5.2.6) wurden für MCFAs und Kokosnussöl in der Literatur weitere gesundheitsfördernde Effekte beschrieben. Kokosnussöl weist, wie auch PUFAs (5.2.8.1), ein anti-oxidatives und anti-

inflammatorisches Potenzial auf (Kamisah et al., 2015; Marina et al., 2009; Yeap et al., 2015; Zakaria et al., 2011), welches wie bereits erläutert im Zusammenhang mit der Pathogenese von AD von besonderer Bedeutung sein kann (5.2.8.1). Vieles deutet außerdem darauf hin, dass die verstärkte Aufnahme von Kokosnussöl zur Vermeidung von Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, Typ II Diabetes mellitus und AD wie z.B. Fettleibigkeit, Dyslipidämie und Hypertonie beitragen kann (Airhart et al., 2016; DebMandal und Mandal, 2011; Fernando et al., 2015). Es ist allerdings unklar, ob diese Effekte sowie die anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Kokosnussöl auf dessen besondere Fettsäurekomposition mit einem hohen Gehalt an MCFAs oder auf andere typische Inhaltsstoffe wie beispielsweise Polyphenole, Squalene, Tocopherole und Phytosterinen zurückzuführen sind (Lei et al., 2016; Marina et al., 2009; Vysakh et al., 2014).

Wie bereits beschrieben, werden mit der Nahrung aufgenommene MCFAs schnell zu Ketonkörpern metabolisiert, die den bei AD vorliegenden zerebralen Hypometabolismus ausgleichen können (de Leon et al., 1983; Friedland et al., 1989; Hoyer, 1992; Lei et al., 2016; Newman und Verdin, 2014b) und in verschiedenen Tiermodellen mit einer reduzierten β - und Taupathologie assoziiert sind (Kashiwaya et al., 2013; Studzinski et al., 2008; Van der Auwera et al., 2005). Aufgrund eines direkten Effekts auf die Aktivität der α - und γ -Sekretase ist außerdem von einer verringerten $A\beta$ -Produktion in Anwesenheit von MCFAs auszugehen (Grimm et al., 2013a; Holmes et al., 2012). Zusätzlich dazu ist die $A\beta$ -induzierte Toxizität bei Neuronen infolge der Supplementierung von Kokosnussöl und β -Hydroxybutyrat reduziert (Kashiwaya et al., 2000; Nafar und Mearow, 2014) (5.2.5). In ihrer Gesamtheit deuten diese Effekte darauf hin, dass die gesteigerte Aufnahme von MCFAs in reiner Form oder in Form von Kokosnussöl ein protektives Potenzial hinsichtlich AD besitzen könnte.

Da bei einzelnen AD-Patienten verbesserte kognitive Fähigkeiten nach der Supplementierung von Kokosnussöl beobachtet werden konnten, wird die sogenannte Kokosnussöl- bzw. Ketondiät seit einiger Zeit verstärkt in den Medien, aber auch in der Fachliteratur, als mögliche therapeutische Maßnahme zur Behandlung von AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert (DeDea, 2012; Fernando et al., 2015; Hertz et al., 2015; Johnson, 2012; Newport, 2008; Sharma et al., 2014; Villariba, 2011).

Die tägliche Aufnahme von 40ml Kokosnussöl über einen Zeitraum von drei Wochen führte in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Yang et al. mit 44 AD-Patienten zu verbesserten kognitiven Leistungen, wobei die positiven Effekte bei Frauen ohne Diabetes mellitus Typ II am stärksten ausgeprägt waren (Hu Yang et al., 2015). Positive Effekte auf die Kognition hatte auch die Zufuhr von 56g MCTs pro Tag über einen Zeitraum von 24 Wochen bei zwei Patienten mit MCI wie von Rebello et al. veröffentlicht wurde (Rebello et al., 2015). Letzteres deutet darauf hin, dass die protektiven Effekte des Kokosnussöls nicht nur auf die Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, sondern auch direkt auf die MCFAs bzw. die daraus entstehenden Metabolite zurückgeführt werden können. Damit übereinstimmend wurde in weiteren Publikationen von verbesserten Resultaten bei Gedächtnis- und Kognitionstests infolge einer Steigerung des Ketonkörper-Gehalts sowie von einer positiven Korrelation zwischen dem Ketonkörper-Spiegel und der Gedächtnisleistung bei Patienten mit MCI bzw. AD berichtet (Henderson et al., 2009; Krikorian et al., 2012; Newport et al., 2015).

Aufgrund der Annahme, dass alternative Energiequellen den neuronalen Metabolismus steigern und somit neuroprotektiv sein können, wurde das Präparat Axona® von der Firma Accera als medizinische Ernährung zur Behandlung von AD entwickelt. Es besteht aus MCTs, die überwiegend Caprylsäure (8:0), aber auch andere MCFAs beinhalten und ist insgesamt gut verträglich. Als häufigste Nebenwirkungen des Präparats wurden leichte gastrointestinale Probleme beschrieben (Henderson et al., 2009). Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Axona® wurde festgestellt, dass die Verabreichung von MCTs bereits nach 90min in einer gesteigerten Kognition von AD-Patienten resultiert, wobei sich dieser Effekt auf ApoE ϵ 4-negative Personen beschränkt. Außerdem konnte eine Assoziation zwischen den kognitiven

Fähigkeiten und dem β -Hydroxybutyratspiegel im Blut nachgewiesen werden (Reger et al., 2004). Die Wirksamkeit von Axona® wurde im Jahr 2009 in einer größeren Studie mit 152 AD-Patienten überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die tägliche Verabreichung von 20g MCTs nach drei Monaten zu einer verbesserten Kognition führt, wobei ApoE ϵ 4-negative Personen stärker auf die Therapie ansprechen als ApoE ϵ 4-Träger (Henderson et al., 2009). In einer weiteren Studie mit 22 Probanden wurde der Effekt von Axona® auf die kognitiven Leistungen von japanischen Patienten mit mittelschwerer AD analysiert. Im Gegensatz zu den Publikationen von Henderson et al. und Reger et al. konnte hierbei keine signifikante Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nach Einnahme von Axona® festgestellt werden, auch nicht bei Betrachtung von ausschließlich ApoE ϵ 4-negativen Personen. Bei einigen ApoE ϵ 4-negativen Patienten mit vergleichsweise schwach fortgeschrittener AD war die Einnahme des Präparats allerdings mit leichten Verbesserungen der Kognition assoziiert (Ohnuma et al., 2016). Interessanterweise wurde von Henderson et al. auch ein Zusammenhang zwischen der Wirkung der MCTs und IDE hergestellt: ApoE ϵ 4-negative Personen, die *gain of function*-SNPs in dem für IDE kodierenden Gen aufweisen, profitierten am meisten von der MCT-Zufuhr. Den Autoren zufolge könnte diesem Effekt eine mit den entsprechenden SNPs einhergehende Verringerung des Insulinspiegels, welche sich positiv auf den Ketonkörper-Metabolismus auswirkt, zugrundeliegen (Henderson und Poirier, 2011). Unter Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es jedoch auch denkbar, dass sich die gesteigerte IDE-Sekretion in den Extrazellulärraum in Anwesenheit von MCFAs bei Vorliegen einer allgemein höheren IDE-Enzymaktivität verstärkt auf die Degradation extrazellulär vorliegender A β -Peptide auswirkt. Dies könnte möglicherweise zu einem geringeren Verlust der kognitiven Fähigkeiten führen und ebenfalls eine Erklärung für die stärkere Wirkung der MCTs bei Personen mit den entsprechenden SNPs in dem für IDE kodierenden Gen darstellen.

Zusammenfassend deutet die derzeitige Datenlage darauf hin, dass die gesteigerte Zufuhr von MCFAs zumindest bei AD-Patienten mit bestimmten genetischen Voraussetzungen zu einer verlangsamt Progression von AD führen kann. Zu einer abschließenden Beurteilung des therapeutischen Potenzials dieser Fettsäuren hinsichtlich AD sind allerdings weitere klinische Studien mit einer höheren Anzahl an Probanden und der Untersuchung weiterer klinischer Parameter sowie ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von MCFAs auf die A β - und Taupathologie erforderlich.

5.2.8.3 Fazit

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die PUFAs EPA und DHA als auch MCFAs ein therapeutisches Potenzial hinsichtlich AD besitzen, welches insbesondere für PUFAs am stärksten in den sehr frühen Stadien der Erkrankung ausgeprägt ist. Um dieses bestmöglich nutzen zu können, ist daher die frühe Diagnose der Erkrankung von besonderer Relevanz. Die Identifizierung spezifischer Biomarker, die bereits vor dem Auftreten erster Symptome Veränderungen aufweisen, ist Gegenstand aktueller Forschung (Dubois et al., 2016). Die gesteigerte Aufnahme von EPA und DHA korreliert zudem negativ mit dem Risiko, an AD zu erkranken, weshalb die Langzeit-Supplementierung dieser Fettsäuren auch zu präventiven Zwecken genutzt werden kann. Interessanterweise wurde in einigen Studien sowohl für die Wirkung von PUFAs als auch von MCFAs eine Abhängigkeit von dem ApoE ϵ -Genotyp berichtet. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht bekannt, als mögliche Ursachen werden in der Literatur u.a. ein Einfluss des ApoE ϵ -Genotyps auf den oxidativen Stress sowie ApoE ϵ -abhängige Lipid- und Fettsäuretransportprozesse diskutiert (Barberger-Gateau et al., 2011; Cole et al., 2010; Hanson et al., 2015). Zur Entwicklung gezielterer therapeutischer Interventionen ist daher ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen von PUFAs und MCFAs auf die molekularen Mechanismen von AD essentiell.

5.3 EINFLUSS DER BEI DER ALZHEIMER-KRANKHEIT VERÄNDERTEN ZEREBRALEN LIPIDKOMPOSITION AUF DIE A β -DEGRADATION

Wie bereits erwähnt, liegen bei AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen weitreichende Veränderungen der zerebralen Lipid- und Fettsäurekomposition vor (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Mett et al., 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte beispielsweise eine Reduktion des MCFA-Gehalts in humanem *post mortem* AD-Hirngewebe und im Hirngewebe des 5xFAD-Mausmodells gezeigt werden (Abb. 49, Abb. 50). Es ist allerdings unbekannt, ob die veränderte zerebrale Lipidzusammensetzung als Ursache für die Entwicklung von AD oder eher als Konsequenz der AD-Pathogenese und der damit einhergehenden Neurodegeneration anzusehen ist. Da die enzymatische A β -Degradation durch die Lipidumgebung beeinflusst wird (5.2) und bei LOAD-Patienten eine reduzierte A β -Beseitigung in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Serum vorliegt (Liu et al., 2012; Mawuenyega et al., 2010), wurde in einem weiteren Projekt untersucht, ob die veränderte Lipidkomposition in AD-Hirngewebe eine Reduktion des A β -Abbaus induzieren kann. Hierzu wurde die A β 40-Gesamtdegradation in N2a-Zellen unter Einfluss zerebraler Lipidextrakte aus dem Hirngewebe von AD-Patienten und Kontrollpersonen bzw. dem 5xFAD-Mausmodell und Wildtyp-Mäusen betrachtet.

Zunächst wurde die Viabilität der N2a-Zellen nach Inkubation mit den aus dem Gewebe isolierten Lipiden analysiert. Während die zerebralen Lipidextrakte des AD-Mausmodells keinen Einfluss auf die Viabilität der N2a-Zellen haben, ist diese nach Inkubation mit den Lipidextrakten aus humanem *post mortem* AD-Hirngewebe leicht, aber signifikant um 1,8% reduziert (Abb. 51). Dieses Ergebnis impliziert, dass die aus humanen AD-Hirnen isolierten Lipide ein höheres neurotoxisches Potenzial haben als die Lipidextrakte aus humanem Kontrollgewebe und daher möglicherweise neurodegenerative Prozesse einleiten können. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Im *post mortem*-Hirngewebe von AD-Patienten wurde beispielsweise ein gesteigerter Gehalt an Ceramiden (Filippov et al., 2012; Han et al., 2002; He et al., 2010b; Sato et al., 2005) und Lipidperoxidationsprodukten wie HNE nachgewiesen (Grimm et al., 2016a; Sayre et al., 1997; Williams et al., 2006). Da für Ceramide und HNE mehrfach proapoptische und neurotoxische Wirkungen demonstriert wurden (Jazvinscak Jembrek et al., 2015; Montine et al., 1996; Yadav und Tiwari, 2014), könnte die gesteigerte Zytotoxizität der Lipidextrakte aus humanem *post mortem* AD-Hirngewebe u.a. durch die gesteigerte Konzentration dieser Lipidspezies verursacht werden. Die Tatsache, dass die zerebralen Lipidextrakte aus den 5xFAD-Mäusen hingegen keine Auswirkung auf die Viabilität der N2a-Zellen haben, ist möglicherweise auf die Unterschiede in den Ursachen und der Dauer der AD-Pathogenese in den beiden Modellen zurückzuführen. Während sich AD beim Menschen infolge einer Kombination mehrerer Faktoren über einen sehr langen Zeitraum entwickelt, erfolgt die Progression der Erkrankung bei dem Mausmodell innerhalb weniger Wochen und ist ausschließlich genetisch bedingt. Dies kann natürlich mit unterschiedlichen Veränderungen der Lipidzusammensetzung im Hirngewebe einhergehen.

Interessanterweise hat die Inkubation der N2a-Zellen mit den Lipidextrakten aus allen drei verwendeten humanen *post mortem* AD-Hirnen im Vergleich zu den Lipidextrakten aus Kontrollhirnen eine signifikante Inhibition der A β -Degradation zur Folge (Abb. 52A). Eine analoge Wirkung hat auch das aus dem Hirngewebe der 5xFAD-Mäuse isolierte Lipidgemisch, wobei der Effekt des Lipidextrakts aus einem der drei 5xFAD-Tiere statistisch nicht signifikant ist ($p = 0,068$) (Abb. 53). Im Durchschnitt sind die Effektstärken der zerebralen Lipidextrakte aus dem AD-Mausmodell auf die Gesamt-A β -Degradation in N2a-Zellen geringer ($p \leq 0,001$) ausgeprägt als die der aus den humanen AD-Hirnen isolierten Lipide. Wie bereits erläutert, kann dies auf den verschiedenen Ursachen und der unterschiedlich langen Dauer der humanen und murinen AD-Pathogenese beruhen. Insgesamt belegen diese Daten jedoch, dass die verringerte A β -Degradation bei AD eine Konsequenz der veränderten Lipidhomöostase sein kann. Somit

besteht eventuell ein kausaler Zusammenhang zwischen den Lipidveränderungen im Hirngewebe von AD-Patienten und der Pathogenese der Erkrankung. Des Weiteren ist es denkbar, dass die unter den pathologischen Bedingungen von AD entstehende Veränderung der Lipidkomposition nicht eine der Ursachen der Erkrankung darstellt, sondern diese durch die Verringerung des enzymatischen A β -Abbaus nur weiter verstärkt. In N2a IDE-Knockdown-Zellen ist der A β -Abbau in Anwesenheit der Lipidextrakte aus AD- bzw. 5xFAD-Hirngewebe auch tendenziell bzw. signifikant verringert (Abb. 54A+B), die Effektstärken sind allerdings signifikant geringer ausgeprägt als bei Verwendung der entsprechenden Kontrollzellen (Effektstärke humane AD-Lipidextrakte auf Gesamt-A β -Degradation in N2a WT (mock)/ in N2a IDE-KD: $p \leq 0,001$; Effektstärke 5xFAD-Lipidextrakte auf Gesamt-A β -Degradation in N2a WT (mock)/ in N2a IDE-KD: $p \leq 0,001$). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der A β -Degradation durch die Veränderungen der zerebralen Lipidkomposition bei AD vor allem auf einer Inhibition von IDE, aber möglicherweise auch weiterer A β -degradierender Mechanismen basieren. Für eine Verringerung der IDE-Sekretion spricht das reduzierte Verhältnis zwischen extra- und intrazellulär lokalisiertem IDE nach Inkubation der N2a-Zellen mit den aus AD- bzw. 5xFAD-Hirngewebe extrahierten Lipiden (Abb. 55). In Übereinstimmung damit wurde in der bereits erwähnten Studie von Liu et al. festgestellt, dass die enzymatische Umsetzung eines Substrats, welches unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen primär durch IDE und ACE gespalten wird, im Serum von AD-Patienten geringer ist als im Serum von Kontrollpersonen. Der in dieser Studie gemessene Umsatz des Substrats ist mit dem IDE-Proteingehalt im Serum assoziiert (Liu et al., 2012), was eventuell auf eine verringerte IDE-Sekretion im Blutkreislauf der AD-Patienten hindeuten kann. Dies könnte für eine *in vivo*-Relevanz der festgestellten Beeinflussung der IDE-Sekretion bzw. A β -Degradation durch die bei AD vorliegenden Veränderungen der Lipidhomöostase sprechen. Die Veränderungen des Lipidstoffwechsels im Hirngewebe von AD-Patienten sind vielfältig. Es wurden u.a. veränderte Konzentrationen von Cholesterin, Phospholipiden (u.a. Phosphatidylethanolamin, PC, Plasmalogene), Sphingolipiden (Ceramid, Sphingomyelin, Sulfatide) sowie verschiedener Fettsäuren beschrieben (Grimm et al., 2011a; Grimm et al., 2012b; Kosicek und Hecimovic, 2013; Lim et al., 2014; Liu und Zhang, 2014; Mett et al., 2016; Touboul und Gaudin, 2014; van Echten-Deckert und Walter, 2012). Da die Wirkungen von Lipiden und Fettsäuren auf A β -degradierende Mechanismen nahezu unbekannt sind, lassen sich die festgestellten Effekte der Lipidextrakte aus AD-Hirngewebe auf die A β 40-Degradation in N2a-Zellen derzeit nicht auf bestimmte Lipidklassen, Fettsäuren oder Lipidmetabolite zurückführen.

5.4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte die in der Literatur kontrovers diskutierte Regulation von NEP durch die bei der amyloidogenen APP-Prozessierung entstehende AICD-Domäne nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde das umstrittene Modell von Belyaev et al. (Belyaev et al., 2010) (Abb. 76), in dem ausschließlich das bei der amyloidogenen APP-Prozessierung generierte AICD transkriptionell aktiv ist, experimentell bestätigt und erweitert (Abb. 80). Die transkriptionelle Inaktivität des bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung an der Plasmamembran entstehenden AICDs konnte auf seine schnelle zytosolische Degradation durch IDE zurückgeführt werden (Abb. 22, Abb. 23). Zur weiteren Belegung dieser Daten könnte überprüft werden, ob die im Nukleus vorliegenden AICD-Peptide tatsächlich überwiegend von β -CTF abstammen. Hierzu könnte man C-terminal mit einer Epitopsequenz markiertes α - bzw. β -CTF überexprimieren und die Signalstärke der Epitopsequenz im Zellkern der beiden Zelllinien vergleichen. Dies wäre beispielsweise durch Immunfluoreszenz oder Immunpräzipitation aus nukleären Extrakten möglich. Auch der genaue Mechanismus der Regulation von Zielgenen durch AICD wird in der Literatur diskutiert (5.1.1). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fe65 eine wichtige Rolle bei der AICD-abhängigen transkriptionellen Regulation von NEP zukommt (Abb. 24). Unter Verwendung von Zelllinien, die defizient für weitere AICD-Adapterproteine sind, könnte der Mechanismus der AICD-vermittelten Regulation der NEP-Genexpression genauer beleuchtet werden. Als Ursache für die stärkere zytosolische Degradation der bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung generierten AICD-Peptide durch IDE ist neben der größeren Distanz zum Zellkern auch eine schwächere Bindung an stabilisierende Adapterproteine wie Fe65 (Kimberly et al., 2001; Kinoshita et al., 2002) denkbar. Um dies zu untersuchen, könnte eine Immunpräzipitation von Fe65 aus Zellen, die C-terminal markiertes α - bzw. β -CTF überexprimieren, durchgeführt werden. Durch die quantitative Bestimmung der ko-immunpräzipitierten markierten AICD-Peptide wäre ein Vergleich der Bindungsaffinität zwischen dem von α -CTF abstammenden und dem von β -CTF abstammenden AICDs zu Fe65 möglich.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine bislang weitestgehend unbekannte Regulation von IDE durch den Sättigungsgrad und die Kettenlänge von Fettsäuren nachgewiesen. Hierbei wirken sich sowohl MCFAs als auch die PUFAs EPA und DHA über unterschiedliche Mechanismen positiv auf die IDE-abhängige A β -Degradation aus (Abb. 79, Abb. 80). EPA steigert die Genexpression von IDE durch die Aktivierung des IDE-Promotors, nach Inkubation von N2a-Zellen mit MCFAs ist die Genexpression von IDE ebenfalls leicht gesteigert. Die mögliche Beteiligung von PPAR γ (5.2.7.1) an diesen Effekten könnte durch die Inkubation von PPAR γ -defizienten Zellen mit den entsprechenden PC-Spezies überprüft werden. Im Fall einer PPAR γ -vermittelten Steigerung der IDE-Promotoraktivität sollte in diesen Zellen kein Effekt von PC20:5 auf die Aktivität des IDE-Promotors bzw. die IDE-Genexpression festzustellen sein. DHA und MCFAs erhöhen die A β -Degradation in N2a-Zellen hingegen über eine gesteigerte Sekretion von IDE in den Extrazellulärraum (Abb. 79, Abb. 80). In Anwesenheit des nSMase-Inhibitors GW4869, der die Sekretion von Exosomen inhibiert, ist der Effekt von DHA auf die Gesamt-A β -Degradation signifikant reduziert (Abb. 35), was auf eine Steigerung der exosomalen IDE-Sekretion durch DHA hindeutet. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass GW4869 als nSMase-Inhibitor auch Exosomen-unabhängige Effekte auf die A β -Degradation aufweist. Zur Verifizierung des vorliegenden Ergebnisses wäre es daher sinnvoll, nach Inkubation von N2a-Zellen mit DHA eine Exosomenpräparation aus dem Zellkulturmedium und anschließend eine quantitative Bestimmung des in den Exosomen enthaltenen IDEs durchzuführen. Des Weiteren haben EPA und DHA eine steigernde Wirkung auf die Enzymaktivität von rekombinantem IDE, die möglicherweise auf einer direkten Bindung von PC20:5 bzw. PC22:6 an das Enzym basiert (Abb. 36, Abb. 37). In der Literatur wurde eine Fettsäure-Bindestelle innerhalb der Aminosäure-Sequenz von IDE postuliert (Hamel et al., 2003). Durch die *in*

vitro-Inkubation einer entsprechenden rekombinanten IDE-Deletionsmutante könnte analysiert werden, ob der aktivitätssteigernde Effekt von PC20:5 und PC22:6 auf eine direkte Lipid-Protein-Interaktion an dieser Position zurückzuführen ist. Die in 4.3.2 - 4.3.5 gezeigten Effekte von EPA und DHA auf die A β -Degradation basieren auf der Analyse von N2a-Zellen bzw. humanem rekombinanten IDE. Zur Untersuchung der *in vivo*-Relevanz dieser Mechanismen sollte die A β -Degradation sowie die Genexpression, subzelluläre Lokalisation und Enzymaktivität von IDE im Hirngewebe eines entsprechend gefütterten Tiermodells analysiert werden.

Im Gegensatz dazu konnte die positive Wirkung von MCFAs auf die IDE-Sekretion *in vivo* im Serum eines mit kokosnussölsreicher Diät gefütterten AD-Mausmodells bestätigt werden. Da das Probenmaterial bereits eingefroren war, war eine immunhistologische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von IDE im Gehirn der Tiere leider nicht mehr möglich. Im frontalen Kortex dieser Tiere zeigte sich jedoch eine tendenzielle Reduktion des A β 40- und A β 42-Gehalts, die allerdings aufgrund der geringen Stichprobenanzahl keine statistische Signifikanz erreichte. Aufgrund dessen wäre es interessant, die Fütterungsstudie mit einer größeren Anzahl von Tieren zu wiederholen. Dabei könnte mittels Immunfluoreszenz überprüft werden, ob die Lokalisation von IDE im Hirngewebe der Tiere ebenfalls Veränderungen aufweist. Da die Supplementierung von Kokosnussöl bzw. die Erhöhung der Ketonkörper-Konzentration in einigen Studien mit einer verbesserten Kognition von AD-Patienten in Verbindung gebracht wurde (5.2.8.2), könnten zusätzlich Verhaltens- und Gedächtnistests bei den Tieren durchgeführt werden.

Im Rahmen eines weiteren Projekts konnte nachgewiesen werden, dass Lipidextrakte aus dem Hirngewebe von AD-Patienten und von 5xFAD-Mäusen die Sekretion von IDE und damit einhergehend die A β -Degradation in N2a-Zellen reduzieren (Abb. 52A, Abb. 53, Abb. 55, Abb. 80). Somit besteht möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen den Lipidveränderungen im Hirngewebe von AD-Patienten und der Pathogenese der Erkrankung. Da die Experimente unter Verwendung einer sehr geringen Anzahl an Hirnproben durchgeführt wurden, müssen die generierten Ergebnisse zunächst mit einer größeren Anzahl an Gewebeproben verifiziert werden. Hierbei sollte eine Unterscheidung zwischen weißer und grauer Substanz vorgenommen werden, da sich die Lipidkomposition teilweise erheblich zwischen diesen Bereichen unterscheidet (O'Brien und Sampson, 1965). Des Weiteren sollte auch der Einfluss der Lipidextrakte aus *post mortem* AD-Hirngewebe auf die an der A β -Produktion beteiligten Mechanismen analysiert werden. Beides ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Schließlich wäre es interessant, die *in vivo*-Relevanz der Effekte der zerebralen Lipidextrakte aus AD-Hirngewebe auf die A β -Pathologie zu überprüfen. Hierzu könnte eine Mikroinjektion der aus *post mortem* AD-Hirngewebe bzw. aus Kontrollgewebe gewonnenen Lipidextrakte in das Gehirn eines AD-Mausmodells erfolgen. Durch die Anfärbung der amyloiden Plaques nach einigen Wochen könnte geschlussfolgert werden, ob die Veränderungen der Lipidkomposition in AD-Hirngewebe die Akkumulation von A β -Peptiden *in vivo* induzieren können und somit als mögliche Ursache der Erkrankung in Betracht gezogen werden sollten. Dieses Experiment wird derzeit unter Verwendung des APP^{swe}/PS1 Δ Exon9-Mausmodells durchgeführt.

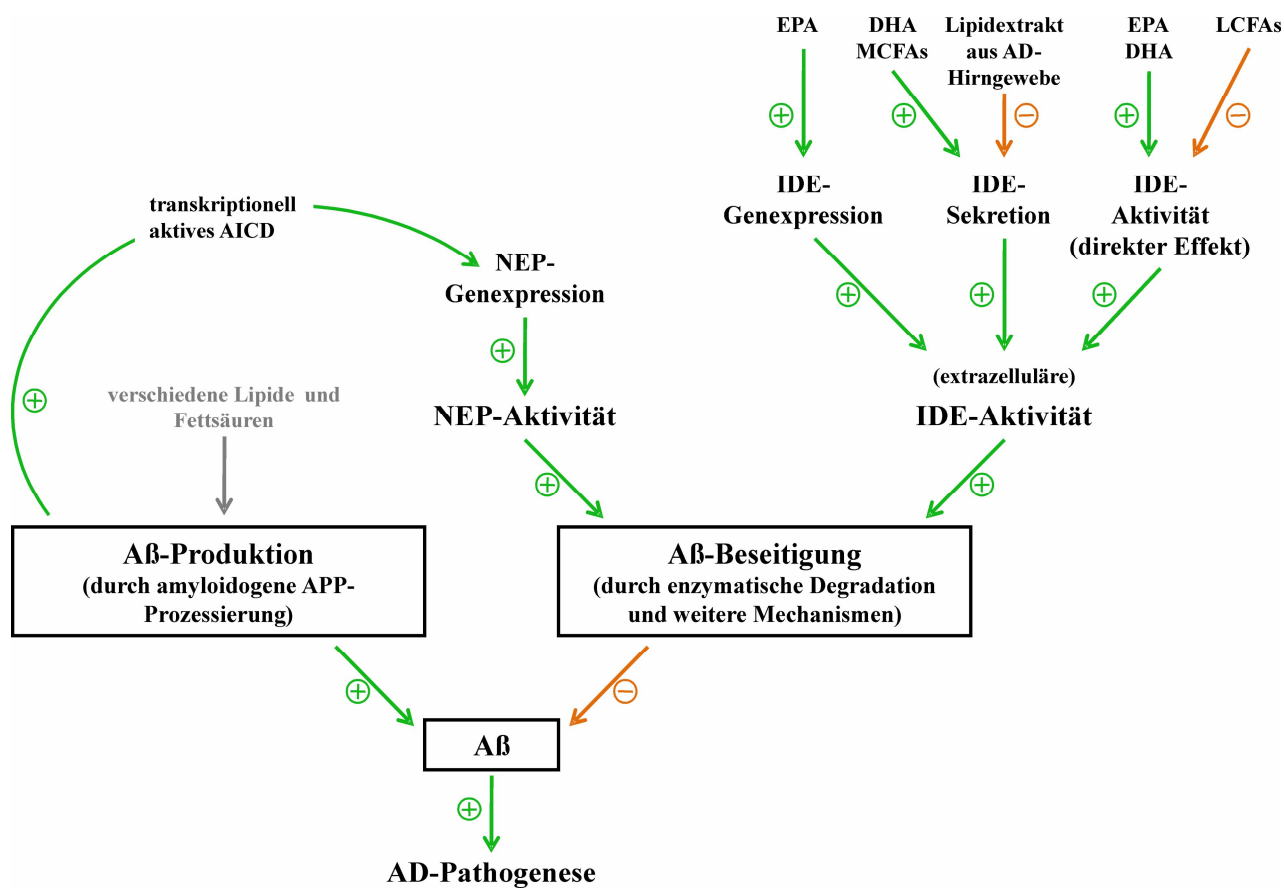


Abb. 80: Zusammenfassung der identifizierten Mechanismen zur Regulation von NEP und IDE

Der Aβ-Gehalt im Hirngewebe ist sowohl von der Produktions- als auch von der Beseitigungsrate des Peptids abhängig. Die Genexpression von NEP wird durch das bei der amyloidogenen APP-Prozessierung generierte Peptid AICD gesteigert. Die Aktivität von IDE wird über unterschiedliche Mechanismen positiv durch EPA, DHA und MCFAs beeinflusst und durch LCFAs sowie durch Lipidextrakte aus *post mortem* AD-Hirngewebe inhibiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott, A. (2008). Neuroscience: The plaque plan. *Nature* 456, 161-164.
2. Affholter, J.A., Hsieh, C.L., Francke, U., and Roth, R.A. (1990). Insulin-degrading enzyme: stable expression of the human complementary DNA, characterization of its protein product, and chromosomal mapping of the human and mouse genes. *Mol Endocrinol* 4, 1125-1135.
3. Agostinho, P., Cunha, R.A., and Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16, 2766-2778.
4. Agranoff, B.W., Benjamins, J.A., and Hajra, A.K. (1999). Properties of Brain Lipids. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*.
5. Airhart, S., Cade, W.T., Jiang, H., Coggan, A.R., Racette, S.B., Korenblat, K., Spearie, C.A., Waller, S., O'Connor, R., Bashir, A., Ory, D.S., Schaffer, J.E., Novak, E., Farmer, M., Waggoner, A.D., Davila-Roman, V.G., Javidan-Nejad, C., and Peterson, L.R. (2016). A Diet Rich in Medium-Chain Fatty Acids Improves Systolic Function and Alters the Lipidomic Profile in Patients With Type 2 Diabetes: A Pilot Study. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 504-512.
6. Alam, J., and Cook, J.L. (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188, 245-254.
7. Alves da Costa, C., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Vincent, B., Boyer, N., Kawarai, T., Girardot, N., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 26, 6377-6385.
8. Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr Psychiatr-Gerichtl Med* 109, 146-148.
9. Alzheimer's Disease Facts and Figures (2015). Alzheimer's Association.
10. Annweiler, C., and Beauchet, O. (2011). Vitamin D-mentia: randomized clinical trials should be the next step. *Neuroepidemiology* 37, 249-258.
11. Ariga, T., McDonald, M.P., and Yu, R.K. (2008). Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J Lipid Res* 49, 1157-1175.
12. Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol* 61, 661-666.
13. Asai, M., Yagishita, S., Iwata, N., Saido, T.C., Ishiura, S., and Maruyama, K. (2011). An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J* 25, 3720-3730.
14. Ashley, J., Packard, M., Ataman, B., and Budnik, V. (2005). Fasciilin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci* 25, 5943-5955.
15. Avraham, Y., Saidian, M., Burston, J.J., Mevorach, R., Vorobiev, L., Magen, I., Kunkes, E., Borges, B., Lichtman, A.H., and Berry, E.M. (2011). Fish oil promotes survival and protects against cognitive decline in severely undernourished mice by normalizing satiety signals. *J Nutr Biochem* 22, 766-776.
16. Aydin, D., Weyer, S.W., and Muller, U.C. (2012). Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res* 217, 423-434.
17. Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67.
18. Bagyinszky, E., Youn, Y.C., An, S.S., and Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging* 9, 535-551.
19. Balk, E., Chung, M., Lichtenstein, A., Chew, P., Kupelnick, B., Lawrence, A., DeVine, D., and Lau, J. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 1-6.
20. Bandaru, V.V., Troncoso, J., Wheeler, D., Pletnikova, O., Wang, J., Conant, K., and Haughey, N.J. (2009). ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain. *Neurobiol Aging* 30, 591-599.
21. Baranillo, R.J., Bharani, K.L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12, 32-46.
22. Barbagallo, M., and Dominguez, L.J. (2014). Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *World J Diabetes* 5, 889-893.
23. Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Peres, K., Dartigues, J.F., and Renaud, S. (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 325, 932-933.
24. Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.F., and Alperovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69, 1921-1930.

25. Barberger-Gateau, P., Samieri, C., Feart, C., and Plourde, M. (2011). Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids and Alzheimer's disease: interaction with apolipoprotein E genotype. *Curr Alzheimer Res* 8, 479-491.
26. Barcelo-Coblijn, G., Kitajka, K., Puskas, L.G., Hoggies, E., Zvara, A., Hackler, L., Jr., and Farkas, T. (2003). Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochimica et biophysica acta* 1632, 72-79.
27. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., and Reinherz, E.L. (1989). The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol* 142, 283-287.
28. Barnes, D.E., and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10, 819-828.
29. Barucker, C., Harmeier, A., Weiske, J., Fauler, B., Albring, K.F., Prokop, S., Hildebrand, P., Lurz, R., Heppner, F.L., Huber, O., and Multhaup, G. (2014). Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide A β 42 as a regulator of gene transcription. *J Biol Chem* 289, 20182-20191.
30. Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., and Holtzman, D.M. (2006). Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 12, 856-861.
31. Bauer, C., Pardossi-Piquard, R., Dunys, J., Roy, M., and Checler, F. (2011). gamma-Secretase-mediated regulation of neprilysin: influence of cell density and aging and modulation by imatinib. *J Alzheimers Dis* 27, 511-520.
32. Baulac, S., LaVoie, M.J., Kimberly, W.T., Strahle, J., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., and Xia, W. (2003). Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. *Neurobiol Dis* 14, 194-204.
33. Becker, K.A., Riethmuller, J., Zhang, Y., and Gulbins, E. (2010). The role of sphingolipids and ceramide in pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J* 4, 39-47.
34. Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J.I., Goldin, A., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2711-2716.
35. Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213-227.
36. Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., and Turner, A.J. (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10, 94-100.
37. Belyaev, N.D., Kellett, K.A., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285, 41443-41454.
38. Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., and De Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96, 732-742.
39. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Fatty Acids Are Key Constituents of Lipids. *Biochemistry 5th edition*
40. Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270-281.
41. Blass, J.P., Sheu, R.K., and Gibson, G.E. (2000). Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann N Y Acad Sci* 903, 204-221.
42. Blish, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
43. Blomqvist, M.E., McCarthy, S., Blennow, K., Andersson, B., and Prince, J.A. (2010). Evaluation of neprilysin sequence variation in relation to CSF beta-Amyloid levels and Alzheimer disease risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 1, 47-52.
44. Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.C., Marini, A.M., and Heurteaux, C. (2009). Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology* 34, 2548-2559.
45. Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzog, M.C., Radde, R., Staufenbiel, M., Lewis, J., Hutton, M., Tolnay, M., and Jucker, M. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171, 2012-2020.
46. Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 16, 6229-6241.
47. Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66, 1631-1646.

48. Borquez, D.A., and Gonzalez-Billault, C. (2012). The amyloid precursor protein intracellular domain-fe65 multiprotein complexes: a challenge to the amyloid hypothesis for Alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis* 2012, 353145.
49. Boston, P.F., Bennett, A., Horrobin, D.F., and Bennett, C.N. (2004). Ethyl-EPA in Alzheimer's disease--a pilot study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71, 341-346.
50. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
51. Braak, H., Braak, E., and Bohl, J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* 33, 403-408.
52. Breitner, J.C., Wyse, B.W., Anthony, J.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Norton, M.C., Tschanz, J.T., Plassman, B.L., Meyer, M.R., Skoog, I., and Khachaturian, A. (1999). APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study. *Neurology* 53, 321-331.
53. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
54. Brown, G., Greaves, M.F., Lister, T.A., Rapson, N., and Papamichael, M. (1974). Expression of human T and B lymphocyte cell-surface markers on leukaemic cells. *Lancet* 2, 753-755.
55. Brown, G., Hogg, N., and Greaves, M. (1975). Candidate leukaemia-specific antigen in man. *Nature* 258, 454-456.
56. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
57. Bulloj, A., Leal, M.C., Xu, H., Castano, E.M., and Morelli, L. (2010). Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis* 19, 79-95.
58. Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Zimmer, V.C., Mett, J., Weingartner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lutjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33, 16072-16087.
59. Burg, V.K. (2014). Dissertation: Sterine und die molekularen Mechanismen der APP Prozessierung: Zusammenhänge und Implikationen für die Alzheimer Krankheit. Universität des Saarlandes.
60. Butterfield, D.A. (2003). Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem* 10, 2651-2659.
61. Cader, A.A., Butterfield, D.A., Watkins, B.A., BH, C.H., and Hennig, B. (1995). Electron spin resonance studies of fatty acid-induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 665-673.
62. Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173-2181.
63. Calder, P.C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83, 1505S-1519S.
64. Calon, F., Lim, G.P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Jr., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2004). Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43, 633-645.
65. Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.S., Jun, S.B., Lovinger, D., and Kim, H.Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 111, 510-521.
66. Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
67. Cao, X., and Sudhof, T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279, 24601-24611.
68. Carey, R.M., Balcz, B.A., Lopez-Coviella, I., and Slack, B.E. (2005). Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 6, 30.
69. Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., and Marcinkiewicz, M. (2002). Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 849-856.
70. Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., Goate, A.M., Bales, K.R., Paul, S.M., Bateman, R.J., and Holtzman, D.M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* 3, 89ra57.
71. Catala, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157, 1-11.
72. Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26, 267-298.

73. Chambrier, C., Bastard, J.P., Rieusset, J., Chevillotte, E., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Hainque, B., Riou, J.P., Laville, M., and Vidal, H. (2002). Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res* 10, 518-525.
74. Chang, K.A., Kim, H.S., Ha, T.Y., Ha, J.W., Shin, K.Y., Jeong, Y.H., Lee, J.P., Park, C.H., Kim, S., Baik, T.K., and Suh, Y.H. (2006). Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668 regulates the nuclear translocation of the APP intracellular domain and induces neurodegeneration. *Mol Cell Biol* 26, 4327-4338.
75. Chen, A.C., and Selkoe, D.J. (2007). Response to: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the Abeta-Degrading Enzyme Nephrylysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP." *Neuron* 46, 541-554. *Neuron* 53, 479-483.
76. Chen, C.T., Liu, Z., Ouellet, M., Calon, F., and Bazinet, R.P. (2009). Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80, 157-163.
77. Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogaeva, E., Wakutani, Y., Pardossi-Piquard, R., Ruan, X., Tandon, A., Checler, F., Marambaud, P., Hansen, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* 440, 1208-1212.
78. Cheng, H., Wang, L., Shi, T., Shang, Y., and Jiang, L. (2015). Association of insulin degrading enzyme gene polymorphisms with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci* 125, 328-335.
79. Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333-366.
80. Chiu, C.C., Su, K.P., Cheng, T.C., Liu, H.C., Chang, C.J., Dewey, M.E., Stewart, R., and Huang, S.Y. (2008). The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 1538-1544.
81. Chyung, J.H., Raper, D.M., and Selkoe, D.J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280, 4383-4392.
82. Cirrito, J.R., May, P.C., O'Dell, M.A., Taylor, J.W., Parsadanian, M., Cramer, J.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Bales, K.R., Paul, S.M., DeMattos, R.B., and Holtzman, D.M. (2003). In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* 23, 8844-8853.
83. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
84. Cole, G.M., Ma, Q.L., and Frautschy, S.A. (2010). Dietary fatty acids and the aging brain. *Nutr Rev* 68 Suppl 2, S102-111.
85. Cole, L.K., Vance, J.E., and Vance, D.E. (2012). Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 754-761.
86. Comba, A., Lin, Y.H., Eynard, A.R., Valentich, M.A., Fernandez-Zapico, M.E., and Pasqualini, M.E. (2011). Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis Rev* 30, 325-342.
87. Connor, S., Tenorio, G., Clandinin, M.T., and Sauve, Y. (2012). DHA supplementation enhances high-frequency, stimulation-induced synaptic transmission in mouse hippocampus. *Appl Physiol Nutr Metab* 37, 880-887.
88. Conquer, J.A., Tierney, M.C., Zecevic, J., Bettger, W.J., and 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, 1305-1312.
89. Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 162, 313-319.
90. Cooper, R.A. (1978). Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* 8, 413-430.
91. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
92. Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., and et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-184.
93. Courchesne-Loyer, A., Fortier, M., Tremblay-Mercier, J., Chouinard-Watkins, R., Roy, M., Nugent, S., Castellano, C.A., and Cunnane, S.C. (2013). Stimulation of mild, sustained ketonemia by medium-chain triacylglycerols in healthy humans: estimated potential contribution to brain energy metabolism. *Nutrition* 29, 635-640.
94. Cox, C., Sutherland, W., Mann, J., de Jong, S., Chisholm, A., and Skeaff, M. (1998). Effects of dietary coconut oil, butter and safflower oil on plasma lipids, lipoproteins and lathosterol levels. *Eur J Clin Nutr* 52, 650-654.

95. Crichton, G.E., Bryan, J., and Murphy, K.J. (2013). Dietary antioxidants, cognitive function and dementia--a systematic review. *Plant Foods Hum Nutr* 68, 279-292.
96. Crupi, R., Marino, A., and Cuzzocrea, S. (2013). n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem* 20, 2953-2963.
97. Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M., Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop, T., and Rapoport, S.I. (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27, 3-20.
98. Cupers, P., Orleans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* 78, 1168-1178.
99. Daly, T.A., Wang, M., and Regen, S.L. (2011). The origin of cholesterol's condensing effect. *Langmuir* 27, 2159-2161.
100. DaRocha-Souto, B., Scotton, T.C., Coma, M., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Sereno, L., Rodriguez, M., Sanchez, B., Hyman, B.T., and Gomez-Isla, T. (2011). Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 360-376.
101. Davis, J.B. (1996). Oxidative mechanisms in beta-amyloid cytotoxicity. *Neurodegeneration* 5, 441-444.
102. Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., and Sirinathsinghji, D.J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1-13.
103. de Bruijn, R.F., and Ikram, M.A. (2014). Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med* 12, 130.
104. de Leon, M.J., Ferris, S.H., George, A.E., Reisberg, B., Christman, D.R., Kricheff, II, and Wolf, A.P. (1983). Computed tomography and positron emission transaxial tomography evaluations of normal aging and Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 3, 391-394.
105. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
106. De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1857-1870.
107. De Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. *Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. EMBO Rep* 8, 141-146.
108. de Urquiza, A.M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R.H., Griffiths, W., Sjoval, J., and Perlmann, T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
109. Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., and Zlokovic, B. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9, 907-913.
110. Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118, 4002-4013.
111. DebMandal, M., and Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. *Asian Pac J Trop Med* 4, 241-247.
112. Deckelbaum, R.J., Worgall, T.S., and Seo, T. (2006). n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr* 83, 1520S-1525S.
113. DeClercq, V., d'Eon, B., and McLeod, R.S. (2015). Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1851, 1123-1133.
114. DeDea, L. (2012). Can coconut oil replace caprylidene for Alzheimer disease? *JAAPA* 25, 19.
115. Defilippis, A.P., Blaha, M.J., and Jacobson, T.A. (2010). Omega-3 Fatty acids for cardiovascular disease prevention. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 12, 365-380.
116. DeGeorge, J.J., Nariai, T., Yamazaki, S., Williams, W.M., and Rapoport, S.I. (1991). Arecoline-stimulated brain incorporation of intravenously administered fatty acids in unanesthetized rats. *J Neurochem* 56, 352-355.
117. DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
118. Dennis, E.A., and Norris, P.C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 15, 511-523.
119. Dickerson, B.C., Goncharova, I., Sullivan, M.P., Forchetti, C., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Beckett, L.A., and deToledo-Morrell, L. (2001). MRI-derived entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and very mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 747-754.

120. Ding, F., Yao, J., Rettberg, J.R., Chen, S., and Brinton, R.D. (2013). Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS One* 8, e79977.
121. Dinkins, M.B., Dasgupta, S., Wang, G., Zhu, G., and Bieberich, E. (2014). Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35, 1792-1800.
122. Drubin, D.G., and Kirschner, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103, 2739-2746.
123. Du, J., Zhang, L., Liu, S., Zhang, C., Huang, X., Li, J., Zhao, N., and Wang, Z. (2009). PPARgamma transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 485-490.
124. Du, J., Zhang, L., Liu, S., and Wang, Z. (2010). Palmitic acid and docosahexaenoic acid opposingly regulate the expression of insulin-degrading enzyme in neurons. *Pharmazie* 65, 231-232.
125. Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J.F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M.O., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J.L., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J., Jack, C.R., Jr., Proceedings of the Meeting of the International Working Group, the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of, A.D., July, and Washington Dc, U.S.A. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 12, 292-323.
126. Duckworth, W.C., Stentz, F.B., Heinemann, M., and Kitabchi, A.E. (1979). Initial site of insulin cleavage by insulin protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 635-639.
127. Dulin, F., Leveille, F., Ortega, J.B., Mornon, J.P., Buisson, A., Callebaut, I., and Colloc'h, N. (2008). P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582, 1865-1870.
128. Dyall, S.C., and Michael-Titus, A.T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med* 10, 219-235.
129. Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7, 949-957.
130. Eckman, C.B., Mehta, N.D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L.M., Prada, C.M., Younkin, S.G., Hutton, M., and Hardy, J. (1997). A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6, 2087-2089.
131. Eckman, E.A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K., and Eckman, C.B. (2003). Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 278, 2081-2084.
132. Eckman, E.A., Adams, S.K., Troendle, F.J., Stodola, B.A., Kahn, M.A., Fauq, A.H., Xiao, H.D., Bernstein, K.E., and Eckman, C.B. (2006). Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 281, 30471-30478.
133. Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 277, 13389-13393.
134. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.
135. Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C.L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.
136. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123.
137. Eisele, Y.S., Baumann, M., Klebl, B., Nordhammer, C., Jucker, M., and Kilger, E. (2007). Gleevec increases levels of the amyloid precursor protein intracellular domain and of the amyloid-beta degrading enzyme neprilysin. *Mol Biol Cell* 18, 3591-3600.
138. El-Amouri, S.S., Zhu, H., Yu, J., Marr, R., Verma, I.M., and Kindy, M.S. (2008). Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 172, 1342-1354.
139. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
140. Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Ruitenberg, A., Van Swieten, J.C., Hofman, A., Wittman, J.C., and Breteler, M.M. (2002). Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study. *Neurology* 59, 1915-1921.
141. Erdos, E.G., and Skidgel, R.A. (1988). Human neutral endopeptidase 24.11 (NEP, enkephalinase); function, distribution and release. *Adv Exp Med Biol* 240, 13-21.

142. Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
143. Espuny-Camacho, I., Dominguez, D., Merchiers, P., Van Rompaey, L., Selkoe, D., and De Strooper, B. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhances the activity of an insulin degrading enzyme-like metalloprotease for amyloid-beta clearance. *J Alzheimers Dis* 20, 1119-1132.
144. Fader, C.M., and Colombo, M.I. (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* 2, 122-125.
145. Fam, S.S., Murphey, L.J., Terry, E.S., Zackert, W.E., Chen, Y., Gao, L., Pandalai, S., Milne, G.L., Roberts, L.J., Porter, N.A., Montine, T.J., and Morrow, J.D. (2002). Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A4/J4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 277, 36076-36084.
146. Fantini, J., and Yahi, N. (2010). Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids: common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 12, e27.
147. Farooqui, A.A., and Horrocks, L.A. (2001). Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J Mol Neurosci* 16, 263-272; discussion 279-284.
148. Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., and Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4162-4167.
149. Felsenstein, K.M., Hunihan, L.W., and Roberts, S.B. (1994). Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet* 6, 251-255.
150. Fernando, W.M., Martins, I.J., Goozee, K.G., Brennan, C.S., Jayasena, V., and Martins, R.N. (2015). The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *Br J Nutr* 114, 1-14.
151. Filippov, V., Song, M.A., Zhang, K., Vinters, H.V., Tung, S., Kirsch, W.M., Yang, J., and Duerksen-Hughes, P.J. (2012). Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 29, 537-547.
152. Fisk, L., Nalivaeva, N.N., Boyle, J.P., Peers, C.S., and Turner, A.J. (2007). Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. *Neurochem Res* 32, 1741-1748.
153. Flammang, B., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Debayle, D., Dabert-Gay, A.S., Thevenet, A., Lauritzen, I., and Checler, F. (2012). Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis* 30, 145-153.
154. Fleisher, A.S., Truran, D., Mai, J.T., Langbaum, J.B., Aisen, P.S., Cummings, J.L., Jack, C.R., Jr., Weiner, M.W., Thomas, R.G., Schneider, L.S., Tariot, P.N., and Alzheimer's Disease Cooperative, S. (2011). Chronic divalproex sodium use and brain atrophy in Alzheimer disease. *Neurology* 77, 1263-1271.
155. Frautschy, S.A., Cole, G.M., and Baird, A. (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol* 140, 1389-1399.
156. Freshney, R.I. (2011). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6.
157. Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jonhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxen-Irving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L.O., and Palmblad, J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* 63, 1402-1408.
158. Freund-Levi, Y., Hjorth, E., Lindberg, C., Cederholm, T., Faxen-Irving, G., Vedin, I., Palmblad, J., Wahlund, L.O., Schultzberg, M., Basun, H., and Eriksdotter Jonhagen, M. (2009). Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory markers in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease: the OmegAD study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 481-490.
159. Freund Levi, Y., Vedin, I., Cederholm, T., Basun, H., Faxen Irving, G., Eriksdotter, M., Hjorth, E., Schultzberg, M., Vessby, B., Wahlund, L.O., Salem, N., Jr., and Palmblad, J. (2014). Transfer of omega-3 fatty acids across the blood-brain barrier after dietary supplementation with a docosahexaenoic acid-rich omega-3 fatty acid preparation in patients with Alzheimer's disease: the OmegAD study. *J Intern Med* 275, 428-436.
160. Friedland, R.P., Jagust, W.J., Huesman, R.H., Koss, E., Knittel, B., Mathis, C.A., Ober, B.A., Mazoyer, B.M., and Budinger, T.F. (1989). Regional cerebral glucose transport and utilization in Alzheimer's disease. *Neurology* 39, 1427-1434.
161. Frykman, S., Hur, J.Y., Franberg, J., Aoki, M., Winblad, B., Nahalkova, J., Behbahani, H., and Tjernberg, L.O. (2010). Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain. *PLoS One* 5, e8948.
162. Fukami, S., Watanabe, K., Iwata, N., Haraoka, J., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Fraser, P., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Saido, T.C. (2002). Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res* 43, 39-56.
163. Funamoto, S., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Hirotani, N., Saido, T.C., and Ihara, Y. (2004). Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42. *Biochemistry* 43, 13532-13540.

164. Gao, L., Yin, H., Milne, G.L., Porter, N.A., and Morrow, J.D. (2006). Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 281, 14092-14099.
165. Gersbacher, M.T., Goodger, Z.V., Trutzel, A., Bundschuh, D., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2013). Turnover of amyloid precursor protein family members determines their nuclear signaling capability. *PLoS One* 8, e69363.
166. Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S., and Nicholson, D.W. (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395-406.
167. Ghiso, J., Shayo, M., Calero, M., Ng, D., Tomidokoro, Y., Gandy, S., Rostagno, A., and Frangione, B. (2004). Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42. *J Biol Chem* 279, 45897-45908.
168. Ghosal, K., Vogt, D.L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18367-18372.
169. Ghosal, K., Stathopoulos, A., and Pimplikar, S.W. (2010). APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS One* 5, e11866.
170. Ghosh, A.K., and Osswald, H.L. (2014). BACE1 (beta-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society reviews* 43, 6765-6813.
171. Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., and Herman, M.M. (2006). High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp Neurol* 200, 460-467.
172. Giedraitis, V., Kilander, L., Degerman-Gunnarsson, M., Sundelof, J., Axelsson, T., Syvanen, A.C., Lannfelt, L., and Glaser, A. (2009). Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 59-68.
173. Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.
174. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
175. Godyn, J., Jonczyk, J., Panek, D., and Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep* 68, 127-138.
176. Goedert, M., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1991). Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 1, 441-447.
177. Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Six, J., Lubke, U., Vandermeeren, M., Cras, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5066-5070.
178. Goedert, M., Strittmatter, W.J., and Roses, A.D. (1994). Alzheimer's disease. Risky apolipoprotein in brain. *Nature* 372, 45-46.
179. Gohring, B., Holzhausen, H.J., Meye, A., Heynemann, H., Rebmann, U., Langner, J., and Riemann, D. (1998). Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med* 2, 409-414.
180. Golde, T.E., Schneider, L.S., and Koo, E.H. (2011). Anti-abeta therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron* 69, 203-213.
181. Golde, T.E., Koo, E.H., Felsenstein, K.M., Osborne, B.A., and Miele, L. (2013). gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et biophysica acta* 1828, 2898-2907.
182. Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
183. Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W., Jr., Morris, J.C., Growdon, J.H., and Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491-4500.
184. Gomez-Pinilla, F., and Tyagi, E. (2013). Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuronal plasticity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 726-733.
185. Goodger, Z.V., Rajendran, L., Trutzel, A., Kohli, B.M., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2009). Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci* 122, 3703-3714.
186. Gottfries, C.G., Karlsson, I., and Svennerholm, L. (1996). Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr* 8, 365-372.
187. Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491-1495.
188. Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Greengard, P., Relkin, N.R., and Gandy, S. (1998). Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J Neurochem* 71, 1920-1925.
189. Goyens, P.L., Spilker, M.E., Zock, P.L., Katan, M.B., and Mensink, R.P. (2005). Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *J Lipid Res* 46, 1474-1483.

190. Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 278, 31261-31268.
191. Green, K.N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E.B., Yurko-Mauro, K.A., Ellis, L., and LaFerla, F.M. (2007). Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci* 27, 4385-4395.
192. Grimm, M.O., Grimm, H.S., Patzold, A.J., Zinser, E.G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J.A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., and Hartmann, T. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7, 1118-1123.
193. Grimm, M.O., Grimm, H.S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T., and Bergmann, C. (2008). Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283, 11302-11311.
194. Grimm, M.O., Grosgen, S., Riemenschneider, M., Tanila, H., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2011a). From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218, 7713-7722.
195. Grimm, M.O., Grosgen, S., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., Friess, P., Muller, U., Fassbender, K., Riemenschneider, M., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2011b). Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 695413.
196. Grimm, M.O., Kuchenbecker, J., Grosgen, S., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Rothhaar, T.L., Friess, P., de Wilde, M.C., Broersen, L.M., Penke, B., Peter, M., Vigh, L., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2011c). Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286, 14028-14039.
197. Grimm, M.O., Kuchenbecker, J., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Burg, V.K., Friess, P., Muller, U., Grimm, H.S., Riemenschneider, M., and Hartmann, T. (2011d). Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 116, 916-925.
198. Grimm, M.O., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., Friess, P., Kins, S., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2012a). Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem* 23, 1214-1223.
199. Grimm, M.O., Rothhaar, T.L., and Hartmann, T. (2012b). The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Exp Brain Res* 217, 365-375.
200. Grimm, M.O., Zinser, E.G., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Kaestner, L., Bayer, T.A., Lipp, P., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2012c). Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 7, e34095.
201. Grimm, M.O., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Zimmer, V.C., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Lehmann, J., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2013a). Effect of Different Phospholipids on alpha-Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 14, 5879-5898.
202. Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013b). Neprilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5, 98.
203. Grimm, M.O., Zimmer, V.C., Lehmann, J., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2013c). The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013, 814390.
204. Grimm, M.O., Hundsdorfer, B., Grosgen, S., Mett, J., Zimmer, V.C., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Lehmann, J., Patzold, A., Zinser, E.G., Tanila, H., Shen, J., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014a). PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 34, 92-110.
205. Grimm, M.O., Lehmann, J., Mett, J., Zimmer, V.C., Grosgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014b). Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases* 13, 75-81.
206. Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Grosgen, S., Haupenthal, V.J., Blumel, T., Hundsdorfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015a). APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7, 77.
207. Grimm, M.O., Stahlmann, C.P., Mett, J., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., Lehmann, J., Hundsdorfer, B., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015b). Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on Ass Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19, 646-656.

208. Grimm, M.O., Hauptenthal, V.J., Mett, J., Stahlmann, C.P., Blumel, T., Mylonas, N.T., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016a). Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neuro-degenerative diseases* 16, 44-54.
209. Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Hauptenthal, V.J., Blumel, T., Stotzel, H., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016b). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid-beta by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 534-542.
210. Grösgen, S. (2013). Dissertation: Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheit. Universität des Saarlandes.
211. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.
212. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.
213. Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* 276, 35235-35238.
214. Guan, H., Liu, Y., Daily, A., Police, S., Kim, M.H., Oddo, S., LaFerla, F.M., Pauly, J.R., Murphy, M.P., and Hersh, L.B. (2009). Peripherally expressed neprilysin reduces brain amyloid burden: a novel approach for treating Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 87, 1462-1473.
215. Guenette, S., Chang, Y., Hiesberger, T., Richardson, J.A., Eckman, C.B., Eckman, E.A., Hammer, R.E., and Herz, J. (2006). Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development. *EMBO J* 25, 420-431.
216. Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25, 3-28.
217. Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992a). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500-503.
218. Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., and et al. (1992b). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
219. Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.
220. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.
221. Hama, E., and Saido, T.C. (2005). Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide. *Med Hypotheses* 65, 498-500.
222. Hamel, F.G., Upward, J.L., and Bennett, R.G. (2003). In vitro inhibition of insulin-degrading enzyme by long-chain fatty acids and their coenzyme A thioesters. *Endocrinology* 144, 2404-2408.
223. Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
224. Han, X., Holtzman, D.M., and McKeel, D.W., Jr. (2001). Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* 77, 1168-1180.
225. Han, X., D, M.H., McKeel, D.W., Jr., Kelley, J., and Morris, J.C. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82, 809-818.
226. Han, X. (2010). The pathogenic implication of abnormal interaction between apolipoprotein E isoforms, amyloid-beta peptides, and sulfatides in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 41, 97-106.
227. Hanson, A.J., Craft, S., and Banks, W.A. (2015). The APOE genotype: modification of therapeutic responses in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 21, 114-120.
228. Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 35, 256-263.
229. Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
230. Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
231. Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., and Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3, 1016-1020.
232. Hashimoto, M., Hossain, S., Yamasaki, H., Yazawa, K., and Masumura, S. (1999). Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids* 34, 1297-1304.

233. Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J., and Shido, O. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 81, 1084-1091.
234. Hashimoto, M., Tanabe, Y., Fujii, Y., Kikuta, T., Shibata, H., and Shido, O. (2005). Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats. *J Nutr* 135, 549-555.
235. Hashimoto, M., Hossain, S., and Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem* 293, 1-8.
236. Hashimoto, M., Shahdat, H.M., Yamashita, S., Katakura, M., Tanabe, Y., Fujiwara, H., Gamoh, S., Miyazawa, T., Arai, H., Shimada, T., and Shido, O. (2008). Docosahexaenoic acid disrupts in vitro amyloid beta(1-40) fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex of Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 107, 1634-1646.
237. Hashimoto, M., Hossain, S., Tanabe, Y., Kawashima, A., Harada, T., Yano, T., Mizuguchi, K., and Shido, O. (2009). The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta(1-40). *J Nutr Biochem* 20, 965-973.
238. Hashimoto, M., Katakura, M., Hossain, S., Rahman, A., Shimada, T., and Shido, O. (2011). Docosahexaenoic acid withstands the A β (25-35)-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem* 22, 22-29.
239. He, G., Luo, W., Li, P., Remmers, C., Netzer, W.J., Hendrick, J., Bettayeb, K., Flajolet, M., Gorelick, F., Wennogle, L.P., and Greengard, P. (2010a). Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* 467, 95-98.
240. He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.X., and Schuchman, E.H. (2010b). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 398-408.
241. Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H.P., Wolfer, D.P., and Muller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.
242. Hebert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Muller, U., and De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep* 7, 739-745.
243. Helisalimi, S., Hiltunen, M., Vepsalainen, S., Iivonen, S., Mannermaa, A., Lehtovirta, M., Koivisto, A.M., Alafuzoff, I., and Soininen, H. (2004). Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 1746-1748.
244. Hellstrom-Lindahl, E., Ravid, R., and Nordberg, A. (2008). Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A β levels. *Neurobiol Aging* 29, 210-221.
245. Hemming, M.L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., and Selkoe, D.J. (2007). Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an A β -degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med* 4, e262.
246. Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6, e257.
247. Henderson, S.T., Vogel, J.L., Barr, L.J., Garvin, F., Jones, J.J., and Costantini, L.C. (2009). Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr Metab (Lond)* 6, 31.
248. Henderson, S.T., and Poirier, J. (2011). Pharmacogenetic analysis of the effects of polymorphisms in APOE, IDE and IL1B on a ketone body based therapeutic on cognition in mild to moderate Alzheimer's disease; a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Med Genet* 12, 137.
249. Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23, 4106-4115.
250. Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2, 461-462.
251. Hertz, L., Chen, Y., and Waagepetersen, H.S. (2015). Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, beta-amyloid toxicity, and astrocyte function. *J Neurochem* 134, 7-20.
252. Hickman, S.E., Allison, E.K., and El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28, 8354-8360.
253. Hjorth, E., Zhu, M., Toro, V.C., Vedin, I., Palmblad, J., Cederholm, T., Freund-Levi, Y., Faxen-Irving, G., Wahlund, L.O., Basun, H., Eriksdotter, M., and Schultzberg, M. (2013). Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid-beta₄₂ by human microglia and decrease inflammatory markers. *J Alzheimers Dis* 35, 697-713.
254. Holmes, O., Paturi, S., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2012). Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry* 51, 3565-3575.
255. Holtzman, D.M., Herz, J., and Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006312.

256. Hone, E., Martins, I.J., Fonte, J., and Martins, R.N. (2003). Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery. *J Alzheimers Dis* 5, 1-8.
257. Hong, Y., Beckett, C., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012). The impact of amyloid precursor protein signalling and histone deacetylase inhibition on neprilysin expression in human prostate cells. *Int J Cancer* 130, 775-786.
258. Hooijmans, C.R., Van der Zee, C.E., Dederen, P.J., Brouwer, K.M., Reijmer, Y.D., van Groen, T., Broersen, L.M., Lutjohann, D., Heerschap, A., and Kiliaan, A.J. (2009). DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Dis* 33, 482-498.
259. Horrocks, L.A., and Farooqui, A.A. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 361-372.
260. Hosono, T., Mouri, A., Nishitsuji, K., Jung, C.G., Kontani, M., Tokuda, H., Kawashima, H., Shibata, H., Suzuki, T., Nabehsima, T., and Michikawa, M. (2015). Arachidonic or Docosahexaenoic Acid Diet Prevents Memory Impairment in Tg2576 Mice. *J Alzheimers Dis* 48, 149-162.
261. Hossain, S., Hashimoto, M., Katakura, M., Miwa, K., Shimada, T., and Shido, O. (2009). Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-S5Y5 cells. *J Neurochem* 111, 568-579.
262. Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 16, 647-652.
263. Hoyer, S. (1992). Oxidative energy metabolism in Alzheimer brain. Studies in early-onset and late-onset cases. *Mol Chem Neuropathol* 16, 207-224.
264. Hsieh, J.J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M.G., and Hayward, S.D. (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 16, 952-959.
265. Hu Yang, I., De la Rubia Orti, J.E., Selvi Sabater, P., Sancho Castillo, S., Rochina, M.J., Manresa Ramon, N., and Montoya-Castilla, I. (2015). [Coconut Oil: Non-Alternative Drug Treatment against Alzheimer S Disease]. *Nutr Hosp* 32, 2822-2827.
266. Huang, S.M., Mouri, A., Kokubo, H., Nakajima, R., Suemoto, T., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Noda, Y., Yamaguchi, H., Nabeshima, T., Saido, T.C., and Iwata, N. (2006). Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem* 281, 17941-17951.
267. Huang, T.L., Zandi, P.P., Tucker, K.L., Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Fried, L.P., Burke, G.L., and Carlson, M.C. (2005). Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology* 65, 1409-1414.
268. Huenniger, K., Kramer, A., Soom, M., Chang, I., Kohler, M., Depping, R., Kehlenbach, R.H., and Kaether, C. (2010). Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci* 67, 3187-3196.
269. Hundsdorfer, B. (2014). Dissertation: Lipide bei der Alzheimer Krankheit: Einfluss auf die Amyloid-beta Aggregation und der bidirektionale Zusammenhang zwischen Gangliosiden und der Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins. Universität des Saarlandes.
270. Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Iba, M., Aboagye, A.K., Paul, S.M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2010). A{beta} accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. *Am J Pathol* 177, 1977-1988.
271. Hussain, G., Schmitt, F., Loeffler, J.P., and Gonzalez de Aguilar, J.L. (2013). Fattening the brain: a brief of recent research. *Front Cell Neurosci* 7, 144.
272. Hussein, N., Ah-Sing, E., Wilkinson, P., Leach, C., Griffin, B.A., and Millward, D.J. (2005). Long-chain conversion of [13C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res* 46, 269-280.
273. Huysseune, S., Kienlen-Campard, P., Hebert, S., Tasiaux, B., Leroy, K., Devuyst, O., Brion, J.P., De Strooper, B., and Octave, J.N. (2009). Epigenetic control of aquaporin 1 expression by the amyloid precursor protein. *FASEB J* 23, 4158-4167.
274. Ibarguren, M., Lopez, D.J., and Escriba, P.V. (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et biophysica acta* 1838, 1518-1528.
275. Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zerfass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996). Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271, 22908-22914.
276. Igarashi, M., Chang, L., Ma, K., and Rapoport, S.I. (2013). Kinetics of eicosapentaenoic acid in brain, heart and liver of conscious rats fed a high n-3 PUFA containing diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 89, 403-412.
277. Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., and Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 198-210.

278. Ishimaru, F., and Shipp, M.A. (1995). Analysis of the human CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter region: two separate regulatory elements. *Blood* 85, 3199-3207.
279. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T.C. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6, 143-150.
280. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., and Saido, T.C. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550-1552.
281. Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., and Saido, T.C. (2004). Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* 24, 991-998.
282. Iwata, N., Sekiguchi, M., Hattori, Y., Takahashi, A., Asai, M., Ji, B., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Muramatsu, S., and Saido, T.C. (2013). Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep* 3, 1472.
283. Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45-53.
284. Jack, C.R., Jr., Lowe, V.J., Weigand, S.D., Wiste, H.J., Senjem, M.L., Knopman, D.S., Shiung, M.M., Gunter, J.L., Boeve, B.F., Kemp, B.J., Weiner, M., Petersen, R.C., and Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2009). Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1355-1365.
285. Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., and Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12, 1059-1065.
286. Jameson, L., Frey, T., Zeeberg, B., Dalldorf, F., and Caplow, M. (1980). Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 19, 2472-2479.
287. Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13, 159-170.
288. Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
289. Jazvinscak Jembrek, M., Hof, P.R., and Simic, G. (2015). Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and Abeta Accumulation. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 346783.
290. Johnson, G.D., and Ahn, K. (2000). Development of an internally quenched fluorescent substrate selective for endothelin-converting enzyme-1. *Anal Biochem* 286, 112-118.
291. Johnson, L. (2012). Coconut oil touted as Alzheimer's remedy. www.cbn.com/cbnnews/healthscience/2012/January/Coconut-oil-Touted...
292. Joshi, P., Benussi, L., Furlan, R., Ghidoni, R., and Verderio, C. (2015). Extracellular vesicles in Alzheimer's disease: friends or foes? Focus on abeta-vesicle interaction. *International journal of molecular sciences* 16, 4800-4813.
293. Kadowaki, H., and Grant, M.A. (1995). Relationship of membrane phospholipid composition, lactosylceramide molecular species, and the specificity of CMP-N-acetylneuraminyl:lactosylceramide alpha 2,3-sialyltransferase to the molecular species composition of GM3 ganglioside. *J Lipid Res* 36, 1274-1282.
294. Kakuda, N., Funamoto, S., Yagishita, S., Takami, M., Osawa, S., Dohmae, N., and Ihara, Y. (2006). Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. *J Biol Chem* 281, 14776-14786.
295. Kalani, A., Tyagi, A., and Tyagi, N. (2014). Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol* 49, 590-600.
296. Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42, 776-782.
297. Kalmijn, S., van Boxtel, M.P., Ocke, M., Verschuren, W.M., Kromhout, D., and Launer, L.J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62, 275-280.
298. Kamal-Eldin, A., and Appelqvist, L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.
299. Kamal-Eldin, A., and Yanishlieva, N.V. (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 825-836.
300. Kametani, F., Tanaka, K., Ishii, T., Ikeda, S., Kennedy, H.E., and Allsop, D. (1993). Secretory form of Alzheimer amyloid precursor protein 695 in human brain lacks beta/A4 amyloid immunoreactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 392-398.

301. Kamisah, Y., Periyah, V., Lee, K.T., Noor-Izwan, N., Nurul-Hamizah, A., Nurul-Iman, B.S., Subermaniam, K., Jaarin, K., Azman, A., Faizah, O., and Qodriyah, H.M. (2015). Cardioprotective effect of virgin coconut oil in heated palm oil diet-induced hypertensive rats. *Pharm Biol* 53, 1243-1249.
302. Kanemitsu, H., Tomiyama, T., and Mori, H. (2003). Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 350, 113-116.
303. Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., and Koo, E.H. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 106, 1159-1166.
304. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
305. Kang, J., and Muller-Hill, B. (1990). Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 1192-1200.
306. Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10, 698-712.
307. Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., and Veech, R.L. (2000). D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5440-5444.
308. Kashiwaya, Y., Bergman, C., Lee, J.H., Wan, R., King, M.T., Mughal, M.R., Okun, E., Clarke, K., Mattson, M.P., and Veech, R.L. (2013). A ketone ester diet exhibits anxiolytic and cognition-sparing properties, and lessens amyloid and tau pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34, 1530-1539.
309. Kelleher, R.J., 3rd, Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209-1215.
310. Kennedy, E.P., and Weiss, S.B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 222, 193-214.
311. Kerridge, C., Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2014). The Abeta-clearance protein transthyretin, like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain. *J Neurochem* 130, 419-431.
312. Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt, J.D., and Rumbaugh, G. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 870-880.
313. Kim, H.S., Kim, E.M., Lee, J.P., Park, C.H., Kim, S., Seo, J.H., Chang, K.A., Yu, E., Jeong, S.J., Chong, Y.H., and Suh, Y.H. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *FASEB J* 17, 1951-1953.
314. Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guenette, S.Y., and Selkoe, D.J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276, 40288-40292.
315. Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382-6387.
316. Kinoshita, A., Whelan, C.M., Smith, C.J., Berezovska, O., and Hyman, B.T. (2002). Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with Fe65 and translocation to the nucleus. *J Neurochem* 82, 839-847.
317. Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Barcelo-Coblijn, G., Yeo, Y.K., and Farkas, T. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2619-2624.
318. Klebe, R.J., Chen, T., and Ruddle, F.H. (1970). Controlled production of proliferating somatic cell hybrids. *J Cell Biol* 45, 74-82.
319. Kogel, D., Concannon, C.G., Muller, T., Konig, H., Bonner, C., Poeschel, S., Chang, S., Egensperger, R., and Prehn, J.H. (2012). The APP intracellular domain (AICD) potentiates ER stress-induced apoptosis. *Neurobiol Aging* 33, 2200-2209.
320. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2, 371-375.
321. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., and Fahrenholz, F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5815-5820.
322. Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., and Ripova, D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 731526.

323. Konietzko, U., Goodger, Z.V., Meyer, M., Kohli, B.M., Bosset, J., Lahiri, D.K., and Nitsch, R.M. (2010). Co-localization of the amyloid precursor protein and Notch intracellular domains in nuclear transcription factories. *Neurobiol Aging* 31, 58-73.
324. Konietzko, U. (2012). AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9, 200-216.
325. Koo, E.H., and Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269, 17386-17389.
326. Kornberg, R.D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30, 235-239.
327. Kosicek, M., and Hecimovic, S. (2013). Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *International journal of molecular sciences* 14, 1310-1322.
328. Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., and Yamashima, T. (2006). Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci Res* 56, 159-164.
329. Kouchi, Z., Kinouchi, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998). The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur J Biochem* 258, 291-300.
330. Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie - Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Leipzig.
331. Krikorian, R., Shidler, M.D., Dangelo, K., Couch, S.C., Benoit, S.C., and Clegg, D.J. (2012). Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 33, 425 e419-427.
332. Kroger, E., Verreault, R., Carmichael, P.H., Lindsay, J., Julien, P., Dewailly, E., Ayotte, P., and Laurin, D. (2009). Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Clin Nutr* 90, 184-192.
333. Kuchenbecker, J. (2011). *Dissertation: Docosahexaensäure und Plasmalogene in der Alzheimer Krankheit*. Universität des Saarlandes.
334. Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020-3032.
335. Kuo, W.L., Montag, A.G., and Rosner, M.R. (1993). Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology* 132, 604-611.
336. Kurochkin, I.V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345, 33-37.
337. Kurochkin, I.V. (2001). Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci* 26, 421-425.
338. Kuusisto, J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkanen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., Hanninen, T., Pyorala, K., Kesaniemi, Y.A., Riekkinen, P., and et al. (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ* 309, 636-638.
339. La Fata, G., Weber, P., and Mohajeri, M.H. (2014). Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. *Nutrients* 6, 5453-5472.
340. Lai, A., Sisodia, S.S., and Trowbridge, I.S. (1995). Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270, 3565-3573.
341. Laitinen, M.H., Ngandu, T., Rovio, S., Helkala, E.L., Uusitalo, U., Viitanen, M., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2006). Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22, 99-107.
342. Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001). beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 76, 1121-1128.
343. Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6448-6453.
344. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
345. Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.F., Kobayashi, T., Salles, J.P., Perret, B., Bonnerot, C., and Record, M. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380, 161-171.
346. Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., and Michaelsen, K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in lipid research* 40, 1-94.
347. Le Brocq, D., Henry, A., Cappai, R., Li, Q.X., Tanner, J.E., Galatis, D., Gray, C., Holmes, S., Underwood, J.R., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Evin, G. (1998). Processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in *Pichia pastoris*: immunodetection of alpha-, beta-, and gamma-secretase products. *Biochemistry* 37, 14958-14965.

348. Le Kim, D., and Betzing, H. (1976). Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357, 1321-1331.
349. Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1666, 62-87.
350. Lee, M.R., Lee, D., Shin, S.K., Kim, Y.H., and Choi, C.Y. (2008). Inhibition of APP intracellular domain (AICD) transcriptional activity via covalent conjugation with Nedd8. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 976-981.
351. Lei, E., Vacy, K., and Boon, W.C. (2016). Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochem Int* 95, 75-84.
352. Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. (2003a). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093.
353. Leissring, M.A., Lu, A., Condron, M.M., Teplow, D.B., Stein, R.L., Farris, W., and Selkoe, D.J. (2003b). Kinetics of amyloid beta-protein degradation determined by novel fluorescence- and fluorescence polarization-based assays. *J Biol Chem* 278, 37314-37320.
354. Leissring, M.A., Malito, E., Hedouin, S., Reinstatler, L., Sahara, T., Abdul-Hay, S.O., Choudhry, S., Maharvi, G.M., Fauq, A.H., Huzarska, M., May, P.S., Choi, S., Logan, T.P., Turk, B.E., Cantley, L.C., Manolopoulou, M., Tang, W.J., Stein, R.L., Cuny, G.D., and Selkoe, D.J. (2010). Designed inhibitors of insulin-degrading enzyme regulate the catabolism and activity of insulin. *PLoS One* 5, e10504.
355. Lengqvist, J., Mata De Urquiza, A., Bergman, A.C., Willson, T.M., Sjovall, J., Perlmann, T., and Griffiths, W.J. (2004). Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 3, 692-703.
356. Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-357.
357. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V., and McInnes, R.R. (1988). Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 168, 1247-1253.
358. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., and et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
359. Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124-1126.
360. Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., and McGowan, E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.
361. Li, J., Liu, K., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, F., Yang, H., Liu, J., Pan, T., Chen, J., Wu, M., Zhou, X., and Yuan, Z. (2013). Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity. *Nat Immunol* 14, 793-803.
362. Liberato, M.V., Nascimento, A.S., Ayers, S.D., Lin, J.Z., Cvorovic, A., Silveira, R.L., Martinez, L., Souza, P.C., Saidenberg, D., Deng, T., Amato, A.A., Togashi, M., Hsueh, W.A., Phillips, K., Palma, M.S., Neves, F.A., Skaf, M.S., Webb, P., and Polikarpov, I. (2012). Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS One* 7, e36297.
363. Lim, G.P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Jr., Frautschi, S.A., and Cole, G.M. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 25, 3032-3040.
364. Lim, W.L., Martins, I.J., and Martins, R.N. (2014). The involvement of lipids in Alzheimer's disease. *J Genet Genomics* 41, 261-274.
365. Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361-370.
366. Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
367. Linscheer, W.G., and Vergroesen, A.J. (1994). Lipids. *Modern Nutrition in Health and Disease*.
368. Liu, L., Herukka, S.K., Minkeviciene, R., van Groen, T., and Tanila, H. (2004). Longitudinal observation on CSF Abeta42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice. *Neurobiol Dis* 17, 516-523.
369. Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe, H.S., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L., and Bu, G. (2007). Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56, 66-78.
370. Liu, Q., and Zhang, J. (2014). Lipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 30, 331-345.
371. Liu, Y., Studzinski, C., Beckett, T., Guan, H., Hersh, M.A., Murphy, M.P., Klein, R., and Hersh, L.B. (2009). Expression of neprilysin in skeletal muscle reduces amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Mol Ther* 17, 1381-1386.

- 372.Liu, Z., Zhu, H., Fang, G.G., Walsh, K., Mwamburi, M., Wolozin, B., Abdul-Hay, S.O., Ikezu, T., Leissring, M.A., and Qiu, W.Q. (2012). Characterization of insulin degrading enzyme and other amyloid-beta degrading proteases in human serum: a role in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 29, 329-340.
- 373.Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- 374.Llorente, A., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2007). Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur J Cell Biol* 86, 405-415.
- 375.London, E., and Brown, D.A. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et biophysica acta* 1508, 182-195.
- 376.Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995). Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65, 1009-1025.
- 377.Lu, D.C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R.F., Ellerby, L.M., Ye, X., Salvesen, G.S., Koo, E.H., and Bredesen, D.E. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med* 6, 397-404.
- 378.Lukiw, W.J., Cui, J.G., Marcheselli, V.L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C.N., and Bazan, N.G. (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115, 2774-2783.
- 379.Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Jr., Das, S., and Potter, H. (1994). Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372, 92-94.
- 380.Ma, Q.L., Yang, F., Rosario, E.R., Ubeda, O.J., Beech, W., Gant, D.J., Chen, P.P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y., Vinters, H.V., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci* 29, 9078-9089.
- 381.Madani, R., Poirier, R., Wolfer, D.P., Welzl, H., Groscurth, P., Lipp, H.P., Lu, B., El Mouedden, M., Mercken, M., Nitsch, R.M., and Mohajeri, M.H. (2006). Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit in vivo. *J Neurosci Res* 84, 1871-1878.
- 382.Magara, F., Muller, U., Li, Z.W., Lipp, H.P., Weissmann, C., Stagljar, M., and Wolfer, D.P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4656-4661.
- 383.Mahley, R.W., Nathan, B.P., and Pitas, R.E. (1996). Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777, 139-145.
- 384.Malapaka, R.R., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J.H., Zhou, X.E., Xu, Y., Gong, Y., Li, J., Yong, E.L., Chalmers, M.J., Chang, L., Resau, J.H., Griffin, P.R., Chen, Y.E., and Xu, H.E. (2012). Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 287, 183-195.
- 385.Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J., and Schofield, P.R. (1988). Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* 229, 206-210.
- 386.Malito, E., Hulse, R.E., and Tang, W.J. (2008). Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell Mol Life Sci* 65, 2574-2585.
- 387.Mally, M., Peterlin, P., and Svetina, S. (2013). Partitioning of oleic acid into phosphatidylcholine membranes is amplified by strain. *J Phys Chem B* 117, 12086-12094.
- 388.Maloney, B., and Lahiri, D.K. (2011). The Alzheimer's amyloid beta-peptide (Abeta) binds a specific DNA Abeta-interacting domain (AbetaID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. *Gene* 488, 1-12.
- 389.Mann, N.J., O'Connell, S.L., Baldwin, K.M., Singh, I., and Meyer, B.J. (2010). Effects of seal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects. *Lipids* 45, 669-681.
- 390.Maqsood, S., Benjakul, S., and Kamal-Eldin, A. (2012). Extraction, processing, and stabilization of health-promoting fish oils. *Recent Pat Food Nutr Agric* 4, 141-147.
- 391.Marina, A.M., Man, Y.B., Nazimah, S.A., and Amin, I. (2009). Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *Int J Food Sci Nutr* 60 Suppl 2, 114-123.
- 392.Markesbery, W.R., Kryscio, R.J., Lovell, M.A., and Morrow, J.D. (2005). Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 58, 730-735.
- 393.Marlowe, L., Peila, R., Benke, K.S., Hardy, J., White, L.R., Launer, L.J., and Myers, A. (2006). Insulin-degrading enzyme haplotypes affect insulin levels but not dementia risk. *Neuro-degenerative diseases* 3, 320-326.
- 394.Marr, R.A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M.S., Hersh, L.B., Gage, F.H., Verma, I.M., and Masliah, E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23, 1992-1996.

395. Marteinsdottir, I., Horrobin, D.F., Stenfors, C., Theodorsson, E., and Mathe, A.A. (1998). Changes in dietary fatty acids alter phospholipid fatty acid composition in selected regions of rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22, 1007-1021.
396. Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., and Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757-2763.
397. Mathieu, G., Denis, S., Langelier, B., Denis, I., Laviaille, M., and Vancassel, S. (2010). DHA enhances the noradrenaline release by SH-SY5Y cells. *Neurochem Int* 56, 94-100.
398. Matsas, R., Kenny, A.J., and Turner, A.J. (1986). An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience* 18, 991-1012.
399. Matsuzaki, K., Kato, K., and Yanagisawa, K. (2010). Abeta polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 868-877.
400. Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774.
401. McDermott, J.R., and Gibson, A.M. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res* 22, 49-56.
402. McMurray, J.J., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R., Investigators, P.-H., and Committees (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *The New England journal of medicine* 371, 993-1004.
403. Meilandt, W.J., Cisse, M., Ho, K., Wu, T., Esposito, L.A., Scarce-Levie, K., Cheng, I.H., Yu, G.Q., and Mucke, L. (2009). Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic Abeta oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 29, 1977-1986.
404. Mett, J., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2016). The Effects of Glycerophospholipids and Fatty Acids on APP Processing: Implications for Alzheimer's Disease. *Handbook of Lipids in Human Function: Fatty acids*, 377-421.
405. Mikulca, J.A., Nguyen, V., Gajdosik, D.A., Teklu, S.G., Giunta, E.A., Lessa, E.A., Tran, C.H., Terak, E.C., and Raffa, R.B. (2014). Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther* 39, 25-37.
406. Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., and Thiele, D.L. (2003). Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6221-6226.
407. Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9, 129-137.
408. Miners, J.S., Van Helmond, Z., Chalmers, K., Wilcock, G., Love, S., and Kehoe, P.G. (2006). Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 1012-1021.
409. Miners, J.S., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008a). Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of insulin-degrading enzyme activity in brain tissue homogenates. *J Neurosci Methods* 169, 177-181.
410. Miners, J.S., Verbeek, M.M., Rikkert, M.O., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008b). Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* 167, 229-236.
411. Miners, J.S., Baig, S., Tayler, H., Kehoe, P.G., and Love, S. (2009). Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 902-914.
412. Miners, J.S., Barua, N., Kehoe, P.G., Gill, S., and Love, S. (2011). Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 944-959.
413. Miners, S., van Helmond, Z., Barker, R., Passmore, P.A., Johnston, J.A., Todd, S., McGuinness, B.M., Panza, F., Seripa, D., Solfrizzi, V., Love, S., Prince, J.A., and Kehoe, P.G. (2012). Genetic variation in MME in relation to neprilysin protein and enzyme activity, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3, 30-38.
414. Mohsenzadegan, M., and Mirshafiey, A. (2012). The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 11, 203-216.
415. Montine, T.J., Amarnath, V., Martin, M.E., Strittmatter, W.J., and Graham, D.G. (1996). E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *Am J Pathol* 148, 89-93.
416. Montine, T.J., and Morrow, J.D. (2005). Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 166, 1283-1289.
417. Moore, T.J., Lione, A.P., Sugden, M.C., and Regen, D.M. (1976). Beta-hydroxybutyrate transport in rat brain: developmental and dietary modulations. *Am J Physiol* 230, 619-630.
418. Morelli, L., Llovera, R., Gonzalez, S.A., Affranchino, J.L., Prelli, F., Frangione, B., Ghiso, J., and Castano, E.M. (2003). Differential degradation of amyloid beta genetic variants associated with hereditary dementia or stroke by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* 278, 23221-23226.

419. Morishima-Kawashima, M. (2014). Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the beta-carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by gamma-secretase. *Front Physiol* 5, 463.
420. Morris, A.A. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *J Inher Metab Dis* 28, 109-121.
421. Morris, J.C., Heyman, A., Mohs, R.C., Hughes, J.P., van Belle, G., Fillenbaum, G., Mellits, E.D., and Clark, C. (1989). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 39, 1159-1165.
422. Morris, J.C., Edland, S., Clark, C., Galasko, D., Koss, E., Mohs, R., van Belle, G., Fillenbaum, G., and Heyman, A. (1993). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part IV. Rates of cognitive change in the longitudinal assessment of probable Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 2457-2465.
423. Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., and Schneider, J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60, 940-946.
424. Morris, M.C., and Tangney, C.C. (2014). Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol Aging* 35 Suppl 2, S59-64.
425. Mouton, P.R., Martin, L.J., Calhoun, M.E., Dal Forno, G., and Price, D.L. (1998). Cognitive decline strongly correlates with cortical atrophy in Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging* 19, 371-377.
426. Mueller-Stener, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E.D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L., and Gan, L. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 51, 703-714.
427. Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-347.
428. Muller, T., Concannon, C.G., Ward, M.W., Walsh, C.M., Tirniceriu, A.L., Tribl, F., Kogel, D., Prehn, J.H., and Egensperger, R. (2007). Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell* 18, 201-210.
429. Muller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85, 393-406.
430. Müller, U., and Wild, K. (2013). Structure and Function of the APP Intracellular Domain in Health and Disease. *Understanding Alzheimer's Disease*.
431. Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5, 197-206.
432. Muskiet, F.A., van Goor, S.A., Kuipers, R.S., Velzing-Aarts, F.V., Smit, E.N., Bouwstra, H., Dijck-Brouwer, D.A., Boersma, E.R., and Hadders-Algra, M. (2006). Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 135-144.
433. Nafar, F., and Mearow, K.M. (2014). Coconut oil attenuates the effects of amyloid-beta on cortical neurons in vitro. *J Alzheimers Dis* 39, 233-237.
434. Nagase, H., and Nakayama, K. (2014). The Intracellular Domain of Amyloid Precursor Protein is a Potential Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Curr Drug Discov Technol* 11, 243-258.
435. Nakaya, T., and Suzuki, T. (2006). Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD. *Genes Cells* 11, 633-645.
436. Nakayama, K., Ohkawara, T., Hiratochi, M., Koh, C.S., and Nagase, H. (2008). The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. *Neurosci Lett* 444, 127-131.
437. Nalivaeva, N.N., Beckett, C., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012a). Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 120 Suppl 1, 167-185.
438. Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., Lewis, D.I., Pickles, A.R., Makova, N.Z., Bagrova, D.I., Dubrovskaya, N.M., Plesneva, S.A., Zhuravin, I.A., and Turner, A.J. (2012b). Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J Mol Neurosci* 46, 569-577.
439. Neufassung der Leitsätze für Speisefette und -öle (2011). Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft.
440. Nevin, K.G., and Rajamohan, T. (2004). Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clin Biochem* 37, 830-835.
441. Newman, A.B., Fitzpatrick, A.L., Lopez, O., Jackson, S., Lyketsos, C., Jagust, W., Ives, D., Dekosky, S.T., and Kuller, L.H. (2005). Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort. *J Am Geriatr Soc* 53, 1101-1107.
442. Newman, J.C., and Verdin, E. (2014a). Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab* 25, 42-52.
443. Newman, J.C., and Verdin, E. (2014b). beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite. *Diabetes Res Clin Pract* 106, 173-181.
444. Newport, M. (2008). What if there was a cure for Alzheimer's disease and no one knew? A case study. www.coconutketones.com/whatifcure.pdf.

445. Newport, M.T., VanItallie, T.B., Kashiwaya, Y., King, M.T., and Veech, R.L. (2015). A new way to produce hyperketonemia: use of ketone ester in a case of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 11, 99-103.
446. Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L., and Silver, D.L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503-506.
447. Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H., Yhlen, B., Anggard, E.E., and Halliwell, B. (1999). F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72, 734-740.
448. Nunan, J., Williamson, N.A., Hill, A.F., Sernee, M.F., Masters, C.L., and Small, D.H. (2003). Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein. *J Neurosci Res* 74, 378-385.
449. O'Brien, J.S., and Sampson, E.L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 6, 537-544.
450. Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., and Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129-10140.
451. Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 1063-1070.
452. Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K., and Dale, G.E. (2000). Structure of human neutral endopeptidase (Nepriylsin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296, 341-349.
453. Oehlenschlaeger, J. (2012). Seafood: nutritional benefits and risk aspects. *Int J Vitam Nutr Res* 82, 168-176.
454. Oh, M., Im, I., Lee, Y.J., Kim, Y.H., Yoon, J.H., Park, H.G., Higashiyama, S., Kim, Y.C., and Park, W.J. (2004). Structure-based virtual screening and biological evaluation of potent and selective ADAM12 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 6071-6074.
455. Ohkawara, T., Nagase, H., Koh, C.S., and Nakayama, K. (2011). The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene* 475, 1-9.
456. Ohnuma, T., Toda, A., Kimoto, A., Takebayashi, Y., Higashiyama, R., Tagata, Y., Ito, M., Ota, T., Shibata, N., and Arai, H. (2016). Benefits of use, and tolerance of, medium-chain triglyceride medical food in the management of Japanese patients with Alzheimer's disease: a prospective, open-label pilot study. *Clinical interventions in aging* 11, 29-36.
457. Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* 11, 1907-1913.
458. Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D.H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., Ikezoe, K., Furuya, H., Kawarabayashi, T., Shoji, M., Checler, F., Iwaki, T., Makifuchi, T., Takeda, K., Kira, J., and Tabira, T. (2005). Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19, 255-257.
459. Ollendorf, D.A., Sandhu, A.T., Chapman, R., Heidenreich, P.A., Russo, E., Shore, K.K., Synnott, P., Travers, K., Weissberg, J., and Pearson, S.D. (2015). CardioMEMS™ HF System (St. Jude Medical, Inc.) and Sacubitril/Valsartan (Entresto™, Novartis AG) for Management of Congestive Heart Failure. Institute for Clinical and Economic Review.
460. Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53, 1937-1942.
461. Ouellet, M., Emond, V., Chen, C.T., Julien, C., Bourasset, F., Oddo, S., LaFerla, F., Bazinet, R.P., and Calon, F. (2009). Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int* 55, 476-482.
462. Ozturk, A., DeKosky, S.T., and Kamboh, M.I. (2006). Lack of association of 5 SNPs in the vicinity of the insulin-degrading enzyme (IDE) gene with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 406, 265-269.
463. Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101, 942-948.
464. Pan, J.W., Rothman, T.L., Behar, K.L., Stein, D.T., and Hetherington, H.P. (2000). Human brain beta-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting-induced ketosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1502-1507.
465. Papandreou, C.N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C.L., Reuter, V.E., Powell, C.T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H.I., Albino, A.P., and Nanus, D.M. (1998). Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4, 50-57.
466. Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Muller, U., St George Hyslop, P., and Checler, F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554.
467. Pardossi-Piquard, R., Dunys, J., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Sevalle, J., Pimplikar, S., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2007). Response to correspondence: Pardossi-Piquard et

- al., "Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAAPP and APLP." *Neuron* 46, 541-554. *Neuron* 53, 483-486.
468. Parks, J.K., Smith, T.S., Trimmer, P.A., Bennett, J.P., Jr., and Parker, W.D., Jr. (2001). Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem* 76, 1050-1056.
469. Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38, 9728-9734.
470. Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis* 2, 289-301.
471. Pawlosky, R.J., Hibbeln, J.R., Novotny, J.A., and Salem, N., Jr. (2001). Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42, 1257-1265.
472. Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R.F., and et al. (1995). A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7, 297-301.
473. Perez, A., Morelli, L., Cresto, J.C., and Castano, E.M. (2000). Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res* 25, 247-255.
474. Perez, S.E., Berg, B.M., Moore, K.A., He, B., Counts, S.E., Fritz, J.J., Hu, Y.S., Lazarov, O., Lah, J.J., and Mufson, E.J. (2010). DHA diet reduces AD pathology in young APPsw/PS1 Delta E9 transgenic mice: possible gender effects. *J Neurosci Res* 88, 1026-1040.
475. Petersen, R.C., Smith, G.E., Waring, S.C., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., and Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56, 303-308.
476. Phuyal, S., Hessvik, N.P., Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 281, 2214-2227.
477. Piironen, V., Lindsay, D.G., T.A., M., Toivo, J., and Lampi, A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80, 939-966.
478. Pinnix, I., Ghiso, J.A., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2013). Major carboxyl terminal fragments generated by gamma-secretase processing of the Alzheimer amyloid precursor are 50 and 51 amino acids long. *Am J Geriatr Psychiatry* 21, 474-483.
479. Plassman, B.L., Langa, K.M., Fisher, G.G., Heeringa, S.G., Weir, D.R., Ofstedal, M.B., Burke, J.R., Hurd, M.D., Potter, G.G., Rodgers, W.L., Steffens, D.C., Willis, R.J., and Wallace, R.B. (2007). Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology* 29, 125-132.
480. Poirier, R., Wolfert, D.P., Welzl, H., Tracy, J., Galsworthy, M.J., Nitsch, R.M., and Mohajeri, M.H. (2006). Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of Abeta-related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis* 24, 475-483.
481. Polidori, M.C., Pientka, L., and Mecocci, P. (2012). A review of the major vascular risk factors related to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 32, 521-530.
482. Preston, S.D., Steart, P.V., Wilkinson, A., Nicoll, J.A., and Weller, R.O. (2003). Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29, 106-117.
483. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.
484. Probst, A., Langui, D., and Ulrich, J. (1991). Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol* 1, 229-239.
485. Pryor, W.A., and Porter, N.A. (1990). Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 8, 541-543.
486. Puchowicz, M.A., Xu, K., Sun, X., Ivy, A., Emancipator, D., and LaManna, J.C. (2007). Diet-induced ketosis increases capillary density without altered blood flow in rat brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1607-1615.
487. Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
488. Qing, H., He, G., Ly, P.T., Fox, C.J., Staufienbiel, M., Cai, F., Zhang, Z., Wei, S., Sun, X., Chen, C.H., Zhou, W., Wang, K., and Song, W. (2008). Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 205, 2781-2789.
489. Qiu, W.Q., Ye, Z., Kholodenko, D., Seubert, P., and Selkoe, D.J. (1997). Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem* 272, 6641-6646.
490. Qiu, W.Q., Walsh, D.M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisky, M.B., Rosner, M.R., Safavi, A., Hersh, L.B., and Selkoe, D.J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273, 32730-32738.

491. Qiu, W.Q., and Folstein, M.F. (2006). Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27, 190-198.
492. Quinn, J.F., Raman, R., Thomas, R.G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E.B., Van Dyck, C., Galvin, J.E., Emond, J., Jack, C.R., Jr., Weiner, M., Shinto, L., and Aisen, P.S. (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 304, 1903-1911.
493. Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11172-11177.
494. Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373-383.
495. Rebello, C.J., Keller, J.N., Liu, A.G., Johnson, W.D., and Greenway, F.L. (2015). Pilot feasibility and safety study examining the effect of medium chain triglyceride supplementation in subjects with mild cognitive impairment: A randomized controlled trial. *BBA Clin* 3, 123-125.
496. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 108-120.
497. Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., and Pappolla, M.A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7, 321-331.
498. Reger, M.A., Henderson, S.T., Hale, C., Cholerton, B., Baker, L.D., Watson, G.S., Hyde, K., Chapman, D., and Craft, S. (2004). Effects of beta-hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. *Neurobiol Aging* 25, 311-314.
499. Reiman, E.M., Quiroz, Y.T., Fleisher, A.S., Chen, K., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Fagan, A.M., Shah, A.R., Alvarez, S., Arbelaez, A., Giraldo, M., Acosta-Baena, N., Sperling, R.A., Dickerson, B., Stern, C.E., Tirado, V., Munoz, C., Reiman, R.A., Huentelman, M.J., Alexander, G.E., Langbaum, J.B., Kosik, K.S., Tariot, P.N., and Lopera, F. (2012). Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol* 11, 1048-1056.
500. Reinhardt, S., Schuck, F., Grosgen, S., Riemenschneider, M., Hartmann, T., Postina, R., Grimm, M., and Endres, K. (2014). Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J* 28, 978-997.
501. Relton, J.M., Gee, N.S., Matsas, R., Turner, A.J., and Kenny, A.J. (1983). Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *Biochem J* 215, 519-523.
502. Riddell, D.R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11, 1288-1293.
503. Riemer, J., and Kins, S. (2013). Axonal transport and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases* 12, 111-124.
504. Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., Wolfert, D.P., and Muller, U.C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27, 7817-7826.
505. Robinson, A., Grosgen, S., Mett, J., Zimmer, V.C., Hauptenthal, V.J., Hundsdorfer, B., Stahlmann, C.P., Slobodskoy, Y., Muller, U.C., Hartmann, T., Stein, R., and Grimm, M.O. (2014). Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13, 263-272.
506. Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z., and Puigserver, P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 582, 46-53.
507. Rogaeva, E.A., Fafel, K.C., Song, Y.Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., Richard, E., Rogaev, E.I., Frommelt, P., Sadovnick, A.D., Meschino, W., Rockwood, K., Boss, M.A., Mayeux, R., and St George-Hyslop, P. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology* 57, 621-625.
508. Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J., and Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40, 260-269.
509. Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., Sorocea, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens, C., and Schwartz, J.C. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288, 286-288.
510. Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C., and Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45, 87-146.
511. Ross, R.A., Spengler, B.A., and Biedler, J.L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71, 741-747.
512. Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hauptenthal, V.J., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Mett, J., Riemenschneider, M., Grimm, H.S., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2012). Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012, 141240.

513. Russo, R., Borghi, R., Markesbery, W., Tabaton, M., and Piccini, A. (2005). Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett* 579, 6027-6030.
514. Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zargone, T., Goate, A., Mayo, K., Perlmutter, D., Coma, M., Zhong, Z., and Zlokovic, B.V. (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* 13, 1029-1031.
515. Saido, T., and Leissring, M.A. (2012). Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006379.
516. Saido, T.C. (1998). Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol Aging* 19, S69-75.
517. Saido, T.C. (2013). Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89, 321-339.
518. Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C., and Hall, G.F. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 3842-3849.
519. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Press.
520. Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994a). Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem* 269, 1510-1517.
521. Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994b). APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol Dis* 1, 13-24.
522. Sarda, N., Gharib, A., Moliere, P., Grange, E., Bobillier, P., and Lagarde, M. (1991). Docosahexaenoic acid (cervonic acid) incorporation into different brain regions in the awake rat. *Neurosci Lett* 123, 57-60.
523. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2, 835-841.
524. Sastry, P.S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Progress in lipid research* 24, 69-176.
525. Sato, H., Tomimoto, H., Ohtani, R., Kitano, T., Kondo, T., Watanabe, M., Oka, N., Akiguchi, I., Furuya, S., Hirabayashi, Y., and Okazaki, T. (2005). Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 130, 657-666.
526. Saul, A., Sprenger, F., Bayer, T.A., and Wirths, O. (2013). Accelerated tau pathology with synaptic and neuronal loss in a novel triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34, 2564-2573.
527. Savage, M.J., Trusko, S.P., Howland, D.S., Pinsker, L.R., Mistretta, S., Reaume, A.G., Greenberg, B.D., Siman, R., and Scott, R.W. (1998). Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J Neurosci* 18, 1743-1752.
528. Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G., and Smith, M.A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68, 2092-2097.
529. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
530. Scheff, S.W., and Price, D.A. (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33, 190-199.
531. Scheff, S.W., and Price, D.A. (1998). Synaptic density in the inner molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 1146-1153.
532. Scheinfeld, M.H., Matsuda, S., and D'Adamio, L. (2003). JNK-interacting protein-1 promotes transcription of A beta protein precursor but not A beta precursor-like proteins, mechanistically different than Fe65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1729-1734.
533. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.
534. Schott, J.M., Price, S.L., Frost, C., Whitwell, J.L., Rossor, M.N., and Fox, N.C. (2005). Measuring atrophy in Alzheimer disease: a serial MRI study over 6 and 12 months. *Neurology* 65, 119-124.
535. Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
536. Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C.N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874.
537. Schwartz, J.C., de la Baume, S., Malfroy, B., Patey, G., Perdrisot, R., Swerts, J.P., Fournie-Zaluski, M.C., Gacel, G., and Roques, B.P. (1980). "Enkephalinase", a newly characterised dipeptidyl carboxypeptidase: properties and possible role in enkephalinergic transmission. *Int J Neurol* 14, 195-204.

538. Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-597.
539. Serhan, C.N. (2006). Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin* 24, 341-364.
540. Shaikh, S.R., and Edidin, M. (2008). Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection. *Chem Phys Lipids* 153, 24-33.
541. 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., and Selkoe, D.J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837-842.
542. Sharma, A., Bemis, M., and Desilets, A.R. (2014). Role of Medium Chain Triglycerides (Axona(R)) in the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 29, 409-414.
543. Shearman, M.S., Beher, D., Clarke, E.E., Lewis, H.D., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A.L., Stevenson, G., and Castro, J.L. (2000). L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry* 39, 8698-8704.
544. Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M.R., and Tang, W.J. (2006). Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* 443, 870-874.
545. Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., and St George-Hyslop, P.H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
546. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., and Zlokovic, B.V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489-1499.
547. Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., Newgard, C.B., Farese, R.V., Jr., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., and Verdin, E. (2013). Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211-214.
548. Siepman, M. (2009). Dissertation: Regulatorische Funktion der Phosphorylierung von Nephrylysin in der Lokalisation an der Plasmamembran und der Interaktion mit dem Tumorsuppressor PTEN. Universität Bonn.
549. Sigman, J.A., Patwa, T.H., Tablante, A.V., Joseph, C.D., Glucksman, M.J., and Wolfson, A.J. (2005). Flexibility in substrate recognition by thimet oligopeptidase as revealed by denaturation studies. *Biochem J* 388, 255-261.
550. Slack, B.E., Ma, L.K., and Seah, C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J* 357, 787-794.
551. Slunt, H.H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A.C., Tanzi, R.E., and Sisodia, S.S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269, 2637-2644.
552. 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., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
553. Smith, Q.R., and Nagura, H. (2001). Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *J Mol Neurosci* 16, 167-172; discussion 215-121.
554. Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Muller, U., Kins, S., and Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24, 3624-3634.
555. Soderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26, 421-425.
556. Song, C., Shieh, C.H., Wu, Y.S., Kalueff, A., Gaikwad, S., and Su, K.P. (2016). The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: Acting separately or synergistically? *Progress in lipid research* 62, 41-54.
557. Song, E.S., Juliano, M.A., Juliano, L., and Hersh, L.B. (2003). Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J Biol Chem* 278, 49789-49794.
558. Spector, A.A., and Yorek, M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26, 1015-1035.
559. Spector, R. (1988). Fatty acid transport through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 50, 639-643.
560. Spencer, B., Marr, R.A., Rockenstein, E., Crews, L., Adame, A., Potkar, R., Patrick, C., Gage, F.H., Verma, I.M., and Masliah, E. (2008). Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9, 109.

561. Sprecher, C.A., Grant, F.J., Grimm, G., O'Hara, P.J., Norris, F., Norris, K., and Foster, D.C. (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 32, 4481-4486.
562. Sprecher, H., and Chen, Q. (1999). Polyunsaturated fatty acid biosynthesis: a microsomal-peroxisomal process. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60, 317-321.
563. St George-Hyslop, P. (2000). Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 7, 546-548.
564. Stachel, S.J., Coburn, C.A., Steele, T.G., Jones, K.G., Loutzenhiser, E.F., Gregro, A.R., Rajapakse, H.A., Lai, M.T., Crouthamel, M.C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J.E., Pietrak, B.L., Espeseth, A.S., Shi, X.P., Chen-Dodson, E., Holloway, M.K., Munshi, S., Simon, A.J., Kuo, L., and Vacca, J.P. (2004). Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem* 47, 6447-6450.
565. Stargardt, A., Gillis, J., Kamphuis, W., Wiemhoefer, A., Kooijman, L., Raspe, M., Benckhuijsen, W., Drijfhout, J.W., Hol, E.M., and Reits, E. (2013). Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APP^{swe}PS1^{dE9} and 3xTg-AD mouse models. *Aging Cell* 12, 499-507.
566. Stillwell, W., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Siddiqui, R., and Wassall, S.R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45, 559-579.
567. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.
568. Studzinski, C.M., MacKay, W.A., Beckett, T.L., Henderson, S.T., Murphy, M.P., Sullivan, P.G., and Burnham, W.M. (2008). Induction of ketosis may improve mitochondrial function and decrease steady-state amyloid-beta precursor protein (APP) levels in the aged dog. *Brain Res* 1226, 209-217.
569. Su, H.M. (2010). Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21, 364-373.
570. Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., and Suzuki, T. (2005). Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem* 280, 42364-42374.
571. Sun, Z.X., Zhou, Q.H., and Sui, S.F. (2005). Cholesterol depletion inhibits the degradation of amyloid beta-peptide in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci Lett* 391, 71-75.
572. Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M.A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., and Tabaton, M. (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 10, 279-288.
573. Tamaoka, A., Sawamura, N., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Shoji, S., and Mori, H. (1995). Amyloid beta protein 1-42/43 (A beta 1-42/43) in cerebellar diffuse plaques: enzyme-linked immunosorbent assay and immunocytochemical study. *Brain Res* 679, 151-156.
574. Tamboli, I.Y., Barth, E., Christian, L., Siepmann, M., Kumar, S., Singh, S., Tolksdorf, K., Heneka, M.T., Lutjohann, D., Wunderlich, P., and Walter, J. (2010). Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* 285, 37405-37414.
575. Tanford, C. (1987). Amphiphile orientation: physical chemistry and biological function. *Biochem Soc Trans* 15 Suppl, 1S-7S.
576. Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
577. Tariot, P.N., Schneider, L.S., Cummings, J., Thomas, R.G., Raman, R., Jakimovich, L.J., Loy, R., Bartocci, B., Fleisher, A., Ismail, M.S., Porsteinsson, A., Weiner, M., Jack, C.R., Jr., Thal, L., Aisen, P.S., and Alzheimer's Disease Cooperative Study, G. (2011). Chronic divalproex sodium to attenuate agitation and clinical progression of Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 68, 853-861.
578. Thinakaran, G., Slunt, H.H., Spitzer, L., Lee, M.K., Sisodia, S.S. (1995). Tissue distribution and developmental expression of the amyloid precursor protein homolog, APLP1. *SocNeurosciAbstr* 21.
579. Tian, Y., Bassit, B., Chau, D., and Li, Y.M. (2010). An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production. *Nat Struct Mol Biol* 17, 151-158.
580. Tiraboschi, P., Hansen, L.A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L.J., and Corey-Bloom, J. (2004). Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62, 1977-1983.
581. Touboul, D., and Gaudin, M. (2014). Lipidomics of Alzheimer's disease. *Bioanalysis* 6, 541-561.
582. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
583. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-1247.
584. Tso, P., and Fujimoto, K. (1991). The absorption and transport of lipids by the small intestine. *Brain Res Bull* 27, 477-482.

585. Tucker, H.M., Simpson, J., Kihiko-Ehmann, M., Younkin, L.H., McGillis, J.P., Younkin, S.G., Degen, J.L., and Estus, S. (2004). Plasmin deficiency does not alter endogenous murine amyloid beta levels in mice. *Neurosci Lett* 368, 285-289.
586. Tully, A.M., Roche, H.M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D., and Gibney, M.J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* 89, 483-489.
587. Tuohimaa, P., Keisala, T., Minasyan, A., Cachat, J., and Kalueff, A. (2009). Vitamin D, nervous system and aging. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S278-286.
588. Turner, A.J., Isaac, R.E., and Coates, D. (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23, 261-269.
589. Uhlik, M.T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A.J., Siderovski, D.P., and Johnson, G.L. (2005). Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* 345, 1-20.
590. Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., and Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med* 18, 421-430.
591. Van der Auwera, I., Wera, S., Van Leuven, F., and Henderson, S.T. (2005). A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)* 2, 28.
592. van Echten-Deckert, G., and Walter, J. (2012). Sphingolipids: critical players in Alzheimer's disease. *Progress in lipid research* 51, 378-393.
593. van Gelder, B.M., Tjhuis, M., Kalmijn, S., and Kromhout, D. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 85, 1142-1147.
594. Van Kuijk, F.J., Holte, L.L., and Dratz, E.A. (1990). 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1043, 116-118.
595. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
596. Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W.Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M.R., and Selkoe, D.J. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20, 1657-1665.
597. Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., and Bordet, R. (2009). PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 34, 199-211.
598. Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., and Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279, 44945-44954.
599. Villariba, C.C. (2011). Virgin coconut oil hailed as cure for Alzheimer's. www.newsinfo.inquirer.net.
600. Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoeker, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C.C., Masters, C.L., Australian Imaging, B., and Lifestyle Research, G. (2013). Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357-367.
601. Virchow, R. (1854a). Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Virchows Arch. Pathol. Anat* 6, 135-138.
602. Virchow, R. (1854b). Weitere Mitteilungen über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 6, 268-271.
603. von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117, 4435-4448.
604. Vysakh, A., Ratheesh, M., Rajmohan, T.P., Pramod, C., Premalal, S., Girish kumar, B., and Sibi, P.I. (2014). Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. *Int Immunopharmacol* 20, 124-130.
605. Waldron, E., Isbert, S., Kern, A., Jaeger, S., Martin, A.M., Hebert, S.S., Behl, C., Weggen, S., De Strooper, B., and Pietrzik, C.U. (2008). Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Exp Cell Res* 314, 2419-2433.
606. Walsh, D.M., Fadeeva, J.V., LaVoie, M.J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W.T., Wasco, W., and Selkoe, D.J. (2003). gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664-6673.
607. Wang, C., Chung, M., Lichtenstein, A., Balk, E., Kupelnick, B., DeVine, D., Lawrence, A., and Lau, J. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 1-8.
608. Wang, D.S., Lipton, R.B., Katz, M.J., Davies, P., Buschke, H., Kuslansky, G., Verghese, J., Younkin, S.G., Eckman, C., and Dickson, D.W. (2005a). Decreased neprilysin immunoreactivity in Alzheimer disease, but not in pathological aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 378-385.

609. Wang, H., Zang, C., Liu, X.S., and Aster, J.C. (2015a). The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *J Cell Physiol* 230, 982-988.
610. Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Dominguez, B., Lee, K.F., Gan, W.B., and Zheng, H. (2005b). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-1225.
611. Wang, R., Wang, S., Malter, J.S., and Wang, D.S. (2009). Effects of HNE-modification induced by Abeta on neprilysin expression and activity in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 108, 1072-1082.
612. Wang, S., Wang, R., Chen, L., Bennett, D.A., Dickson, D.W., and Wang, D.S. (2010). Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem* 115, 47-57.
613. Wang, S., He, F., and Wang, Y. (2015b). Association between polymorphisms of the insulin-degrading enzyme gene and late-onset Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 28, 94-98.
614. Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.
615. Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., and Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95-100.
616. Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
617. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825-2835.
618. Weihrauch, J.L., and Gardner, J.M. (1978). Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc* 73, 39-47.
619. Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862.
620. Weller, R.O., Massey, A., Kuo, Y.M., and Roher, A.E. (2000). Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A beta in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 903, 110-117.
621. Weller, R.O., Preston, S.D., Subash, M., and Carare, R.O. (2009). Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther* 1, 6.
622. Whelan, J., and Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annu Rev Nutr* 26, 75-103.
623. Whiley, L., Sen, A., Heaton, J., Proitsi, P., Garcia-Gomez, D., Leung, R., Smith, N., Thambisetty, M., Kloszewska, I., Mecocci, P., Soininen, H., Tsolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., Legido-Quigley, C., and AddNeuroMed, C. (2014). Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35, 271-278.
624. White, B. (2009). Dietary fatty acids. *Am Fam Physician* 80, 345-350.
625. White, J.A., Manelli, A.M., Holmberg, K.H., Van Eldik, L.J., and Ladu, M.J. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* 18, 459-465.
626. Wiktorowska-Owczarek, A., Berezinska, M., and Nowak, J.Z. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* 24, 931-941.
627. Wiley, J.C., Smith, E.A., Hudson, M.P., Ladiges, W.C., and Bothwell, M. (2007). Fe65 stimulates proteolytic liberation of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain. *J Biol Chem* 282, 33313-33325.
628. Williams, T.I., Lynn, B.C., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2006). Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27, 1094-1099.
629. Winkler, E., Kamp, F., Scheuring, J., Ebke, A., Fukumori, A., and Steiner, H. (2012). Generation of Alzheimer disease-associated amyloid beta42/43 peptide by gamma-secretase can be inhibited directly by modulation of membrane thickness. *J Biol Chem* 287, 21326-21334.
630. Wisniewski, T., Dowjat, W.K., Buxbaum, J.D., Khorkova, O., Efthimiopoulos, S., Kulczycki, J., Lojewska, W., Wegiel, J., Wisniewski, H.M., and Frangione, B. (1998). A novel Polish presenilin-1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer's disease and leads to death as early as the age of 28 years. *Neuroreport* 9, 217-221.
631. Wlaz, P., Socala, K., Nieoczym, D., Luszczyki, J.J., Zarnowska, I., Zarnowski, T., Czuczwar, S.J., and Gasior, M. (2012). Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. *Neuropharmacology* 62, 1882-1889.
632. Wood, L.S., Pickering, E.H., McHale, D., and DeChairo, B.M. (2007). Association between neprilysin polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 427, 103-106.
633. World Alzheimer Report (2015). Alzheimer's Disease International (ADI), London.
634. Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschmeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived

- exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-10972.
635. Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., and Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453-457.
636. Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Milburn, M.V. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3, 397-403.
637. Xu, X., Zhou, H., and Boyer, T.G. (2011). Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling. *EMBO Rep* 12, 216-222.
638. Yadav, R.S., and Tiwari, N.K. (2014). Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 50, 168-176.
639. Yamada, K., and Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91, 267-270.
640. Yang, X., Sheng, W., Sun, G.Y., and Lee, J.C. (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58, 321-329.
641. Yang, X., Sun, G.Y., Eckert, G.P., and Lee, J.C. (2014). Cellular membrane fluidity in amyloid precursor protein processing. *Mol Neurobiol* 50, 119-129.
642. Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297, 97-100.
643. Yatin, S.M., Aksenova, M., Aksenov, M., Markesbery, W.R., Aulick, T., and Butterfield, D.A. (1998). Temporal relations among amyloid beta-peptide-induced free-radical oxidative stress, neuronal toxicity, and neuronal defensive responses. *J Mol Neurosci* 11, 183-197.
644. Yeap, S.K., Beh, B.K., Ali, N.M., Yusof, H.M., Ho, W.Y., Koh, S.P., Alitheen, N.B., and Long, K. (2015). Antistress and antioxidant effects of virgin coconut oil. *Exp Ther Med* 9, 39-42.
645. Yin, J.X., Maalouf, M., Han, P., Zhao, M., Gao, M., Dharshaun, T., Ryan, C., Whitelegge, J., Wu, J., Eisenberg, D., Reiman, E.M., Schweizer, F.E., and Shi, J. (2016). Ketones block amyloid entry and improve cognition in an Alzheimer's model. *Neurobiol Aging* 39, 25-37.
646. Yin, K.J., Cirrito, J.R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., Bateman, R., Song, H., Hsu, F.F., Turk, J., Xu, J., Hsu, C.Y., Mills, J.C., Holtzman, D.M., and Lee, J.M. (2006). Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci* 26, 10939-10948.
647. Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257-263.
648. Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 27, 14459-14469.
649. Young-Pearse, T.L., Chen, A.C., Chang, R., Marquez, C., and Selkoe, D.J. (2008). Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Dev* 3, 15.
650. Yu, C., Kim, S.H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., and Sisodia, S.S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J Biol Chem* 276, 43756-43760.
651. Yuyama, K., Sun, H., Sakai, S., Mitsutake, S., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y., and Igarashi, Y. (2014). Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289, 24488-24498.
652. Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y., and Igarashi, Y. (2015). A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. *FEBS Lett* 589, 84-88.
653. Zakaria, Z.A., Somchit, M.N., Mat Jais, A.M., Teh, L.K., Salleh, M.Z., and Long, K. (2011). In vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities of dried and fermented processed virgin coconut oil. *Med Princ Pract* 20, 231-236.
654. Zambrano, N., Minopoli, G., de Candia, P., and Russo, T. (1998). The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 273, 20128-20133.
655. Zanetti, O., Solerte, S.B., and Cantoni, F. (2009). Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr* 49 Suppl 1, 237-243.
656. Zavodnik, I.B., Zaborowski, A., Niekurzak, A., and Bryszewska, M. (1997). Effect of free fatty acids on erythrocyte morphology and membrane fluidity. *Biochem Mol Biol Int* 42, 123-133.
657. Zhang, W., Li, P., Hu, X., Zhang, F., Chen, J., and Gao, Y. (2011). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 2653-2670.
658. Zhang, Y., and Lee, D.H. (2011). Sink hypothesis and therapeutic strategies for attenuating Abeta levels. *Neuroscientist* 17, 163-173.

- 659.Zhang, Y., Wang, B., Wan, H., Zhou, Q., and Li, T. (2013). Meta-analysis of the insulin degrading enzyme polymorphisms and susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 541, 132-137.
- 660.Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.Z., Kim, S.H., and Xu, X. (2004). Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279, 50647-50650.
- 661.Zhao, J., Li, L., and Leissring, M.A. (2009). Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener* 4, 4.
- 662.Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B., and Pasinetti, G.M. (2007). Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 824-830.
- 663.Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y., and Van der Ploeg, L.H. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- 664.Zierenberg, O., and Grundy, S.M. (1982). Intestinal absorption of polyenephosphatidylcholine in man. *J Lipid Res* 23, 1136-1142.
- 665.Zilkha, K.J., and Mc, A.B. (1963). The phospholipid composition of cerebrospinal fluid in diseases associated with demyelination. *Q J Med* 32, 79-97.
- 666.Zinser, E.G. (2009). Dissertation: Pleiotroper Effekt der Ganglioside auf die APP-Prozessierung in der Alzheimer Krankheit. Universität Heidelberg.

7 ANHANG

Hirnproben Kontrollen, Amsterdam:

| Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak | Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak |
|-----|--------------|------------|-------|-------|-----|--------------|------------|-------|-------|
| 1 | 1990_042 | männl. | 76 | 1 | 102 | 2002_024 | weibl. | 75 | 1 |
| 7 | 1991_125 | männl. | 61 | 1 | 115 | 2003_006 | weibl. | 91 | 3 |
| 8 | 1992_026 | männl. | 83 | 1 | 124 | 2004_020 | männl. | 96 | 1 |
| 9 | 1992_029 | männl. | 79 | 2 | 126 | 2004_026 | weibl. | 91 | 1 |
| 14 | 1993_015 | männl. | 75 | 1 | 134 | 2004_049 | weibl. | 77 | 1 |
| 15 | 1993_035 | weibl. | 89 | 2 | 153 | 2005_032 | männl. | 74 | 0 |
| 27 | 1994_053 | männl. | 83 | 1 | 156 | 2005_044 | männl. | 80 | 0 |
| 28 | 1994_074 | weibl. | 85 | 0 | 157 | 2005_055 | männl. | 84 | 1 |
| 29 | 1994_076 | männl. | 78 | 2 | 158 | 2005_060 | männl. | 91 | 1 |
| 34 | 1995_092 | weibl. | 63 | 0 | 162 | 2005_073 | männl. | 87 | 3 |
| 35 | 1995_093 | männl. | 78 | 1 | 165 | 2005_083 | weibl. | 85 | 1 |
| 36 | 1995_097 | weibl. | 89 | 1 | 167 | 2006_008 | weibl. | 85 | 2 |
| 37 | 1995_101 | weibl. | 73 | 1 | 175 | 2006_080 | weibl. | 89 | 2 |
| 38 | 1996_032 | weibl. | 60 | 2 | 176 | 2007_007 | männl. | 84 | 1 |
| 39 | 1996_044 | weibl. | 90 | 2 | 177 | 2007_032 | weibl. | 87 | 3 |
| 40 | 1996_051 | weibl. | 71 | 2 | 178 | 2007_046 | männl. | 89 | 1 |
| 42 | 1996_078 | weibl. | 87 | 2 | 183 | 2008_032 | männl. | 71 | 2 |
| 43 | 1996_084 | weibl. | 78 | 2 | 188 | 2008_103 | männl. | 80 | 1 |
| 44 | 1996_085 | männl. | 84 | 1 | 189 | 2008_105 | weibl. | 89 | 3 |
| 45 | 1996_125 | männl. | 93 | 3 | 190 | 2009_001 | männl. | 88 | 2 |
| 46 | 1997_039 | männl. | 87 | 3 | 191 | 2009_003 | männl. | 62 | 1 |
| 54 | 1998_016 | weibl. | 82 | 1 | 195 | 2009_021 | weibl. | 99 | 2 |
| 57 | 1998_039 | männl. | 85 | 2 | 196 | 2009_022 | weibl. | 77 | 1 |
| 58 | 1998_049 | männl. | 87 | 2 | 197 | 2009_039 | männl. | 82 | 3 |
| 61 | 1998_089 | weibl. | 90 | 1 | 207 | 2009_075 | männl. | 88 | 3 |
| 63 | 2000_030 | männl. | 82 | 2 | 211 | 2009_095 | weibl. | 71 | 1 |
| 65 | 2000_106 | weibl. | 88 | 2 | 218 | 2010_007 | weibl. | 85 | 2 |
| 67 | 2000_137 | weibl. | 92 | 1 | 220 | 2010_015 | weibl. | 73 | 1 |
| 69 | 2000_142 | weibl. | 82 | 1 | 222 | 2010_039 | weibl. | 60 | 1 |
| 70 | 2001_006 | weibl. | 91 | 1 | 225 | 2010_062 | weibl. | 94 | 1 |
| 73 | 2001_017 | männl. | 79 | 1 | 228 | 2010_070 | weibl. | 60 | 1 |
| 75 | 2001_021 | männl. | 82 | 1 | | | | | |
| 76 | 2001_029 | weibl. | 90 | 1 | | | | | |
| 77 | 2001_046 | männl. | 88 | 1 | | | | | |
| 83 | 2001_079 | weibl. | 90 | 3 | | | | | |
| 85 | 2001_086 | männl. | 88 | 1 | | | | | |
| 87 | 2001_094 | männl. | 86 | 2 | | | | | |
| 89 | 2001_096 | weibl. | 77 | 1 | | | | | |
| 97 | 2001_139 | weibl. | 73 | 2 | | | | | |
| 101 | 2002_018 | weibl. | 92 | 1 | | | | | |

Hirnproben AD, Amsterdam;

| Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak | Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak |
|-----|--------------|------------|-------|-------|-----|--------------|------------|-------|-------|
| 2 | 1990_069 | weibl. | 91 | 4 | 78 | 2001_063 | männl. | 85 | 5 |
| 3 | 1990_117 | männl. | 86 | 5 | 79 | 2001_066 | weibl. | 96 | 5 |
| 4 | 1991_078 | weibl. | 98 | 5 | 80 | 2001_070 | weibl. | 86 | 6 |
| 5 | 1991_080 | weibl. | 86 | 4 | 81 | 2001_071 | weibl. | 91 | 5 |
| 6 | 1991_088 | männl. | 90 | 5 | 82 | 2001_076 | weibl. | 78 | 6 |
| 10 | 1992_052 | weibl. | 90 | 5 | 84 | 2001_081 | weibl. | 93 | 5 |
| 11 | 1992_068 | weibl. | 78 | 6 | 86 | 2001_087 | weibl. | 89 | 5 |
| 12 | 1992_084 | männl. | 76 | 5 | 88 | 2001_095 | weibl. | 81 | 6 |
| 13 | 1992_088 | männl. | 83 | 4 | 90 | 2001_098 | weibl. | 94 | 6 |
| 16 | 1993_138 | weibl. | 74 | 6 | 91 | 2001_105 | weibl. | 79 | 4 |
| 17 | 1994_002 | weibl. | 80 | 6 | 92 | 2001_116 | weibl. | 94 | 4 |
| 18 | 1994_006 | weibl. | 90 | 5 | 93 | 2001_120 | weibl. | 87 | 5 |
| 19 | 1994_007 | weibl. | 78 | 6 | 94 | 2001_124 | weibl. | 86 | 6 |
| 20 | 1994_014 | weibl. | 77 | 5 | 95 | 2001_125 | weibl. | 77 | 6 |
| 21 | 1994_016 | weibl. | 86 | 5 | 96 | 2001_129 | weibl. | 91 | 6 |
| 22 | 1994_022 | weibl. | 87 | 5 | 98 | 2002_001 | weibl. | 84 | 5 |
| 23 | 1994_023 | weibl. | 87 | 6 | 99 | 2002_002 | männl. | 92 | 4 |
| 24 | 1994_028 | männl. | 70 | 6 | 100 | 2002_004 | weibl. | 91 | 4 |
| 25 | 1994_045 | weibl. | 82 | 6 | 103 | 2002_027 | weibl. | 85 | 5 |
| 26 | 1994_046 | weibl. | 90 | 4 | 104 | 2002_047 | weibl. | 83 | 5 |
| 30 | 1994_082 | männl. | 64 | 6 | 105 | 2002_050 | weibl. | 95 | 4 |
| 31 | 1994_086 | männl. | 75 | 5 | 106 | 2002_056 | weibl. | 85 | 5 |
| 32 | 1994_101 | weibl. | 87 | 6 | 107 | 2002_061 | weibl. | 76 | 5 |
| 33 | 1995_077 | männl. | 72 | 5 | 108 | 2002_072 | weibl. | 62 | 6 |
| 41 | 1996_063 | weibl. | 82 | 5 | 109 | 2002_080 | weibl. | 86 | 5 |
| 47 | 1997_087 | weibl. | 78 | 5 | 110 | 2002_085 | weibl. | 79 | 5 |
| 49 | 1997_136 | weibl. | 62 | 6 | 111 | 2002_088 | weibl. | 78 | 5 |
| 50 | 1997_167 | weibl. | 82 | 5 | 112 | 2002_093 | weibl. | 87 | 5 |
| 51 | 1998_007 | weibl. | 75 | 6 | 113 | 2002_096 | weibl. | 82 | 6 |
| 52 | 1998_011 | männl. | 62 | 5 | 114 | 2002_102 | weibl. | 88 | 5 |
| 53 | 1998_015 | weibl. | 87 | 6 | 116 | 2003_008 | weibl. | 95 | 4 |
| 55 | 1998_026 | weibl. | 67 | 5 | 117 | 2003_034 | weibl. | 91 | 5 |
| 56 | 1998_032 | weibl. | 92 | 4 | 118 | 2003_070 | männl. | 87 | 5 |
| 59 | 1998_052 | weibl. | 90 | 4 | 119 | 2003_071 | weibl. | 84 | 5 |
| 60 | 1998_065 | weibl. | 90 | 5 | 120 | 2003_110 | weibl. | 82 | 5 |
| 62 | 1998_132 | männl. | 75 | 5 | 121 | 2004_006 | weibl. | 89 | 5 |
| 64 | 2000_062 | weibl. | 91 | 4 | 122 | 2004_010 | weibl. | 85 | 5 |
| 66 | 2000_119 | weibl. | 85 | 5 | 123 | 2004_011 | weibl. | 84 | 5 |
| 68 | 2000_138 | weibl. | 84 | 5 | 125 | 2004_025 | weibl. | 90 | 4 |
| 71 | 2001_010 | weibl. | 84 | 4 | 127 | 2004_029 | weibl. | 78 | 5 |
| 72 | 2001_013 | weibl. | 68 | 5 | 128 | 2004_030 | weibl. | 89 | 5 |
| 74 | 2001_019 | weibl. | 92 | 5 | | | | | |

| Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak | Nr. | Autopsie-Nr. | Geschlecht | Alter | Braak |
|-----|--------------|------------|-------|-------|-----|--------------|------------|-------|-------|
| 129 | 2004_032 | männl. | 64 | 5 | 184 | 2008_045 | weibl. | 85 | 4 |
| 130 | 2004_034 | weibl. | 89 | 5 | 185 | 2008_047 | männl. | 77 | 6 |
| 131 | 2004_038 | weibl. | 62 | 5 | 186 | 2008_063 | weibl. | 78 | 5 |
| 132 | 2004_039 | weibl. | 69 | 6 | 187 | 2008_075 | männl. | 88 | 4 |
| 133 | 2004_043 | weibl. | 88 | 5 | 192 | 2009_006 | weibl. | 81 | 5 |
| 135 | 2004_053 | weibl. | 94 | 4 | 193 | 2009_009 | weibl. | 88 | 5 |
| 136 | 2004_058 | weibl. | 86 | 4 | 194 | 2009_019 | weibl. | 84 | 4 |
| 137 | 2004_064 | weibl. | 88 | 5 | 198 | 2009_040 | männl. | 83 | 6 |
| 138 | 2004_077 | weibl. | 74 | 5 | 199 | 2009_041 | weibl. | 85 | 6 |
| 139 | 2004_083 | weibl. | 90 | 5 | 200 | 2009_049 | weibl. | 81 | 4 |
| 140 | 2004_086 | weibl. | 84 | 5 | 201 | 2009_050 | weibl. | 88 | 5 |
| 141 | 2005_003 | weibl. | 84 | 5 | 202 | 2009_053 | männl. | 70 | 4 |
| 142 | 2005_005 | weibl. | 94 | 5 | 203 | 2009_059 | männl. | 74 | 6 |
| 143 | 2005_010 | männl. | 93 | 5 | 204 | 2009_065 | weibl. | 75 | 5 |
| 144 | 2005_011 | weibl. | 93 | 4 | 205 | 2009_069 | weibl. | 72 | 6 |
| 145 | 2005_012 | weibl. | 91 | 6 | 206 | 2009_072 | männl. | 91 | 4 |
| 146 | 2005_013 | weibl. | 89 | 6 | 208 | 2009_082 | weibl. | 66 | 5 |
| 147 | 2005_016 | weibl. | 81 | 5 | 209 | 2009_086 | weibl. | 84 | 6 |
| 148 | 2005_021 | weibl. | 89 | 5 | 210 | 2009_088 | weibl. | 90 | 6 |
| 149 | 2005_022 | weibl. | 78 | 5 | 212 | 2009_100 | weibl. | 94 | 4 |
| 150 | 2005_023 | weibl. | 81 | 6 | 213 | 2009_101 | weibl. | 96 | 4 |
| 151 | 2005_026 | weibl. | 84 | 5 | 214 | 2009_105 | weibl. | 82 | 5 |
| 152 | 2005_028 | männl. | 93 | 4 | 215 | 2009_107 | männl. | 88 | 5 |
| 154 | 2005_033 | männl. | 70 | 5 | 216 | 2010_001 | weibl. | 92 | 5 |
| 155 | 2005_036 | weibl. | 94 | 4 | 217 | 2010_004 | männl. | 77 | 5 |
| 159 | 2005_064 | weibl. | 77 | 5 | 219 | 2010_011 | männl. | 80 | 4 |
| 160 | 2005_070 | weibl. | 77 | 5 | 221 | 2010_016 | männl. | 86 | 5 |
| 161 | 2005_071 | männl. | 64 | 6 | 223 | 2010_051 | männl. | 74 | 6 |
| 163 | 2005_074 | weibl. | 72 | 5 | 224 | 2010_054 | weibl. | 82 | 6 |
| 164 | 2005_075 | männl. | 82 | 5 | 226 | 2010_068 | männl. | 85 | 4 |
| 166 | 2006_006 | weibl. | 87 | 6 | 227 | 2010_069 | weibl. | 66 | 5 |
| 168 | 2006_010 | weibl. | 93 | 4 | | | | | |
| 169 | 2006_013 | männl. | 81 | 4 | | | | | |
| 170 | 2006_018 | männl. | 73 | 6 | | | | | |
| 171 | 2006_020 | weibl. | 77 | 5 | | | | | |
| 172 | 2006_044 | weibl. | 86 | 4 | | | | | |
| 173 | 2006_048 | männl. | 70 | 6 | | | | | |
| 174 | 2006_051 | männl. | 61 | 5 | | | | | |
| 179 | 2007_089 | weibl. | 74 | 5 | | | | | |
| 180 | 2008_004 | weibl. | 82 | 6 | | | | | |
| 181 | 2008_005 | männl. | 90 | 4 | | | | | |
| 182 | 2008_018 | weibl. | 84 | 6 | | | | | |

8 PUBLIKATIONEN

ERSTAUTORENSCHAFTEN

- Grimm, M.O.*, **Mett, J.***, Stahlmann, C.P., Grosgen, S., Hauptenthal, V.J., Blumel, T., Hundsdorfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7, 77.
- Grimm, M.O.*, **Mett, J.***, Stahlmann, C.P., Hauptenthal, V.J., Blumel, T., Stotzel, H., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid-beta by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 534-542.
- **Mett, J.**, Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2016). The Effects of Glycerophospholipids and Fatty Acids on APP Processing: Implications for Alzheimer's Disease. *Handbook of Lipids in Human Function: Fatty acids*, 377-421.
- Grimm, M.O.*, **Mett, J.***, and Hartmann, T. (2016). The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 17.
- Grimm, M.O.*, **Mett, J.***, Grimm, H.S., and Hartmann, T. APP function and lipids: A bidirectional link. *Front Mol Neurosci. Manuscript under review.*
- Grimm, M.O*., **Mett, J.*** et al. The effect of lauric acid and myristic acid in coconut oil on A β -homeostasis in Alzheimer's disease. *Manuscript in preparation.*

MITAUTORENSCHAFTEN

- Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hauptenthal, V.J., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., **Mett, J.**, Riemenschneider, M., Grimm, H.S., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2012). Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012, 141240.
- Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Zimmer, V.C., **Mett, J.**, Weingartner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lutjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33, 16072-16087.

-
- Grimm, M.O., **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5, 98.
 - Grimm, M.O.*, Hundsdorfer, B.*, Grosgen, S., **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Lehmann, J., Patzold, A., Zinser, E.G., Tanila, H., Shen, J., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 34, 92-110.
 - Grimm, M.O.*, Lehmann, J.*, **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Grosgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases* 13, 75-81.
 - Robinson, A., Grosgen, S., **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Haupenthal, V.J., Hundsdorfer, B., Stahlmann, C.P., Slobodskoy, Y., Muller, U.C., Hartmann, T., Stein, R., and Grimm, M.O. (2014). Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13, 263-272.
 - Grimm, M.O.*, Haupenthal, V.J.*, **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Blumel, T., Mylonas, N.T., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2016). Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neuro-degenerative diseases* 16, 44-54.
 - Grimm, M.O.*, Stahlmann, C.P.*, **Mett, J.**, Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., Lehmann, J., Hundsdorfer, B., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on A β Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19, 646-656.
 - Grimm, M.O.*, Regner, L.*, **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Schorr, P., Nelke, C., Streidenberger, O., Stoetzel, H., Winkler, J., Zaidan, S.R., Thiel, A., Endres, K., Grimm, H.S., Volmer, D.A., and Hartmann, T. (2016). Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 17.

* *equally contributed*

POSTER

- Zimmer, V.C., Lehmann, J., **Mett, J.**, Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Hundsdörfer, B., Stahlmann, C.P., Tanila, H., Müller, U., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T.* (2013). Bidirectional link between sulfatides and amyloid precursor protein processing: Consequence for Alzheimer's disease. Neuroscience 2013, San Diego, U.S.A.
- Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., **Mett, J.**, Weingärtner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant Sterols the better cholesterol in Alzheimer's Disease? A mechanistical study. Neuroscience 2013, San Diego, U.S.A.
- **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Hundsdörfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., Müller, U., Grimm, H.S., Hartmann, T.*, and Grimm, M.O.* (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.
- Stahlmann, C.P., **Mett, J.**, Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., Lehmann, J., Hundsdörfer, B., Blümel, T., Endres, K., Grimm, H.S., Hartmann, T.*, and Grimm, M.O.* (2015). Impact of α -, γ - and d-tocopherol on A β generation and degradation in neuroblastoma cells. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.
- Haupenthal, V.J., **Mett, J.**, Stahlmann, C.P., Blümel, T., Mylonas, N.T., Endres, K., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T.* (2015). Oxidized DHA species and lipid-peroxidation products increase amyloidogenic APP-processing. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.
- Lehmann, J.*, Blümel, T.*, **Mett, J.**, Zimmer, V.C., Grösgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdörfer, B., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T.* (2015). Impact of vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid- β peptide degradation in Alzheimer's disease. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.

* *equally contributed*

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und begleitet haben und somit direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Tobias Hartmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und die Bereitstellung der finanziellen Rahmenbedingungen, die das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein großer Dank gilt Dr. Marcus Grimm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit. Für seine Unterstützung, die unzähligen hilfreichen Anregungen und Diskussionen, die motivierenden Gespräche und das in mich gesetzte Vertrauen bin ich ihm besonders dankbar.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Experimentellen Neurologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Benjamin Hundsdörfer, Christoph Stahlmann, Viola Hauptenthal, Dr. Verena Burg, Dr. Heike Grimm, Anna Lauer, Shatha Zaidan, Inge Tomic und allen medizinischen Doktoranden der Arbeitsgruppe für das freundschaftliche Verhältnis, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Die vielen heiteren, wenn auch arbeitsintensiven Stunden im Labor werden mir in guter Erinnerung bleiben. Dr. Heike Grimm danke ich zudem für ihre Unterstützung bei der Verfassung zahlreicher Manuskripte.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern Bernadette und Dieter Mett sowie meinem Bruder Ralf Mett für den stetigen Rückhalt und ihre uneingeschränkte Unterstützung in jederlei Hinsicht bedanken, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre. Anthony Becking danke ich ebenfalls für seine bedingungslose Unterstützung und die aufmunternden Worte, wann immer es nötig war.