

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

**Die Auswirkungen von α -Tocopherol und α -Tocotrienol auf die
amyloidogene Prozessierung und Cholesterinhomöostase
im Rahmen der Alzheimer Krankheit**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2022

vorgelegt von: Liesa Regner-Nelke (geborene Regner)
geb. am: 22.12.1993 in Greiz

Für meine Eltern, meine Schwester und Christopher

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Absatz 1 Nr. 2 – Eidesstattliche Versicherung

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 wie beschrieben 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 (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater 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 in 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. Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Düsseldorf, 21.09.2021

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	IX
III.	Tabellenverzeichnis	X
IV.	Kooperationen	XII
1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Die Auswirkungen von α -Tocopherol und α -Tocotrienol auf die amyloidogene Prozessierung und Cholesterinhomöostase im Rahmen der Alzheimer Krankheit	1
1.2	The influence of α -Tocopherol and α -Tocotrienol on the amyloidogenic processing and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease.....	4
2	Einleitung.....	6
2.1	Die Alzheimer Krankheit.....	6
2.1.1	Zusammenfassung	6
2.1.2	Geschichte	6
2.1.3	Epidemiologie	6
2.1.4	Ätiologie.....	7
2.1.4.1	Risikofaktoren	7
2.1.4.2	Protektive Faktoren	8
2.1.4.3	Gendefekte/Mutationen	9
2.1.5	Pathogenese	9
2.1.6	Klinische Präsentation der Alzheimer Erkrankung	13
2.2	Molekulare Mechanismen der Alzheimer Krankheit.....	14
2.2.1	Das Amyloid Vorläuferprotein und seine proteolytische Prozessierung.....	14
2.2.2	Das katabole System des A β -Metabolismus	17
2.3	Vitamin E.....	20
2.3.1	Biosynthese und Vorkommen	21
2.3.2	Die enterale Aufnahme von Vitamin E	22
2.4	Die Cholesterinhomöostase	23
2.4.1	Überblick HMG-CoA-Reduktase.....	28

2.5	Fragestellung der Arbeit	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Material	32
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	32
3.1.2	Geräte	36
3.1.3	Zelllinien	38
3.1.4	Antikörper	39
3.1.5	Kits	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Zellbiologische Methoden	40
3.2.1.1	Kultivierung von Zellen	40
3.2.1.2	Langzeitlagerung und Rekultivierung von Zellen	40
3.2.1.3	Inkubation von Zellen mit α -TP und α -TT	41
3.2.1.4	Inkubation von Zellen mit β - und γ -Sekretase-Inhibitoren	42
3.2.1.5	Langzeitinkubation von Zellen zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration	42
3.2.1.6	Bestimmung der Zytotoxizität durch LDH-Messung	42
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	44
3.2.2.1	RNS-Isolation aus Zellen mit Trizol	44
3.2.2.2	Photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNS	44
3.2.2.3	Synthetisierung von cDNS	44
3.2.2.4	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	45
3.2.2.5	Auswertung qPCR mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode	46
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.3.1	Aufbereitung von konditioniertem Medium und Zellen	46
3.2.3.2	Homogenisierung von Zellen	47
3.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration durch BCA-Messung	48
3.2.3.4	Immunpräzipitation von Amyloid beta	48
3.2.3.5	SDS-Page	49

3.2.3.6	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Western Blot.....	50
3.2.3.7	Immunologischer Nachweis	51
3.2.3.8	A β -Degradation	52
3.2.3.9	Bestimmung der Sekretaseaktivität	53
3.2.3.9.1	Bestimmung der Sekretaseaktivität in lebenden Zellen	53
3.2.3.9.2	Bestimmung der Sekretaseaktivität aus post-nukleären Fraktionen	54
3.2.3.9.2.1	Herstellung von post-nukleären-Fraktionen und isolierter Membranen.....	54
3.2.3.9.2.2	Messung der Sekretaseaktivität in isolierten Membranen.....	55
3.2.3.10	Bestimmung der Konzentration von Gesamt- und freiem Cholesterin	55
3.2.3.11	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies.....	56
3.2.3.11.1	Bestimmung hoch-reaktiver Sauerstoffspezies mit Aminophenyl Fluoreszein ..	56
3.2.3.11.2	Bestimmung H ₂ O ₂ -induzierter reaktiver Sauerstoffspezies mit Amplex Red.....	57
3.2.4	Massenspektrometrische Methoden	57
3.2.4.1	Vorbereitung der Proben	57
3.2.4.2	Kapillare LC-MS/MS-Messung	59
3.2.4.2.1	Bestimmung der Aufnahme von α - Tocopherol und α -TT in Zellen	60
3.2.5	Statistische Auswertung	61
3.2.5.1	T-Test	61
3.2.5.2	Varianzanalyse und post hoc-Tests	61
3.2.5.3	Signifikanz von Korrelationen	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Der Einfluss von α -TT und α -TP auf ROS, die Cholesterinbiosynthese und die amyloidogene Prozessierung im Rahmen der Alzheimer Krankheit	62
4.1.1	Ergebnisse der kapillären LC-MS/MS-Messung.....	62
4.1.2	Aufnahme von α -TP und α -TT in Zellen.....	63
4.1.2.1	Zytotoxizität von α -TP und α -TT	64
4.1.3	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Cholesterinkonzentration in SH-SY5Y Zellen....	64
4.1.4	Einfluss von α -TP und α -TT auf reaktive Sauerstoffspezies.....	66

4.1.4.1	Einfluss von α -TP und α -TT auf hROS.....	67
4.1.4.2	Einfluss von α -TP und α -TT auf H ₂ O ₂ induzierte ROS.....	68
4.1.5	Einfluss von α -TP und α -TT auf die amyloidogene Prozessierung.....	68
4.1.5.1	Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β	68
4.1.5.1.1	Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen.....	69
4.1.5.1.2	Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-WT Zellen.....	70
4.1.5.2	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase.....	72
4.1.5.2.1	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase auf lebenden Zellen	72
4.1.5.2.2	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase auf post-nukleären Fraktionen.....	75
4.1.5.3	Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF-Zellen.....	78
4.1.5.4	Einfluss von α -TP und α -TT auf sAPP β	79
4.1.5.5	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen.....	81
4.1.5.6	Einfluss von α -TT auf die Proteinlevel.....	83
4.1.6	Einfluss von α -TP und α -TT auf die Degradation von A β	84
4.1.6.1	Einfluss von α -TT auf die IDE unabhängige Degradation von A β	85
4.2	Ergebnisse aus Kooperationen im Rahmen weiterer Projekte.....	87
4.2.1	Vitamin D und seine Analoga reduzieren die A β -Synthese und steigern die A β -Degradation.....	87
4.2.2	Der Effekt von Koffein und anderen Methylxanthinen auf die A β -Homöostase in SH-SY5Y Zellen.....	90
5	Diskussion.....	95
5.1.1	Bedeutung des Vitamin E Metabolismus im Kontext der Alzheimer Krankheit.....	95
5.1.1.1	Biologisches Potenzial der E Vitamine.....	95
5.1.1.2	Einfluss des Metabolismus der E Vitamine auf chronische Erkrankungen.....	97
5.1.2	Die biologischen Eigenschaften von Vitamin E im Rahmen der Pathogenese der Alzheimer Krankheit.....	103

5.1.2.1	Die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der E Vitamine.....	103
5.1.2.1.1	Einfluss von Vitamin E als Antioxidans auf die Alzheimer Erkrankung	104
5.1.2.1.2	Die Wirkung von Vitamin E auf Inflammationsprozesse im Rahmen der Alzheimer Krankheit	108
5.1.2.1.3	Der Einfluss von Vitamin E auf die Cholesterinhomöostase im Rahmen der Alzheimer Krankheit.....	111
5.1.2.2	Der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung	115
5.1.2.3	Der Einfluss von Vitamin E auf die A β -Degradation.....	118
5.1.2.4	Vitamin E in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen.....	119
5.1.2.4.1	α -TP, α -TT in der Therapie und Diagnostik der Alzheimer Erkrankung.....	120
5.2	Zusammenfassung und Ausblick	122
6	Literaturverzeichnis.....	124
7	Publikationen	157
8	Danksagung.....	159

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
‰	Promille
Abb.	Abbildung
ACE	engl. angiotensin converting enzyme
AD	engl. Alzheimer´s disease
ADAM	engl. a disintegrin and metalloprotease
AG	Arbeitsgruppe
AICD	engl. APP intracellular domain
ANOVA	engl. analysis of variance
APCI	engl. atmospheric pressure chemical ionization
APF	Aminophenyl Fluoreszein
Aph1	engl. anterior pharynx defective 1
APOE	Apolipoprotein E
APP	engl. amyloid precursor protein
AS	Aminosäure
Aβ	Amyloid-β
BACE1	engl. β-site APP cleaving enzyme 1
bd	bidestilliert
BCA	engl. bicinchoninic acid
BSA	engl. bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise

C/EBP β	engl. CCAAT/enhancer-binding-proteine
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD36	engl. cluster determinant 36
cDNS	engl. complementary DNA, cDNA
CID	engl. collisin-induced dissociation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
CRP	C-reaktiven Proteins
CSL	CBF1-SU(H)-LAG1
Ct	engl. treshold cycle
CUR	engl. curtain gas
CuSO ₄	Kupfersulfat
CXP	engl. collision cell exit potential
DHA	engl. docosahexaenoic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagels medium
DMGGBQ	2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol
DMPBQ	2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTHGGBQ	2,3-dimethyl-6-tetrahydrogeranylgeranyl-1,4-benzoquinol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DP	engl. declustering potential
ECE	engl. endothelin converting enzyme
ECL	engl. enhanced chemo-luminescence

EDTA	engl. ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
EP	engl. entrance potential
EPA	engl. eicosapentaenoic acid
ESI	engl. electrospray ionization
et al.	und weitere
EtOH	Ethanol
FCS	engl. fetal calf serum
FPR	formyl peptide receptor
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GS1	engl. nebulizer gas
GS2	engl. heater gas
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	Guanintriphosphatase
GWAS	engl. genome-wide association study
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	SalzsäureHHE 4-Hydroxy-Hexenal
HD	Huntington's disease
HDL	engl. high-density Lipoprotein
HGA	Homogenisat
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
HRP	engl. horseradish peroxidase
IDE	engl. insulin degrading enzyme

IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kontr.	Kontrolle
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	engl. low-density Lipoprotein
LGI3	engl. leucine-rich glioma inactivated protein
LOAD	engl. late onset Alzheimer's disease
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LRP-1	engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1
LTB	Leukotrien
M	Molar
m/z	Masse durch Ladung
mA	Milliampere
MCI	engl. mild cognitive impairment
MCS	engl. macrophage-colony stimulating factor
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGGBQ	2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	engl. matrix metalloproteinase

MPBQ	2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol
mRNS	engl. messenger RNA
MSBQ	2-methyl-6-solanesyl-1,4-benzoquinol
MTHGGBQ	2-methyl-6-tetrahydrogeranylgeranyl-1,4-benzoquinol
MUFAs	engl. monounsaturated fatty acids
n.s.	nicht signifikant
N2a	Neuro-2a
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleimide
NEP	Neprilysin
NF κ B	engl. nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NFTs	engl. neurofibrillary tangles
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P40 Substitut
NPC1	Niermann-Pick C1
Nr.	Nummer
NRF2	engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NSAR	Nicht-steroidalen-Antirheumatika
OD	optische Dichte
PBS	engl. phosphate buffered saline

PC	Phosphatidylcholin
PC-8	Plastochromanol-8
PD	engl. Parkinson's disease
PEN2	engl. presenilin enhancer 2
PG	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPP	Phytylpyrophosphat
PQ-9	Plastoquinol-9
PS	Presenilin
psi	engl. pound-force per square inch
PUFAs	engl. polyunsaturated fatty acids
PTFE	Polytetrafluorethylen
RT-PCR	engl. real time polymerase chain reaction
RAGE	engl. receptor for advanced glycation end products
RhoA	RAS Homolog A
RNA	engl. ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	engl. reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SAM	S-adenosyl-L-Methionin
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
Sek	Sekunden
SMR	engl. single reaction monitoring

SNP	engl. single nucleotide polymorphism
SPP	Solanesylpyrophosphat
SR-B1	engl scavenger receptor class B typ 1
ST6Gal 1	ST6 Beta-Galactosid Alpha-2,6-Sialyltransferase 1
StabwM	Standardabweichung des Mittelwertes
Std	Stunden
swe	engl. swedish
Tab.	Tabelle
TBS	engl. Tris-buffered saline
THGGPP	Tetrahydrogeranylgeranylpyrophosphat
TLR	engl. toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TREM	engl. triggering receptor expressed on myeloid cells
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPDRS	engl. Unified Parkinson's Disease Rating Scale
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 fragmen

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Einteilung der Braak-Stadien: A Neurofibrilläres Stadium VI, B Neurofibrilläres Stadium III, C Neurofibrilläres Stadium I+II [35].	11
Abbildung 2 Die proteolytische Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins	16
Abbildung 3 Darstellung der Strukturformeln der Vitamin E-Derivate, übersetzt und abgewandelt nach Regner-Nelke et al., 2021	20
Abbildung 4 Vitamin E Absorption, Abbildung übersetzt nach Yap & Lye [465]	23
Abbildung 5 Beispielchromatogramm für α -TT und α -TP	62
Abbildung 6 Zytotoxizität von α -TP und α -TT	64
Abbildung 7 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Konzentration von Gesamtcholesterin in SH-SY5Y Zellen.....	65
Abbildung 8 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Konzentration von freiem Cholesterin in SH-SY5Y Zellen.....	66
Abbildung 9 Einfluss von α -TP und α -TT auf hROS.....	67
Abbildung 10 Einfluss von α -TP und α -TT auf H ₂ O ₂ induzierte ROS	68
Abbildung 11 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen	69
Abbildung 12 Einfluss von α -TP auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen.....	70
Abbildung 13 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-WT Zellen.....	71
Abbildung 14 Einfluss von α -TT auf die Aktivität der γ - Sekretase auf lebenden Zellen	72
Abbildung 15 Einfluss von α -TP auf die Aktivität der γ - Sekretase auf lebenden Zellen.....	73
Abbildung 16 Einfluss von α -TT auf die Aktivität der β - Sekretase auf lebenden Zellen	74
Abbildung 17 Einfluss von α -TP auf die Aktivität der β - Sekretase auf lebenden Zellen	74
Abbildung 18 Einfluss von α -TT auf die γ -Sekretase in post-nukleären Fraktionen	75
Abbildung 19 Einfluss von α -TP auf die γ -Sekretase in post-nukleären Fraktionen	76
Abbildung 20 Einfluss von α -TT auf die β -Sekretase in post-nukleären Fraktionen.....	77
Abbildung 21 Einfluss von α -TP auf die β -Sekretase in post-nukleären Fraktionen	77
Abbildung 22 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF Zelle	78
Abbildung 23 Einfluss von α -TP auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF Zellen.....	79
Abbildung 24 Einfluss von α -TT auf sAPP β	80

Abbildung 25 Einfluss von α -TP auf sAPP β	80
Abbildung 26 Einfluss von α -TT auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen	81
Abbildung 27 Einfluss von α -TP auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen	82
Abbildung 28 Einfluss von α -TT auf die Proteinexpression von BACE1, PS1 und Nicastrin	83
Abbildung 29 Einfluss von α -TT auf die A β -Degradation.....	84
Abbildung 30 Einfluss von α -TP auf die A β -Degradation.....	85
Abbildung 31 Einfluss von α -TT auf die IDE unabhängige A β -Degradation.....	86
Abbildung 32 Einfluss von Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen.....	88
Abbildung 33 Einflussfaktoren der Bioverfügbarkeit von Vitamin E.....	102
Abbildung 34 Positive und negative Effekte von α -Tocopherol und α -Tocotrienol auf die Alzheimer Krankheit.....	123

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien.....	32
Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 3 Geräte	36
Tabelle 4 Zelllinien und Medien	38
Tabelle 5 Antikörper	39
Tabelle 6 Kits	39
Tabelle 7 verwendete Primer.....	46
Tabelle 8 Bedingungen für Blocken, Primär- und Sekundärantikörper	52
Tabelle 9 Verdünnung von Sekretasesubstraten bei Messung mit lebenden Zellen	54
Tabelle 10 Verdünnung von Sekretasesubstraten bei Messung in isolierten Membranen	55
Tabelle 11 Massenspektrometrieparameter QTRAP 4000.....	60
Tabelle 12 SRM Parameter QTRAP 4000	60

Tabelle 13 Berechnete Aufnahme von α -TP und α -TT in SHSY5Y Zellen.....	63
Tabelle 14 Biologische Eigenschaften von Tocopherolen und Tocotrienolen, Tabelle übersetzt und ergänzt nach Boccardi et al. 2016.....	96

IV. Kooperationen

Einige in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden im Rahmen von Kooperationen durchgeführt. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über entsprechende Abbildungen sowie den Beitrag einzelner Personen.

Abbildung	Tätigkeit	Zuständige Person
	Projektplanung/ Betreuung	Prof. Dr. M. Grimm
Abbildung 5	Inkubation der Zellen mit α -TP, α - TT LC-MS/MS-Messung	L. Regner-Nelke J. Winkler
Abbildung 7	Inkubation der Zellen mit α -TP, α - TT, Messung Gesamtcholesterin	L. Regner-Nelke H. Stoetzel
	Inkubation der Zellen mit α -TP, α - TT, Messung freies-Cholesterin	L. Regner-Nelke H. Stoetzel
Abbildung 8		
Abbildung 9	Inkubation der Zellen mit α -TP, α - TT hROS-Messung	L. Regner-Nelke Dr. C. Stahlmann
Abbildung 10	Inkubation der Zellen mit α -TP, α - TT Messung H ₂ O ₂ induziertes ROS	L. Regner-Nelke Dr. C. Stahlmann
Abbildung 18	Inkubation der Zellen mit α - TT Messung der γ -Sekretaseaktivität	L. Regner-Nelke Dr. C. Nelke
Abbildung 19	Inkubation der Zellen mit α -TP Messung der γ -Sekretaseaktivität	L. Regner-Nelke Dr. C. Nelke
Abbildung 20	Inkubation der Zellen mit α - TT Messung der β -Sekretaseaktivität	L. Regner-Nelke Dr. C. Nelke
Abbildung 21	Inkubation der Zellen mit α -TP Messung der β -Sekretaseaktivität	L. Regner-Nelke Dr. C. Nelke
Abbildung 26	Inkubation der Zellen mit α - TT Durchführung qtPCR	L. Regner-Nelke O. Streidenberger
Abbildung 27	Inkubation der Zellen mit α - TP Durchführung qtPCR	L. Regner-Nelke O. Streidenberger
Abbildung 28	Inkubation der Zellen mit α - TT Messung BACE1, PS1, Nicastrin	L. Regner-Nelke Dr. J. Mett

1 Zusammenfassung

1.1 Die Auswirkungen von α -Tocopherol und α -Tocotrienol auf die amyloidogene Prozessierung und Cholesterinhomöostase im Rahmen der Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Erkrankung (engl. Alzheimer's disease, AD) stellt die weltweit häufigste Ursache für Demenz dar. Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs) bilden eine entscheidende Komponente der Pathogenese, der erstmals von Alois Alzheimer beschriebenen Erkrankung. Extrazelluläres Amyloid oder auch neuritische Plaques bestehen aus aggregierten Amyloid β (A β)-Proteinen. Diese entstehen durch die proteolytische Prozessierung des Amyloid Vorläufer Proteins (engl. amyloid-precursor-protein, APP). APP, welches unter anderem von Neuronen exprimiert wird, ist ein Typ-I-Transmembraneprotein, dessen genaue Funktion noch nicht gänzlich geklärt ist. Die hydrophobe transmembrane Domäne des APP beinhaltet die A β -Sequenz, welche im Rahmen der proteolytischen Prozessierung von APP durch die Aspartyl-Proteasen β - und γ -Sekretase freigesetzt wird.

Darüber hinaus spielen reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese chronischer Erkrankungen, zu welche auch AD zählt. Auch die Cholesterinhomöostase trägt maßgeblich zur Pathogenese der AD bei. Hypercholesterinämie ist ein bekannter Risikofaktor verschiedener chronischer Erkrankungen und wird mit einer Förderung von Inflammationsprozessen, oxidativem Stress, sowie einer erhöhten Freisetzung von A β aus APP in Zusammenhang gebracht.

In zahlreichen früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Vitamin E ein hohes antioxidatives, Cholesterin-senkendes sowie antiinflammatorisches Potenzial besitzt, weshalb es als neuroprotektive Substanz im Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht wurde. Bezüglich AD zeigte sich innerhalb epidemiologischer Studien ein verringertes Erkrankungsrisiko. Im Rahmen randomisierter, kontrollierter Studien konnten diese Effekte jedoch nicht reproduziert werden, weshalb Vitamin E als diätische Therapieoption kontrovers diskutiert wird. Als Ursache für die inkongruente Studienlage wird häufig das unterschiedliche Studiendesign angeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es die Wirkung der Vitamin E-Derivate α -Tocopherol (α -TP) und α -Tocotrienol (α -TT) auf die amyloidogene Prozessierung, die Beseitigung von ROS sowie den Cholesterinspiegel zu untersuchen, um ein detaillierteres Wirkprofil des Vitamins im Rahmen von AD zu erhalten und gegebenenfalls anteilige Ursachen der widersprüchlichen Studienlage zu erkennen.

Aufgrund des hohen antioxidativen Potenzials von α -TP sowie der ausführlichen bisherigen Studienlage zu diesem wurde das Vitamin E-Derivat im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Tocotrienole (TTs) zeichnen sich durch ihre ausgeprägten Cholesterin-senkenden Eigenschaften über die Beeinflussung des SREBP (engl. sterol regulatory element-binding protein, „Sterol-regulierendes Element bindendes Protein“) /SCAP (engl. SREBP cleavage activating protein, „SREBP-Spaltung-aktivierendes Protein“-) Systems aus, was sie zu einer interessanten Substanz bei der Suche nach ernährungsbezogener

Beeinflussung der AD Pathogenese macht. Aus diesem Grund wurde α -Tocotrienol (α -TT) in dieser Arbeit ausgewählt, um den Effekt der beiden Vitamin E-Derivate im Rahmen der durchgeführten Experimente vergleichen zu können.

Zur Untersuchung des Effekts von α -TP und α -TT auf die amyloidogene Prozessierung wurden humane Neuroblastomzellen verwendet. Es zeigte sich eine Erhöhung des Gesamt-A β sowohl durch die Inkubation mit α -TP als auch α -TT. Zur weiteren Aufschlüsselung des hierfür zugrundeliegenden Mechanismus erfolgte die Untersuchung der Aktivität der β - und γ -Sekretase unter Einfluss der Vitamin E-Derivate. Es ergab sich eine erhöhte Aktivität der Sekretasen. Dass dieser ein direkter Effekt von α -TP und α -TT zugrunde liegen könnte, ergaben die Untersuchung der Sekretaseaktivität in post-nukleären Fraktionen, sowie die Analyse der Expression der den Sekretasen zugrundeliegenden Gene. Der Abbau von A β trägt maßgeblich zur A β -Homöostase und dem generellen A β -Aufkommen bei. Unter dem Einfluss von α -TP und α -TT zeigte sich eine Reduktion der Degradation, woraus sich schließen lässt, dass die Erhöhung des Gesamt-A β neben der Aktivierung der A β -produzierenden Enzyme auch auf eine Reduktion des A β -Abbaus zurückzuführen sein könnte. Durch die Verwendung von Insulin als kompetitiven Inhibitor des Insulin-degradierenden Enzyms (engl. insulin degrading enzyme, IDE), welches maßgeblich am A β -Abbau beteiligt ist, war keine Beeinflussung der Degradation nach Inkubation mit α -TT zu verzeichnen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der Einfluss von α -TT über einen Mechanismus zustande kommt, bei welchem IDE eine entscheidende Rolle spielt.

Bei der Untersuchung des Effekts der Vitamin E Derivate auf den Cholesterinspiegel zeigte sich eine deutliche Dominanz des Cholesterin-senkenden Effekts von α -TT im Vergleich mit α -TP. Darüber hinaus zeigte sich hierbei eine stärkere Senkung des Gesamt-Cholesterins als des freien Cholesterins, was vermuten lässt, dass der Cholesterin-senkende-Effekt des α -TTs vor allem über verestertes Cholesterin erfolgt.

Aufgrund der Wechselwirkungen von A β und ROS ist die antioxidative Rolle der Vitamin E-Derivate im Rahmen von AD entscheidend. Die Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften erfolgte durch eine Behandlung der humanen Neuroblastomzellen mit hochreaktiven Sauerstoffspezies (engl. highly-reactive oxygen species, hROS) und H₂O₂ induziertem hROS. Durch die Inkubation mit den Vitamin E-Derivaten erfolgte eine Reduktion der Oxidantien. Der Effekt von α -TT auf hROS war im Vergleich mit α -TP stärker ausgeprägt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die vielfältigen Effekte von Vitamin E-Derivaten im Rahmen von AD. Durch sowohl vorteilhafte Eigenschaften wie die Senkung des Cholesterinspiegels und hROS, als auch nachteilige Eigenschaften wie die Induktion der A β -Synthese und Reduktion der A β -Degradation wird deutlich, dass eine unreflektierte Supplementation von Vitamin E nicht für jeden Patienten geeignet ist. Vielmehr sind das metabolische Profil sowie das Erkrankungsstadium im Sinne von personalisierter Medizin mit einzubeziehen. So könnten Patienten mit einem hohen Cholesterinspiegel vorwiegend von dem Cholesterin-senkenden Effekt des Vitamin Es profitieren,

während eine Vitamin E-Zufuhr bei Patienten mit geringem oder normwertigem Cholesterinspiegel weniger Vorteile birgt.

1.2 The influence of α -Tocopherol and α -Tocotrienol on the amyloidogenic processing and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the world's most common cause of dementia. It is characterised by amyloid plaques and neurofibrillary tangles, as crucial parts of the disease pathogenesis. The extracellular amyloid plaques contain aggregates of amyloid- β (A β), generated by sequential proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP). The type 1 transmembrane protein APP is expressed by neurons and other cells, yet its function remains unclear. The hydrophobic transmembrane domain of APP includes the A β sequence that is released via amyloidogenic processing through β - and γ -secretase activity.

Besides A β , reactive oxygen species are a significant part of AD pathogenesis, since they induce A β synthesis, inflammation, and neurodegeneration. Furthermore, the cholesterol homeostasis plays a critical role in AD pathogenesis. Hypercholesterolemia is a well-known risk factor in multiple chronic diseases as well as AD. It's associated with induced inflammation, oxidative stress and an increased A β synthesis.

Vitamin E shows relevant antioxidative potential as well as cholesterol lowering effects in early studies. Therefore, studies focussed on evaluating its neuroprotective properties regarding neurodegenerative diseases. Regarding AD, there was a reduced risk of disease development. However, these promising effects could not be substantiated in randomized, controlled studies, leading to a controversy in terms of vitamin E as a therapeutic option in AD. Vastly variable study-designs could be a reason for these inhomogeneous results.

The aim of this work was to evaluate the effect of α -Tocopherol (α -TP) and α -Tocotrienol (α -TT) on the amyloidogenic processing, reduction of ROS and cholesterol homeostasis to gain a detailed knowledge on the impact of vitamin E in AD and potentially find further reasons for inconsistencies in former studies.

Due to its high antioxidative properties α -TP was so far in the focus of science and is likely the most studied form of vitamin E. Therefore, it was used in this work. Tocotrienols (TTs), however, are unique due to their cholesterol-lowering effects by modifying the sterol regulatory element-binding protein (SREBP)/ SREBP-cleavage activating protein (SCAP)-system. This renders them an attractive target in the search for a diet-based AD therapy. Therefore α -Tocotrienol (α -TT) was used in this work as well aiming to facilitate a comparison between the two vitamin E forms.

To evaluate the effects of α -TP and α -TT on the amyloidogenic processing, human neuroblastoma cells were used. There was an increase in total A β following the incubation with α -TP and α -TT. To further break down this mechanism, the β - and γ -secretase activity was measured, revealing an increased activity for both enzymes. Since there was a similar effect in postnuclear fractions but nearly no alteration on a genetic level, a direct effect of α -TP and α -TT on the enzymes was suggested. Degradation of A β constitutes another important component of A β -homeostasis. A β -degradation was

decreased due to α -TP and α -TT treatment, therefore contributing to the observed rise in total A β . When using insulin as a competitive inhibitor of the insulin degrading enzyme (IDE), which is one of the major enzymes involved in A β -degradation, there was no effect following α -TT incubation, suggesting an IDE-mediated mechanism of reduced A β -degradation.

When evaluating the effects of α -TP and α -TT on cholesterol levels, there was a reduction of cholesterol especially after α -TT treatment. Furthermore, there was a pronounced reduction of total cholesterol in comparison to free cholesterol suggesting a connection between the cholesterol-lowering effect and cholesterol esters.

Due to the interaction between ROS and A β , vitamin E forms are a promising target in AD therapy since they are potent antioxidants. To evaluate the antioxidative effects of the vitamin E forms, human neuroblastoma cells were treated with highly-reactive oxygen species (hROS) and H₂O₂ induced hROS as well as α -TP and α -TT. There was a reduction in oxygens, especially through α -TT regarding hROS. These results evidence the versatile effects of vitamin E forms on AD. Favourable characteristics like cholesterol-lowering and ROS-reducing properties alongside detrimental effects like induced A β synthesis and reduced A β -degradation suggest that Vitamin E supplementation is not suitable for every patient. In the framework of personalized medicine, the patient's metabolic profile and state of the disease should be taken into consideration. Patients with hypercholesterolemia might profit from the cholesterol-lowering effects, while patients with normal cholesterol levels are solely exposed to unfavourable characteristics.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer Krankheit

2.1.1 Zusammenfassung

Die AD ist die häufigste Ursache für Demenzerkrankungen weltweit [107]. Es handelt sich um eine degenerative Erkrankung des höheren Alters, welche zu progressivem Gedächtnisverlust führt. Pathologische Merkmale sind Hirnatrophie [251], Untergang von Synapsen, extrazelluläre Ablagerung von A β in Form von senilen Plaques sowie intrazelluläre Neurofibrillenbündel (NFT), bestehend aus hyperphosphorylierte Tau-Proteine [451]. Bezüglich des sporadischen Auftretens der Erkrankung werden eine frühe, auch präsenile Form genannt, welche sich vor dem 65. Lebensjahr manifestiert, sowie die LOAD (engl. late-onset Alzheimers disease), auch senile Form genannt, welche sich nach dem 65. Lebensjahr manifestiert, unterschieden [359,419].

Aus wirtschaftlicher Perspektive stellt die Erkrankung insbesondere in fortgeschrittenen Stadien eine Belastung für das Gesundheitssystem dar. Allein in Deutschland betragen die jährlichen Kosten eines Menschen mit Demenz für den Kostenträger ca. 20654 € [261].

2.1.2 Geschichte

Die Entdeckung von AD geht auf Alois Alzheimer einen deutschen Neuropathologen und Psychiater zurück. In Frankfurt begegnete Alzheimer der Patientin Auguste Deter, welche von ihrem Ehemann eingewiesen worden war. Dieser beklagte seine Frau habe sich innerhalb des letzten Jahres stark verändert, sei eifersüchtig, verwirrt und fühle sich häufig verfolgt. Es schloss sich eine fünf Jahre andauernde Krankengeschichte mit progressiven kognitiven Einschränkungen, Halluzinationen und stark eingeschränkten sozialen Funktionen an. Am achten April 1906 starb Auguste Deter schließlich an den Folgen eines infizierten Dekubitus. Nach ihrem Tod untersuchte Alzheimer das Gehirn der Patientin und entdeckte histologische Veränderungen, die heute als Amyloid-Plaques, NFTs und arteriosklerotische Veränderungen bekannt sind [107].

2.1.3 Epidemiologie

Nach dem Bericht von Alzheimer's Disease International litten 2015 46,8 Millionen Menschen weltweit an AD. Es wird von einer Verdopplung der Zahl der Erkrankten innerhalb von 20 Jahren ausgegangen. Dies würde bedeuten, dass 2050 131,5 Millionen Menschen an AD leiden werden. Der Bericht von Alzheimer's Disease International führt zudem die regionale Verteilung der Erkrankten auf. So zeigen Europa und Amerika mit 10,5 und 9,4 Millionen Erkrankten eine ähnliche Prävalenz, wohingegen in Afrika 4,0 Millionen Menschen, in Asien lediglich 2,2 Millionen Menschen betroffen sind.

In Deutschland sind nach der Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. derzeit ca. 1,7 Millionen Menschen von Demenz betroffen. Jährlich kommt es zu mehr als 300.000 Neuerkrankungen. Die Anzahl der Erkrankten nimmt aufgrund des demografischen Wandels stetig zu, weshalb 2050 mit 3 Millionen

Betroffenen gerechnet wird. Eine Meta-Analyse der Inzidenz und Prävalenz von AD in Europa von 2017 zeigte, wie viele Studien zuvor, dass Frauen signifikant häufiger von AD betroffen sind als Männer (2020 Alzheimer's disease facts and figures).

Mit zunehmendem Alter steigt die Zahl der Erkrankten bei beiden Geschlechtern [291]. Ab einem Alter von 65 Jahren kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Erkrankungen. Bei Patienten über einem Alter von 85 kommt AD jedoch seltener vor. Dies wird einerseits dadurch begründet, dass erkrankte Patienten häufig nicht dieses hohe Alter erreichen und die Feststellung der Erkrankung in diesem Alter erschwert ist [196].

2.1.4 Ätiologie

2.1.4.1 Risikofaktoren

Hohes Alter scheint nach dem aktuellen Stand der Forschung den signifikantesten Risikofaktor für die Erkrankung an AD darzustellen (2020 Alzheimer's disease facts and figures). Ein großer Risikofaktor für LOAD stellt das Tragen von zwei Kopien des $\epsilon 4$ Allels, des Apolipoprotein E-Gens dar. Apolipoprotein E ist das prädominante Apolipoprotein des Gehirns und importiert Cholesterin durch das Lipoproteinrezeptor-verwandte Protein in Neurone [63]. Auch die Hypercholesterinämie ist ein möglicher Risikofaktor für AD. Besonders der Einfluss auf die Pathomechanismen im Zusammenhang des A β -Metabolismus stehen hier im Vordergrund. In vielen longitudinalen, bevölkerungsbezogenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Assoziation zwischen erhöhtem Cholesterin-Spiegel und AD in späterem Alter besteht [200]. Des Weiteren war ein Zusammenhang zwischen dem Cholesterin-Metabolismus und dem Risiko an AD zu erkranken zu beobachten. In transgenen AD-Mausmodellen zeigte sich im Rahmen einer ernährungsbedingt herbeigeführten Hypercholesterinämie der gesamt A β -Spiegel erhöht. Cholesterin senkende Medikamente hingegen führten zu einer Reduktion der A β -Pathologie [344,345,389]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass auch Kaninchen, die Cholesterin-reich ernährt wurden, eine zweifache Erhöhung der A β -Spiegel im Hippocampus aufwiesen [403]. Untersuchungen der molekularen Mechanismen lassen vermuten, dass Cholesterin einen direkten Effekt auf die Pathogenese von AD ausübt. Dies geschieht durch Erhöhung der durch die β - und γ -Sekretase medierte A β -Produktion [104,137,394,435,456]. Viele klinische Studien assoziierten Statine, welche über eine Inhibition der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) eine hemmende Wirkung auf die Cholesterin de novo Synthese ausüben, mit einem verminderten Risiko an AD zu erkranken [151,449,450]. Andere Studien hingegen ergaben keinen Unterschied [106,340,367]. Dennoch könnte die Modulation der Cholesterin Synthese einen bedeutenden Ansatzpunkt für die Reduktion des Risikos der Erkrankung an AD darstellen.

Einen weiteren Risikofaktor neurodegenerativer Erkrankungen und so auch der Demenz und AD stellt Übergewicht dar [26,248]. So zeigte eine Metaanalyse ein signifikant erhöhtes Risiko an AD zu erkranken bei Patienten, welche an Adipositas litten [325]. Die bei übergewichtigen Patienten erhöhte

Cholesterin-Synthese bildet hier einen möglichen kausalen Zusammenhang [262].

Rauchen wurde zeitweise in der Literatur als möglicher protektiver Faktor für AD diskutiert, jedoch zeigte sich unter anderem anhand der Rotterdam-Studie eine Assoziation zwischen Rauchen und einer Verdopplung des Risikos an AD zu erkranken [305].

Die Auswirkungen von Alkoholkonsum auf die Inzidenz von AD sind abhängig von der Ausprägung des Trinkverhaltens. So ergab ein Konsum von drei Gläsern Wein täglich einen protektiven Effekt in Bezug auf AD [232]. Neben der Frequenz des Alkoholkonsums werden auch unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit zu der Art des Alkohols, also Spirituosen, Bier oder Wein diskutiert [219]. Eine nationale, retrospektive Kohortenstudie in Frankreich stellte Alkoholkonsum im Rahmen einer Alkoholkrankung als Risikofaktor für alle Formen der Demenz, insbesondere präseniler Demenzformen dar [376]. Die negativen Auswirkungen exzessiven Alkoholkonsums sind neben der toxischen Wirkung des Alkohols selbst auch auf eine häufig im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit stehende Mangelernährung zurückzuführen [347].

Auch der Mangel einzelner Ernährungsbestandteile wie Vitamin D hat negative Auswirkung auf die AD-Pathologie zur Folge. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien ergaben eine Erhöhung des A β -Spiegels um 20-30% im Rahmen eines Vitamin D Mangels [142]. Zudem zeigte sich ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen erniedrigten Serumspiegeln und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Demenz [225].

2.1.4.2 *Protektive Faktoren*

Neben den Risikofaktoren für AD zeigen sich protektive Faktoren, welche mit einem reduzierten Risiko der Erkrankung oder einer milderen Ausprägung der klinischen Präsentation von AD assoziiert sind. Aufgrund der häufig beobachteten Diskrepanz zwischen kognitiven Einschränkungen und histopathologischer Schädigung des Hirngewebes wurde die Hypothese der kognitiven Reserven aufgestellt. Diese besagt, dass die Diskrepanz zwischen Symptomatik und Histopathologie der Kapazität kognitiver Reserven zuzuschreiben ist. Hierbei können zwei Modelle unterschieden werden: Das erste basiert auf der Menge vorhandener Neuronen, also der Größe des Gehirns, der Synapsen-Dichte und Dichte dendritischer Verzweigungen. Das zweite Modell bezieht sich auf den Umfang des genutzten neuronalen Netzwerks im Gesunden. Im Erkrankungsfall sind so mehr Ressourcen vorhanden, um die Funktion geschädigter Hirnregionen zu übernehmen [457]. Assoziiert mit der Ausprägung kognitiver Ressourcen sind die generelle Intelligenz, der Bildungsstand, aber auch Freizeit- und berufliche Aktivitäten [457]. So zeigte eine Studie von Stern *et al.* die Assoziation von höherer bildungstechnischer und beruflicher Ausbildung mit einem reduzierten Risiko der Inzidenz von AD [407]. Neben dem Bildungsgrad spielen weitere Faktoren des Lebensstils eine entscheidende Rolle. Sportliche Aktivität reduziert das Risiko für AD um bis zu 45%. Dies erfolgt unter anderem über die Reduktion bekannter allgemeiner Risikofaktoren für AD oder Demenz, wie Adipositas, arterieller Hypertonie oder Dyslipidämie [157].

Im Zusammenhang zwischen der Ernährung und AD zeigen Ernährungsformen aber auch einzelne Ernährungsbestandteile eine protektive Wirkung. So ist beispielsweise die Phospholipid-Zusammensetzung ein wichtiger Faktor der Membranfunktion in Neuronen. Eine ausreichende Aufnahme von Docosahexaensäure (engl. docosahexaenoic acid, DHA), Eicosapentaensäure (EPA), Uridinmonophosphat, Cholin, Folsäure, Vitamin B6, B12, C und E und Selen wird empfohlen, da diese zur Synthese von Phospholipiden beitragen und mit einer besseren synaptischen Funktion und Erhaltung assoziiert sind [73]. Ernährungsbestandteile wie die mehrfach ungesättigte Fettsäure DHA zeigen zudem einen positiven Einfluss auf die A β -Synthese [138]. In einer randomisiert-kontrollierten, doppelverblindeten Interventionsstudie konnte ein positiver Effekt der Einnahme eines Vitamin- und Fettsäure-Supplements auf die kognitiv-funktionellen Fähigkeiten der Probanden im prodromalen Stadium der Alzheimer Erkrankung gezeigt werden. Neuropsychologische Testungen blieben hingegen weitgehend unverändert [398].

2.1.4.3 Gendefekte/Mutationen

Über 50% des Risikos für AD sind auf Gendefekte/Mutationen zurückzuführen [126]. Frühe AD wird hierbei mit autosomal-dominanten Mutationen der Gene von APP, Presenilin 1 (PSEN 1) und Presenilin 2 (PSEN 2) in Verbindung gebracht [443]. Diese Mutationen können eine Erhöhung des A β oder Verschiebung des A β -Ratio zur Folge haben [378]. Genvarianten des PSEN 1 Gens, welche mit AD assoziiert sind, zeigten zudem eine Erhöhung der A β 1-42/A β 1-40 Ratio *in vitro* und *in vivo* [378]. LOAD weist einen Zusammenhang mit einem Polymorphismus im APOE Gen auf. Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorkommen des Apolipoprotein E Typ 4 Allels (APO E- ϵ 4) und dem familiären LOAD [409]. Eine Studie, in welcher der Zusammenhang zwischen APOE- ϵ 4 und Demenz und AD bei Nigerianern untersucht wurde, zeigte keine signifikante Assoziation. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Umweltfaktoren, ebenso eine entscheidende Rolle bei AD spielen [149]. Auch Varianten des TREM 2 (eng. triggering receptor expressed on myeloid cells 2) sind mit dem Risiko an AD zu erkranken assoziiert [145].

2.1.5 Pathogenese

Die Neuropathogenese von AD ist vorwiegend charakterisiert durch zwei Proteine. Zum einen das abnorme Tau-Protein, welches innerhalb der Nervenzelle Einschlusskörperchen bildet, des Weiteren das A β -Protein, welches sich außerhalb der Nervenzelle im extrazellulären Raum ablagert. Diese beiden Strukturen werden auch als intrazelluläre NFTs und neuritische Plaques bezeichnet. Zu Beginn der Erkrankung kommt es zunächst ausschließlich zu intraneuronalen Einschlüssen der NFTs. Erst im Verlauf entstehen A β -Ablagerungen im extrazellulären Raum.

1986 wurde erstmals die Akkumulation von Tau-Proteinen im Hirngewebe von AD-Patienten festgestellt und in den Zusammenhang mit NFTs gebracht [451]. In seiner normalen Form ist das Tau-

Protein für die Stabilisierung von Mikrotubuli des Zytoskeletts der Neuronen, Neuritenwachstum, Membraninteraktionen und axonalen Transport zuständig. Die Fähigkeit der Zusammenführung von Mikrotubuli des Phosphoproteins Tau wird durch den Grad seiner Phosphorylierung bestimmt. Auch im Gesunden kommt es im Rahmen der Entwicklung, bei Anästhesie und Hypothermie zu einer vorübergehenden Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, jedoch in geringerem Ausmaß. Im Rahmen der Alzheimer Erkrankung kommt es zu einer drei- bis vierfach stärkeren Phosphorylierung des Tau-Proteins. Diese hat eine Polymerisierung der Tau-Proteine zu gepaarten helikalen Filamenten (engl. paired helical filaments, PHF) gemischt mit geraden Filamenten (engl. straight filaments, SF) zur Folge, sodass NFTs gebildet werden [179]. NFTs lassen sich in drei Stadien einteilen: diffuse, punktuelle nicht fibrilläre Vorläufer-Formen, gereifte intrazelluläre NFTs, welche aus filamentösen Aggregaten aus phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Tau bestehen und extrazelluläre NFTs, welche nach dem neuronalen Zelltod auftreten [12,33]. Durch die Vorläufer-Formen, welche von zelleigenen Enzymen nicht abgebaut werden können, entsteht eine Immunreaktion [14]. Die Ablagerung der NFTs entspricht einem bestimmten Muster für welches Braak und Braak *et al.* sechs Stadien festlegten (Abbildung 1). Zunächst kommt es zur Atrophie des medialen, temporalen Kortex. Im Verlauf ist der gesamte Neokortex betroffen mit Aussparung des sensorischen, motorischen und visuellen Kortex. Die Stadien I und II definieren das transentorhinale Stadium der Erkrankung, in welchem der transentorhinale und entorhinale Kortex betroffen sind. Im Stadium II sind zudem die hippocampale CA1 Region, der temporale Kortex, der magnozellige Vorderhirnkomplex sowie der Nucleus anterior-dorsalis des Thalamus betroffen. In Stadium III zeigt sich ein weiterer Progress der bereits in Stadium II betroffenen Regionen sowie eine zusätzliche Beteiligung der weiteren hippocampalen Substrukturen, der Amygdala, der Nucleus reuniens sowie des tuberomammilären Nucleus. In Stadium IV kam es zu einem weiteren Progress der bereits in Stadium III betroffenen Regionen sowie eine Beteiligung des Claustrums und ersten Veränderungen des Neokortex. Die Stadien III und IV werden auch als das limbische Stadium der Erkrankung bezeichnet. Im Stadium V zeigt sich erstmals eine Beteiligung aller Bereiche des Neokortex mit weiterhin relativer Aussparung des primär sensorischen und motorischen Kortex. Auch in Stadium VI bleiben diese Regionen verhältnismäßig unbeeinflusst und es kommt hingegen zu einem stärkeren Progress der Erkrankung in den bisher betroffenen Regionen sowie dem Striatum und der Substantia nigra. Die Stadien V und VI werden als Isokortikal Stadien bezeichnet [34].



Abbildung 1 Schematische Darstellung der Einteilung der Braak-Stadien: A Neurofibrilläres Stadium VI, B Neurofibrilläres Stadium III, C Neurofibrilläres Stadium I+II [35].

Neuritische Plaques setzen sich aus aggregierten A β -Proteinen zusammen, welche wiederum durch die proteolytische Prozessierung von APP entstehen [68]. APP ist ein transmembranes Protein, welches unter anderem in Neuronen exprimiert wird. Seine genaue Funktion ist noch nicht gänzlich geklärt. Die transmembrane Domäne beinhaltet die A β -Sequenz. Die proteolytische Prozessierung von APP erfolgt durch die Aspartyl-Proteasen β - und γ -Sekretase.

A β ist ein 4kDa schweres Peptid, welches auch im physiologischen Zellmetabolismus vorkommt [152]. Im Rahmen von AD kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen der Synthese und Degradation der A β -Peptide sowie einer Aggregation derselbigen [158]. Durch den proteolytischen Schnitt der γ -Sekretase mit dynamischer Schnittstelle kommt es zu einer heterogenen Peptidpopulation. Mit bis zu 90% bilden hierbei A β 40, also jene A β -Peptide, die an der Position 40 enden, die häufigste Form, gefolgt von A β 42 [379]. A β 42 spielt eine entscheidende Rolle, da es durch zwei zusätzliche hydrophobe Aminosäuren (Isoleucin an Position 41 und Alanin an Position 42) stärker zur Aggregation tendiert [184]. A β -Mono- und Oligomere können weiter abgebaut werden. Ein mangelnder Abbau von A β führt zur Akkumulation der Proteine bis hin zu nicht löslichen Plaques [277].

Den löslichen A β -Proteinen werden neurotoxische Eigenschaften zugeschrieben. So zeigten bereits frühe zellkulturbasierte Studien den Zelltod von Neuronen nach der Applikation von A β 25-35 [464]. Zwar sind die extrazellulären Amyloid-Plaques ein charakteristisches pathologisches Kennzeichen von AD, dennoch konnte festgestellt werden, dass Oligomere von A β , welche bis zu 50 A β -Untereinheiten entsprechen, die toxischste A β -Form darstellen [197,386]. Die Toxizität von A β äußert sich über viele Mechanismen, wie cholinerge Dysfunktion, Störung der Calcium-Homöostase, Entzündung, oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion. Diese vielfältigen Mechanismen resultieren schließlich in der neuronalen bzw. synaptischen Dysfunktion und dem Untergang von Neuronen [76,105,134,191,241].

Entzündungsprozesse sind ein bekannter Faktor der Alzheimer Pathogenese, welche zunächst jedoch als parallel ablaufender Mechanismus, welcher nicht zum Krankheitsprogress beiträgt, gewertet wurden. Mittlerweile ist bekannt, dass die Entzündungsreaktionen durchaus eine entscheidende Rolle spielen. Zudem zeigte sich, dass diese insbesondere durch A β -Oligomere hervorgerufen werden [269].

Ursächlich ist, dass A β 1-42 Oligomere die Reifung peripherer Monozyten in phagozytische Mikroglia fördern, im Gegensatz zu A β 1-42 Monomeren oder Fibrillen [67].

Obwohl A β -Ablagerungen und NFTs durch hyperphosphorylierte Tau-Proteine charakteristisch für AD sind, bilden sie dennoch kein Alleinstellungsmerkmal, da sie nicht spezifisch für diese Erkrankung sind. So werden Erkrankungen mit Zelleinschlüssen von abnormalem Tau auch als Tauopathien bezeichnet. Zu diesen gehören neben AD unter anderem die frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus in Verbindung mit Chromosom 17, die chronisch traumatische Enzephalopathie, der Morbus Pick und die supranukleäre Blickparese [442].

Im Rahmen von Statin-Studien wurde eine weitere Komponente der Alzheimer Pathologie deutlich. Es zeigte sich eine signifikant geringere Inzidenz und langsames Fortschreiten von AD innerhalb der Statin-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle [151,449]. Dieser Effekt wird auf die Reduktion der Isoprenoid-Synthese und Proteinprenylierung zurückgeführt. Eckert *et al.* zeigten einen erhöhten Spiegel von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) in grauer und weißer Substanz des Hirngewebes von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [92]. Anhand Zellkultur-basierter Studien konnte demonstriert werden, dass die A β -Erhöhung durch FPP und GGPP vermutlich über eine Stimulation der γ -Sekretase abläuft [206,477]. Zudem zeigte eine Studie mit transgenen Mäusen, welche haplodefizient für das Enzym Farnesyltransferase waren, eine Reduktion der Prenylierung von Proteinen sowie eine Reduktion der Alzheimer Pathologie in APP/PS1 transgenen Mäusen [477].

A β als die Hauptkomponente der neuritischen Plaques wirft die Frage auf, ob es die Ursache oder eine Folge der Alzheimerpathologie darstellt. Seit 1992 wurde in der Literatur die Amyloid-Kaskade Hypothese diskutiert, die besagt, dass A β die ursächliche Komponente der Alzheimer Pathologie darstellt und, dass NFTs, Zelluntergang, vaskuläre Schäden und Demenz lediglich eine Folge der Ablagerungen sind [159]. Die Hypothese wurde unterstützt durch das Vorkommen der Pathologie bei Personen, welche autosomal-dominante Mutationen in den Genen des APP oder des γ -Sekretase Proteins Presenilin 1 oder 2 tragen, sowie der Tatsache, dass Personen mit Trisomie 21, bei welchen das Chromosom 21, auf dem auch APP kodiert ist, drei Mal vorkommt, und somit eine Überexpression dessen besteht, häufig von präsenilem AD betroffen sind [448]. Darüber hinaus wird die Hypothese durch transgene APP- oder APP/PS1-Mausmodelle unterstützt, die pathologische und klinische Charakteristika der familiären AD, wie die Bildung von Amyloid-Plaques, den Untergang von Synapsen und Gedächtniseinschränkungen aufweisen [327]. Zudem konnte anhand verschiedener pharmakologischer, genetischer und immunologischer Therapiestudien, welche eine Reduktion des A β im Hirn zum Ziel hatten, eine Reduktion des Synapsenunterganges sowie der kognitiven Defizite erreicht werden [133,221]

Es gibt jedoch auch wissenschaftliche Erkenntnisse, welche gegen die Amyloid-Kaskade sprechen. So

konnte anhand von Positronenemissionstomografie-Computertomografien (PET-CTs) gezeigt werden, dass auch asymptomatische Personen große Mengen an A β aufweisen, ohne Korrelation mit kognitiven Einschränkungen [6]. In einer weiteren PET-Studie von Fagan *et al.* ergab sich bei kognitiv uneingeschränkten Patienten im Alter von 43-89 Jahren eine positive Korrelation zwischen Tau und phosphoryliertem Tau im cerebrospinalen Liquor und der Menge des kortikalen Amyloids. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen A β 42 in Hirn oder Liquor oder Tau/phosphoryliertem Tau mit der Leistung in psychometrischen Tests [99]. Auch die toxischen Eigenschaften der A β -Oligomere werden in einigen Studien in Frage gestellt. So konnte dargestellt werden, dass Zelltod von Neuronen in APP oder APP/PS1 transgenen Mäusen quasi nicht vorkommt, was wiederum darauf schließen lässt, dass endogenes A β unabhängig von der Formation keine Neurodegeneration *in vivo* hervorruft [349]. Im Rahmen dieser Argumentation tritt die Rolle von Tau Proteinen in der Alzheimer Pathologie verstärkt in den Vordergrund. Ein Fehlen von Tau in APP/PS1-Mausmodellen ergab eine Reduktion des neuronalen Zelltods sowie der amyloidogenen Prozessierung von APP [217].

2.1.6 Klinische Präsentation der Alzheimer Erkrankung

Bezüglich der Präsentation der klinischen Symptomatik lässt sich die Alzheimer Erkrankung je nach Literatur in verschiedene Stadien einteilen, in welchen jeweils zwischen kognitiven Defiziten und nicht-kognitiven Defiziten unterschieden wird. In dieser Arbeit werden die klinischen Symptome anhand der vier Stadien: Prä-Demenz, milde Demenz, moderate Demenz und starke Demenz erläutert.

Klinisch präsentiert sich das Stadium der Prä-Demenz mit Aufmerksamkeitsdefiziten, Neugedächtnisstörungen sowie einer längeren Verarbeitungszeit von Informationen und Störungen der exekutiven Funktionen [226,426]. Zu den nicht kognitiven Defiziten in diesem klinischen Stadium der Erkrankung zählen depressive Stimmungslagen sowie soziale Zurückgezogenheit [192]. In diesem Stadium sind die kognitiven Defizite meist noch nicht alltagseinschränkend, sodass sie durch die Verwendung von Merkhilfen oder der Vermeidung fordernder Situationen ausgeglichen werden können. Die Betroffenen verharmlosen oder verbergen ihre Einschränkungen meist [112]. Aufgrund der milden Symptomatik und zusätzlichen Bagatellisierung dieser durch die Patienten kommt es in diesem Prä-klinischen Stadium selten zur Diagnosestellung der Alzheimer Erkrankung [87].

Im Verlauf der Erkrankung stehen besonders Neugedächtnisstörungen im Vordergrund, doch auch Inhalte des Langzeitgedächtnisses sowie des implizierten Gedächtnisses sind betroffen. In diesem Stadium der milden Demenz zeigt sich die Fähigkeit zum Planen, Bewerten und Organisieren nicht länger nur bei komplexen Aufgaben, sondern bereits auf alltäglicher Ebene eingeschränkt [228]. Bezüglich der Sprache ist ein reduzierter Wortschatz und Sprachfluss auffallend [59]. Episoden der Desorientiertheit stellen insbesondere im Zusammenhang mit dem Straßenverkehr ein Problem dar, da Distanzen und Geschwindigkeiten schwerer eingeschätzt werden können, was sich in einem erhöhten Risiko für Verkehrsunfälle manifestiert [84]. Bezüglich der nicht-kognitiven Einschränkungen zeigten

sich auch in diesem Stadium depressive Symptome. Eine zusätzlich vorliegende Depression sollte jedoch ausgeschlossen werden [326].

Das Stadium der moderaten Demenz ist durch eine starke Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses sowie des logischen Schlussfolgerns, Planens und Organisierens gekennzeichnet. Sprachprobleme werden durch Wortfindungsstörungen und Paraphasien deutlicher [112]. Zudem zeigen sich Einschränkungen beim Lesen, welche vornehmlich auf linguistische Defizite als visuelle Wahrnehmungsstörungen zurückzuführen sind [70]. Auch beim Schreiben zeigt sich eine Erhöhung der Rechtschreibfehler sowie eine Reduktion der Paragraphenlänge [285]. Episoden der Desorientiertheit in bekannter Umgebung nehmen ebenfalls zu [164]. Ein Drittel der Patienten entwickeln in diesem Stadium zusätzlich illusorische und wahnhaftige Symptome [111]. Bis zu 20% der Betroffenen entwickeln Halluzinationen, meist von visuellem Charakter, die mit besonders ausgeprägten cholinergen Defiziten assoziiert sind [212]. Das Verhalten kann von Agitiertheit und verbalen sowie physischen Aggressionen geprägt sein. Auch Rastlosigkeit, welche sich durch zielloses Umherlaufen äußert, ist häufig [79]. Zu diesem Zeitpunkt ist ein selbständiges Leben der Patienten nicht länger möglich, was häufig die Einbeziehung von Pflegediensten oder Pflegeeinrichtungen zur Folge hat [446].

Im Stadium der starken Demenz sind nahezu alle kognitiven Fähigkeiten eingeschränkt. Die Sprachproduktion ist reduziert auf wenige Worte, was die Äußerung der persönlichen Bedürfnisse behindert. Es erfolgt ein Zurückgreifen auf emotionale Signale. So können Rastlosigkeit und Aggression ein Hinweis auf Schmerzen sein [112]. Es zeigt sich zudem eine fortschreitende Abnahme kortikaler, extrapyramidaler und pyramidaler Funktionen [114]. Die pseudobulbäre Dysphagie ist eine häufige Symptomatik im späten Stadium der Alzheimer Demenz und erhöht das Risiko für Malnutrition, Dehydratation und Aspiration [31,60].

Die häufigsten Todesursachen von AD-Patienten stellen die Pneumonie, gefolgt von Myokardinfarkten und Septikämien dar [113].

2.2 Molekulare Mechanismen der Alzheimer Krankheit

2.2.1 Das Amyloid Vorläuferprotein und seine proteolytische Prozessierung

Die überschüssige Ablagerung von A β -Peptiden gilt als eine der Hauptursachen für die Degeneration von Neuronen im Rahmen von AD [418].

Es handelt sich um ein Peptid bestehend aus 38 bis 43 Aminosäuren, welches durch den sequenziellen Schnitt von APP entsteht [193]. APP kann auf zwei Weisen geschnitten werden: Die sogenannte amyloidogene Prozessierung, durch welche A β -Peptide entstehen. Diese erfolgt durch den Schnitt der β - und γ -Sekretase [153]. Sowie die nicht-amyloidogene Prozessierung, welche durch das Enzym α -Sekretase erfolgt, deren Schnittstelle innerhalb der A β -Sequenz des Amyloid Vorläufer Proteins liegt und demzufolge keine A β -Peptide produziert [154].

APP ist ubiquitär im Körper des Menschen und insbesondere im zentralen Nervensystem zu finden. Durch alternatives Spleißen gibt es bis zu 10 APP Varianten, die 639-770 Aminosäuren lang sind. APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀ bilden die drei Hauptformen, aus welchen im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung A β entstehen kann [286,309]. Während APP₇₅₁ und APP₇₇₀ vorwiegend in nicht neuronalen Zellen vorkommen, stellt APP₆₉₅ die Hauptisoform im humanen Gehirn und in Neuronen dar [194]. Alle drei Isoformen sind strukturiert in eine große extrazelluläre Domäne, eine kurze transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne [276]. Die Ektodomäne enthält eine Cystein-reiche, globuläre Domäne (E1), eine saure Domäne (AC), eine Helix-reiche Domäne (E2) sowie einen Teil der A β -Domäne, welcher weiter in die transmembrane Domäne reicht. Die kurze zytoplasmatische Domäne enthält ein YENPTY-Motiv, das für Proteininteraktionen verantwortlich ist. Die E1 Domäne ist aufgebaut aus einer Heparin-Bindungsstelle (HBD), einer Metall-bindenden Domäne (MBD) mit Kupfer und Zink Bindungsstellen. Die E2 Domäne besteht aus sechs α -Helices, die die Struktur einer gewickelten Spule bilden [267]. Die überwiegende Menge von APP wird über den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert. Hierbei wird APP zunächst durch die α -Sekretase proteolytisch geschnitten.

Die α -Sekretase gehört zur ADAM (engl. a disintegrin and metalloprotease) Proteinfamilie. Die enzymatische Aktivität der α -Sekretase zeigt sich in ADAM9, 10, 17 und 19 [101]. Überexpression oder Herunterregulierung dieser ADAM Proteine in verschiedensten Zelllinien führt zur Erhöhung oder Reduktion von löslichem APP α (engl. soluble APP α , sAPP α) [11], dem löslichen Schnittprodukt der Sekretase. APP ist jedoch nicht das einzige Substrat der α -Sekretasen. So ist ADAM17 auch in die proteolytische Prozessierung des Notch-Rezeptors involviert [38]. Der Notch-Signalweg ist für die Embryogenese aber auch im adulten Organismus für Zelldifferenzierung entscheidend [10].

Der Schnitt von APP durch die α -Sekretase erfolgt zwischen Lysin-16 und Leucin-17 innerhalb der A β -Sequenz. Es entsteht das N-terminale sezernierte APP (sAPP α) und das C-terminale Fragment (CTF), welches aus 83 Aminosäuren besteht und anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten wird. Durch diesen zweiten Schnitt entsteht das 3kDa schwere P3 und die APP intrazelluläre Domäne (enlg. APP intracellular domain, AICD) [154]. sAPP α werden verschiedene neuroprotektive Effekte zugeschrieben, wie Synaptogenese, Neuritenwachstum und Abschwächung neurotoxischer Wirkungen. Eine Aktivierung der α -Sekretase-abhängigen endoproteolytischen APP-Verarbeitung zum Schutz vor der dendritischen- und Phospho-Tau-abhängigen Toxizität bei der Alzheimer Erkrankung wird daher diskutiert [71].

Die amyloidogene Prozessierung des APP erfolgt durch den Schnitt der β -Sekretase BACE1 (engl. β -Site APP cleaving enzyme 1). Es handelt sich hierbei um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der A β -Synthese. BACE1 ist eine membrangebundene Aspartyl-Protease, die in verschiedenen Geweben, insbesondere im Hirngewebe und Neuronen vorkommt und ein saures pH-Optimum hat [176]. Intrazellulär befindet sich die Sekretase meist im Golgi-Apparat und Endosomen, kann jedoch auch zur Zelloberfläche gelangen [202]. Anhand APP-überexprimierender Mausmodelle konnte gezeigt werden,

dass eine genetische Inaktivierung von BACE1 zu einer Reduktion der A β -Synthese führt und A β -Ablagerungen erfolgreich blockiert [208,235]. Der Schnitt von BACE1 findet an Asparaginsäure-1 (β Position) und Glutaminsäure-11 (β' Position) statt. Die häufigere Schnittstelle Glutaminsäure-11 bildet eine C-terminales Fragment (engl. C-terminal fragment, CFT), bestehend aus 89 Aminosäuren, welches anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten wird, wodurch wiederum A β 11-40/42 entsteht [135].

Die γ -Sekretase wird durch einen membrangebundenen Enzymkomplex aus vier Proteinen gebildet. Hierzu gehören: Nicastrin, PSEN2 (engl. presenilin enhancer 2), Aph1a oder b (engl. anterior pharynx defective 1) und als katalytisches Zentrum PS1 oder 2 [20]. Die Zusammenführung von Presenilin mit den weiteren Proteinen führt zur Autoproteolyse von Presenilin in zwei Untereinheiten, ein N-terminales Fragment (engl. N-terminal fragment, NTF) und ein C-terminales Fragment, die jeweils ein transmembranes Aspartat zum katalytischen Zentrum beitragen. Die aktive Protease schneidet dann in der transmembranen Domäne des APP und produziert heterogene A β -Peptide, die bezüglich der C-terminalen Enden in einer Länge von 38-43 Aminosäuren variieren, und AICDs mit 50 oder 51 Aminosäuren langen Resten [123,328].

Im Rahmen der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird das in der Zellmembran verbliebene 83 Aminosäuren umfassende α -CTF durch den γ -Sekretasekomplex geschnitten. Hierdurch entstehen das 16 Aminosäuren umfassende Peptid p3, das sezerniert wird und AICD, das im Zellinneren verbleibt [152,155].

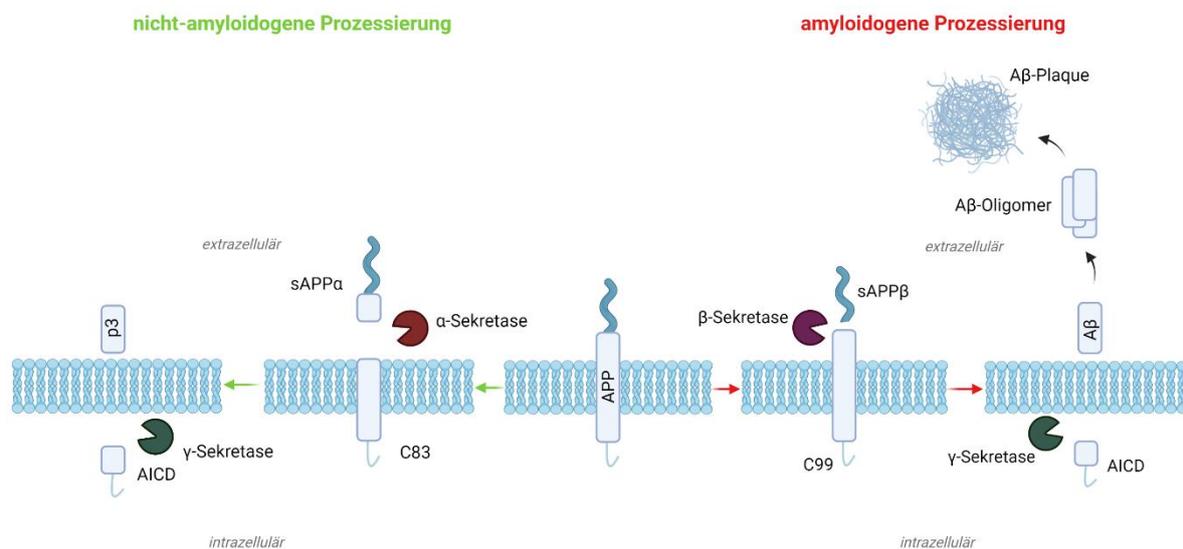


Abbildung 2 Die proteolytische Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins

2.2.2 Das katabole System des A β -Metabolismus

Es wurden bisher verschiedene Wege beschrieben, wie A β aus dem Hirngewebe eliminiert wird [19]. A β -Proteasen können A β in kleinere Fragmente schneiden oder degradieren [469]. Andere Proteine wie Apolipoprotein E (APOE) oder α 2-Makroglobulin (α 2-M) interagieren wiederum mit Transportproteinen wie VLDLR (engl. very low-density lipoprotein receptor), LRP1-Rezeptor (engl. lipoprotein receptor-related protein-receptor) und P-Glycoprotein, welche in Astrozyten und der abluminalen Seite des zerebralen Endothels vorhanden sind und den Transport von A β über die Blut-Hirn-Schranke in den Blutkreislauf fördern [74]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass A β und andere lösliche Produkte über den lymphatischen Weg aus dem Hirngewebe abtransportiert werden können [51]. Einen weiteren Weg der A β -Elimination stellt die Phagozytose durch Mikroglia, Astrozyten und Makrophagen dar [94,181,474].

Zu den A β -degradierenden Proteasen gehören die Metalloendopeptidasen, von welchen Neprilysin (NEP), das Insulin-degradierende Enzym (engl. insulin- degrading enzyme, IDE) und das Endothelin-konvertierende Enzym-1 und 2 (engl. endothelin-converting enzyme 1/2, ECE1/2) in den Abbau von A β -Peptiden involviert sind [16,93]. Abhängig vom Vorkommen der Proteasen erfolgt die Degradation von A β in unterschiedlichen Gewebekomponenten. Die Expression von NEP erfolgt vorwiegend in präsynaptischen Neuronen [121], aktivierten Astrozyten [109] und Mikroglia [168]. IDE wird von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia synthetisiert [25]. Da die Protease via Exosomen freigesetzt wird [416], erfolgt durch sie insbesondere der Abbau extrazellulärer A β -Ablagerungen. ECE wird hingegen in Neuronen, Endothelzellen [280] und Astrozyten [282] exprimiert und degradiert A β primär auf intrazellulärer Ebene [93].

Weitere degradierende Enzyme sind ACE (engl. angiotensin-coverting enzyme) eine Zink-Metalloprotease, die vorwiegend in Neuronen vorkommt [170] und der Gewebsplasminogen-Aktivator (engl. tissue plasminogen activator, tPA) eine Serinprotease, welche neben Neuronen auch von Mikroglia exprimiert wird [209,254]. Matrix-Metalloproteasen (MMP) werden von Astrozyten exprimiert und sezerniert. Es zeigte sich, dass MMP-9 extrazellulär sowohl A β -Monomere, als auch Fibrillen degradiert [461]. Die lysosomale Cystein-Protease Cathepsin B (CAT-B) degradiert A β nachdem dieses durch Mikroglia phagozytiert wurde [283]. Eine weitere lysosomale Protease ist das ECE-2, dass sowohl in Lysosomen als auch in Endosomen vorkommt und intrazelluläres A β degradiert [306].

In eukaryotischen Zellen existieren zwei Hauptwege für die Degradation zellulärer Proteine, das Ubiquitin-Proteasom-System (engl. ubiquitin-proteasome system, UPS), welches 80-90 % der Proteine degradiert, hierunter auch kurzlebige, abnormale, geschädigte oder denaturierte Proteine [354] und Autophagie, wodurch langlebige Proteine sowie Zellorganellen degradiert werden.

Im Rahmen von AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zeigt sich eine intraneuronale Akkumulation von Ubiquitin, welche durch die Inhibition der Proteasomenaktivität durch A β erklärt

wird, wodurch wiederum die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation des Proteasoms blockiert wird. Aggregierte A β -Formen, insbesondere Oligomere sind ein kompetitives Substrat Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des humanen 20S Proteasoms [475]. Zhao und Yang *et al.* demonstrierten jedoch, dass die proteasomale Degradation von A β 1-42 dosisabhängig, ohne signifikante Beeinflussung der gesamten katalytischen Aktivität des Proteasoms abläuft [475]. Bezüglich der Effizienz der Degradation aggregierter Proteine zeigten sich Gliazellen vorteilhaft gegenüber Neuronen [185], was eine mögliche Erklärung dafür sein könnte, dass diese keine Protein-Aggregate enthalten [351].

Autophagie ist ein weiterer entscheidender Weg für den Abbau aggregierter Proteine in Zellen, die unter Stress stehen. Es konnte gezeigt werden, dass A β aus APP während des Prozesses der Autophagie von APP-reichen Organellen entsteht [471]. Diese A β -Peptide werden anschließend in Lysosomen degradiert [292]. Innerhalb von Neuronen formen sich Autophagosomen und Endosomen im Bereich der Synapsen. Die vollständige Reinigung dieser Kompartimente erfordert den retrograden Transport in den Neuronen-Zellkörper, wo eine hohe Konzentration von Lysosomen vorhanden ist. Im Rahmen von AD sind die Reifung der Autophagolysosomen und ihr retrograder Transport beeinträchtigt, wodurch es zur Akkumulation von Autophagie-Zwischenprodukten (autophagie Vakuolen) in Form von Schwellungen entlang den Neuriten kommt. Die Kombination aus verstärkter Autophagie und mangelhaftem Abtransport von A β -bildenden Vakuolen bietet günstige Umstände für A β -Akkumulation bei AD [292].

Apolipoprotein E (Apo E) ist wie bereits erwähnt einer der Risikofaktoren für AD, dennoch spielt es auch in der A β -Degradation eine entscheidende Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass ApoE A β binden kann und diese Komplexe sowohl die Ausbreitung von fibrilliertem A β als auch den Transport von löslichem A β beeinflussen [445]. Anhand von AD-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch eine Steigerung der ApoE-Expression A β reduziert und die kognitiven Fähigkeiten verbessert werden [66]. Eine gegenteilige Hypothese besagt, dass Apo E A β nicht bindet, sondern mit diesem um die Bindungsstelle des LRP-1 in Astrozyten konkurriert und somit auf indirekte Weise den A β -Metabolismus beeinflusst [433].

Apolipoprotein J (Apo J) ist ebenfalls bekannt dafür mit A β zu interagieren und ermöglicht dessen Transport und somit die Beseitigung über die Blut-Hirn-Schranke durch Megalin oder den LRP-2 Rezeptor [275]. Neben Apolipoprotein J wurde auch für α 1-Antitrypsin ein Einfluss auf die A β -Homöostase nachgewiesen. α 1-Antitrypsin ist ein Serinproteaseinhibitor der in Astrozyten exprimiert wird [1] und A β bindet. Im Hirngewebe von AD-Patienten fand sich eine Überexpression von α 1-Antitrypsin [2]. Auch α 2-Makroglobulin, eine Matrixmetalloproteinase, ist fähig A β zu binden [210].

Ein weiterer Weg, um A β aus dem Hirngewebe zu entfernen, ist die Aufnahme dessen durch Gliazellen. Hier gibt es die Möglichkeit der Pinozytose, also die Aufnahme flüssiger, löslicher Produkte [240], oder Phagozytose [214].

Neben der Phagozytose, einer Unterform der Endozytose, trägt auch die Rezeptor-medierte Endozytose

zur Entfernung von A β aus dem Hirngewebe bei. Zu diesen Rezeptoren gehören der Scavenger Rezeptor Typ A, B1, Differenzierungsprotein 36 (eng. cluster determinant 36, CD36) und CD40, Toll-like Rezeptoren (engl. toll-like receptors, TLR), der Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (engl. receptor for advanced glycation end product, RAGE), Formyl-Peptid-Rezeptor (engl. formyl peptide receptor, FPR), Fc Rezeptoren, TREM 2, LGI3 (engl. leucine-rich glioma inactivated protein) und LRP [351].

2.3 Vitamin E

Vitamin E wurde erstmals 1922 von dem amerikanischen Endokrinologen und Anatom Herbert M. Evans sowie seiner Assistentin Katherine S. Bishop entdeckt. Sie identifizierten die fettlösliche Substanz als notwendigen Faktor für die Reproduktion von Ratten im Rahmen verschiedener Diät-Experimente [98]. Die chemische Struktur von Vitamin E wurde wenige Jahre darauf 1935 von dem deutschen Chemiker Erhard Fernholz entschlüsselt [380], was noch im selben Jahr die Synthese von dl- α -TP durch den Schweizer Chemiker und Nobelpreisträger Paul Karrer zur Folge hatte [195]. Der Überbegriff Vitamin E beschreibt vier TP- und vier TT-Derivate, welche zusammengefasst als Tocochromanole bezeichnet werden [120]. Die gemeinsame Grundstruktur der E Vitamine bildet der Chromanring, der an Position 6 hydroxyliert ist. Durch die unterschiedliche Methylierung des Rings lässt sich eine α -, β -, γ - und δ -Form unterscheiden [352]. Abhängig von der angehängten Seitenkette können weitere vier Formen unterschieden werden: TP– die eine gesättigte Fettsäure enthalten, Tocomonoenole und marine Tocopherole (MDT)– die eine einfach ungesättigte Fettsäure enthalten sowie TT– welche eine dreifach ungesättigte Fettsäure enthalten [381].

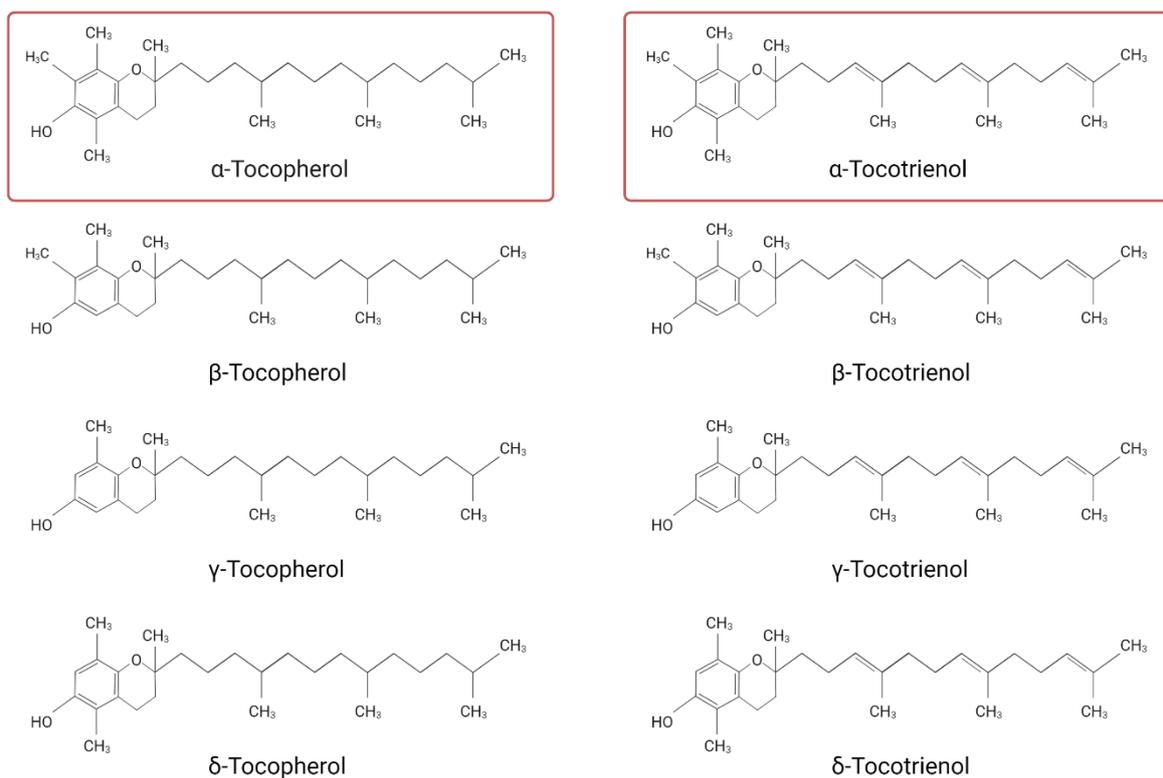


Abbildung 3 Darstellung der Strukturformeln der Vitamin E-Derivate, übersetzt und abgewandelt nach Regner-Nelke et al., 2021

α -TP ist aus drei stereometrischen Zentren zusammengesetzt, was es zu einem chiralen Molekül macht. Durch unterschiedliche Anordnungen der Stoffgruppen an diesen stereometrischen Zentren entstehen acht Stereoisomere des α -TP [37]. RRR- α -TP ist in natürlicher Form in Nahrungsmitteln wie Nüssen, Samen und Gemüse-basierten Ölen zu finden. Das synthetisch hergestellte all-rac- α -TP ist eine Racemat-Zusammensetzung aller acht Stereoisomere (RRR-, RRS-, RSR-, RSS-, SRR-, SRS-, SSR-, SSS-) und wird als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben [186,476].

2.3.1 Biosynthese und Vorkommen

Da Vitamin E ausschließlich in Organismen synthetisiert werden kann, die zur Photosynthese fähig sind, stellt es eine essenzielle Nahrungskomponente für Menschen und Tiere dar. Die Biosynthese der E Vitamine beginnt im Zytoplasma der Pflanzenzellen und setzt sich nach dem ersten Schritt in den Plastiden fort [400]. Die chemische Familie der Tocochromanole besteht aus einem polaren Chromanol Ring und einer lipophilen Polyprenyl-Seitenkette, welche abhängig vom jeweiligen Tocochromanol Typ variiert. Im ersten Schritt der Synthese der Tocochromanole wird die aromatische Kopfgruppe der Homogentisinsäure durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat gebildet [236]. Es folgt die Kondensation des polaren aromatischen Kopfes von Homogentisinsäure mit der jeweiligen Lipidseitenkette. Für TP bildet hierbei Phytylpyrophosphat (PPP) die Vorläufersubstanz. Für TT ist es Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und für Tocomonoenole Solanesylpyrophosphat (SPP), Plastochromanol-8 (PC-8) und Tetrahydrogeranylgeranylpyrophosphat (THGGPP). Dieser Schritt wird von drei spezifischen Formen der Homogenisat (HGA)-Prenyltransferase katalysiert [255]. Die Produkte dieser Reaktion sind 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol (MPBQ) bei der Reaktion von HGA und PPP, 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol (MGGBQ) bei der Reaktion von HGA und GGPP und 2-methyl-6-solanesyl-1,4-benzoquinol (MSBQ)/ 2-methyl-6-tetrahydrogeranylgeranyl-1,4-benzoquinol (MTHGGBQ) bei der Reaktion von HGA und PC-8/Tocomonoenole.

Diese werden anschließend entweder direkt zu Vorläufern von β - und δ -Tocochromanolen oder im Falle von TP mit Hilfe von S-adenosyl-L-Methionin (SAM) zu 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol (DMPBQ) methyliert. Bei TT werden diese zu 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol (DMGGBQ) oder Plastoquinol-9 (PQ-9) im Falle von PC-8 und 2,3-dimethyl-6-tetrahydrogeranylgeranyl-1,4-benzoquinol (DMTHGGBQ) im Falle von Tocomonoenolen methyliert [58].

Sowohl Methyl- als auch Dimethyl-Benzoquinole werden anschließend weiter zu γ - und δ -Tocochromanol zyklisiert mit Hilfe der TP-Zyklase. Im letzten Schritt der Tocochromanol-Biosynthese entstehen durch die Methylierung von γ - und δ -Tocochromanol, durch die γ -TP-Methyltransferase, α - und β - Tocochromanol. Der Methylgruppenspende für diesen Schritt ist erneut SAM [255,391].

2.3.2 Die enterale Aufnahme von Vitamin E

Vitamin E wird in der Nahrung häufig zusammen mit Lipiden aufgenommen. Die intestinale Absorption von Vitamin E in die Enterozyten erfolgt hauptsächlich durch drei Proteine: Niemann-Pick C1 (NPC1), Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) und CD36 [9]. Alle drei befinden sich auf der apikalen Seite der Enterozyten und sind weder gewebe- noch substratspezifisch [342]. Der darauffolgende intrazelluläre Transport von Vitamin E ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird davon ausgegangen, dass NPC1 und NPC2 darin eine Rolle spielen [9]. An der basolateralen Seite der Enterozyten werden die E Vitamine an den Blutstrom abgegeben. Dies geschieht größtenteils durch die Aufnahme in Chylomikrone. Ein kleiner Teil der E Vitamine wird jedoch auch durch ABCA1 [415] und Apo-AI in Lipoproteinen hoher Dichte (engl. high-density Lipoproteine, HDL) aufgenommen [299]. Zudem wurden unspezifische Plasmatransporter für α -TP beschrieben [422]. Ein Großteil des in Lipoproteinen enthaltenen Vitamin E verbleibt in den Chylomikronen, während die Triglyzeride durch die Lipoproteinlipase (LPL) aus ihnen gelöst werden (Abbildung 4). Die verbliebenen Reste gelangen dann zur Leber und über den ApoB-Rezeptor wird Vitamin E in diese aufgenommen. Weitere Möglichkeiten der Aufnahme von Vitamin E in die Leber bilden der Low-density Lipoprotein-Rezeptor (LDLR), Lipoprotein-related Proteins (LRP) und der SR-B1. Das im HDL enthaltene Vitamin E wird über den SR-B1 in die Leber aufgenommen [341]. Die Versorgung des extrahepatischen Gewebes mit Vitamin E erfolgt durch die Aufnahme von Chylomikronen über Lipoproteine sehr geringer Dichte (engl. very low-density- lipoproteine, VLDL) oder LDL durch spezifische Rezeptoren oder die Produkte der LPL. Die Verteilung von α -TP in den verschiedenen Lipoproteinen verhält sich folgendermaßen: 65 Moleküle je Partikel für VLDL, 8-12 Moleküle je Partikel für LDL und etwa ein Molekül je Partikel für HDL [32]. Es wird davon ausgegangen, dass das von der Leber synthetisierte LDL andere Gewebe mit Vitamin E versorgt. Extrahepatisches Gewebe kann wiederum Vitamin E für die Leber über einen umgekehrten Cholesterin-Transport bereitstellen [357]. Während seiner Aufnahme in den Enterozyten und dem Transport in das Zielgewebe verbleibt Vitamin E in seiner ursprünglichen Form und wird nicht in eine bioaktivere Form umgewandelt. Erst in der Leber wird speziell α -TP an das α -TTP gebunden, um seine Seitenkette vor Oxidation zu schützen und den Transport in die, in der Leber gebildeten, Lipoproteine zu erleichtern. Die übrigen Vitamin E Derivate werden vermutlich durch die Cytochrome P450 hydroxyliert [169,312]. Die Endprodukte des Vitamin E Katabolismus sind eine Gruppe von Metaboliten, die bisher als Ausscheidungsprodukte angesehen wurden. Einige dieser Metabolite wurden nun im Plasma detektiert und in *in vitro* Systemen hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Es ist möglich, dass sie eine neue Klasse regulatorischer Metabolite bilden [374].

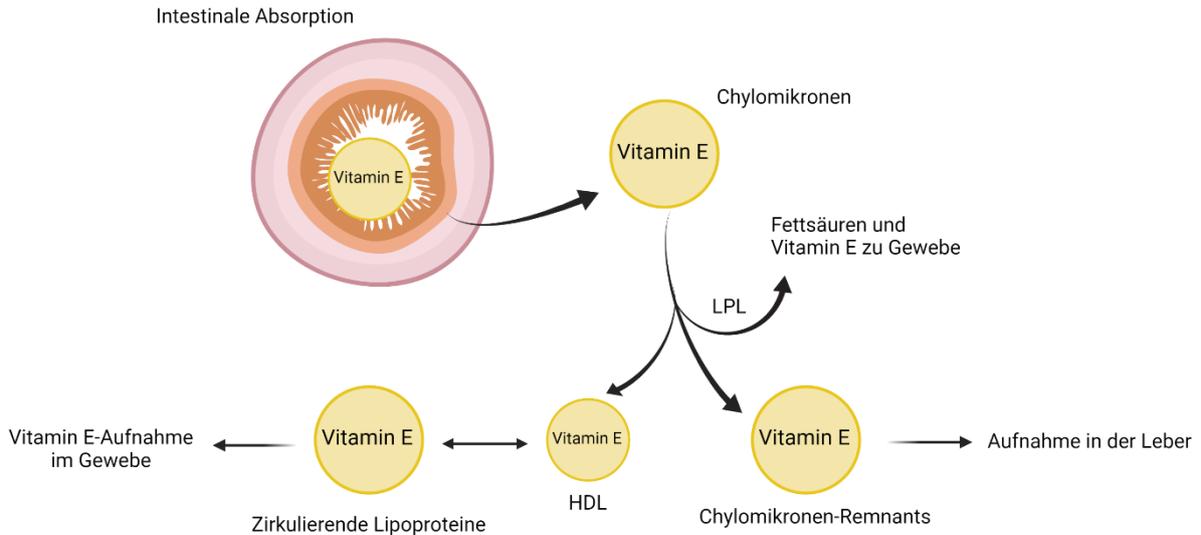


Abbildung 4 Vitamin E Absorption, Abbildung übersetzt nach Yap & Lye [465]

2.4 Die Cholesterinhomöostase

Bereits in frühen Studien konnte festgestellt werden, dass sowohl natürliche als auch synthetische TT einen Cholesterin-senkenden Effekt aufweisen [330]. Dieser wurde durch die posttranskriptionale Suppression der HMG-CoA-Reduktase, welche die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A zu Mevalonat im Rahmen der Cholesterinbiosynthese katalysiert, erklärt [314]. α -TP wurde eine Abschwächung dieses Effekts bei zusätzlicher Verabreichung zugeschrieben [333]. Mit der Entdeckung des SREBP/SCAP-Systems durch Brown und Goldstein konnte auch der Effekt von TT und TP auf den Feedback-Zyklus der Cholesterinbiosynthese aufgezeigt werden.

1933 identifizierten Schoenheimer und Breusch die Cholesterinbiosynthese als ersten anabolen Stoffwechselweg, der durch einen Feedback-Zyklus reguliert wird [375]. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die HMG-CoA-Reduktase, deren Aktivität durch einen hohen Cholesterinspiegel und die Akkumulation dessen sinkt, was wiederum die Cholesterinbiosynthese reduziert. Die Transkription der HMG-CoA-Reduktase wird durch SREBP (engl. sterol regulatory element-binding protein) reguliert. SREBPs sind membrangebundene Transkriptionsfaktoren deren über 20 Zielgene in die Cholesterin- und Lipogenese involviert sind. Mittlerweile konnten drei Isoformen der SREBPs identifiziert werden. SREBP-1a und -1c, welche auf dem gleichen Gen exprimiert werden und zur Transkription von Proteinen und Enzymen des Fettsäuren- und Glucose-/Insulinstoffwechsels zuständig sind, sowie SREBP-2, welches auf einem separaten Gen exprimiert wird, und spezifisch für die Cholesterinbiosynthese ist. In der Membran des endoplasmatischen Retikulums liegen SREBPs in einer Haarnadelstruktur vor, mit dem N- und C-terminalen Ende in das Zytosol ragend. Sie setzen sich aus

drei Domänen zusammen: einer N-terminalen ersten Domäne aus 480 AS, welche als Transkriptionsfaktor der Helix-Loop- Helix-Leucin-Zipper Familie fungiert, einer zweiten Membran-Anker Domäne, welche aus zwei Membran-durchspannenden Elementen aus 80 AS sowie einer hydrophilen Schlaufe aus 30 AS besteht, sowie einer dritten C-terminalen regulatorischen Domäne aus 590 AS [296].

Die als Transkriptionsfaktor fungierende erste Domäne enthält eine Reihe saurer Aminosäuren, welche Coaktivatoren der Transkription rekrutieren [279]. Diese Aminosäuresequenz ist in SREBP-1a und SREBP-2 relativ lang. In SREBP-1c ist die Sequenz jedoch kürzer, was dazu führt, dass dieses einen schwächeren Aktivator darstellt [308,390]. Das in der N-terminalen Domäne enthaltene Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Motiv, vermittelt durch Dimerisierung den Eintritt in den Nukleus und das Binden an die DNS. In der Basisregion dieses Motivs enthalten die SREBPs eine Tyrosin Aminosäure anstelle einer Arginin Aminosäure, wie es eigentlich in fast allen Mitgliedern der Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Familie der Fall ist. Diese Aminosäuresubstitution erlaubt den SREBPs Dekanucleotide Segmente der DNS zu erkennen, welche auch als SREs (engl. sterol regulatory elements) bezeichnet werden [198]. Im Gegensatz zu der gewöhnlichen Bindungsstelle der Helix-Loop- Helix-Leucin-Zipper-Proteine, die palindrom verlaufen, sind die SREs nicht palindrom verlaufend [388].

Abhängig von der intrazellulären Sterol-Konzentration werden die SREBPs durch zwei Sekretasen geschnitten, wodurch das N-terminale Fragment in den Nukleus transportiert wird, um dort die Transkription von Lipidstoffwechsel-spezifischen Proteinen zu aktivieren, oder die proteolytische Freisetzung der SREBPs aus der Membran wird blockiert. Die bis zu diesem Zeitpunkt bereits im Nukleus angekommenen N-terminalen Fragmente werden abgebaut, was zu einer Abnahme der Transkription von Enzymen des Lipidstoffwechsels führt [41].

In einer Zelle mit Sterol-Mangel wird die N- terminale Domäne der SREBPs von der Membran durch zwei sequenzielle, proteolytische Schnitte freigesetzt. Die N-terminale Domäne begibt sich dann zum Nukleus der Zelle und bindet an SREs, welche die Genexpression multipler Gene der Cholesterinbiosynthese, der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren sowie der Triglyzeridbiosynthese und Lipid Aufnahme verstärken. Zielgene der Cholesterinbiosynthese stellen die HMG-CoA-Synthase, die HMG-CoA-Reduktase, die Farnesyldiphosphat Synthase und Schalensynthase dar. Für die Biosynthese von Fettsäuren und Triglyzeriden sind es wiederum die Acetyl-CoA-Karboxylase, die Fettsäure Synthase, die Stearoyl-CoA-Desaturase und die Glycerol-3-phosphat-Acetyltransferase. Des Weiteren verstärken die SREBPs die Transkription von LDL-Rezeptoren, welche für die Aufnahme von Cholesterin aus Plasmalipoproteinen in die Zelle verantwortlich sind.

Der erste proteolytische Schnitt zur Freisetzung der N-terminalen Domäne der SREBPs erfolgt durch die S1P (engl. site-1-protease). Hierfür wird das Protein SCAP (engl. SREBP cleavage activating protein) benötigt, welches an SREBP bindet, dieses stabilisiert und zum Golgi-Apparat transportiert, in welchem die aktive Form der S1P lokalisiert ist. SCAP ist ein integrales Membranprotein und besteht aus zwei

Domänen. Die N-terminale Domäne besteht aus 730 AS, welche acht Membran-durchspannende Segmente bilden. In diesen Segmenten wechseln sich wiederum hydrophobe und hydrophile Sequenzen ab [294]. An den luminalen Schleifen enthält SCAP drei Oligosaccharidketten. Die C-terminale Domäne besteht aus ca. 550 AS und ragt in das Zytosol. Sie enthält fünf WD Repeat Domänen [132].

Innerhalb der Zelle bilden SREBPs und SCAP einen engen Komplex, welcher durch die Verbindung zwischen der C-terminalen Domäne der SREBP und der WD Repeat Domäne der SCAP zustande kommt [364]. Verschiedene Experimente zeigen, dass die Bildung dieses Komplexes für den Schnitt der S1P benötigt wird. So verhindert die Entfernung der C-terminalen Domäne von SERBP-2 die Interaktion dessen mit SCAP und damit den Schnitt der S1P [365].

Der SREBP/SCAP-Komplex befindet sich abhängig vom Cholesterin-Spiegel der Zelle entweder durch eine hohe Cholesterinkonzentration auf das ER beschränkt, oder durch einen Cholesterinmangel in Vesikeln zwischen ER und Golgi-Apparat, welche dem Transport des Komplexes dienen. Im Fall eines Cholesterinmangels wird SREBP durch SCAP zu dem Golgi-Apparat transportiert, um dort proteolytisch geschnitten zu werden [75]. Dieser Transport findet durch die Bildung von Vesikeln statt. Hierbei gruppieren sich der SCAP/SREBP-Komplex zusammen mit anderen Proteinen zu COPII (engl. common coat protein II)-beschichteten Vesikeln, welche sich vom ER abtrennen [295]. COPII Vesikel sind Transportvesikel, die sich vom ER abtrennen, um den anterograden, intrazellulären Transport von Lipiden und Proteinen zu ermöglichen [265]. Sie bestehen aus fünf löslichen zytoplasmatischen Proteinen, welche sich in einer festen Reihenfolge an der Membran des ER anordnen [17]. Hieraus entsteht ein innerer Mantel, bestehend aus Sec23-Sec24 Dimeren sowie Sar1 und ein äußerer Mantel bestehend aus Sec31 und Sec13 [406]. Die Anordnung der Proteine wird durch die kleine Guanintriophosphatase (GTPase) Sar1 initiiert. Durch die Aufnahme von Guanintriophosphat (GTP) wird diese an die Membran des ER angelagert. Dieser Schritt wird wiederum durch den Guanin Nukleotid Austauschfaktor, Sec 12, katalysiert [17]. Durch die GTP-Bindung von Sar1 wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche eine amphipathische-Helix des Proteins zum Vorschein bringt, die sich flach in die ER Membran einfügt [264]. In seiner aktiven Form bindet Sar1 an den Sec23/Sec24 heterodimer Subkomplex und bildet damit den so genannten pre-budding Komplex. Dieser Schritt wiederum rekrutiert den Sec13/Sec31 heterotetrameren Subkomplex zum Sec23/Sec24-Kern. Diese drei Subkomplexe Sar1, Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 sind für die Formation von COPII-Vesikeln ausreichend [246]. Sec13/Sec31 wiederum fügt sich selbst zu einem polyedrischen Käfig, welcher zur Krümmung der Membran und Abtrennung des Vesikels beiträgt [405].

Die GTPase aktivierenden Proteine Sec23 und Sec31 tragen zur GTP-Hydrolyse innerhalb des fertigen COPII-Mantels bei [444]. Diese Hydrolyse scheint essenziell für die definitive Abknospung des Vesikels von der ER-Membran [27]. Nach der Bildung des Vesikels kommt es im Verlauf zum Auflösen der Hülle des Transportvesikels und Wiederverwendung der Komponenten der COPII-Hülle [18].

SCAP enthält eine Bindungsstelle für COPII-Proteine, welche den SCAP/SREBP-Komplex in den Vesikel gruppieren [411]. Rawson *et al.* konnten anhand von SRD-13A Zellen– Ovar-Zellen von

chinesischen Hamstern, welche kein SCAP exprimieren, zeigen, dass SREBP nicht zum Golgi-Apparat transportiert werden kann und somit die Cholesterinsynthese der Zellen außer Kraft gesetzt wird. So ist naheliegend, dass im Fall eines Cholesterinüberschusses, der Transport des SCAP/SREBP-Komplexes zum Golgi-Apparat verhindert wird [339]. Dies geschieht durch eine Konformationsänderung von SCAP, durch welche dieses im ER gehalten wird [364].

Der Schnitt der S1P findet innerhalb der Schlaufe von SREBP, welche die beiden Transmembrandomänen verbindet und in das Lumen des ER ragt, statt. Im Fall von SREBP-2 erfolgt dieser Schnitt zwischen den Aminosäuren Leucin und Serin der RSVLS-Sequenz. Für die proteolytische Aktivität benötigt die S1P einen basischen Rest in der P4 Position sowie Leucine in der P1 Position. Die Reste der Positionen P2, P3, und P1' können hingegen beliebig substituiert werden, ohne die proteolytische Aktivität zu beeinflussen [89]. Nach dem Schnitt der S1P sind die SREBPs in zwei Hälften geteilt, welche weiterhin membrangebunden sind. Die N-terminale Domäne wird hierbei als Zwischenprodukt des SREBP bezeichnet [363].

Anschließend erfolgt der Schnitt der S2P (engl. site-2-protease). Dieser findet auf der N-terminalen Seite der ersten Transmembrandomäne in der Membran statt und setzt so die Transkriptionsfaktor-Domäne frei. Im Fall von SREBP-2 erfolgt der Schnitt zwischen Leucine und Cystein der DRSRILLC -Sequenz. Es wird vermutete, dass das zweite Arginin dieser Sequenz die Bindungsstelle zwischen der hydrophilen N-terminalen Domäne und dem hydrophoben Membran-durchspannenden Segment ist. Aus diesem Grund erfolgt der Schnitt drei Reste hin zum C-terminalen Ende, innerhalb des Membran-durchspannenden Segments. Beim Verlassen der Membran beinhaltet die N-terminale Domäne drei hydrophobe ILL-Reste am C-terminalen Ende [90]. Diese bilden den austauschbaren Teil der DRSRILLC-Sequenz, da gezeigt werden konnte, dass alle vier einzeln mit Alanin substituiert werden können, ohne den Schnitt der S2P zu beeinflussen. Die DRSR-Sequenz wird jedoch benötigt um die Erkennung der Schnittstelle durch die S2P zu gewährleisten [90].

Nach erfolgtem Schnitt der SP2 wird ein 68kDa schweres nSREBP, welches einen Helix-Loop- Helix-Leucin-Zipper und die ersten drei Membran-durchspannenden Aminosäuren enthält, freigesetzt. Dieses gelangt anschließend in den Nukleus, um dort an SREs zu binden. Hier führt es zusätzlich über die SREs im Bereich der Promotorregionen von SREBP-Genen zur Synthese neuer SREBP-mRNS [369]. Der nach dem zweiten Schnitt im Golgi-Apparat verbliebene Teil des SREBP wird degradiert [387]. SCAP wiederum gelangt zurück zum ER um ein weiteres SREBP-Molekül zu binden und zum Golgi-Apparat zu begleiten [75].

Befindet sich eine Zelle im Zustand des Lipidüberflusses wird der Schnitt der SREBPs durch die S1P eingestellt. Dieser Prozess wird durch die polytropische membrangebundene Domäne von SCAP mediiert. Es wird vermutet, dass fünf der acht membrandurchspannenden Domänen die SCAP Sterol-sensitive Domänen beinhalten [294]. Durch Punktmutationen innerhalb dieser Domänen konnte gezeigt

werden, dass die Sterol-Sensitivität und damit der Feedback Mechanismus der Cholesterinbiosynthese entfällt [293]. Des Weiteren wurde eine Homologie der Sterol-sensitiven Domäne von SCAP mit einer Sequenz innerhalb der membrangebundenen Domäne des Enzyms HMG-CoA-Reduktase gefunden [171]. Diese membrangebundene Domäne des Enzyms soll in der Präsenz von Cholesterin ermöglichen, dass das Enzym schnell degradiert wird [55].

In einer Studie von Adams *et al.* konnte gezeigt werden, dass Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin die Aktivierung von SREBPs auf unterschiedlichen Wegen inhibieren. Es wurde Methyl- β -cyclodextrin für den Transport von Cholesterin in den Ovar-Zellen chinesischer Hamster verwendet. Nach Zelleintritt sorgte Cholesterin für eine Formänderung von SCAP, die ein neues Fragment des Proteins zum Vorschein brachte. Durch diese Veränderung wurde die Verbindung von SCAP und Insig möglich. Insigs sind Speicherproteine des ER und verhindern die Bewegung des SCAP/SREBP-Komplexes zum Golgi-Apparat und damit die Prozessierung von SREBP zu seiner aktiven Form. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass 25-Hydroxycholesterin eine potentere Wirkung auf die Bindung zwischen SCAP und Insig hat als Cholesterin. Dennoch kommt es durch 25-Hydroxycholesterin nicht zu einer detektierbaren Formänderung von SCAP. Hieraus lässt sich schließen, dass Cholesterin auf direktem Weg mit SCAP interagiert, um eine Bindung zwischen diesem und Insig zu erwirken. 25-Hydroxycholesterin hingegen erzielt seine Wirkung indirekt durch ein vermeintliches 25-Hydroxycholesterin Sensorprotein [3].

Insigs regulieren die Lipidsynthese durch Inhibition des Transports von SREBPs aus dem ER zum Golgi-Apparat, wo sie proteolytisch aktiviert werden [463]. Durch die Bindung des SCAP/SREBP-Komplexes mit Insigs kann dieser nicht länger in die COPII-bedeckten Vesikel aufgenommen werden [411], welche für den Transport zum Golgi-Apparat entscheidend sind [97]. In einer Studie, in welcher Zellen mit Überexpression der SCAP Domäne, welche die transmembranen Helices eins bis sechs enthält, verwendet wurden, konnte eine Übersättigung der endogen produzierten Insig-Proteine festgestellt werden, da die Blockade des SCAP/SREBP-Komplexes zum Golgi-Apparat nicht länger durch Sterole stattfinden konnte [462]. In einer *in vitro* Studie von Sun *et al.* konnte gezeigt werden, dass in isolierten Membranen 25-Hydroxycholesterin die Sar1-abhängige Bindung von Sec23/24 an SCAP blockiert. Dieser Effekt ist abhängig von Insig. Genauer gesagt ist für die Bindung von Sec23/24 an SCAP eine Hexapeptidsequenz, MELADL, in der zytoplasmatischen Schlaufe zwischen der sechsten und siebten Transmembranhelix von SCAP notwendig. Der genaue Mechanismus, mit welchem Insigs die Blockade der Sec 23/24-SCAP-Bindung ermöglichen, ist noch nicht bekannt [411]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Cholesterin direkt an SCAP bindet [336], seine Konformation ändert und damit die Bindung von SCAP an Insigs ermöglicht [3].

Die sechste Schlaufe interagiert jedoch nicht direkt mit Insig, da gekürztes SCAP, welches keine sechste Schlaufe mehr besitzt, weiterhin Sterol-induziert an Insig bindet. Es wäre jedoch möglich, dass das

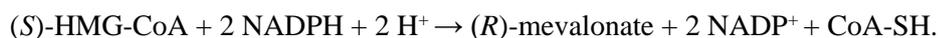
gebundene Insig die sechste Schlaufe verschließt, womit sie Sec23/24 nicht länger zur Verfügung steht [411].

2.4.1 Überblick HMG-CoA-Reduktase

Die HMG-CoA-Reduktase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese und bildet einen entscheidenden Ansatzpunkt für die Beschleunigung und Hemmung dieser [40,131].

Die HMG-CoA-Reduktase kommt sowohl in Eu- als auch Prokaryoten vor. Durch polygenetische Analysen wurden zwei Klassen des Enzyms definiert: Klasse I, welche in Eukaryoten und einigen Archaea vorkommt und Klasse II, die in Eubakterien und Archaea gefunden werden. Abhängig vom Organismus wird sie durch ein Multimer einer Spezies-spezifischen Anzahl von identischen Monomeren gebildet [119]. Die kristalline Struktur konnte bisher von der humanen [180], als auch der *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA-Reduktase erforscht werden [213]. Das Enzym besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit zwei zusammenhängenden Domänen. Der löslichen C-terminalen Domäne, bestehend aus 548 Aminosäuren, die das katalytische Zentrum enthält und einer membrangebundenen Domäne, bestehend aus 339 Aminosäuren, durch welche die Reduktase in der Membran verankert ist [129]. Diese N-terminale Domäne besteht aus acht transmembranen Domänen, die durch kurze hydrophile Schlaufen voneinander getrennt sind [356]. Anhand transfizierter Ovarzellen chinesischer Hamster, welche die Membrandomäne der HMG-CoA-Reduktase nicht kodieren, konnte gezeigt werden, dass das gekürzte lösliche Enzym ein Fünftel so schnell degradiert wurde, im Vergleich mit dem vollständigen Enzym. Dies lässt darauf schließen, dass die N-terminale Domäne der HMG-CoA-Reduktase eine entscheidende Rolle in der schnellen Degradation des Enzyms spielt [129].

In eukaryotischen Zellen ist die HMG-CoA-Reduktase im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert die folgende Reaktion der Cholesterinbiosynthese [119]:



Die Regulation des Enzyms findet sowohl transkriptionell, translational, als auch post-translational statt [131]. Um die transkriptionelle Regulation der Cholesterin-homöostase über die HMG-CoA-Reduktase zu untersuchen, verbanden Osborne *et al.* das 5'-Ende des Reduktase Gens von Hamstern mit der kodierenden Region für die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) [302]. Es zeigte sich, dass aus diesem Gen hohe Aktivitätslevel von CAT in L Zellen von Mäusen gemessen werden konnten. Sterole führten zu einer Suppression dieser Expression von 70% bis zu 90%. Wurden Deletionen innerhalb der Genabschnitte, die für die Förderung oder Inhibition der Expression verantwortlich sind, vorgenommen, führte dies zu einer Reduktion der CAT Expression *in vivo*, als auch der CAT mRNA *in vitro*. Es ist davon auszugehen, dass die Promotor- und Inhibitionsabschnitte der Transkription eng assoziiert sind, da jeder Reduktase-CAT Plasmid, der transkriptionelle Aktivität zeigte, ebenfalls durch Sterole zu inhibieren war [301]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die Transkription der LDL-Rezeptoren

Genprodukte dargestellt werden. Diese werden ebenfalls durch die An- oder Abwesenheit von Sterolen reguliert. Die Verbindung der 5' flankierenden DNS der LDL-Rezeptor-Gene zeigte auch hier mit der kodierenden Region bakterieller CAT eine suffiziente Expression, als auch eine negative Feedback-Regulation durch die An- oder Abwesenheit von Sterolen [410]. Durch das Prinzip der substituierten Mutagenese konnten schließlich die Promotor Elemente für die basale Expression sowie die Sterol-abhängige Reduktion der Transkription der HMG-CoA-Reduktase-Gene identifiziert werden. Es zeigte sich, dass diese Sequenz ein Octanukleotid enthält, welches ein 7/8-Basenpaar enthält, das ebenfalls in der regulatorischen Sequenz des LDL-Rezeptor-Promotors und anderen Sterol-abhängigen Genen gefunden wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass dieses Octanukleotid, GTGGCGGTG, die Bindungsstelle für Sterol-abhängige Proteine darstellt, die die Transkription unterdrücken [303]. Auch für die HMG-CoA-Reduktase-Synthase war es möglich Sequenzen der 5' flankierenden Region der Gene von Hamstern, die für die Sterol-abhängige Transkription verantwortlich sind zu identifizieren. Punktmutationen innerhalb dieser Gen-Sequenzen verhinderten die natürlich erhöhte Expression als Reaktion auf Sterol-Mangel in Zellen [395]. Die basale Transkriptionsrate, welche auch in Anwesenheit von Sterolen stattfindet, wurde durch die Mutationen jedoch nicht beeinflusst. Auch hier waren die 7/8 Basenpaaren, welche zuvor in den Genen der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors als Sterol regulierende Sequenz deklariert wurden zu finden [395].

Innerhalb der Sterol-regulierenden Sequenz (SRE-1) des Promotors der HMG-CoA-Reduktase konnten wiederum zwei Domänen identifiziert werden, welche besonders entscheidend für die Sterol Regulation sind. Da diese Domänen durch drei nicht essentielle Basen voneinander getrennt werden, ist es möglich, dass die Sterol abhängige Regulation der HMG-CoA-Reduktase Gentranskription zusätzliche oder andere Faktoren als die Sterol-Regulation des LDL-Rezeptors und der HMG-CoA-Reduktase benötigt [304].

Neben der Beeinflussung der Transkription ist die Regulation der HMG-CoA-Reduktase auch über die Translation möglich [54]. So konnte gezeigt werden, dass Cholesterinsubstitution von Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der HMG-CoA-Reduktase über eine Reduktion der translationalen Effizienz der Reduktase mRNA führt. Diese Reduktion war mit Polymikrosomen assoziiert und lässt somit vermuten, dass eine Cholesterinsubstitution die Initiation der Protein Synthese herabreguliert [54].

Posttranskriptionell erfolgt die Regulation der HMG-CoA Reduktase über die Degradation dieser, welche durch die Anwesenheit von Sterolen beschleunigt wird. Die Sterol-sensitive Domäne des Enzyms bindet unter dem Einfluss von Sterolen an das ER-Protein Insig-1. Dieser Prozess wird durch eine Überexpression SCAP inhibiert, wodurch sich vermuten lässt, dass sowohl die HMG-CoA-Reduktase als auch SCAP an dieselbe Stelle des Insig-1 binden [384].

2.5 Fragestellung der Arbeit

AD ist die häufigste Form der Demenz und für ca. 60%-80% der Demenzerkrankungen verantwortlich (2020 Alzheimer's disease facts and figures). Durch den Pflegeaufwand, den die Erkrankung insbesondere in späteren Stadien mit sich bringt, entstehen relevante Kosten für das Gesundheitssystem [261]. Dennoch fehlt es an Behandlungsmöglichkeiten, die über die symptomatische Therapie der Erkrankung hinausgehen. Die Entwicklung wirkungsvoller therapeutischer Strategien zur Behandlung der AD ist notwendig, um die Krankheitsbelastung für Gesundheitssysteme und Patienten zu reduzieren.

Die Neuropathogenese der AD ist vorwiegend charakterisiert durch das abnorme Tau-Protein, welches durch Hyperphosphorylierung intrazelluläre NFTs bildet sowie das A β -Protein, welches den Hauptbestandteil extrazellulärer neuritischer Plaques bildet. Durch diese Prozesse hervorgerufene Entzündungsreaktionen, aber auch oxidativer Stress tragen zum Fortschreiten der Erkrankung bei. Durch eine Reduktion der A β -Plaques zeigen sich klinische Symptome rückläufig [133]. A β entsteht durch sequenzielle Spaltung des APP im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung. Hierbei erfolgt zunächst ein Schnitt der β -Sekretase, wodurch β -CTF und sAPP β entstehen [135]. β -CTF wird im Anschluss durch den γ -Sekretasekomplex geschnitten, wodurch heterogene A β -Peptide und AICDs entstehen [123,328].

Neben A β -Peptiden und hyperphosphoryliertem Tau wurden durch Alois Alzheimer auch Lipidgranulome und Fett-Einschlüsse im Hirngewebe als charakteristische Bestandteile der Pathogenese von AD beschrieben [108]. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Alzheimer Pathogenese und Lipiden. So wurden veränderte Lipid-Zusammensetzungen im Hirngewebe von AD-Patienten nachgewiesen. Die APP-Prozessierung steht zudem unter dem Einfluss der umgebenden Lipide. So wirken unter anderem Cholesterin, Sphingolipide, Plasmalogene und mehrfach ungesättigte Fette auf die Ätiologie, Pathogenese aber auch Prävention der Alzheimer Erkrankung [161]. Grimm *et al.* zeigten beispielweise eine Steigerung der amyloidogenen Prozessierung und Reduktion der nicht-amyloidogenen Prozessierung durch trans-Fettsäuren im Vergleich zu cis-Fettsäuren [140]. Die mehrfach ungesättigte Fettsäure DHA lenkt die amyloidogene Prozessierung von APP in Richtung der nicht-amyloidogenen Prozessierung und führt somit zu einer reduzierten Freisetzung von A β [138]. Die α -Sekretase-Aktivität wird durch kurze und ungesättigte Fettsäuren gesteigert was wiederum eine positive Beeinflussung der Alzheimer Erkrankung zur Folge haben kann [141]. Da APP als auch die an der amyloidogenen Prozessierung beteiligten Sekretasen Transmembranproteine sind und die proteolytischen Schnitte somit im hydrophoben Teil der Lipid-Doppelmembran stattfinden, wird der Einfluss von Lipiden auf diesen Prozess unter anderem auf die Zusammensetzung der Lipidmembran zurückgeführt. So ist der Schnittpunkt der γ -Sekretase und somit die Länge des A β -Peptids von der Fluidität der Membran abhängig [447].

Cholesterin ist ein essenzieller Bestandteil der Lipid-Doppelmembranen von Säugetieren. Durch seine

Struktur wird abhängig von der Menge des enthaltenen Cholesterins die Fluidität der Membran beeinflusst. Cholesterin bildet zudem einen Bestandteil von Mikrodomänen (engl. Lipid rafts) bestehend aus einer speziellen Protein- und Lipidzusammensetzung. Diese kommen in der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat und der Membran von Endosomen vor. Innerhalb dieser Lipid rafts finden sich bevorzugt bestimmte Transmembranproteine, so auch APP und die Sekretasen der amyloidogenen Prozessierung [64,175].

Durch seine antioxidativen, antiinflammatorischen und cholesterin-senkenden Eigenschaften ist das lipophile Vitamin E von wissenschaftlicher Relevanz hinsichtlich AD. Da α -TP die dominante Vitamin E Form im humanen Blut und Gewebe darstellt [289], war es im Vergleich zu anderen Vitamin E-Derivaten zunächst stärker im Fokus der Forschung. Auf welche Weise die Supplementation von α -TP die amyloidogene Prozessierung beeinflusst, ist zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Insbesondere die Auswirkungen auf den A β - Spiegel, Proteinlevel und die Expression amyloidogener Sekretasen, aber auch der Einfluss auf den A β -Katabolismus sollte analysiert werden.

Eine weitere Untergruppe der E Vitamine bilden die TT, welche drei Doppelbindungen enthalten und sich so strukturell aber auch in ihren Eigenschaften von den TP unterscheiden. So beeinflussen sie die Biosynthese von Isoprenoiden und zeigen hierüber vermutlich Auswirkungen auf die prenylierungsabhängige Pathogenese von AD [222]. Die Auswirkung dieses bisher weniger erforschten Vitamin E Derivats auf die amyloidogene Prozessierung ist ebenfalls unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Wie bereits erläutert, spielt Cholesterin eine entscheidende Rolle im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung und ein niedriger Cholesterin-Spiegel ist demzufolge in Bezug auf AD anzustreben. Neben antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften konnte den Vitamin E-Derivaten mehrfach ein Cholesterin-senkender Effekt nachgewiesen werden [380]. Im Hinblick auf ein mögliches protektives oder therapeutisches Potenzial von α -TP und α -TT ist ein Vergleich der Effekte der beiden Substanzen auf die amyloidogene Prozessierung, als auch die Cholesterin-Senkung, zur Identifikation des zur Substitution geeigneteren Derivats entscheidend.

Zudem wurde der Einfluss von Vitamin D-Derivaten und Koffein sowie anderen Methylxanthinen auf die amyloidogene Prozessierung und A β -Degeneration im Rahmen von Kooperationen analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
A β (1-40)-Peptid	Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn)
A β (1-42)-Peptid	Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn)
Acetonitrile	VWR
Bicinchoninsäure	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck Millipore Millipore
Complete Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA	Roche
CuSO ₄ x 5H ₂ O	Roth
DMEM	Sigma Aldrich, Thermo Scientific
DMSO	Roth
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösung (Western Lightning Plus ECL)	Perkin Elmer
EDTA	Roth
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol HPLC grade	Sigma Aldrich
Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies
FCS	PAN Biotech
Fixierlösung	Kodak
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
GM6001	Merck Millipore
HCL, rauchend	Merck Millipore
Hepes	Sigma Aldrich
Hygromycin B	PAN Biotech

Chemikalie	Hersteller
Insulin	Sigma Aldrich
Isopropanol, HPLC grade	VWR
KCL	Merck Millipore
KH ₂ PO ₄ x 3H ₂ O	Merck Millipore
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Lipofectamine 2000	Life Technologies
MEM Aminosäure-Lösung	Sigma Aldrich
Methanol-HPLC grade	VWR
MgCl ₂	Roth
Milchpulver, blotting grade	Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Roth
NaCl	AppliChem
NaOH	Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Roth
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich
NEM	Santa Cruz Biotechnology
NP-40	Substitute Fluka
Opti-MEM	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich
Proteingrößenmarker Page Ruler	Promega
Protein-G-Sepharose	Sigma Aldrich
SDS	Sigma Aldrich
Tocopherol	Sigma Aldrich
Tocotrienol	Sigma Aldrich
Tricin	Biomol
Tris	Sigma Aldrich
Triton X-100	Merck Millipore
Trizma Base	Sigma Aldrich

Chemikalie	Hersteller
TRIzol Reagenz	Life Technologies
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma Aldrich
Wasser, HPLC grade	VWR
Zeocin	Life Technologies
ZnCl ₂	Sigma Aldrich
β-Sekretase-Inhibitor II	Merck Millipore
β-Sekretase-Substrat IV	Merck Millipore
γ-Sekretase-Inhibitor X	Merck Millipore
γ-Sekretase-Substrat	Merck Millipore

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10cm-Schalen für Zellkultur	Sarstedt
12-Wellplatte für Zellkultur	Falcon
24-Wellplatte für Zellkultur	Falcon
6-Wellplatte für Zellkultur	Falcon
96-DeepWellplatte	Nunc
96-Wellplatte für RT-PCR, 6x16, weiß	Thermo Scientific
96-Wellplatte für Zellkultur	Falcon
96-Wellplatte MaxiSorp, schwarz	VWR
96-Wellplatte	Nunc
ECL-Hyperfilm	Amersham
Einfrierröhrchen 1,8ml	Nunc
Falconröhrchen, 15ml	Sarstedt
Falconröhrchen, 50ml	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolien TypeC DinA4	Xerox
Glasflaschen, 2ml	NeoLab
Glaskügelchen für Minilyis-Homogenisator, 0,5mm	Peqlab

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Glaspipetten	NeoLab
Glasröhrchen für Arbeit mit Lipiden	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein/Selbst konstruiert
Kanüle 23G x 1“, 0,6mm x 25mm	Becton, Dickinson and Company
Keramikkügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4mm	Peqlab
Maushirn (Wildtyp) für post-nukleären Fraktionen	AG Bals
Nitrozellulosemembran 0,2 µm Porengröße	Whatman
Nitrozellulosemembran, 0,45µm Porengröße	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
PTFE Filterplatten	Bedford
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 1,5ml, Schwarz	Eppendorf
Silikonmatte	Nunc
Tris-Tricin-Gele, 10-20%, 10 oder 12 Bahnen	Anamed Gelelektrophorese
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Well-Platten	Peqlab
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Scientific

3.1.2 Geräte

Tabelle 3 Geräte

Geräte/Zubehör	Hersteller
Agilent 1200 Series Kapillar HPLC System	Santa Clara
Analysenwaage ABS 80-4	Kern
8-Kanal-Pipette, elektronisch	Nunc
Brutschrank 37°C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipette M4	Eppendorf
Fluorometer Safire2	Tecan
Fluorometer/Luminometer Infinite M1000 Pro	Tecan
Gefrierschrank -20°C Premium	Liebherr
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Hamilton-Kapillare	Hamilton
Heizblock Thermoschüttler	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Kühlzentrifuge Fresco 21	Thermo scientific
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Massenspektrometer 4000 QTRAP	AB Sciex
Microplate Reader	LAB4you
Mikrowelle	Continent
Minilys Homogenisator	Peqlab
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific (Eigentum von AG Bals)
PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Präzisionswaage EW	Kern

Geräte/Zubehör	Hersteller
Rotor TLA-55	Beckmann Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software Piko Real 2.1	Thermo Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Stickstoff-Abdampfvorrichtung	VLH
Stickstofftank -196°C GT 140	Air Liquide
TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Überkopftaumler Reax2	Heidolph Instruments
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Wasserbad	GFL
Wheaton-Schüttler Multi Reax	Heidolph Instruments
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus

3.1.3 Zelllinien

Tabelle 4 Zelllinien und Medien

Bezeichnung	Beschreibung/ Antibiotika-Resistenz	Herkunft	Medium
N2a	murine Wildtyp-Neuroblastom- Zellen		DMEM 0,1mM MEM 10% FCS 1% Pen/Strep 2mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat
N2a-IDE-KD	murine Neuroblastom-Zellen mit stabiler IDE sh-RNS-Expression/ Hygromycin B-resistent	Hergestellt von Dr. Janine Mett	DMEM 0,1mM MEM 10% FCS 1% Pen/Strep 2mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat 400µg/ml Hygromycin B
N2a WT (mock)	Vergleichszellen für N2a-IDE-KD/ Hygromycin B-resistent	Hergestellt von Dr. Janine Mett	DMEM 0,1mM MEM 10% FCS 1% Pen/Strep 2mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat 400µg/ml Hygromycin B
SH-SY5Y-WT	humane Neuroblastom-Zellen		DMEM 0,1mM MEM 10% FCS
SH-SY5Y-APP	humane Neuroblastom- Zellen mit stabiler APP ₆₉₅ Expression/ Hygromycin B-resistent	Hergestellt von Dr. Heike Grimm	DMEM 0,1mM MEM 10% FCS 400µg/ml Hygromycin B
SH-SY5Y-β-CTF	humane Neuroblastom-Zellen mit stabiler Expression der letzten 99 C-terminalen Aminosäuren von humanem APP ₆₉₅ / Zeocin-resistent, Hygromycin B-resistent	Hergestellt von Christoph Stahlmann	DMEM 0,1mM MEM 10% FCS 400µg/ml Hygromycin B

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Epitop/Klonalität	Verwendung/Konjugation	Hersteller/Quelle
W02	A β	5-10 Aminosäuren der A β -Sequenz von humanem APP/ monoklonal	A β -Gesamt- Immunpräzipitation, A β -, APP- und sAPP α -Western Blots	AG Hartmann/ Multhaup/ Beyreuter (Heidelberg)
Mbs492139	sAPP β	freies C-terminales Ende von sAPP β / polyklonal	sAPP β -Western Blot	MyBioSource
PC529	BACE1	BACE1/ polyklonal	BACE1-Western Blot	Merck Millipore
sc7860	Presenilin 1	Aminosäuren 1-70 des N- Terminus von humanem Presenilin 1/ polyklonal	Presenilin 1-Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
P0260	Maus IgG	leichte Ketten von murinem IgG/ polyklonal	Sekundärantikörper für Western Blot/ HRP konjugiert	DAKO
W4011	Kaninchen IgG	schwere und leichte Ketten von Kaninchen IgG/ polyklonal	Sekundärantikörper für Western Blot/ HRP konjugiert	Promega

3.1.5 Kits

Tabelle 6 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Bestimmung der Cholesterinkonzentration in Zellen	Invitrogen
Cytotoxicity Detection KitPLUS	Bestimmung der Zytotoxizität durch LDH-Messung	Roche Diagnostics
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Synthese von cDNS	Life Technologies

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von Zellen

(nach Geraghty *et al.*, 2014)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturschalen der Größe 100x20mm (Tabelle 2), in 10ml Kulturmedium kultiviert. Alle Tätigkeiten zur Kultivierung wurden an einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II unter sterilen Bedingungen absolviert. Bei einer Konfluenz von 90-100% wurden die Zellen zunächst mit 5ml 1x PBS gewaschen und anschließend 2 bis 3 Minuten (min) mit 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung (Tabelle 1) inkubiert. Hierdurch lösten sich einige Zellen vom Kulturschalenboden, die dann mit 8,5ml frischem Medium vollständig abgelöst wurden. Von der Zellsuspension wurden in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie 0,5ml, 1ml oder 3ml in neue Kulturschalen verteilt und mit frischem Medium auf 10ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Je nach darauffolgender Methode wurden die Zellen auf 6-, 24- oder 96-Wellplatten ausgesät oder direkt von den 100x20mm-Schalen ausgehend verwendet.

10x PBS:

1,37M	NaCl
27mM	KCl
127,15mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
17,6mM	KH ₂ PO ₄

pH 7,5

1x PBS:

10x PBS 1:10 mit destilliertem
H₂O verdünnen

3.2.1.2 Langzeitlagerung und Reaktivierung von Zellen

(nach Geraghty *et al.*, 2014)

Um Zellen zu kryokonservieren, wurden diese bei einer erreichten Konfluenz von 60-80% zunächst mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturschalenboden abgelöst und mit 4,5ml Kulturmedium verdünnt und vollständig von der Kulturschale gelöst. Die 5ml Zellsuspension wurden in ein 15ml Falconröhrchen (Tabelle 2) überführt

und 5min bei 355 x g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 1,5ml Einfrierlösung A auf das verbleibende Zellpellet und die Resuspension darin. Danach wurden nochmals 1,5ml der Einfrierlösung B hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1,5ml in zwei Kryogefäße aliquotiert. Um die Zellsuspensionen kontinuierlich 1°C /min abzukühlen wurden diese zunächst über 48Std in Einfrierboxen (Tabelle 3) mit Isopropanol (Tabelle 1) bei -80°C und schließlich in flüssigem Stickstoff (Tabelle 3) gelagert.

Um Zellen zu rekultivieren, wurden die Gefrierkulturen bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, in ein 15ml Falcon überführt und mit 8,5ml warmem Kulturmedium versetzt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 355 x g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10ml warmem Kulturmedium resuspendiert und anschließend in eine 100x20mm-Zellkulturschale überführt.

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

3.2.1.3 Inkubation von Zellen mit α -TP und α -TT

(nach Grimm *et al.*, 2015)

Abhängig vom darauffolgenden Experiment erfolgte die Inkubation von SH-SY5Y-APP oder -WT Zellen (Tabelle 4) mit α -TP und α -TT auf 100x20mm-Kulturschalen, 6-, 24-, oder 96-Wellplatten. Hierfür wurden stets konfluente Zellen verwendet. Vor der Inkubation mit den Vitamin E-Derivaten erfolgte eine 12Std Vorinkubation mit einem Kulturmedium welches einen 0,1%igen Anteil an fötalem Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS) (Tabelle 1) enthielt. Für die Inkubation mit α -TP und α -TT wurden die aliquotierten Stocks dieser sowie 0,1% FCS enthaltendes Inkubationsmedium auf 37°C erwärmt. Es wurde mit einer Konzentration von jeweils 10 μ M α -TP, α -TT inkubiert. Um diese Konzentration zu erreichen, wurden die Substanzen, welche in einer Konzentration von 10mM gelöst und aliquotiert waren 1:1000 im Kulturmedium verdünnt. Um den Einfluss von Ethanol (EtOH) (Tabelle 1) zu überprüfen wurde dieses in entsprechender Konzentration auf die Kontroll-Zellen gegeben. Die Zellen wurden zunächst für 8Std inkubiert und anschließend erneut für 16Std.

3.2.1.4 Inkubation von Zellen mit β - und γ -Sekretase-Inhibitoren

(nach Robinson *et al.*, 2014), (Inkubation mit β -Sekretase-Inhibitor nach Dissertation Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Um die Aktivität der β - oder γ -Sekretase, wie in 3.2.3.9 beschrieben, zu messen wurden die Zellen zunächst auf 96-Wellplatten (Tabelle 2) ausgesät und anschließend wie in 3.2.2.3. mit α -TP und α -TT in einer jeweiligen Konzentration von 10 μ M sowie entsprechender EtOH-Konzentration als Kontrolle inkubiert. 3Std. vor Abschluss der zweiten Inkubation mit TP und TT erfolgte die Vorinkubation mit einem Sekretase-Inhibitor (Tabelle 1). Hierfür wurden 0,5 μ l des jeweiligen Inhibitors in vier Wells gegeben sowie die entsprechende Menge Dimethylsulfoxid (DMSO) (Tabelle 1) als Kontrolle in alle weiteren Wells pipettiert.

Sekretase:	Inhibitor:
β -Sekretase	β -Sekretase-Inhibitor II (Stock 5mM in DMSO)
γ -Sekretase	γ -Sekretase-Inhibitor X (Stock 1mM in DMSO)

3.2.1.5 Langzeitinkubation von Zellen zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration

(Neu Etabliert im Rahmen dieser Arbeit)

Für die Methode der Bestimmung der Cholesterinkonzentration von Gesamt- und freiem Cholesterin mittels Amplex Red Cholesterin Assay Kit (Tabelle 6) wurden SH-SY5Y WT Zellen über insgesamt fünf Tage inkubiert. Die Inkubation erfolgte analog zu den Standardinkubationsbedingungen (3.2.1.3), mit dem Unterschied, dass anstatt nach 6Std alle 24Std frisches Inkubationsmedium auf die Zellen gegeben wurde. Zudem wurden innerhalb der letzten 48Std der Langzeitinkubation 1% FCS haltigem Kulturmedium anstelle von 0,1% FCS haltigem Kulturmedium verwendet.

3.2.1.6 Bestimmung der Zytotoxizität durch LDH-Messung

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

Vor der Verwendung additiver Substanzen für experimentelle Versuche wurde zunächst die Zytotoxizität dieser nach einer Inkubation, wie in 3.2.1.3 beschrieben, bestimmt. Hierfür wurde die Methode der Zytotoxizitätsbestimmung durch Messung der Laktatdehydrogenase-Enzymaktivität verwendet.

Die Laktatdehydrogenase ist ein zentrales Enzym des Zellstoffwechsels und in fast jedem Gewebe der

meisten Lebewesen zu finden. Sie katalysiert die reversible Reduktion von Laktat zu Pyruvat mit Hilfe des Kofaktors Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) unter der Entstehung von NADH/H⁺. Die Laktatdehydrogenase liegt physiologischer Weise im Zytosol der Zelle vor und wird bei Schädigung der Zellmembran in den Extrazellularraum freigesetzt. Somit können pathologisch erhöhte extrazelluläre LDH-Werte zur Quantifizierung der Zellviabilität genutzt werden, da sich die Menge der geschädigten Zellen direkt proportional zur extrazellulären Laktatdehydrogenase-Enzymaktivität verhält.

Um die Enzymaktivität zu messen, wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche (Tabelle 6) verwendet und nach Angaben des Herstellers gebraucht. Hierdurch werden nach der ersten Reaktion der Laktatdehydrogenase in einem zweiten Schritt die entstandenen H/H⁺ von NADH/H⁺ durch einen Katalysator an das gelbe Tetrazonium Salz Iodonitrotetrazolium (INT) transferiert, welches somit zu rotem Formazan reduziert wird. Mit der darauffolgenden Messung der Formazan Absorption kann eine quantitative Aussage über die Zellviabilität bzw. Zytotoxizität getroffen werden, wobei 100% Zellviabilität 0% Zytotoxizität entsprechen.

Für die Anwendung des Cytotoxicity Detection Kits wurde das Kulturmedium von den inkubierten Zellen abgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße (Tabelle 2) überführt. Anschließend erfolgte die Aufbereitung des Mediums, wie in 3.2.3.1 beschrieben. Für die Herstellung einer Positivkontrolle wurde ein Well zunächst 15min mit 1% (v/v) Triton X100 (Tabelle 1) inkubiert, um die Zellen abzutöten. Mit dem Medium der Positivkontrolle wurde ebenfalls wie in 3.2.3.1. beschrieben verfahren. Durch die Verdünnung der Positivkontrolle mit unbehandeltem Inkubationsmedium wurde eine Standardreihe erstellt. In eine 96-Well Platte wurden anschließend 50µl Inkubationsmedium je Well vorgelegt, zu welchen 50µl der Proben oder der Standardreihe hinzugefügt wurden. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit 100µl Reaction Mixture (Tabelle 1) je Well. Nach abstoppen der Reaktion mit 50µl Stop-Solution je Well wurde die 96-Wellplatte in einem ELISA Reader (Tabelle 3) bei einer Absorption von 491nm gemessen.

Reaction Mixture

(für 100 Messungen):

250µl	Catalyst
11,25ml	Dye Solution

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNS-Isolation aus Zellen mit Trizol

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

Die Isolation von RNS aus Zellen erfolgte durch die Single-Step-Methode. Die Zellen wurden hierfür auf 6-Wellplatten ausgesät und inkubiert (3.2.1.3). Anschließend wurde das Medium von den Kulturschalen abgenommen und 1000µl Trizol (Tabelle 1) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann mit einem Gummispatel abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Proben in einem Schüttler für 15 Sekunden homogenisiert und anschließend für 3min. bei RT inkubiert. Durch die darauffolgende Zentrifugation für 15min bei 12000 x rpm und 4°C kommt es zur Bildung von drei Phasen. Einer oberen RNS-Phase, einer mittleren Protein-Phase und einer unteren DNS-Phase. Nach der Überführung der RNS-Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden 500µl Isopropanol hinzugefügt und die Proben für 10min bei RT inkubiert, wodurch die RNS ausfällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der entstandene Überstand abgenommen und das Pellet mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5min bei 12000 x rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 2min lufttrocknen gelassen. Abschließend wurde das Pellet in 100µl Nuklease-freien H₂O aufgenommen und für 10min bei 55°C erhitzt, um die RNS zu lösen.

3.2.2.2 Photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNS

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNS erfolgte mit einem NanoDrop-Spektrometer (Tabelle 3) durch photometrische Messung im Bereich der maximalen Extinktion von RNS und Proteinen. Hierbei wurde für die Bestimmung der Konzentration die Absorption bei 260nm und zur Bestimmung der Reinheit der verwendeten RNA eine Absorption von 280nm gemessen. Als Maß für die Reinheit der Proben wurde der Quotient beider Extinktionen verwendet.

3.2.2.3 Synthetisierung von cDNS

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

Um die isolierte RNS in ihre komplementäre DNS (engl. complementary DNA, cDNA) umzuschreiben, wurde das High Capacity cDNA RT Kit von Applied Biosystem (Tabelle 6) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden 2µl RNS mit Master Mix (siehe unten) in einer 96-Wellplatte vermischt. In einem PCR-Zyklus (Tabelle 3) wurden die Proben für 10min bei 25°C, 120min bei 37°C, 5min bei 85°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die entstandene cDNS wurde mit 180µl H₂O je Ansatz verdünnt und im Anschluss weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Master Mix:

2µl	10x RT Puffer
0,8µl	25x dNTP Mix
2,0µl	10x RT Random Primer
1,0µl	MultiScribe Reverse Transkriptase
4,2µl	Nuclease-freies H ₂ O

3.2.2.4 *Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion*

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

Mit der Methode der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. real time–polymerase chain reaction, RT-PCR) ist es möglich die Expression bestimmter Gene quantitativ zu bestimmen. Dies geschieht durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die doppelsträngige DNS interkaliert. Hierdurch nimmt mit jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenz der DNS zu. Neben dem gesuchten Gen wird auch ein Referenz-Gen (engl. housekeeping gene) mitgemessen, dass von jeder Zelle unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert wird. Somit ist ein quantitativer Vergleich möglich.

Für die Durchführung der RT-PCR wurden 2,5µl cDNS in eine 96-Wellplatte pipettiert, zu jeweils 0,25µl des entsprechenden forward und reverse Primers (Tabelle 7) sowie 2µl H₂O und 5µl SYBR Green Master Mix hinzugegeben wurden. Die Messung erfolgte in einem Piko Real-Time PCR System (Tabelle 3) unter Verwendung der Piko Real 2.1 Software (Tabelle 3). Die Proben wurden im ersten Zyklus für 20sec auf 95°C erhitzt und in den darauffolgenden 40 Zyklen 3sec bei 95°C und 30sec bei 60°C inkubiert. Im letzten Zyklus erfolgte die Abkühlung der Proben auf RT.

RT-PCR Ansatz:

0,25µl	Primer forward
0,25µl	Primer reverse
2µl	H ₂ O
5µl	SYBR Green
2,5µl	cDNS

Tabelle 7 verwendete Primer

Gen	forward Primer	reverse Primer
APH1a	5'-CAG CCA TTA TCC TGC TCC AT-3'	5'-GGA ATG TCA GTC CCG ATG TC-3'
APH1b	5'-GTG TCA GCC CAG ACC TTC AT-3'	5'-CAG GCA GAG TTT CAG GCT TC-3'
BACE1	5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3'	5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3'
NCSTN	5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3'	5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3'
PSEN1	5'-CTC AAT TCT GAA TGC TGC CA-3'	5'-GGC ATG GAT GAC CTT ATA GCA-3'
PSEN2	5'-GAT CAG CGT CAT CGT GGT TA-3'	5'-GGA ACA GCA GCA TCA GTG AA-3'
PSENN	5'-CAT CTT CTG GTT CTT CCG AGA G-3'	5'-AGA AGA GGA AGC CCA CAG C-3'

3.2.2.5 Auswertung qPCR mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

(nach Livak und Schmittgen, 2001)

Bei der Verwendung eines Haushaltgens wird die Expression des zu untersuchenden Gens relativ zu diesem betrachtet. Um die Expressionsunterschiede der Gene zu berechnen, wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode unter Verwendung der Ct-Werte (engl. threshold cycle) genutzt. Der Ct-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem erstmals ein festgelegter Schwellenwert überschritten wird. Es wurde zunächst der Ct-Wert des Haushaltgens von dem des gesuchten Gens abgezogen. Anschließend wurde von diesem Wert der Ct-Wert der Kontroll-Probe subtrahiert und das Ergebnis in die Formel $=2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Aufbereitung von konditioniertem Medium und Zellen

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

Die Zellkulturschalen wurden nach der Inkubation auf einem Eisbad gelagert. Es wurde das konditionierte Medium vollständig abgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend für 5min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert. Der hierdurch von Zellfragmenten gereinigte Überstand wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurde das aufbereitete Medium direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Die in den Kulturschalen verbliebenen Zellen wurden drei Mal mit PBS (3.2.1.1) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abhängig vom darauffolgenden Experiment direkt in der Kulturschale oder nach Überführung in ein Reaktionsgefäß lysiert. Für die Lyse in der Kulturschale wurden die Zellen

60min mit Lyse-Puffer auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Schaber (Tabelle 2) abgetragen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 13000 x g und 4°C zum Sedimentieren des Zelldebris, wurden diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Alternativ wurden die Zellen mit PBS und einem Schaber von der Kulturschale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben bei 13000 x g und 4°C für 5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde dann in Lyse-Puffer resuspendiert und für 60min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation und Trennung des Lysats von Zellfragmenten. Die aufbereiteten Lysate wurden abhängig vom jeweiligen Experiment direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Lyse-Puffer:

150mM	NaCl
50mM	Tris/HCL pH 7,4
2mM	EDTA
0,1%	NP-40
0,1%	Triton-X 100
frisch 10x Complete-Protease Inhibitor 1:10 hinzufügen	

3.2.3.2 Homogenisierung von Zellen

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

Die Homogenisierung von Zellen erfolgte in Abhängigkeit vom darauffolgenden Experiment nach dem Potter-Elvehjem Verfahren oder unter Verwendung eines Minilys-Homogenisators (Tabelle 3).

Die Zellen wurden zunächst mit PBS von der Kulturschale abgenommen und zentrifugiert (3.2.3.1). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in ddH₂O resuspendiert. Die verwendete ddH₂O Menge war hierbei abhängig von der Menge der Zellen sowie dem darauffolgenden Experiment.

Bei Verwendung eines Gewebshomogenisators nach Potter-Elvehjem wurden die Zellen in einem Präzisionszylinder durch die Scherkräfte eines darin rotierenden Pistills aufgeschlossen.

Bei Verwendung eines Minilys-Homogenisators erfolgte der Zellaufschluss durch die Beschleunigung von Keramikkügelchen (Tabelle 2), die zuvor zu den Proben gegeben wurden.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch BCA-Messung

(nach Smith *et al.*, 1985)

Vor der Verwendung von konditioniertem Medium für experimentelle Versuche wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben auf einen einheitlichen Wert eingestellt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Hierzu erfolgte zunächst die Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentrationen der Proben mittels der Bicinchoninsäure-Messung (engl. bicinchoninic acid, BCA).

2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Tabelle 1) ist eine Dicarbonsäure, die mit einwertigen Kupferionen stabile, blau-violette Komplexe bilden kann, was als Biuret-Reaktion bezeichnet wird. Im Rahmen der BCA-Messung wird Kupfersulfat zu den Proben gegeben. Die darin enthaltenen Cu^{2+} Ionen werden im alkalischen Milieu durch die Proteine zu Cu^+ Ionen reduziert, welche wiederum mit Bicinchoninsäure reagieren können.

Für die BCA-Messung wurden 3 μl der, wie in 3.2.3.1 beschrieben, aufbereiteten Zell-Lysate als Fünffachbestimmung sowie 20 μl einer Standardreihe auf eine 96-Wellenschale pipettiert. Die Standardreihe wurde aus in Wasser (Tabelle 1) gelöstem Rinderserum-Albumin hergestellt und umfasst 12 Konzentrationen von 0,1 bis 1,1 μl Protein. Anschließend folgte die Zugabe von 200 μl frisch angesetzter BCA-Reaktionslösung je Well, das 15min bei 37°C und weitere 15min auf einem Schüttler (200U/min) bei RT inkubiert wurde. Die Absorptionsmessung der blau-violetten Farbkomplexe erfolgte dann bei 560nm in einem ELISA Reader. Anhand der Messwerte der Standardreihe wurden anschließend die Proteinkonzentrationen der gemessenen Proben bestimmt.

BCA- Reaktionslösung:

4 % CuSO_4 in ddH₂O : Bicinchoninsäure 1:39

3.2.3.4 Immunpräzipitation von Amyloid beta

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

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist es möglich unter Verwendung eines Antikörpers ein bestimmtes Protein, in diesem Fall A β , aus einem Proteingemisch zu trennen. Hierfür wurde zu 1ml mittels BCA-Messung (3.2.3.3) eingestellten Proben 20 μl Protein G-Sepharose, sowie 5 μl W02 Antikörper (Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Tabelle 5) hinzugefügt. In einem Überkopfschüttler wurden die Proben bei 4°C für 12Std inkubiert. Während dieser Inkubation bindet der Antikörper, die in den Proben enthaltenen

Aß Proteine und wird wiederum von der Protein-G-Sepharose (Tabelle 1) gebunden. Anschließend wurde der Überstand nach einer Minute Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C verworfen. Das entstandene Präzipitat wurde in drei Waschschrritten mit Waschpuffer A, B und C von unspezifischen Bindungen gereinigt. Hierfür wurde das Präzipitat in 1ml Waschpuffer resuspendiert und erneut für 5min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Vollendung der Waschschrritte wurde der restliche im Präzipitat enthaltene Waschpuffer mittels einer Hamilton-Kapillare (Tabelle 3) abgenommen, um jegliche Flüssigkeit aus dem Präzipitat zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und für die ECL- Entwicklung auf eine Nitrozellulosemembran (Tabelle 2) übertragen.

Waschpuffer A:		Waschpuffer B:		Waschpuffer C:	
10mM	Tris/HCL pH 7,5	10mM	Tris/HCL pH 7,5	10mM	Tris/HCL pH 7,5
150mM	NaCl	500mM	NaCl		
2mM	EDTA	2mM	EDTA		
0,1%	Triton-X-100	0,1%	Triton-X 100		
0,1%	NP-40	0,1%	NP-40		

3.2.3.5 SDS-Page

(nach Schägger und von Jagow, 1987)

Die SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist eine Form der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Masse an einem elektrischen Feld. Mit Hilfe dieser Methode wurden Proteine aus Zelllysaten (3.2.3.1), in den Extrazellularraum freigesetzte Proteine aus konditioniertem Kulturmedium und Immunpräzipitate (3.2.3.4) aufgetrennt. Im Fall von Zelllysaten wurden 50µg Protein je Tasche auf ein Polyacrylamid Gel geladen.

Vor dem Auftragen der Proben auf diskontinuierliche 10-20%ige Tris-Tricin-Gradient-Gele (Tabelle 2) wurden diese mit 1/3 Volumen 3x Protein-Probenpuffer versetzt. Bei der Verwendung von Immunpräzipitaten wurde der Protein-Probenpuffer zunächst 1:3 in ddH₂O verdünnt und anschließend 15µl je Probe zugegeben. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) (Tabelle 1) ist ein anionisches Tensid, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch diese nur anhand ihrer Masse aufgetrennt werden. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, wurden die Proben für 5min bei 98°C auf einem Heizblock (Tabelle 3) inkubiert. Danach konnten die Proben direkt weiterverwendet oder bei 4°C gelagert werden.

Um die Proben auf ein Gel zu laden, wurde dieses zunächst in eine Elektrophoreseapparatur (Tabelle 3) eingespannt und mit 1x Kathodenpuffer umgeben. Die Proben wurden für 15 sec bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit der Hamilton-Kapillare in die Gel-Taschen übertragen. In die erste Tasche jedes Gels wurde anstelle einer Probe 5µl des Markers Page Ruler (Tabelle 1) gegeben. Dieser wurde ebenfalls aufgetrennt und zeigte die Proteinstandardgrößen auf, anhand welcher das zu detektierende Protein aufgesucht wurde. Bei einer angelegten Spannung von 120V wurden die Proben zwischen 60 und 90min lang aufgetrennt.

1x SDS-Page Kathodenpuffer:		3x Protein-Probenpuffer:	
1M	Tris/HCL pH 8,25-8,5	187,5mM	Tris/HCL pH 6,8
1M	Tricin	6% (w/v)	SDS
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	

3.2.3.6 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Western Blot

(nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Proteintransfer dient der Übertragung der durch die SDS-PAGE (3.2.3.5) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Tabelle 2), um sie anschließend durch Immundetektion (3.2.3.7) und Chemilumineszenz nachzuweisen. Für den Transfer der Proteine von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Elektrotransfer, die Übertragung durch Anlage eines elektrischen Feldes, verwendet. Hierbei wandern die mit SDS behandelten, negativ geladenen Proteine von der Kathode Richtung Anode. Um den Proteintransfer durchzuführen, wurde zunächst die untere Hälfte des Blotsandwiches, bestehend aus der Kassette, einem Schwamm, zwei Whatman-Filterpapieren (Tabelle 2) sowie der Nitrozellulosemembran vorbereitet. Hierfür wurden alle Bestandteile in einer flachen mit 1x Transferpuffer gefüllten Wanne angefeuchtet und in der aufgeführten Reihenfolge aufeinandergelegt. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel aus seiner Plastikhülle entfernt und auf der Nitrozellulosemembran platziert. Zwei weitere zuvor angefeuchtete Filterpapiere wurden auf das Gel gelegt und vorsichtig mit einem Metallspatel horizontal und vertikal abgestrichen, um Luftblasen aus dem Blotsandwich zu entfernen. Abschließend wurden ein weiterer angefeuchteter Schwamm und der obere Teil der Kassette aufgelegt und das Blotsandwich in eine mit 10x Transferpuffer gefüllte

Blotkammer gestellt. Abhängig von der Masse des zu detektierenden Proteins wurde eine elektrische Stromstärke von 200mA bis 380mA für 45min bis 12h eingestellt.

10x Transferpuffer für Blotsandwich:		Transferpuffer für Blotkammer:	
250mM	Trizma Base	25mM	Tris/HCl pH 8,7
1,57M	Glycin	192mM	Glycin
in ddH ₂ O		20% (v/v)	Methanol
für 1x Transferpuffer 1:10 (v/v) in ddH ₂ O		0,025% (w/v)	SDS
		in ddH ₂ O	

3.2.3.7 Immunologischer Nachweis

(nach Ida *et al.*,1996)

Die Immundetektion dient dem Nachweis einzelner Proteine aus zuvor aufgetrennten und auf einer Nitrozellulosemembran fixierten Proteingemischen (3.2.3.6). Dies geschieht unter dem Einsatz eines Primärantikörpers, der sich spezifisch an das gesuchte Protein bindet. An diesen Primärantikörper bindet wiederum ein Sekundärantikörper, der mit einer Enzym-Antikörper-Konjugation versehen ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um die Meerrettichperoxidase, welche die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert. Ausgehend von der oxidierten Form des Luminols kann eine Chemilumineszenz detektiert werden. Durch das Auftragen von ECL-Lösung (engl. Enhanced chemiluminescence) (Tabelle 1) auf die Nitrozellulosemembran wird so das darin enthaltene Luminol umgesetzt. Das emittierte Licht kann dann auf einem lichtempfindlichen Film detektiert werden. Je nach zu detektierendem Protein wurden verschiedene Primär- und Sekundärantikörper verwendet, sowie unterschiedliche Inkubations- und Blockzeiten, die in Tabelle 8 aufgezeigt sind. Nach vollendetem Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurde diese zunächst in einer Blocklösung inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Bei der Verwendung des Primärantikörpers W02 (Tabelle 5) wurde die Membran vor dem Blocken für 5min in 1x PBS in einer Mikrowelle (Tabelle 3) bei 700W gekocht. Nach zwei Waschsritten mit 1x PBS erfolgte die Inkubation im verdünnten Primärantikörper. In darauffolgenden drei Waschsritten wurden unspezifische Antikörperbindungen sowie schwache Antikörperbindungen entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem in 1x PBS verdünnten Sekundärantikörper. Um eventuelle unspezifische und lockere Antikörperbindungen zu entfernen, wurde die Membran nochmals in vier Schritten gewaschen. Um die Membran zu entwickeln, wurde die ECL-Lösung darauf pipettiert und die Membran anschließend zwischen zwei Klarsicht Kopierfolien gelegt. Diese wurden ausgestrichen, um Luftblasen zu entfernen, und in eine Kassette gespannt. In einer Dunkelkammer wurde ein

lichtempfindlicher Film (Tabelle 1) auf die Kassette aufgelegt und anschließend in einer Entwickler- und Fixierer-Lösung (Tabelle 1) gewaschen. Nach dem Trocknen des Films wurde dieser eingescannt und densitometrisch mit Hilfe des Programmes Image Gauge V3.45 (Tabelle 3) ausgewertet.

ECL- Lösung:

Western Lightning Plus ECL 1 und Western
Lightning Plus ECL 2 1:1 (v/v)

Tabelle 8 Bedingungen für Blocken, Primär- und Sekundärantikörper

Zu detektierendes Protein/Peptid	Blockierlösung/ Inkubationsbedingung	Waschpuffer	1. Antikörper, Inkubationsbedingung	2. Antikörper, Inkubationsbedingung
A β / sAPP α / APP	10% Milchpulver (w/v) in PBS/ 12Std, 4°C	PBS	W02 1 μ g/ml in 1% Milchpulver (w/v) in PBS verdünnt/ 90min, RT	P0260 1:5000 in PBS verdünnt/ 60min, RT
sAPP β	10% Milchpulver (w/v) in PBS/ 12Std, 4°C	PBS	Mbs492139 1:200 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS/ 90min, RT	W4011 1:5000 in PBS verdünnt/ 60min, RT
BACE1	10% Milchpulver (w/v) in PBS/ 12Std, 4°C	PBS	PC529 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS/ 90min, RT	W4011 1:5000 in PBS verdünnt/ 60min, RT
Presenilin1	10% Milchpulver (w/v) in PBS / 60min, RT	PBS	sc7860 1:250 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS verdünnt/ 90min, RT	W4011 1:5000 in PBS verdünnt/ 60min, RT

3.2.3.8 A β -Degradation

(nach Dissertation Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Um neben dem anabolen auch den katabolen A β Stoffwechsel zu untersuchen, wurde die Methode der Bestimmung des nicht abgebauten A β 1-40 durchgeführt. Hierfür wurde eine definierte Menge humanes A β 1-40 zu murinen Neuroblastom-Zellen gegeben und für 6Std inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot-Analyse das im konditionierten Medium verbliebene A β 1-40 bestimmt. Das humane A β 1-40 wird analog zum murinen A β verstoffwechselt. Der in der Western Blot-Analyse verwendete W02 Antikörper bindet jedoch nur humanes A β 1-40 und lässt somit eine Aussage über die Reduktion des A β 1-40 Gehalts zu. Die Aktivität der A β -Degradation steht hierzu im umgekehrt proportionalen

Verhältnis.

Um die A β 1-40 Degradation zu bestimmen, wurden N2a Kontroll- oder IDE-KD Zellen (Tabelle 4) auf eine 24-Wellplatte (Tabelle 2) ausgesät und wie in 3.2.1.3 beschrieben, mit α -TP und α -TT inkubiert. Die zweite Inkubation erfolgte unter zusätzlicher Zugabe von 0,5 μ g/ml humanem A β 1-40 zu den Inkubationsmedien. Nach 6Std wurde das konditionierte Medium wie in 3.2.3.1 beschrieben, aufbereitet und A β 1-40 mittel Western-Blot detektiert.

Um die IDE unabhängige A β -Degradation zu untersuchen, wurden bei der Zellinkubation in jedem Inkubationsschritt 10 μ M Insulin (Tabelle 1) als kompetitiver Inhibitor von IDE zu gegeben.

3.2.3.9 Bestimmung der Sekretaseaktivität

(nach Grimm *et al.*, 2015)

Um die Sekretaseaktivität zu bestimmen, wurde eine fluoreszenz-basierte Methode verwendet. Hierbei wurden intern gequenchte Peptid-Substrate genutzt, die spezifische Aminosäuresequenzen enthalten, die durch β - oder γ -Sekretase geschnitten werden. Durch den Schnitt an entsprechender Stelle kommt es zur Fluoreszenz des geschnittenen Substrats. Die Aktivität der Sekretasen verhält sich somit direkt proportional zur emittierten Fluoreszenz und kann über diese ermittelt werden. Da die Sekretasesubstrate jeweils auch von unspezifischen Proteasen geschnitten werden, wurde zur Erhöhung der Spezifität der Messungen zusätzlich ein β - oder γ -Sekretase -Inhibitor verwendet. Somit kann die durch andere Proteasen entstandene Fluoreszenz ermittelt und subtrahiert werden.

3.2.3.9.1 Bestimmung der Sekretaseaktivität in lebenden Zellen

Für die Bestimmung der Sekretaseaktivität in lebenden Zellen wurden diese auf 96-Wellplatten ausgesät und, wie in 3.2.1.3 beschrieben, mit α -TP und α -TT inkubiert. Nach abnehmen des Inkubationsmediums wurden die Zellen zwei Mal mit auf 37°C erwärmter LCIS (engl. life cell imaging solution) gewaschen. Das entsprechende Substrat wurde wie in Tabelle 9 gezeigt in 37°C warmer LCIS angesetzt. Der LCIS-Substrat Ansatz wurde anschließend nochmals aufgeteilt und mit 10 μ M α -TP, α -TT und EtOH als Kontrolle versetzt. Bei Verwendung eines Inhibitors wurde auch dieser nach erneuter Aufteilung der Ansätze zugegeben.

Die angesetzten Substrat-Lösungen (LCIS+Substrat+TP, LCIS+Substrat+TP+ Inhibitor, LCIS+Substrat+TT, LCIS+Substrat+TT+ Inhibitor, LCIS+Substrat+ Ethanol, LCIS+Substrat+Ethanol+ Inhibitor) wurden anschließend auf die Zellen pipettiert. Die Messung der Sekretaseaktivität erfolgte in einem Fluorometer (Tabelle 3) bei 37°C. Im Fall der β -Sekretaseaktivität erfolgte die Messung bei einer Exzitationswellenlänge von 345 ± 5 nm und einer Emissionswellenlänge von 500 ± 5 nm. Für die Messung der γ -Sekretaseaktivität wurde eine Exzitationswellenlänge von 355 ± 10 nm und eine Emissionswellenlänge von 440 ± 10 nm verwendet.

Tabelle 9 Verdünnung von Sekretasesubstraten bei Messung mit lebenden Zellen

Sekretase	Substrat	Substratverdünnung	Inhibitor	Inhibitorkonzentration
β -Sekretase	β -Sekretase-Substrat IV	1:100 in LCIS verdünnt (v/v)	β -Sekretase-Inhibitor II	4 μ M
γ -Sekretase	γ -Sekretase-Substrat	1:125 in LCIS verdünnt (v/v)	γ -Sekretase-Inhibitor X	2 μ M

Life Cell Imaging Solution:

140mM	NaCl
2,5mM	KCl
1,8mM	CaCl ₂
1,0mM	MgCl ₂
20mM	Hepes
auf pH 7,4 einstellen	

3.2.3.9.2 Bestimmung der Sekretaseaktivität aus post-nukleären Fraktionen

Um den direkten Effekt von TP und TT auf die β - und γ -Sekretase zu bestimmen, wurde zusätzlich zur Messung der Sekretaseaktivität lebender Zellen auch die Sekretaseaktivität von Membranfragmenten bestimmt.

3.2.3.9.2.1 Herstellung von post-nukleären-Fraktionen und isolierter Membranen

Für die Herstellung von post-nukleären-Fraktionen wurden 100x20mm Schalen eukaryoter Zellen drei Mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Spatel und 800 μ l β -/ γ -Saccharose-Puffer von der Kulturschale entfernt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine konstante Menge Keramikugeln zugegeben und die Zellsuspension für 20sec auf Stufe 3 eines Minilyse-Gerätes mechanisch lysiert. Mittels BCA-Messung (3.2.3.3) wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt und auf einen Wert von 2mg/ml bei einem Volumen von 1,2 ml normiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 900 x g und 4°C wurde 1ml des Überstandes in ein Glasgefäß (Tabelle 2) überführt und 10 μ M α -TP, α -TT bzw. EtOH zu diesen post-nukleären Fraktionen pipettiert. Danach folgte eine Inkubation für 15min bei 37°C auf einem Schüttler bei 400/U. Von den somit konditionierten post-nukleären Fraktionen wurde 1ml entnommen und in neue Ultrazentrifugegeeignete Reaktionsgefäße (Tabelle 2) überführt, um isolierte Membranen zu generieren. Die Proben wurden bei 55.000 rpm für 75min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen.

Das Membranpellet wurde in 800µl β -, γ -Sekretasepuffer resuspendiert. Anschließend wurde eine konstante Menge Glaskügelchen (Tabelle 2) zu den Proben gegeben und diese auf Stufe 2 für 10 Sec im Minilyse-Gerät lysiert. Danach wurden die Proben mit einer Kanüle (Tabelle 2) von den Glaskügelchen getrennt und ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.3.9.2.2 Messung der Sekretaseaktivität in isolierten Membranen

Für die Messung der γ -Sekretaseaktivität in isolierten Membranen wurden in eine 96-Wellplatte 100µl je Well der zuvor aufbereiteten Proben (3.2.3.1) gegeben. Zur Bestimmung der β -Sekretaseaktivität aus isolierten Membranen wurden 50µl Probe je Well eingesetzt, zu welchen weitere 50µl PBS pH4,5 gegeben wurden. Die Sekretasesubstrate wurden wie in Tabelle 10 erläutert zunächst in DMSO verdünnt und anschließend analog für die Sekretasemessung in lebenden Zellen (3.2.3.9.1) mit α -TP, α -TT, EtOH und Inhibitoren versetzt. Die darauffolgende Messung im Fluorometer erfolgte wie bereits in 3.2.3.9.1 beschrieben.

Tabelle 10 Verdünnung von Sekretasesubstraten bei Messung in isolierten Membranen

Sekretase	Substrat	Substratverdünnung	Inhibitor	Inhibitorkonzentration
β -Sekretase	β -Sekretase-Substrat IV	1:3 in DMSO verdünnt (v/v)	β -Sekretase-Inhibitor II	4µM
γ -Sekretase	γ -Sekretase-Substrat	1:50 in DMSO verdünnt (v/v)	γ -Sekretase-Inhibitor X	50µM

β -, γ -Sekretasepuffer

10mM	Tris/HCl pH 7,4
1mM	EDTA
200mM	Sucrose

3.2.3.10 Bestimmung der Konzentration von Gesamt- und freiem Cholesterin

(nach Herstellerangaben Amplex Red Cholesterol Assay Kit, Version 2016)

Für die Bestimmung der Cholesterinkonzentration in Zellen wurde das Amplex Red Cholesterol Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode werden zunächst die Cholesterinester durch die Cholesterin-Esterase zu Cholesterin hydrolysiert, das daraufhin mit dem bereits frei vorliegenden Cholesterin durch die Cholesterin-Oxidase oxidiert wird. Das hierdurch entstandene H₂O₂ wird durch das Amplex Red Reagenz (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) detektiert. Katalysiert durch die

Meerrettichperoxidase reagieren H₂O₂ und Amplex Red Reagenz zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin, dessen Emission und Extension zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration genutzt wird. Neben der Bestimmung des Gesamtcholesterins ist auch die Bestimmung ausschließlich freien Cholesterins möglich. Hierfür erfolgt nicht das Hinzufügen von Cholesterin-Esterase, wodurch die Cholesterinester nicht hydrolysiert und somit nicht erfasst werden.

Für die Bestimmung des Gesamt- oder freien Cholesterins wurden die zuvor langzeitinkubierten Zellen (3.2.1.5) zwei Mal mit PBS gewaschen und mit einem Minilys-Homogenisator auf Stufe 3 homogenisiert (3.2.3.2). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben mittels BCA-Messung (3.2.3.3). Es wurde eine Proteinkonzentration von 100µg in 100µl Reaktionspuffer eingestellt. Nach der Zugabe von 100µl Working Solution wurden 100µl der Proben und 100µl einer 8-teiligen Cholesterinstandardreihe von 0-4µg in eine 96-Wellplatte pipettiert. Hierauf erfolgte die Zugabe von 100µl Working Solution je Well. In einem Safire2 Fluorometer wurden die Proben 30sec geschüttelt und anschließend bei einer Extinktionswellenlänge von 530nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm gemessen.

Working Solution (Gesamtcholesterin):

75µl	Amplex Red Reagenz
50µl	Meerrettichperoxidase
50µl	Cholesterin-Oxidase
5µl	Cholesterin-Esterase
4,82ml	Reaktionspuffer
für freies Cholesterin keine Cholesterin Esterase hinzufügen	

3.2.3.11 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

3.2.3.11.1 Bestimmung hoch-reaktiver Sauerstoffspezies mit Aminophenyl Fluoreszein

(nach Setsukinai *et al.*, 2003)

Für die selektive Bestimmung von hROS wurde 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]Benzoensäure (Aminophenyl Fluoreszein, APF) eingesetzt, da dieses ausschließlich durch eine Reaktion mit den hROS -Hydroxylradikalen, Hypochloride, Peroxinitrit Anionen und Peroxiradikale in seine fluorometrische Form umgewandelt wird. Zudem ist es mit einer Detektionsschwelle von 50nM sehr sensitiv [62].

Für die Messung der hROS unter der Verwendung von APF wurden die Zellen auf 96-Wellplatten inkubiert (3.2.1.3). Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit auf 37°C vorgewärmter

LCIS (3.2.3.9.1) gewaschen. APF wurde 1:500 in LCIS verdünnt, um eine Konzentration von 10 μ M zu erreichen. Es wurden 100 μ l APF/LCIS auf die Zellen pipettiert sowie reine LCIS als Kontrolle. Die Messung erfolgte anschließend in einem Safire2 Fluorometer bei einer Extinktionswellenlänge von 490nm und einer Emissionswellenlänge von 515nm. Es erfolgten eine Messung direkt, sowie eine Messung nach 30 und nach 60min. Nach 80min wurden 10 μ l 1M H₂O₂ in jedes Well pipettiert und direkt sowie nach 20min gemessen.

3.2.3.11.2 Bestimmung H₂O₂-induzierter reaktiver Sauerstoffspezies mit Amplex Red

(neu etabliert im Rahmen dieser Arbeit durch Dr. rer. nat. Christoph Stahlmann)

Für die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies unter Verwendung des Amplex Red Reagenzes aus dem Amplex Red Assay Kit wurde ein Teil der Zellen neben α -TP, α -TT bzw. EtOH zusätzlich in jedem Inkubationsschritt (3.2.1.3) mit 1 μ M H₂O₂ inkubiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS (3.2.1.1) gewaschen und 50 μ l Reaktionspuffer des Amplex Red Cholesterol Assay Kits auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen kurz sonifiziert. Für die Positivkontrolle wurde die 20mM H₂O₂ Working Solution auf 10 μ M in Reaktionspuffer verdünnt und 50 μ l auf die Zellen gegeben. Zu den Proben wurden 50 μ l Working Solution pipettiert. Zudem wurden vier Wells mit 50 μ l Reaktionspuffer und 50 μ l Working Solution gefüllt, um in diesen die Grundfluoreszenz zu messen. Die Platte wurde anschließend in einem Safire2 Fluorometer bei einer Extinktion von 530-560nm und einer Emission von 590nm direkt, nach 40min und nach 2Std gemessen.

H ₂ O ₂ Working Solution:		Working Solution:	
23 μ l	3% H ₂ O ₂	75 μ l	Amplex Red
977 μ l	ddH ₂ O	50 μ l	Meerrettichperoxidase
		4,875ml	Reaktionspuffer

3.2.4 Massenspektrometrische Methoden

(nach Masterarbeit Pascal Schorr, Universität des Saarlandes, 2017)

3.2.4.1 Vorbereitung der Proben

Für die Extraktion von α -TP und α -TT aus Zellen wurden die Methoden der Verseifung in Kombination mit flüssig/flüssig Extraktion verwendet, da diese Kombination in der Literatur häufig Verwendung findet [65,458].

Die Zellen wurden zunächst, wie in 3.2.1.3 beschrieben, für 24h mit α -TP und α -TT inkubiert. Nach Abnahme des Mediums wurden sie drei Mal mit 1ml H₂O gewaschen und anschließend in 200 μ l Wasser gelöst. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte unter Verwendung von Glaskügelchen (Tabelle 2) und dem Minilys. Die Lysierung erfolgte auf höchster Geschwindigkeitsstufe für 30s. Es erfolgte eine Verdünnung der Proben auf eine Proteinkonzentration von 10mg/ml.

Die Verseifung und Trennung der Lipidphasen von den Proben erfolgte auf Polytetrafluorethylen (PTFE) Filterplatten für 96-Wellplatten (Tabelle 2).

Für die Extraktion wurden 15 μ L der Standardlösung (A), 20 μ L der Lösung (B) und 30 μ L der homogenisierten Proben mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml auf die Filterplatten gegeben. Anschließend wurde 20 μ L der Lösung (C) hinzugegeben. Es erfolgte dann die Verseifung bei 55°C. Hierfür wurden die Proben auf einem Eppendorf Thermomixer bei 800 rpm für 20min horizontal geschüttelt. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Proben wieder auf. Die Filterplatte wurde an einer 96-Wellplatte befestigt und 60 μ L der Lösung (D) und 330 μ L der Extraktionslösung (E) hinzugefügt. Die Proben wurde anschließend für 20min bei 400rpm geschüttelt. Die organische Schicht wurde mittels Zentrifugation bei 800rpm auf eine 96-Wellplatte transferiert, mit Stickstoff getrocknet und anschließend in 200 μ l Acetonitril (Tabelle 1) gelöst.

Standardlösung (A):

20 μ M	d6- α -TP
0,1% (w/w)	2,6, -di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) in Acetonitril

Lösung B (B):

1,14 M	Ascorbinsäure
1,14 M	Natriumhydroxid
2:1 (v/v)	H ₂ O/Methanol

Lösung C (C):

10 M	Natriumhydroxid
2:1 (v/v)	H ₂ O/Methanol

Lösung D (D):

3,2 M	Salzsäure
2:3 (v/v)	H ₂ O/Acetonitril

Extraktionslösung (E):

6:1:1 (v/v)	Dichlormethan/ Ethylacetat/ n-Hexan
0,01% (w/w) (v/v)	BHT

3.2.4.2 Kapillare LC-MS/MS-Messung

Die Messung erfolgte mit einem Sciex QTRAP 4000 mit positivem Ionen Modus (Tabelle 3), verbunden mit einem Agilent 1200 Serie kapillären HPLC System (Tabelle 3).

1µl des wie in 3.2.4.1 vorbereiteten Extrakts wurde mittels gasdichter Hamilton Spritze infundiert. Die Massenspektrometrie Konditionen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die substanzspezifischen Einzelreaktionsüberwachungsparameter (engl. single reaction monitoring, SMR) sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Separation erfolgte mit einer Agilent Zorbax SB-C18 Säule (0,5x150mm; 5µm; 80 Å) bei 20µL/min (Injektionsvolumen: 1µL; isokarnische Elution mit 100% Acetonitril + 0.1% Ameisensäure für 8 min). Die Säulentemperatur betrug 25°C unter Verwendung eines MayLab Mistra-Switch Säulenofens. Die Retentionszeiten betragen unter diesen Konditionen 1,9min für α-TT und 4,5min für α-TP. Die Detektion der Vitamin E Derivate erfolgte mit dem Sciex QTRAP 4000 triple quadrupole Massenspektrometer mit positiver Elektrospray Ionisation (engl. positive electrospray ionization, ESI) Modus unter der Verwendung von SRMs. Für alle SMR Transitionen betragen die dwell-Zeiten 200ms. Unter ESI Konditionen zeigte sich eine ungewöhnliche Formation von [M – H]⁺ Ionen nach der Hybridabstaktion von den analysierten Molekülen Ähnliches wurde in der Literatur bereits für TP unter chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. atmospheric pressure chemical ionization, APCI) beschrieben [211]. Dieses Ion wurde als Vorläuferion für SRM verwendet, da es den Basis Anstieg im kollisionsinduzierten dissoziation- Spektrum (engl. collision-induced dissociation, CID) unter den angegebenen Konditionen bildete.

Tabelle 11 Massenspektrometrieparameter QTRAP 4000

ISV [V]	5500
TEM [°C]	120
CUR [psi]	27
GS1 [psi]	25
GS2 [psi]	25
Kolisionsgas	medium
EP [V]	10
CXP [V]	14
IH	on
Q1 resolution	unit
Q2 resolution	unit

Tabelle 12 SRM Parameter QTRAP 4000

Substanz	m/z precursor ion	m/z product ion	CE [V]	DP [V]
α -TP	423,2	165,1	33	80
α -TT	429,4	165,1	27	55
d6- α -TP 4	435,4	161,1	33	80

3.2.4.2.1 Bestimmung der Aufnahme von α -Tocopherol und α -TT in Zellen

Die Extraktion für die Messung der Zellaufnahme erfolgte wie in 3.2.4.1 beschrieben. Es wurden drei Proben jeweils drei Mal gemessen. Für die Bestimmung der Konzentration von α -TP und α -TT in den Kontrollproben wurden fünf einzelne Kontrollproben zusammengeführt. Eine Kalibrierungskurve wurde durch Verwendung der Standard-Additionsmethode kalkuliert. Die hierfür verwendeten

Konzentrationen von α -TP und α -TT waren 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 1 und 2nmol/mg Protein. Alle Kalibrierungspunkte wurden extrahiert und verdreifacht mit LC-MS/MS gemessen. Es ergab sich eine Konzentration der Kontrollproben vom $0,067 \pm 0,031$ nmol/mg Protein für α -TP und $0,034 \pm 0,005$ nmol/mg Protein für α -TT.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2007). Ausschließlich für die Durchführung von Varianzanalysen und post-hoc-Tests wurde das Statistik-Programm SPSS Statistics 22 (Tabelle 3) verwendet.

P-Werte unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Die Quantifizierung aller Daten erfolgte auf Grundlage des Mittelwerts von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.5.1 T-Test

Für die Ermittlung der Statistischen Signifikanz beim Mittelwertvergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige, ungepaarte Student's t-test verwendet.

3.2.5.2 Varianzanalyse und post hoc-Tests

Für die Ermittlung der Statistischen Signifikanz beim Mittelwertvergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde eine Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) durchgeführt. Um die Homogenität der Varianz der verwendeten Stichproben vor Anwendung der ANOVA zu prüfen, wurde der Levene-Test verwendet. Lag eine Varianzheterogenität vor, wurde das Signifikanzniveau mit dem Least Significant Difference-Bonferroni Test korrigiert. Bei einer Varianzhomogenität der Gruppen kam der Scheffé-Test zur Anwendung.

3.2.5.3 Signifikanz von Korrelationen

Um die Signifikanz von Korrelationen zu ermitteln, wurde zunächst der Pearson-Korrelationskoeffizient errechnet, welcher den linearen Zusammenhang zweier Variablen angibt. Anschließend wurde die Prüfgröße PG errechnet. War PG größer als der Tabellenwert t der t-Verteilung zweiseitiger Test wurde von einem statistischen Zusammenhang ausgegangen.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von α -TT und α -TP auf ROS, die Cholesterinbiosynthese und die amyloidogene Prozessierung im Rahmen der Alzheimer Krankheit

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von α -TP und α -TT sowie deren Einfluss auf den zellulären Cholesterinspiegel und die amyloidogene Prozessierung.

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

Marcus O. W. Grimm †, **Liesa Regner** †, Janine Mett, Christoph P. Stahlmann, Pascal Schorr, Christopher Nelke, Olga Streidenberger, Hannah Stoetzel, Jakob Winkler, Shatha R. Zaidan, Andrea Thiel, Kristina Endres, Heike S. Grimm, Dietrich A. Volmer and Tobias Hartmann. Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, PMID: 27801864

† *equally contributed*

4.1.1 Ergebnisse der kapillären LC-MS/MS-Messung

Unter den in 3.2.4.2 beschriebenen Konditionen zeigte sich eine Retentionszeit für α -TP zwischen 4,5 und 4,6 min, für α -TT zwischen 1,9 und 2,0 min. Die Quantifizierung und Probenanalyse erfolgte durch den Vergleich der Spitzenratios zwischen dem Standard d6- α -TP und α -TP und α -TT.

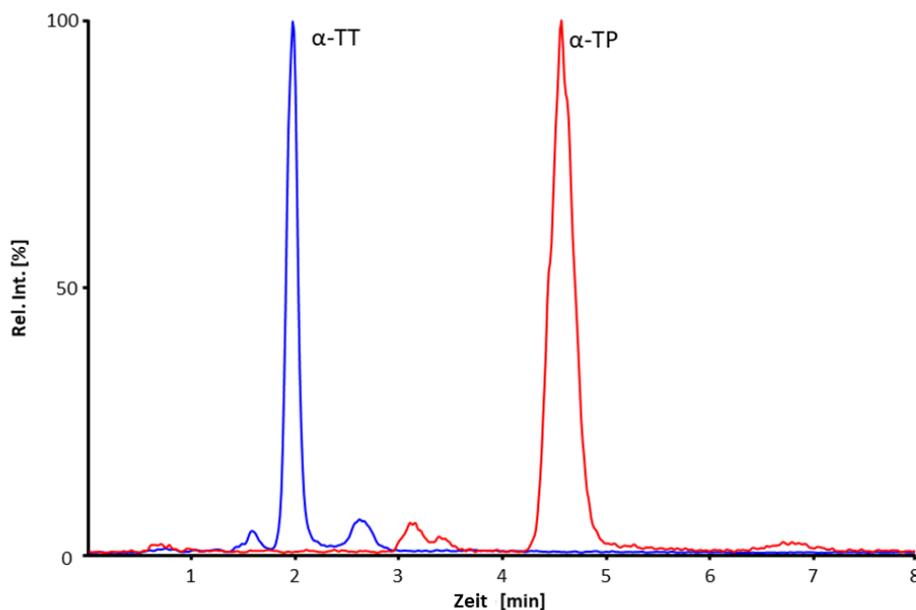


Abbildung 5 Beispielchromatogramm für α -TT und α -TP

4.1.2 Aufnahme von α -TP und α -TT in Zellen

Die Bestimmung der Aufnahme von α -TP und α -TT in Zellen erfolgte wie in 3.2.4.2.1 beschrieben und zeigte einen signifikanten Anstieg vom α -TP und α -TT im Vergleich zu den Kontrollzellen (>500%, $p \leq 0,001$). Um α -TT und α -TP in den Kontrollproben zu messen, wurden fünf unabhängige Proben zusammengefügt. Eine lineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Methode der Standardaddition für α -TP ($c[\text{nmol/mg Protein}] = 2,1227x + 0,01325$; $R^2 > 0,978$) und α -TT ($c[\text{nmol/mg Protein}] = 1,6859 \cdot (\text{area ratio}) + 0,0002$; $R^2 > 0,999$) ergab die in Tabelle 13 aufgeführten Konzentrationen.

Das Ergebnis der Konzentration der Vitamin E-Derivate in den Kontrollproben betrug für α -TT $0,034 \pm 0,005 \text{ nmol/mg Protein}$ und für α -TP $0,067 \pm 0,031 \text{ nmol/mg Protein}$.

Tabelle 13 Berechnete Aufnahme von α -TP und α -TT in SHSY5Y Zellen

Probe	$c(\alpha\text{-TT})$ [nmol/mg Protein]	$c(\alpha\text{-TP})$ [nmol/mg Protein]
Kontroll-Zellen	$0,034 \pm 0,0050$	$0,067 \pm 0,031$
Mit α -TT inkubierte Zellen	$3,872 \pm 0,075$	Nicht bestimmt
Mit α -TP inkubierte Zellen	Nicht bestimmt	$0,303 \pm 0,019$

4.1.2.1 Zytotoxizität von α -TP und α -TT

Um die Zytotoxizität von α -TP und α -TT zu bestimmen, erfolgte eine LDH-Messung (3.2.1.6). Hierfür wurden SH-SY5Y-WT Zellen für 8 und 16Std mit $10\mu\text{M}$ α -TP, α -TT bzw. Ethanol-Kontrolle inkubiert.

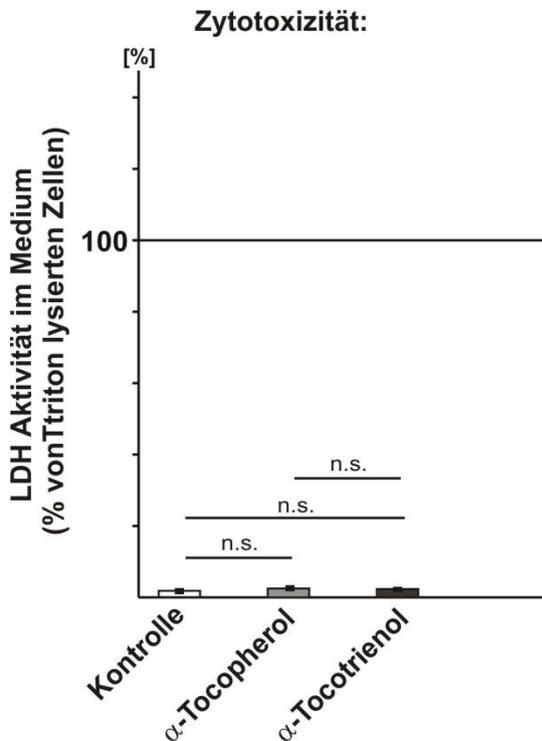


Abbildung 6 Zytotoxizität von α -TP und α -TT

Die LDH-Messung erfolgte nach 16 und 8Std Inkubation mit $10\mu\text{M}$ α -TP und α -TT. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zellviabilität nachgewiesen werden (Zytotoxizität der Kontrolle: $1,8\% \pm 0,1\%$; Zytotoxizität α -TP: $2,5\% \pm 0,3\%$, $p = 0,22$ im Vergleich mit der Kontrolle, $n = 4$; Zytotoxizität α -TT: $2,3\% \pm 0,2\%$, $p = 0,41$ im Vergleich mit der Kontrolle, $p = 0,86$ im Vergleich mit α -TP, $n = 4$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA (n.s. nicht signifikant).

Die LDH-Messung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität bzw. Zellviabilität, weder beim Vergleich von α -TP und α -TT mit der Kontrolle noch beim Vergleich von α -TP und α -TT untereinander (Kontrolle: $1,8\% \pm 0,1\%$; α -TP: $2,5\% \pm 0,3\%$, $p = 0,22$ im Vergleich mit der Kontrolle, $n = 4$; α -TT: $2,3\% \pm 0,2\%$, $p = 0,41$ im Vergleich mit der Kontrolle, $p = 0,86$ im Vergleich mit α -TP, $n = 4$).

4.1.3 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Cholesterinkonzentration in SH-SY5Y Zellen

Verschiedene Studien demonstrierten, dass hohe Cholesterinwerte einen Risikofaktor für Alzheimer darstellen [256,344,389]. Ein therapeutischer Ansatz liegt hier in der Inhibition der Acyl-CoA-Cholesterin-Acetyltransferase (ACAT), die die Veresterung von freiem Cholesterin zu Cholesterinestern katalysiert [56]. In der Literatur wird Vitamin E ein Cholesterin-senkender-Effekt zugesprochen [332], welcher im Fall von TT beispielsweise über die Suppression der HMG-CoA-Reduktase erreicht wird [314]. Da sich die bisherige Literaturlage ausschließlich auf nicht-neuronale Zelllinien bezieht, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von α -TP und α -TT auf die Cholesterinkonzentration in SH-SY5Y-WT Zellen untersucht. Um auch einen möglichen Effekt auf die

ACAT zu detektieren, erfolgte neben freiem Cholesterin auch die Bestimmung des Gesamtcholesterins, das sich aus freiem und verestertem Cholesterin zusammensetzt.

Für die Messung der Cholesterinkonzentration wurden die Zellen über fünf Tage mit 10µM α-TP und α-TT inkubiert (3.2.1.5). Dabei erfolgte die Inkubation der ersten drei Tage in 1% FCS haltigem Medium. Um die extern zugeführte Sterin-Menge möglichst gering zu halten, erfolgte an den letzten beiden Inkubationstagen die Verwendung von 0,1% FCS haltigem Medium. Anschließend wurde der Cholesterin-Gehalt der Zellen fluorometrisch unter Verwendung des Amplex Red Cholesterol Assay Kits detektiert. Abhängig davon ob die Messung von Gesamt- oder freies Cholesterin gemessen wurde, kam es zum Einsatz der Cholesterinesterase im Assay.

Gesamt-Cholesterin:

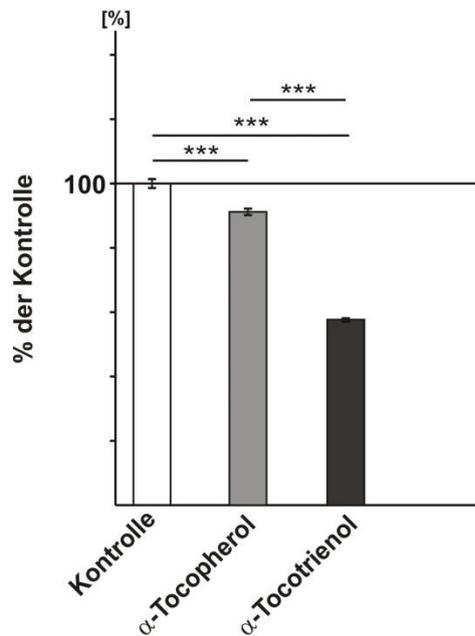


Abbildung 7 Einfluss von α-TP und α-TT auf die Konzentration von Gesamtcholesterin in SH-SY5Y Zellen

Sowohl mit α-TP- (91,2% ± 1,0%, p≤0,001, n=8) als auch mit α-TT behandelte Zellen (57,7% ± 0,6%, p≤0,001, n=8) zeigten eine signifikante Reduktion der Gesamtcholesterin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. 100% der Kontrolle entsprechen 0,0211µg Gesamtcholesterin/µg Protein. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA (***) p≤0,001).

freies Cholesterin:

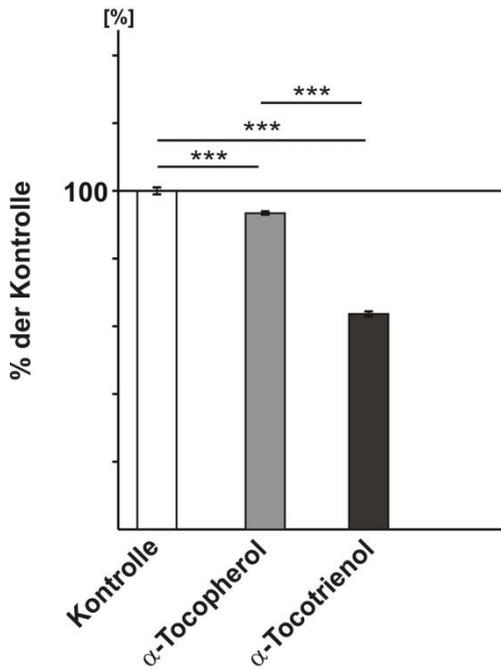


Abbildung 8 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Konzentration von freiem Cholesterin in SH-SY5Y Zellen

Die mit α -TP- ($93,4\% \pm 0,5\%$, $p \leq 0,001$, $n = 8$) sowie die mit α -TT behandelten Zellen ($63,7\% \pm 0,7\%$, $p \leq 0,001$, $n = 8$) zeigten eine signifikante Reduktion der freien Cholesterinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle. 100% der Kontrolle entsprechen $0,0161\mu\text{g}$ freies Cholesterin/ μg Protein. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA (***) $p \leq 0,001$.

Im Fall von α -TT kam es zu einer Reduktion der Konzentration von Gesamt- ($57,7\% \pm 0,6\%$, $p \leq 0,001$, $n=8$) (Abbildung 7) als auch freiem Cholesterin ($63,7\% \pm 0,7\%$, $p \leq 0,001$, $n = 8$) (

Abbildung 8). Da die Abnahme von Gesamtcholesterin die von ausschließlich freiem Cholesterin übersteigt, kann vermutet werden, dass der Cholesterin-reduzierende-Effekt des α -TTs vor allem über verestertes Cholesterin wirkt. Auch α -TP zeigte eine Verminderung des Gesamt- ($91,2\% \pm 1,0\%$, $p \leq 0,001$, $n = 8$) und des freien Cholesterins ($93,4\% \pm 0,5\%$, $p \leq 0,001$, $n = 8$). Im Vergleich der Cholesterinkonzentrationen von α -TT mit α -TP überwog jedoch α -TT deutlich.

4.1.4 Einfluss von α -TP und α -TT auf reaktive Sauerstoffspezies

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies spielt eine entscheidende Rolle in der Pathologie von AD. Es ist bekannt, dass A β zur Entstehung von ROS beiträgt und so zu einer oxidativen Degeneration von

Lipiden und zu Proteinoxidationen führt [413]. Umgekehrt induzieren ROS wiederum eine gesteigerte A β -Produktion [220]. Vitamin E ist bekannt für seinen antioxidativen Effekt und wird aufgrund dessen für den therapeutischen Einsatz in Rahmen von AD diskutiert [146].

Um die antioxidativen Fähigkeiten von α -TP und α -TT zu untersuchen, wurde sowohl der Effekt auf hochreaktive Sauerstoffspezies (engl. highly-reactive oxygen species, hROS) als auch auf H₂O₂-induzierte ROS gemessen.

4.1.4.1 Einfluss von α -TP und α -TT auf hROS

Für die Ermittlung des Einflusses von α -TP und α -TT auf hROS erfolgte die Verwendung von Aminophenyl Fluoreszin, da dies einen spezifischen und sensitiven Detektionsfarbstoff für hROS darstellt [383]. Nach einer 8 und 16Std Inkubation mit 10 μ M α -TP und α -TT wurden die SH-SY5Y-WT Zellen mit 10 μ M APF versetzt und in einem Safire2 Fluorometer gemessen.

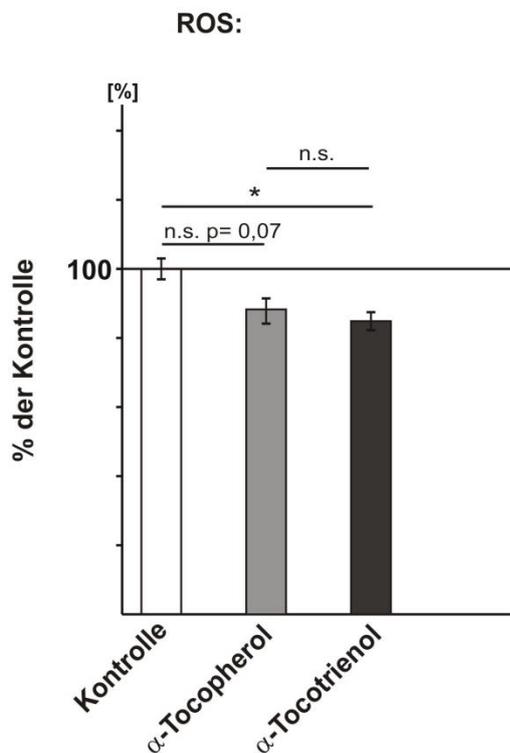


Abbildung 9 Einfluss von α -TP und α -TT auf hROS

Die mit α -TP (88,3% \pm 3,6%, p=0,07, n=16) und α -TT (84,9% \pm 2,6%, p=0,021, n=16) behandelten Zellen zeigten eine leichte Reduktion von hROS im Vergleich zu den Kontrollzellen. Da APF verschiedene hROS mit unterschiedlicher Effektivität detektiert konnte kein Absolut-Wert für hROS errechnet werden. Da NaOCl die gleiche APF-mediierte Fluoreszenz wie ROS in den Kontrollzellen zeigte, wurde dieses verwendet, um die absolute Menge ROS abzuschätzen. 100% der Kontrolle entspricht 2,89nM NaOCl. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA.

Es kam zu einer geringen Reduktion der Menge von hROS in den mit α -TP behandelten Zellen (88,3% \pm 3,6%, p=0,07, n=16). Die mit α -TT behandelten Zellen zeigten hingegen eine signifikante Reduktion auf 84,9% (\pm 2,6%, p=0,021, n=16) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 9).

4.1.4.2 Einfluss von α -TP und α -TT auf H_2O_2 induzierte ROS

Ein Teil der neurotoxischen Wirkung von A β -Peptiden kommt durch die Reduktion von Metallionen und der damit verbundenen Entstehung von H_2O_2 zustande [173]. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der antioxidative Effekt von α -TP und α -TT auf H_2O_2 induzierte ROS in einem separaten Experiment. Hierfür wurden SH-SY5Y-WT Zellen für 8 und 16Std mit $10\mu M$ α -TP und α -TT, sowie $1\mu M$ H_2O_2 inkubiert. Für die fluorometrische Detektion erfolgte die Verwendung des Amplex Red Reagenz.

Hydrogenperoxid induziertes ROS:

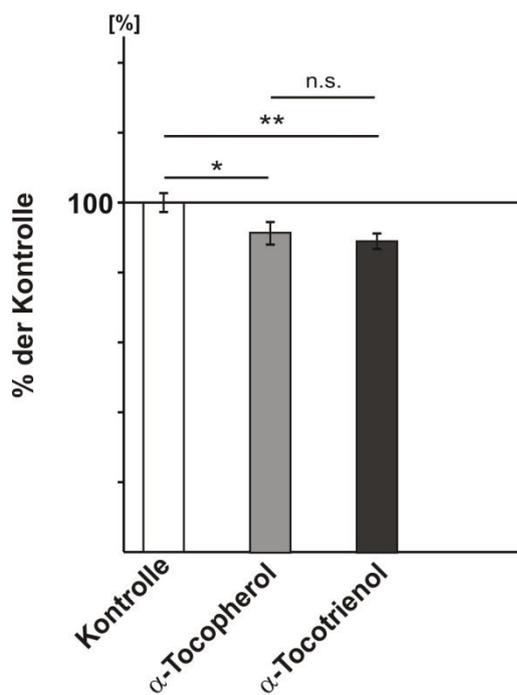


Abbildung 10 Einfluss von α -TP und α -TT auf H_2O_2 induzierte ROS

Sowohl α -TP (91,6% \pm 3,2%; $p = 0,029$), als auch α -TT (89,1% \pm 2,3%, $p = 0,006$) zeigten einen signifikanten Effekt auf H_2O_2 induzierte ROS im Vergleich zur Kontrolle. 100% der Kontrolle entsprechen $0,95\mu M$ H_2O_2 . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA.

Im Einklang mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage zeigte sich durch α -TP (91,6% \pm 3,2%; $p = 0,029$), als auch α -TT (89,1% \pm 2,3%, $p = 0,006$) ein signifikanter Effekt auf H_2O_2 induzierte ROS im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10).

4.1.5 Einfluss von α -TP und α -TT auf die amyloidogene Prozessierung

4.1.5.1 Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β

Um zu untersuchen, ob α -TP und α -TT den A β Stoffwechsel beeinflussen, wurden die Substanzen auf SH-SY5Y Zellen für 8 und 16Std inkubiert und das Gesamt-A β anschließend mittels Western Blot Analyse (3.2.3.4-3.2.3.7) quantifiziert.

4.1.5.1.1 Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen

Zunächst wurde das Gesamt-A β aus konditioniertem Medium von SH-SY5Y-APP Zellen bestimmt. Aufgrund der stabilen Überexpression von APP₆₉₅ eignet sich diese Ziellinie um Einflüsse auf den A β -Stoffwechsel zu untersuchen. Durch die erhöhte A β Freisetzung werden Änderungen innerhalb der amyloidogenen Prozessierung und der A β -Degradation besonders deutlich.

Grimm *et al.* publizierten bereits den Einfluss von α -TP auf Gesamt-A β [143]. Um die Ergebnisse erneut zu verifizieren, wurde dieses Experiment wiederholt. Zudem entstand durch die zeitgleiche Inkubation der Zellen und analoge Behandlung der Proben eine höhere Vergleichbarkeit der Ergebnisse für α -TP und α -TT untereinander. Dieser Vergleich stellt ein entscheidendes Ziel dieser Arbeit dar.

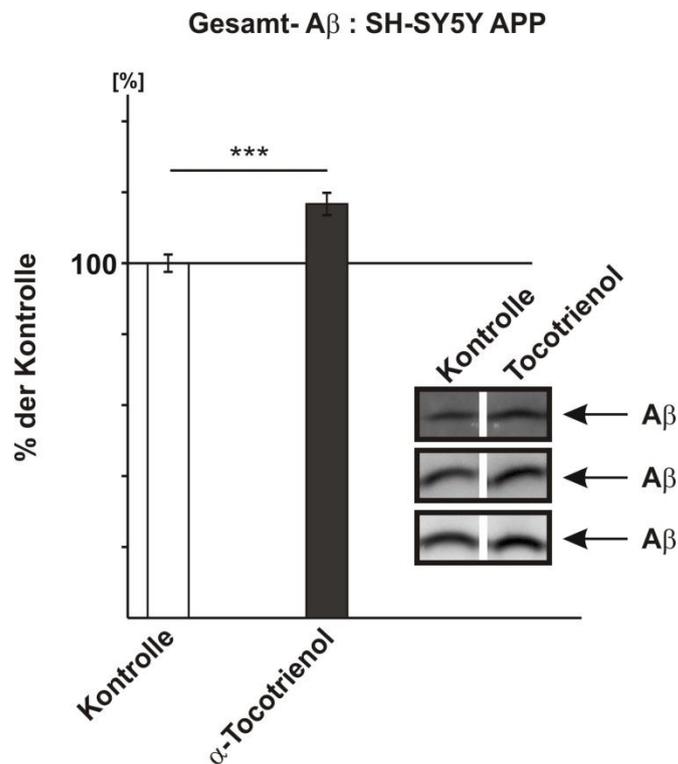


Abbildung 11 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen

Die mit α -TT behandelten SH-SY5Y-APP Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β ($116,7\% \pm 3,1\%$, $p \leq 0,001$, $n=16$). 100% der Kontrolle entsprechen $8,9\text{ng/ml}$ Gesamt-A β . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$.

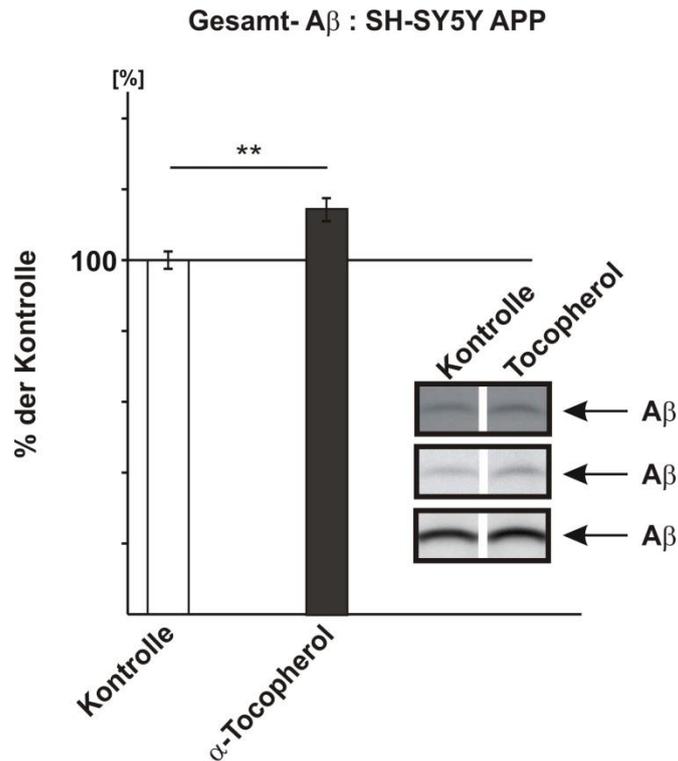


Abbildung 12 Einfluss von α -TP auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen

Die mit α -TP behandelten SH-SY5Y-APP Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β ($114,7\% \pm 3,2\%$, $p \leq 0,01$, $n=16$). 100% der Kontrolle entsprechen $8,9\text{ng/ml}$ Gesamt-A β . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

Die Western Blot Analyse des Gesamt-A β aus SHSY5Y-APP Zellen zeigte im Vergleich mit den Kontroll-Zellen eine signifikante Erhöhung der A β Konzentration in Zellen, die mit α -TT ($116,7\% \pm 3,1\%$, $p \leq 0,001$, $n=16$) (Abbildung 11) oder α -TP ($114,7\% \pm 3,2\%$, $p \leq 0,01$, $n=16$) (Abbildung 12) behandelt wurden.

4.1.5.1.2 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-WT Zellen

Um den nicht-physiologischen Effekt der APP₆₉₅ Überexpression bei Verwendung von SH-SY5Y APP Zellen auszuschließen und die Wirkung von α -TT auf einem Zellsystem mit natürlicher A β Freisetzung zu testen, wurden das Gesamt-A β zusätzlich aus SH-SY5Y WT Zellen bestimmt.

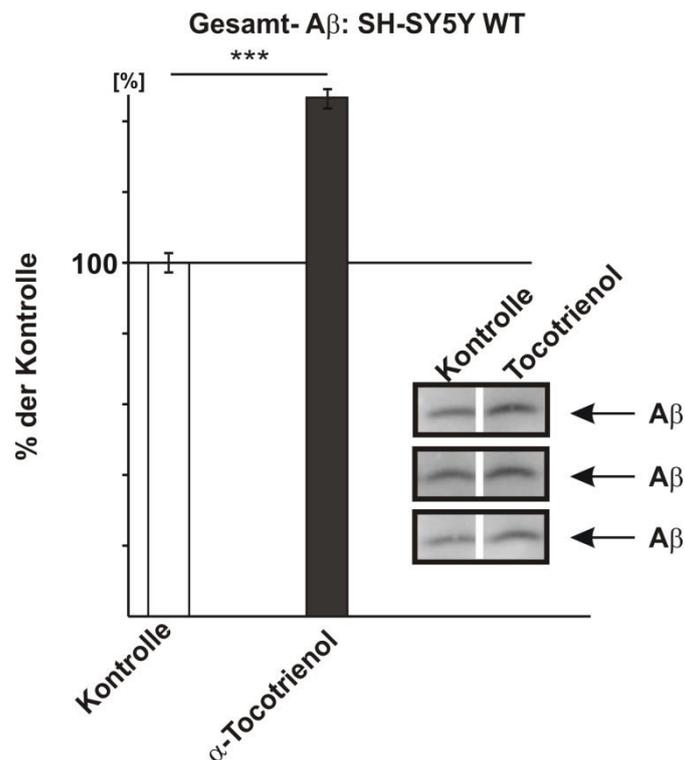


Abbildung 13 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-WT Zellen

Die mit α -TT behandelten SH-SY5Y-WT Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β (146,7% \pm 2,3%, $p \leq 0,001$, $n=4$). 100% der Kontrolle entsprechen 3,1ng/ml Gesamt-A β . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$.

Das quantifizierte Gesamt-A β der Western Blot Analyse aus SH-SY5Y-WT Zellen zeigte eine deutlichere Erhöhung der A β Konzentration der mit α -TT behandelten Zellen (146,7% \pm 2,3%, $p \leq 0,001$, $n=4$) im Vergleich mit der Gesamt-A β -Detektion aus SHSY5Y-APP Zellen (Abbildung 13). Dieser starke Effekt lässt sich dadurch erklären, dass in SH-SY5Y WT Zellen, die A β -Degradation weniger aktiv verläuft als in SH-SY5Y APP Zellen die an eine dauerhaft hohe A β -Konzentration und die Degradation dieser adjustiert sind. Somit führt eine Steigerung der A β -Produktion zu einem starken Anstieg der A β -Konzentration im Medium.

4.1.5.2 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase

Um zu determinieren, ob die Erhöhung des Gesamt-A β einer Beeinflussung des anabolen oder katabolen A β -Stoffwechsels zugrunde liegt, wurde die Aktivität der β - und γ -Sekretase untersucht. Diese bilden A β proteolytisch aus APP und sind somit ein maßgebliches Element des anabolen A β -Stoffwechsels [47,392].

4.1.5.2.1 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase auf lebenden Zellen

Für die Analyse des Eiflusses von α -TP und α -TT auf die β - und γ - Sekretase erfolgte zunächst die Untersuchung der Aktivität der Sekretasen auf intakten, lebenden Zellen. Hierfür wurden SH-SY5Y-WT Zellen für 8 und 16Std. mit 10 μ M α -TP und α -TT inkubiert und anschließend die Sekretaseaktivität fluorometrisch gemessen (3.2.3.9.1). Dies geschah unter zusätzlicher Verwendung eines β - und γ - Sekretase Inhibitors um die Signale anderer, unspezifischer Sekretasen zu detektieren und von den fluorometrischen Signal der Sekretaseaktivität zu subtrahieren.

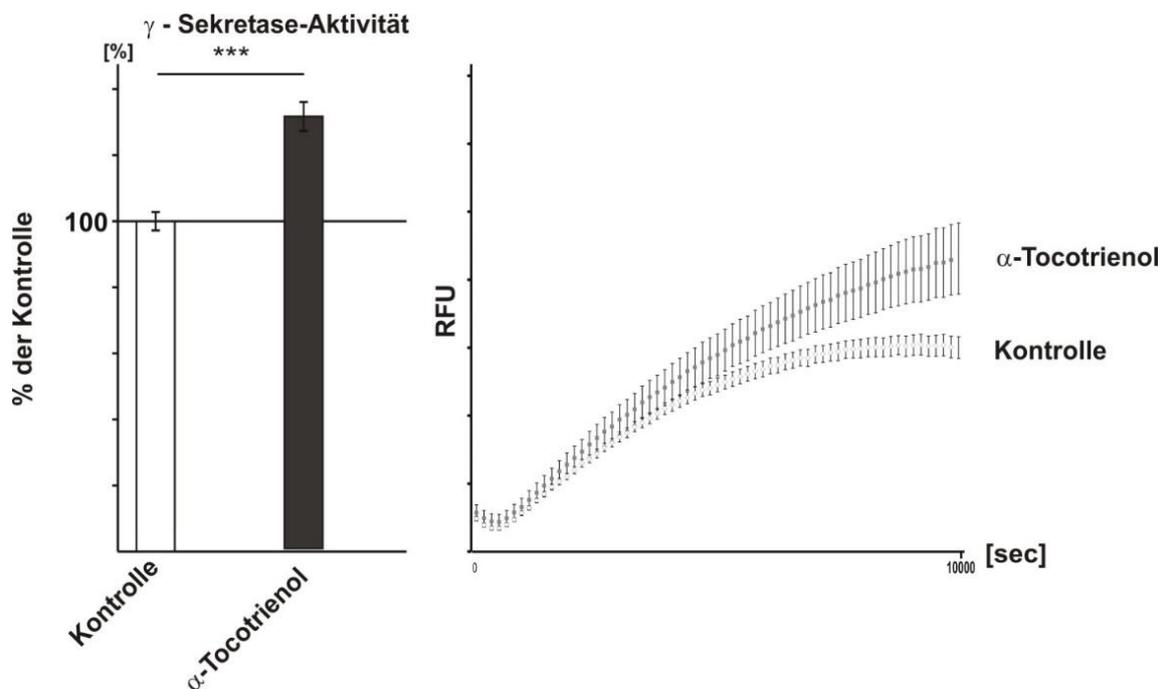


Abbildung 14 Einfluss von α -TT auf die Aktivität der γ - Sekretase auf lebenden Zellen

Die Aktivität der γ -Sekretase in den mit α -TT behandelten SHSY5Y-WT Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle (130,8% \pm 4,6%, $p \leq 0,001$, $n = 20$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$.

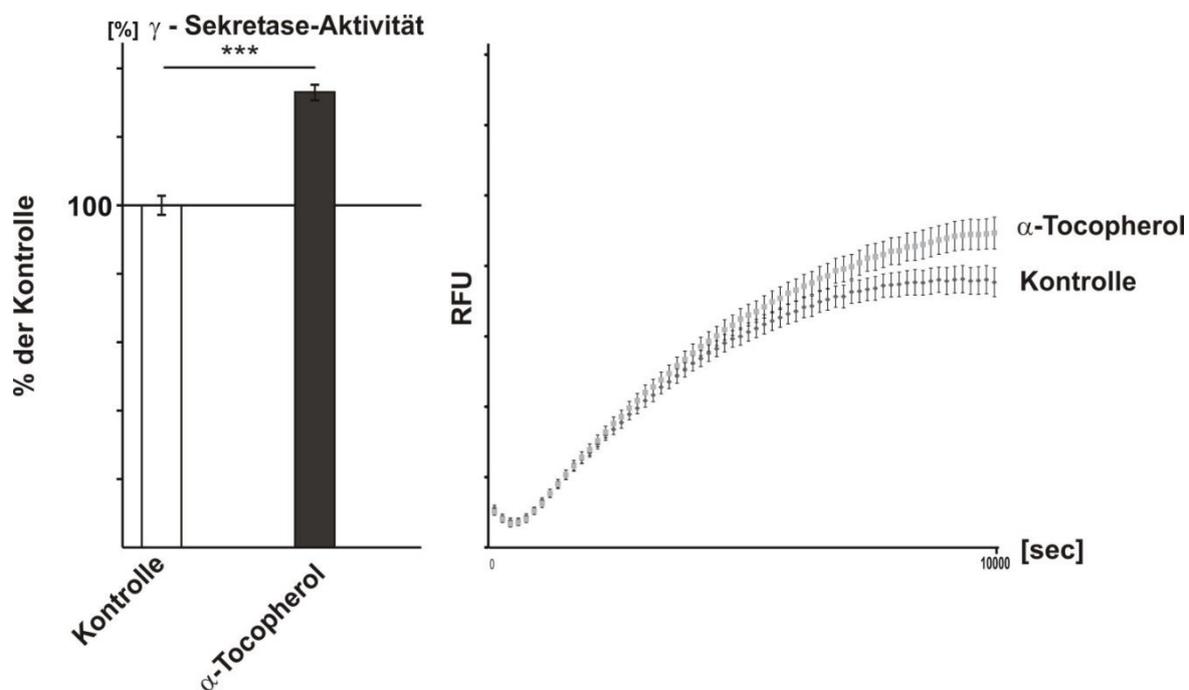


Abbildung 15 Einfluss von α -TP auf die Aktivität der γ - Sekretase auf lebenden Zellen

Die Aktivität der γ -Sekretase in den mit α -TP behandelten SHSY5Y-WT Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($133,0\% \pm 2,2\%$, $p < 0,001$, $n = 20$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$.

Bei der flourometrischen Messung der Aktivität der γ - Sekretase in SHSY5Y-WT Zellen zeigte sich sowohl durch die vorherige und während der Messung erfolgte Inkubation mit α -TT (Abbildung 14), als auch α -TP (Abbildung 15) eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu der Kontrolle (α -TT: $130,8\% \pm 4,6\%$, $p < 0,001$, $n = 20$, α -TP: $133,0\% \pm 2,2\%$, $p < 0,001$, $n = 20$). Hieraus lässt sich schließen, dass beide Vitamin E-Derivate einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben. Der genaue Mechanismus dieser Beeinflussung lässt sich anhand dieses Versuchsaufbaus nicht genauer bestimmen, da nicht zwischen direktem Einfluss auf das Enzym und indirektem Einfluss, z.B. durch Veränderung der Expressionsrate dessen, unterschieden werden kann.

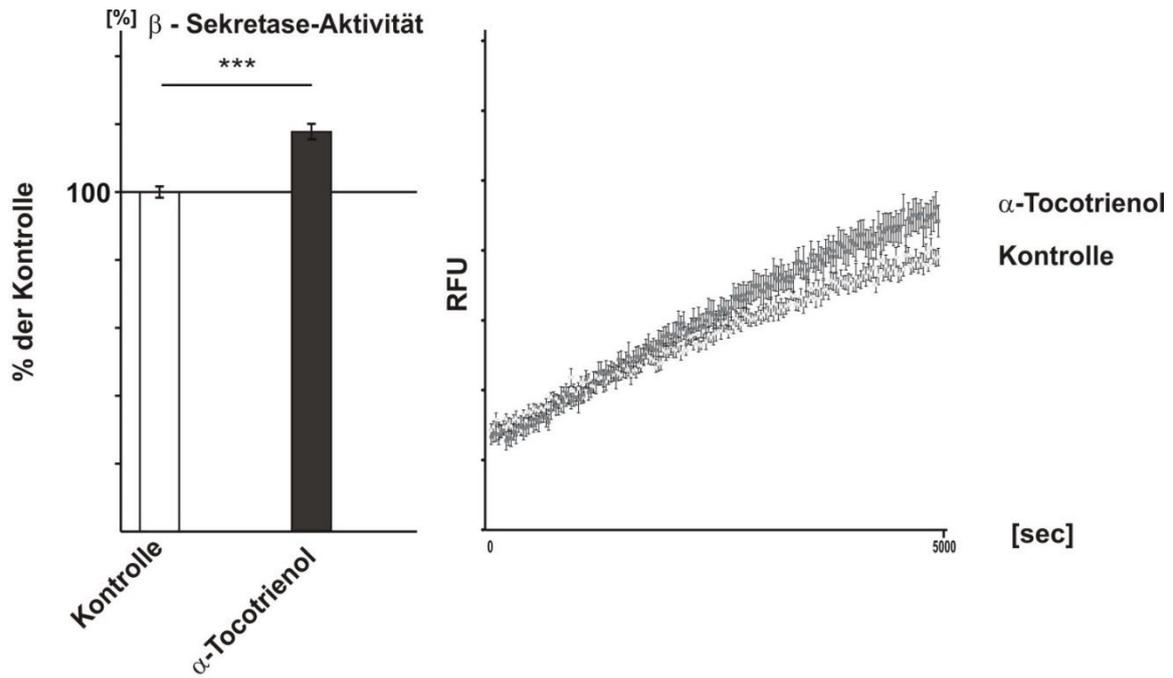


Abbildung 16 Einfluss von α -TT auf die Aktivität der β - Sekretase auf lebenden Zellen

Die Aktivität der β -Sekretase in den mit α -TT behandelten SHSY5Y-WT Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($117,5\% \pm 3,9\%$, $p < 0,001$, $n = 21$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$).

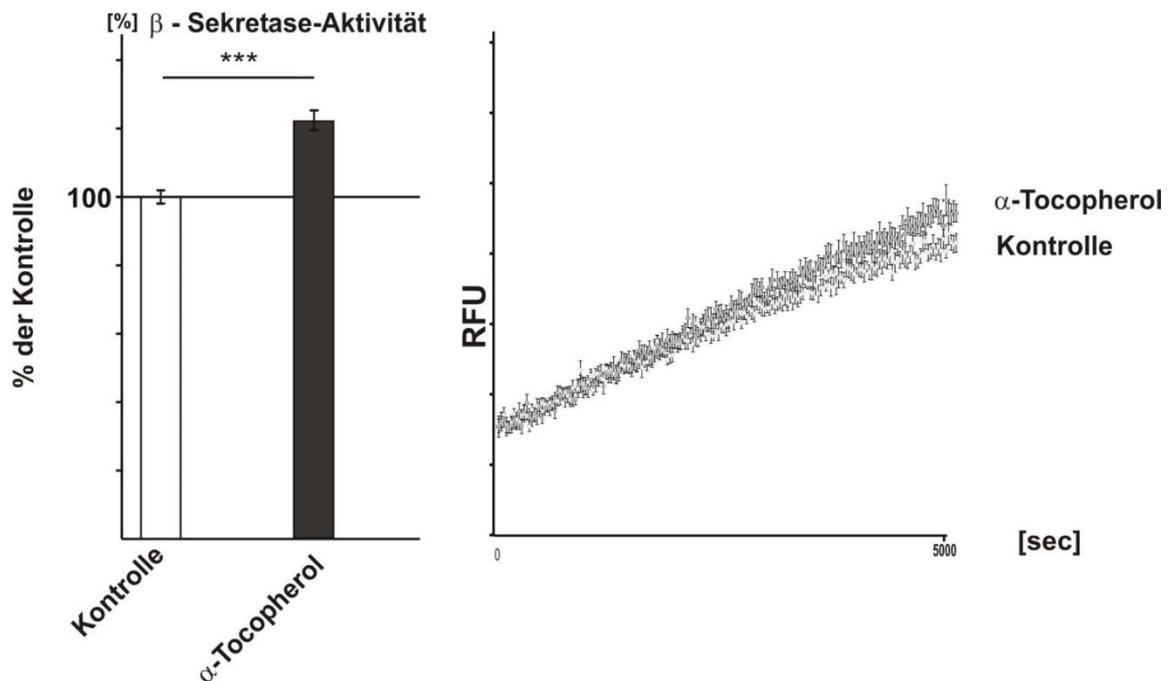


Abbildung 17 Einfluss von α -TP auf die Aktivität der β - Sekretase auf lebenden Zellen

Die Aktivität der β -Sekretase in den mit α -TP behandelten SHSY5Y-WT Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($121,8\% \pm 2,4\%$, $p < 0,001$, $n = 21$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$).

Auch im Fall der β -Sekretase zeigte sich durch die Inkubation der Zellen mit α -TT (Abbildung 16) bzw. α -TP (Abbildung 17) ein signifikanter, steigernder Effekt auf die Enzymaktivität (α -TT: $117,5\% \pm 3,9\%$, $p < 0,001$, $n = 21$, α -TP: $121,8\% \pm 2,4\%$, $p < 0,001$, $n = 21$). Die Entschlüsselung des genauen molekularen Mechanismus dessen war auch hier Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.1.5.2.2 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase auf post-nukleären Fraktionen

Weiterführend sollte untersucht werden, ob der signifikante Effekt von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ - Sekretase auf lebenden Zellen durch direkten oder indirekten Einfluss auf die Sekretasen zustande kommt. Um den direkten Einfluss von α -TP und α -TT auf die Sekretasen zu untersuchen, wurde die Aktivität dieser in post-nukleären Fraktionen fluorometrisch gemessen. Die hierfür verwendeten Membranfragmente von SH-SY5Y-WT Zellen, wurden mit $10\mu\text{M}$ α -TP und α -TT inkubiert (3.2.3.9.2.1). Auf diese Weise konnten indirekte Effekte auf die Sekretasen wie Veränderungen der Genexpression oder der Cholesterinmenge in der Zellmembran ausgeschlossen werden, da diese Prozesse den Erhalt einer intakten, lebenden Zelle voraussetzen.

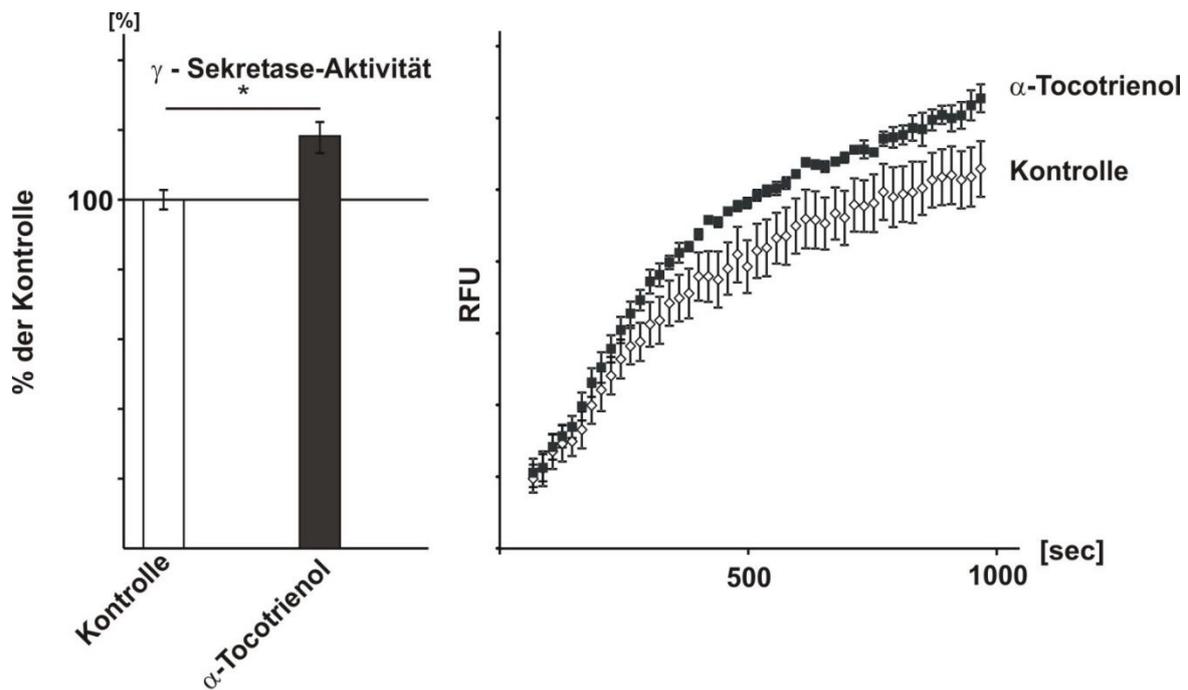


Abbildung 18 Einfluss von α -TT auf die γ -Sekretase in post-nukleären Fraktionen

Die Aktivität der γ -Sekretase in den mit α -TT behandelten post-nukleären Fraktionen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($118,3\% \pm 4,5\%$, $p = 0,02$, $n = 6$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (* $p \leq 0,05$).

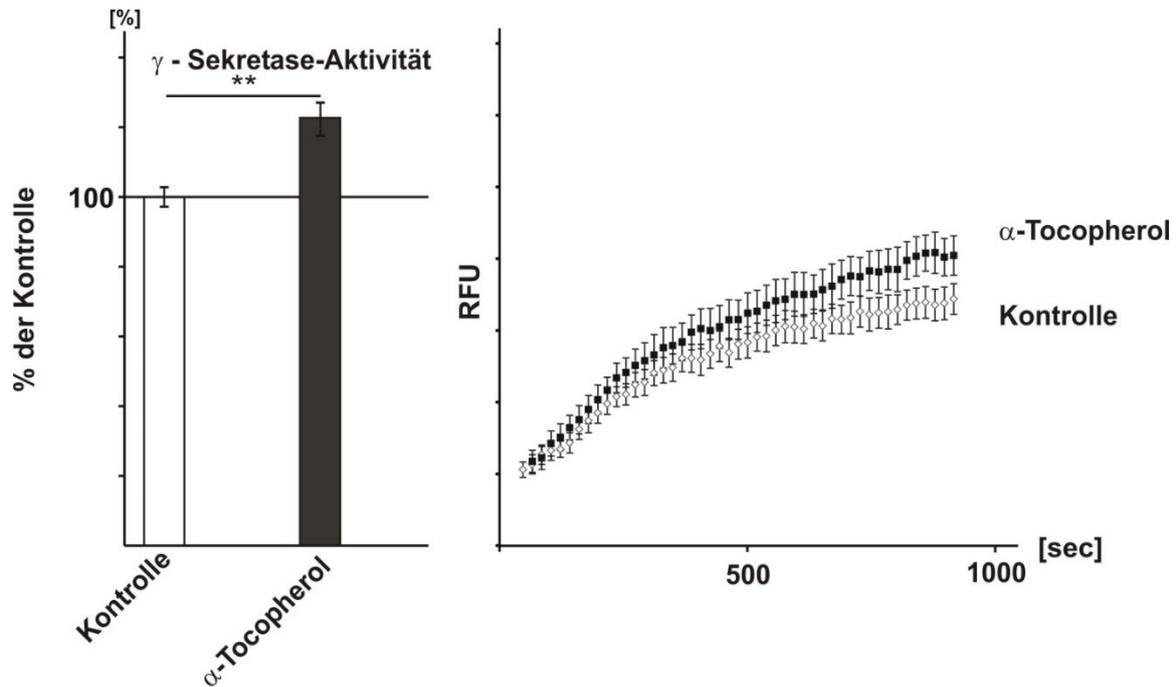


Abbildung 19 Einfluss von α -TP auf die γ -Sekretase in post-nukleären Fraktionen

Die Aktivität der γ -Sekretase in den mit α -TP behandelten post-nukleären Fraktionen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($122,6\% \pm 5,1\%$, $p = 0,008$, $n = 6$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

Bei der Untersuchung der γ -Sekretase Aktivität auf post-nukleären Fraktionen zeigte sich, wie auch schon auf lebenden Zellen, eine erhöhte Enzymaktivität nach der Inkubation mit α -TT ($118,3\% \pm 4,5\%$, $p = 0,02$, $n = 6$) (Abbildung 18) und α -TP ($122,6\% \pm 5,1\%$, $p = 0,008$, $n = 6$) (Abbildung 19). Dies legt nahe, dass der zuvor beobachtete Effekt vorwiegend durch eine direkte Beeinflussung der γ -Sekretase durch die Vitamin E-Derivate entsteht, da Einwirkungen auf die Genexpression durch die Herstellung von Membranfragmenten ausgeschlossen werden.

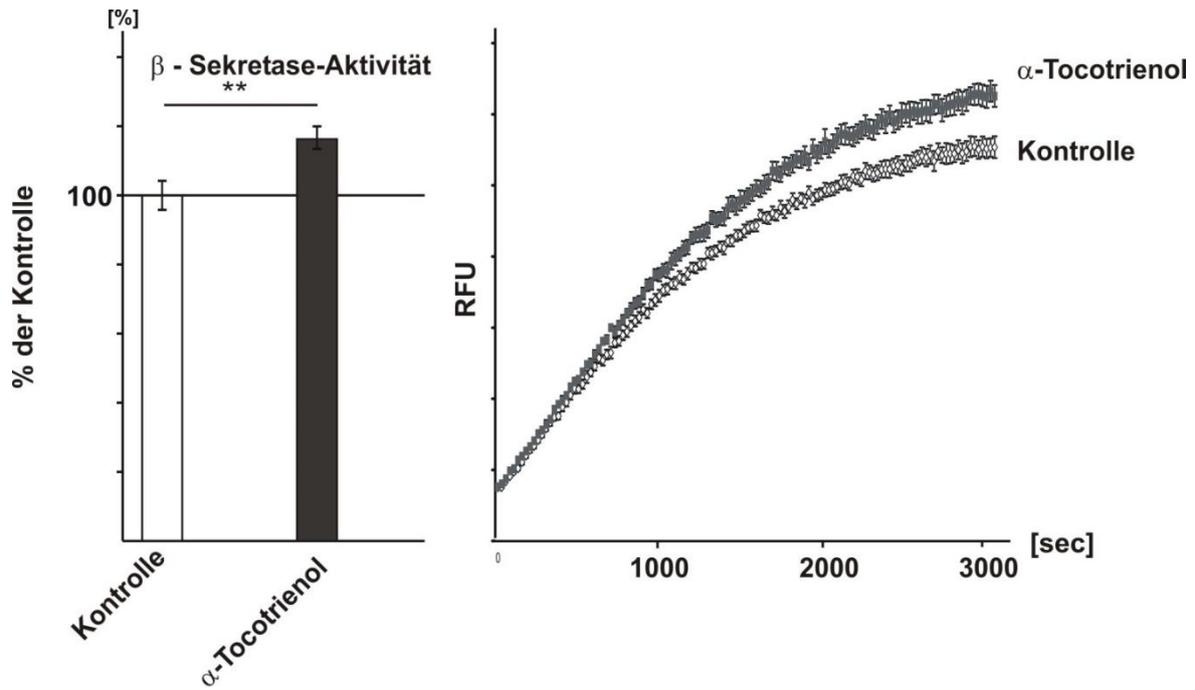


Abbildung 20 Einfluss von α -TT auf die β -Sekretase in post-nukleären Fraktionen

Die Aktivität der β -Sekretase in den mit α -TT behandelten post-nukleären Fraktionen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,007$, $n = 6$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

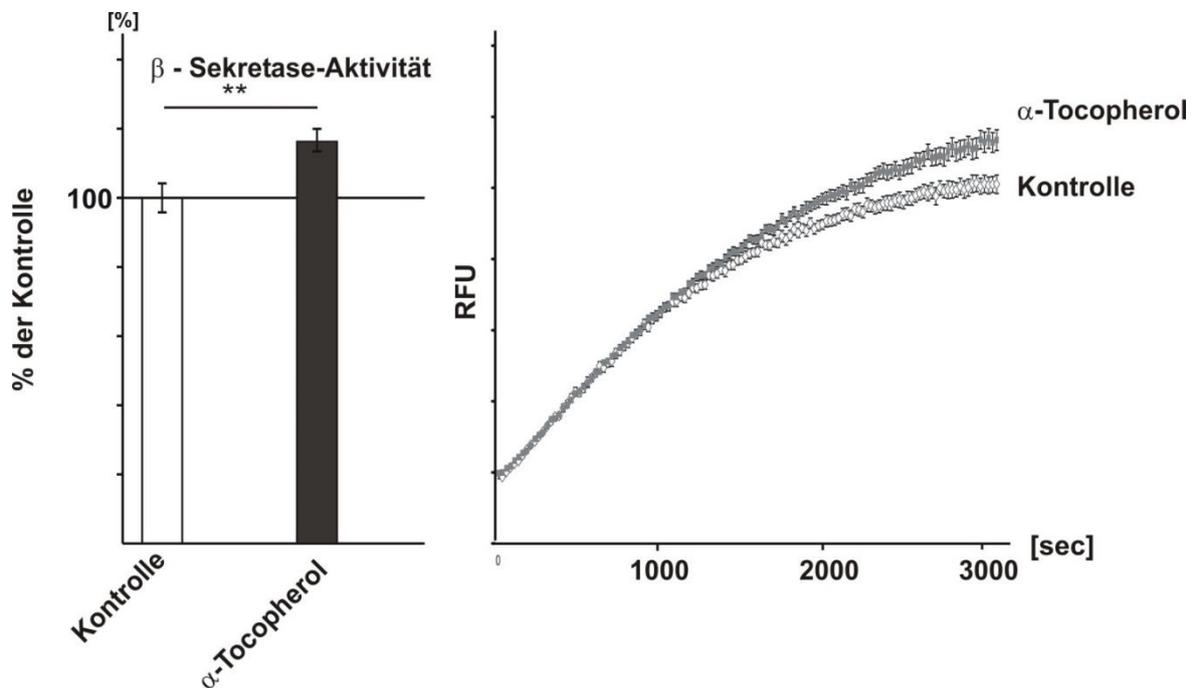


Abbildung 21 Einfluss von α -TP auf die β -Sekretase in post-nukleären Fraktionen

Die Aktivität der β -Sekretase in den mit α -TP behandelten post-nukleären Fraktionen zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ($116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,008$, $n = 6$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

Auch im Fall der β -Sekretase zeigte die Inkubation mit α -TT (Abbildung 20) und α -TP (Abbildung 21) auf post-nukleären Fraktionen eine Steigerung der Enzymaktivität (α -TT: $116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,007$, $n = 6$; α -TP: $116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,008$, $n = 6$). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Wirkung der Vitamin E-Derivate auf die β -Sekretase durch eine direkte Beeinflussung des Enzyms abläuft.

Sowohl im Fall der γ -, als auch β -Sekretase lässt sich ein zusätzlicher Effekt von α -TP und α -TT auf die Genexpression der Enzyme nicht ausschließen. Durch die starke Ähnlichkeit der Effektstärken der β -Sekretase-Aktivität bei der Messung dieser auf lebenden Zellen und post-nukleären Fraktionen lässt sich jedoch vermuten, dass besonders hier der direkte Effekt der Vitamin E-Derivate eine dominante Rolle spielt.

4.1.5.3 Einfluss von α -TP und α -TT auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF-Zellen

Um den Einfluss von α -TP und α -TT auf die Aktivität der γ -Sekretase auf Grundlage eines anderen experimentellen Ansatzes zu verifizieren, erfolgte die Quantifizierung des Gesamt-A β aus SH-SY5Y- β -CTF Zellen (Tabelle 4). Da diese Zelllinie nur die letzten 99 C-terminalen Aminosäuren von humanem APP₆₉₅ (β -CTF) exprimiert, ist das im Medium dieser Zellen angereicherte A β ausschließlich auf den Schnitt der γ -Sekretase zurückzuführen.

Die Zellen wurden hierfür 8 und 16Std mit $10\mu\text{M}$ α -TP und α -TT inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des Gesamt-A β mittels Western Blot Analyse (3.2.3.4-3.2.3.7). Der Effekt von α -TP auf das Gesamt-A β aus SH-SY5Y- β -CTF Zellen wurde bereits 2015 durch Grimm *et. al* untersucht. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Inkubation mit α -TT und α -TP zu erreichen, erfolgte eine Wiederholung dieses Versuchs. Die zuvor von Dr. Christoph Stahlmann erarbeiteten Ergebnisse für α -TP wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Ergebnissen verrechnet [143].

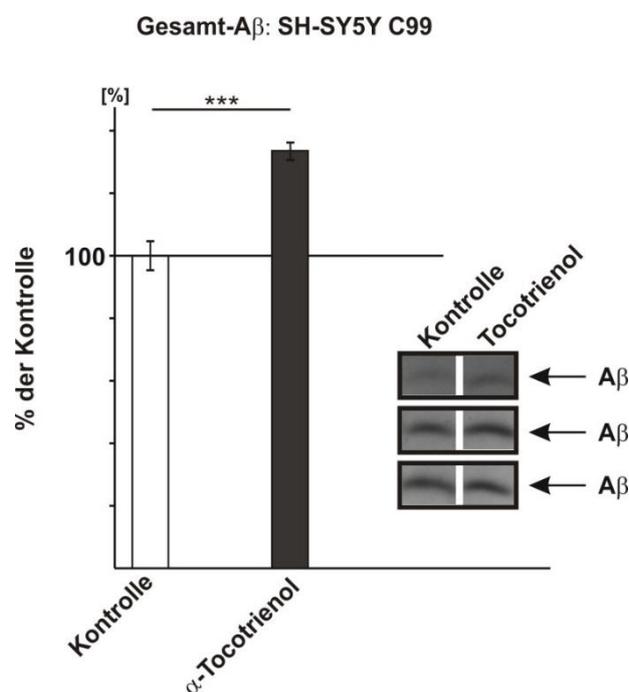


Abbildung 22 Einfluss von α -TT auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF Zelle

Die mit α -TT behandelten SH-SY5Y- β -CTF Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β im Vergleich zur Kontrolle ($133,6\% \pm 2,8\%$, $p \leq 0,001$, $n = 12$). 100% der Kontrolle entsprechen $10,0\text{ng/ml}$ Gesamt-A β . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (***) $p \leq 0,001$.

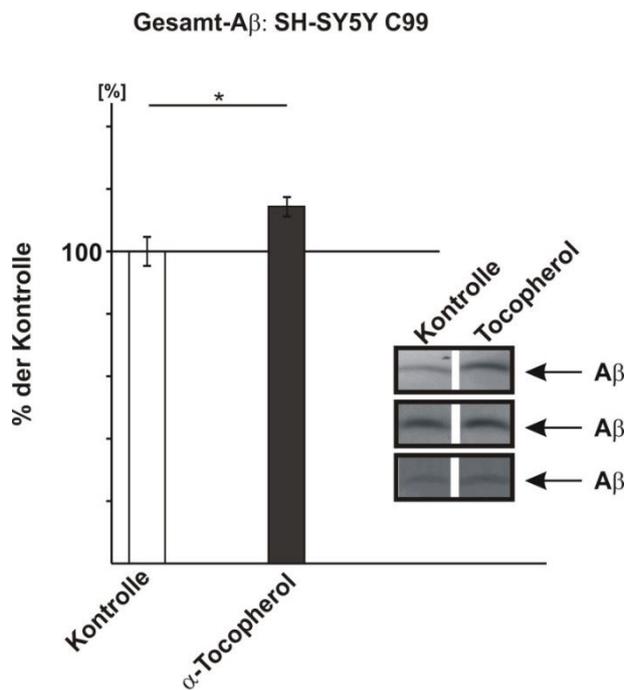


Abbildung 23 Einfluss von α -TP auf Gesamt-A β in SH-SY5Y- β -CTF Zellen

Die mit α -TP behandelten SH-SY5Y- β -CTF Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β im Vergleich zur Kontrolle (114,7% \pm 3,1%, $p \leq 0,05$, $n = 15$). 100% der Kontrolle entsprechen 10,0ng/ml Gesamt-A β . Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (* $p \leq 0,05$).

Entsprechend des direkten Effekts von α -TP und α -TT auf die γ -Sekretase in post-nukleären Fraktionen, konnte auch ein signifikanter Anstieg des Gesamt-A β von SH-SY5Y- β -CTF-Zellen auf 133,6% (\pm 2,8%, $p \leq 0,001$, $n = 12$) unter Einfluss von α -TT (

Abbildung 22) und auf 114,7% (\pm 3,1%, $p \leq 0,05$, $n = 15$) unter Einfluss von α -TP (Abbildung 23) gezeigt werden.

4.1.5.4 Einfluss von α -TP und α -TT auf sAPP β

Um den Effekt von α -TP und α -TT auf die β -Sekretase mit einem weiteren experimentellen Ansatz zu verifizieren, wurde sAPP β aus konditioniertem Medium von mit α -TP und α -TT behandelten SH-SY5Y-APP Zellen detektiert.

sAPP β entsteht als lösliches Fragment durch den Schnitt der β -Sekretase im APP und lässt auf die Funktion dieser zurückschließen [83].

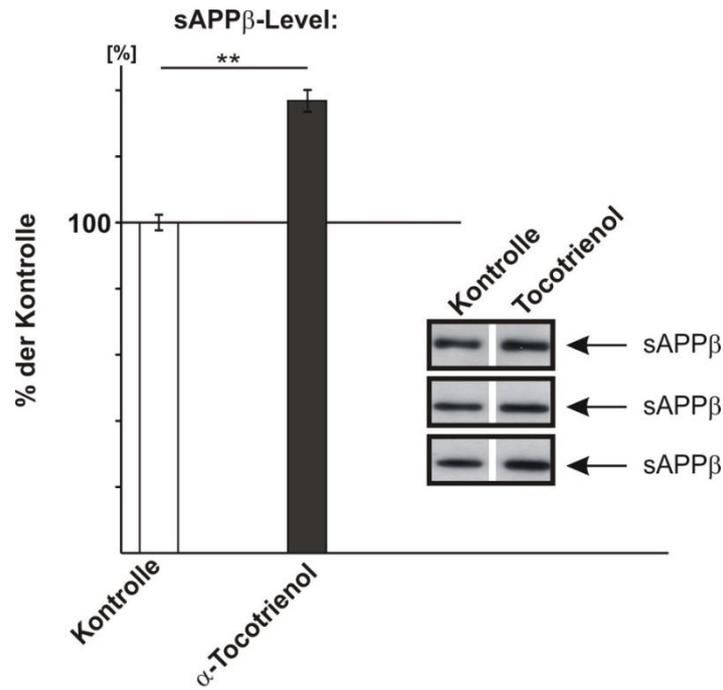


Abbildung 24 Einfluss von α -TT auf sAPP β

Die mit α -TT behandelten Zellen zeigen eine signifikante Steigung der sAPP β -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($136,8\% \pm 3,3\%$, $p = 0,004$, $n = 3$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

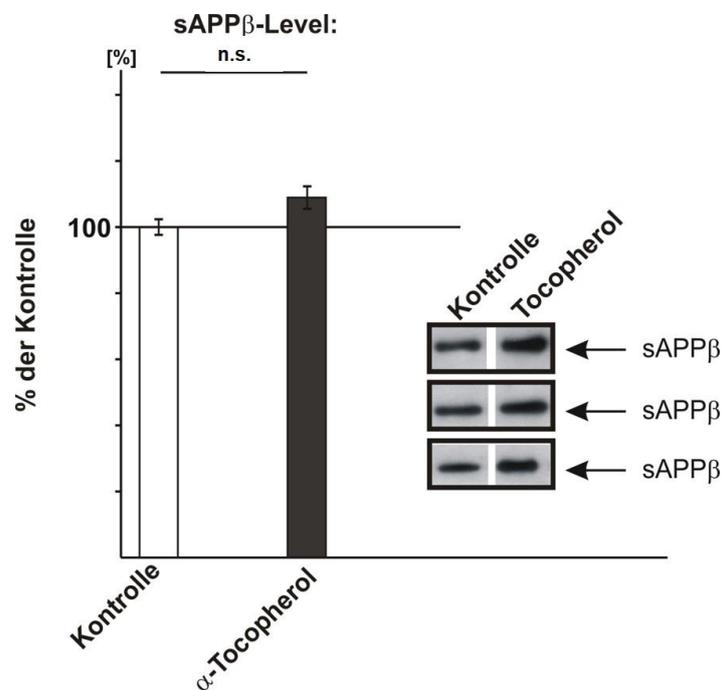


Abbildung 25 Einfluss von α -TP auf sAPP β

Die mit α -TP behandelten Zellen zeigten eine Steigung der sAPP β -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($108,8\% \pm 3,4\%$, $p = 0,06$, $n = 10$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (n.s. = nicht signifikant)

Analog zu dem auf lebenden Zellen und post-nukleären Fraktionen demonstrierten Effekten konnte im Fall von α -TT eine vermehrte β -Sekretaseaktivität über eine Erhöhung des sAPP β auf 136,8% (\pm 3,3%, $p = 0,004$, $n = 3$) (Abbildung 24) im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Durch den Einfluss von α -TP kam es zu einer leichten Erhöhung der sAPP β -Konzentration auf 108,8% (\pm 3,4%, $p = 0,06$, $n = 10$) (Abbildung 25). Diese Ergebnisse zeigten dennoch eine Tendenz in Richtung einer vermehrten Aktivität der β -Sekretase.

4.1.5.5 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen

Neben dem direkten Effekt von α -TP und α -TT auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase wurde auch der indirekte Effekt über die Analyse der Genexpression untersucht. Hierfür erfolgte die Inkubation von SH-SY5Y WT Zellen 8 und 16Std mit 10 μ M α -TP und α -TT. Nach anschließender RNS-Isolation und cDNS-Synthese wurde eine quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen durchgeführt. Im Vergleich mit einem Haushaltsgen erfolgte die Unterscheidung der Expression von *BACE1* für die Analyse der β -Sekretase, sowie *PSEN1*, *PSEN2*, *NCSTN*, *PSENEN*, *APH1A* und *APH1B* für die Analyse des γ -Sekretasekomplexes.

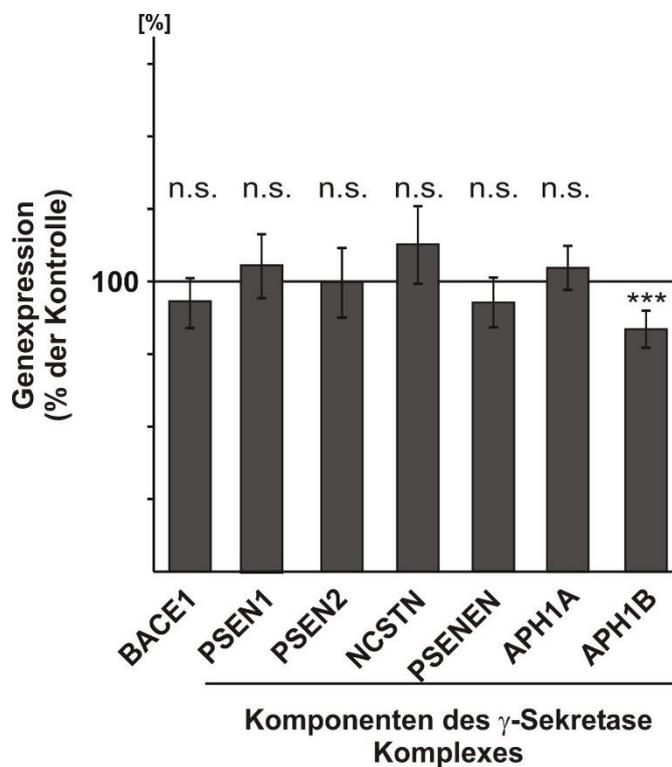


Abbildung 26 Einfluss von α -TT auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen

Die Expression der β - und γ -Sekretase kodierenden Gene zeigte abgesehen von APH1A keinen signifikanten Effekt auf die Behandlung mit α -TT. BACE1 = β -site APP cleaving enzyme 1: 93,2% \pm 4,3%, $p = 0,14$, $n = 8$; PSEN1 = presenilin 1: 107,9% \pm 5,5%, $p = 0,17$, $n = 9$; PSEN2 = presenilin 2: 102,1% \pm 6,0%, $p = 0,73$, $n = 9$; NCSTN = nicastrin: 110,4% \pm 6,6%, $p = 0,13$, $n = 9$; PSENEN = presenilin-enhancer 2: 95,7% \pm 5,2%, $p = 0,42$, $n = 9$; APH1a = anterior-pharynx-defective 1 a: 105,4% \pm 3,8%, $p = 0,18$, $n = 9$; APH1b = anterior-pharynx-defective 1 b: 85,2% \pm 3,4%, $p \leq 0,001$, $n = 9$. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (n.s. nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$).

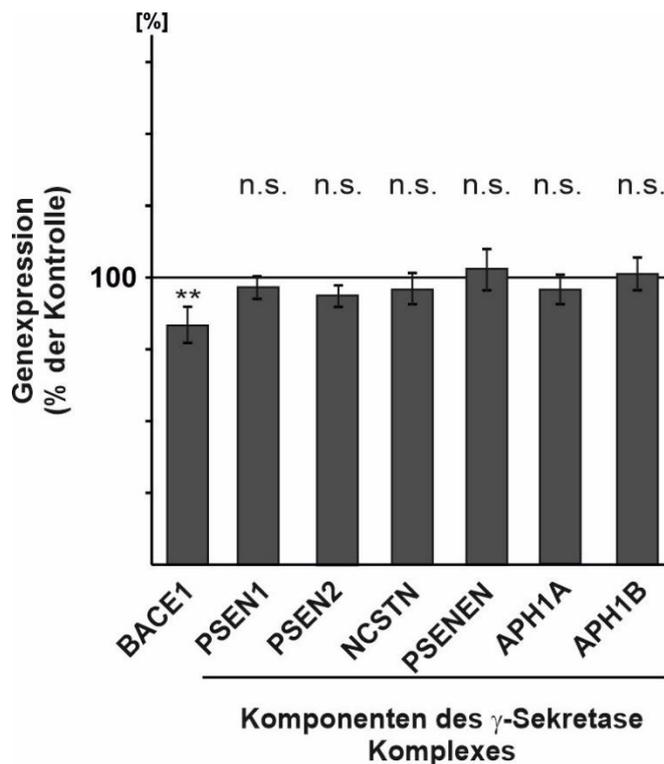


Abbildung 27 Einfluss von α -TP auf die Gen-Expression von β - und γ -Sekretase kodierenden Genen

Die Expression der β - und γ -Sekretase kodierenden Gene zeigte abgesehen von BACE1 keinen signifikanten Effekt auf die Behandlung mit α -TP. BACE1 = β -site APP cleaving enzyme 1: $83,4\% \pm 5,4\%$, $p = 0,007$, $n = 8$; PSEN1 = presenilin 1: $96,8\% \pm 4,0\%$, $p = 0,4$, $n = 9$; PSEN2 = presenilin 2: $94,1\% \pm 4,0\%$, $p = 0,2$, $n = 9$; NCSTN = nicastrin: $95,9\% \pm 5,7\%$, $p = 0,5$, $n = 9$; PSENEN = presenilin-enhancer 2: $103,3\% \pm 7,6\%$, $p = 0,7$, $n = 9$; APH1a = anterior-pharynx-defective 1 a: $95,6\% \pm 5,5\%$, $p = 0,4$, $n = 9$; APH1b = anterior-pharynx-defective 1 b: $101,4\% \pm 5,9\%$, $p = 0,8$, $n = 9$. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (n.s. nicht signifikant, ** $p \leq 0,01$).

Die Behandlung der Zellen mit α -TT zeigte keine Auswirkungen auf die Genexpression des β -Sekretase-Gens *BACE1* (Abbildung 26). Dies lässt darauf schließen, dass die zuvor gesehene Erhöhung der β -Sekretaseaktivität weniger auf einen indirekten als auf einen direkten Effekt von α -TT auf die β -Sekretase zurückzuführen ist. Die Genexpression der Proteine die den γ -Sekretasekomplex bilden zeigen ein ähnliches Ergebnis (PSEN1: $107,9\% \pm 5,5\%$, $p = 0,17$, $n = 9$; PSEN2: $102,1\% \pm 6,0\%$, $p = 0,73$, $n = 9$; NCSTN: $110,4\% \pm 6,6\%$, $p = 0,13$, $n = 9$; PSENEN: $95,7\% \pm 5,2\%$, $p = 0,42$, $n = 9$; APH1a: $105,4\% \pm 3,8\%$, $p = 0,18$, $n = 9$). Ausnahme bildete hier APH1b, bei welchem eine Reduktion der Expression auf $85,2\%$ ($\pm 3,4\%$, $p \leq 0,001$, $n = 9$) im Vergleich zu dem Haushaltsgen Aktin β zu sehen war. Dies lässt vermuten, dass die zuvor gezeigte Erhöhung der γ -Sekretaseaktivität vornehmlich auf einen direkten Effekt des α -TT auf die γ -Sekretase zurückzuführen ist.

Die mit α -TP behandelten Zellen zeigten einen signifikanten Effekt auf die Expression des *BACE1* Gens ($83,4\% \pm 5,4\%$, $p = 0,007$, $n = 8$) (Abbildung 27). Dies deutet eine indirekte Senkung der β -Sekretaseaktivität durch α -TP an, wobei dieser Effekt gering ist. Die Genexpression der Proteine des γ -Sekretasekomplexes wurde durch die Behandlung der Zellen mit α -TP nicht beeinflusst (PSEN1: $96,8\% \pm 4,0\%$, $p = 0,4$, $n = 9$; PSEN2: $94,1\% \pm 4,0\%$, $p = 0,2$, $n = 9$; NCSTN: $95,9\% \pm 5,7\%$, $p = 0,5$, $n = 9$; PSENEN: $103,3\% \pm 7,6\%$, $p = 0,7$, $n = 9$; APH1a: $95,6\% \pm 5,5\%$, $p = 0,4$, $n = 9$; APH1b: $101,4\% \pm$

5,9%, $p = 0,8$, $n = 9$.) Somit ist für diese Protease der direkte Effekt auf die Enzymaktivität vermutlich vorherrschend.

Die Ergebnisse der Echtzeit Polymerasekettenreaktion legen nahe, dass die Beeinflussung der Gen-Expression durch α -TT und α -TP mit unterschiedlichen Schwerpunkten abläuft, da die Expression unterschiedlicher Gene verschiedenstark gesteigert wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit vorausgegangenen experimentellen Beobachtungen, dass die Vitamin E Derivate unterschiedliche Effekte aufweisen [478].

4.1.5.6 Einfluss von α -TT auf die Proteinlevel

In der quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion konnte gezeigt werden, dass α -TT auf die β - und einen Großteil der γ -Sekretase determinierenden Gene keinen Einfluss hat. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden die Proteine BACE1, Presenilin 1 und Nicastrin mittels Western Blot Analyse quantifiziert. Hierfür erfolgte die Verwendung der Lysate von SH-SY5Y-WT Zellen, die zuvor 8 und 16Std mit $10\mu\text{M}$ α -TT inkubiert worden waren.

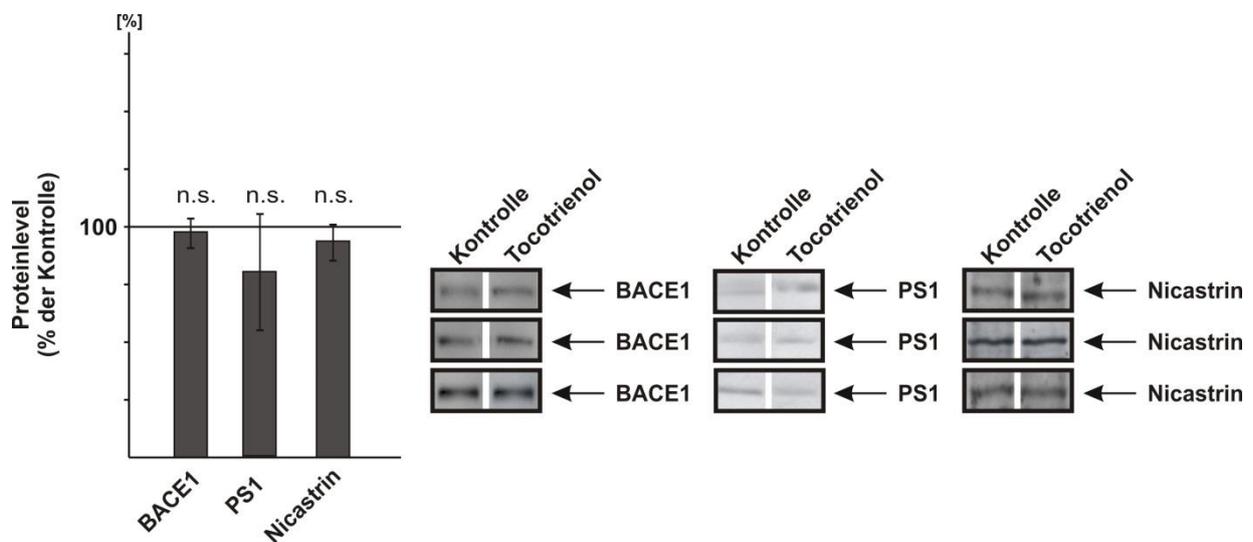


Abbildung 28 Einfluss von α -TT auf die Proteinexpression von BACE1, PS1 und Nicastrin

Die mit α -TT behandelten Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede auf die Expression von BACE 1 ($97,8\% \pm 3,2\%$, $p = 0,68$, $n = 7$), PS1 ($79,8\% \pm 12,6\%$, $p = 0,24$, $n = 8$) und Nicastrin ($91,8\% \pm 3,9\%$, $p = 0,13$, $n = 4$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (n.s. nicht signifikant).

Die Expression der Proteine BACE1 ($97,8\% \pm 3,2\%$, $p = 0,68$, $n=7$), Presenilin 1 ($79,8\% \pm 12,6\%$, $p = 0,24$, $n = 8$) und Nicastrin ($91,8\% \pm 3,9\%$, $p = 0,13$, $n = 4$) wurde durch die Behandlung der Zellen mit

α -TT nicht signifikant verändert (Abbildung 28). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die in lebenden Zellen gezeigte Steigerung der β - und γ -Sekretaseaktivität nicht durch einen indirekten Effekt von α -TT auf die Genexpression von Proteinen zurückzuführen ist. Ein ausschließlich direkter Effekt auf die Sekretasen wird so wahrscheinlicher.

4.1.6 Einfluss von α -TP und α -TT auf die Degradation von A β

Im katabolen A β -Stoffwechsel wird das entstandene Peptid durch diverse Enzyme, wie das Insulin-abbauende Enzym (engl. Insulin-degrading Enzyme, IDE), Neprilysin, oder unspezifische Matrix-Metalloproteasen abgebaut [16]. Eine Änderung der Gesamt-A β -Konzentration kann neben einer gesteigerten oder verringerten A β -Produktion auch auf eine Modulation des A β -Abbaus zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, erfolgte die Inkubation von N2a Zellen mit α -TP und α -TT sowie humanem A β 1-40 (3.2.1.3). Das im konditionierten Medium verbliebene, nicht degradierte A β wurde anschließend mittels Western Blot Analyse (3.2.3.5-3.2.3.7) detektiert. Um das während der Inkubationszeit von den Zellen produzierte murine A β von der Quantifizierung auszuschließen, erfolgte die Verwendung des monoklonalen Antikörpers W02, der ausschließlich humanes A β bindet.

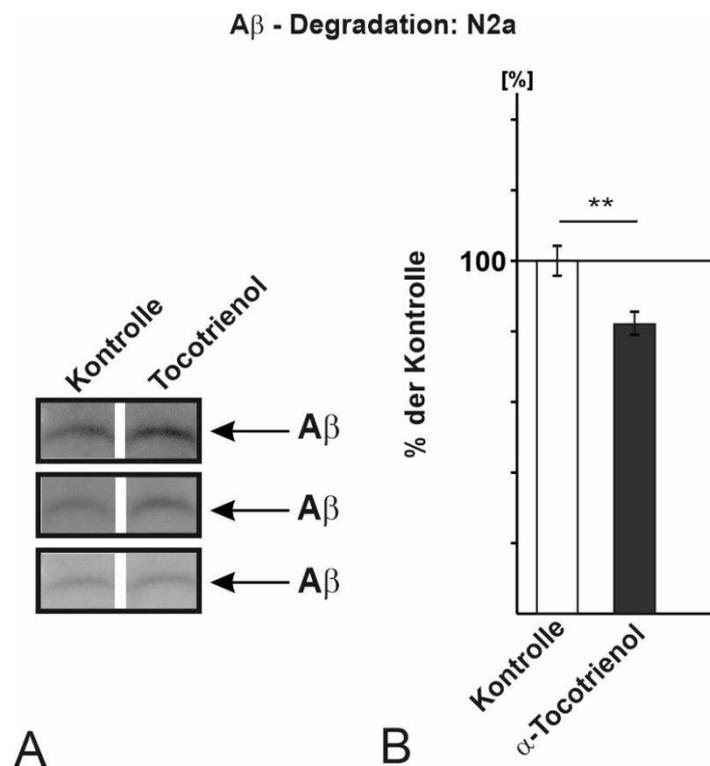


Abbildung 29 Einfluss von α -TT auf die A β -Degradation

Die mit α -TT behandelten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des verbleibenden A β (Abbildung 29 A) und somit eine Reduktion der Degradation ($82,1\% \pm 3,7\%$, $p = 0,003$, $n = 6$) (Abbildung 29 B). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

A β - Degradation: N2a

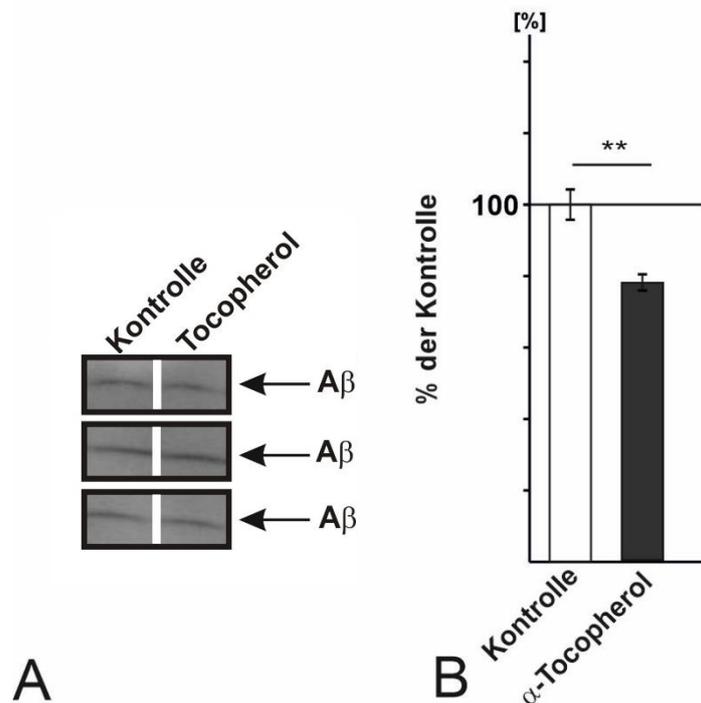


Abbildung 30 Einfluss von α -TP auf die A β -Degradation

Die mit α -TP behandelten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des verbleibenden A β (Abbildung 30 A) und somit eine Reduktion der Degradation ($77,6\% \pm 2,5\%$, $p = 0,001$, $n = 6$) (Abbildung 30 B). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (** $p \leq 0,01$).

Die Auswertung des im konditionierten Medium verbliebenen humanen A β zeigt eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit den Kontrollproben (Abbildung 29). Durch Bildung des Kehrwerts der densitometrisch quantifizierten A β -Banden ließ sich die Aktivität der A β -Degradation errechnen. Diese wurde bei mit α -TT behandelten Zellen von 100% auf $82,1\% (\pm 3,7\%, p = 0,003, n = 6)$ reduziert. Die mit α -TP inkubierten Zellen zeigten eine Reduktion auf $77,6\% (\pm 2,5\%, p = 0,001, n = 6)$ (Abbildung 30). Hieraus lässt sich schließen, dass die Erhöhung des Gesamt-A β neben der Induktion der A β -produzierenden Enzyme auch auf eine Reduktion des A β -Abbaus zurückgeht.

4.1.6.1 Einfluss von α -TT auf die IDE unabhängige Degradation von A β

IDE spielt eine entscheidende Rolle im Abbau von A β [329] und lässt sich durch verschiedene Stoffe und Mechanismen in seiner proteolytischen Tätigkeit beeinflussen [174]. Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit die Reduktion der A β -Degradation durch α -TP und α -TT auf eine Modulation der IDE-Wirkung zurück geht. Hierfür erfolgte wie in 4.1.6 erläutert die Inkubation von N2a Zellen mit α -TT und humanem A β 1-40. Zudem wurden zu jedem Inkubationsschritt $10\mu\text{M}$ Insulin

als kompetitiver Inhibitor von IDE gegeben. So konnte die A β -Degradation unabhängig von IDE untersucht werden.

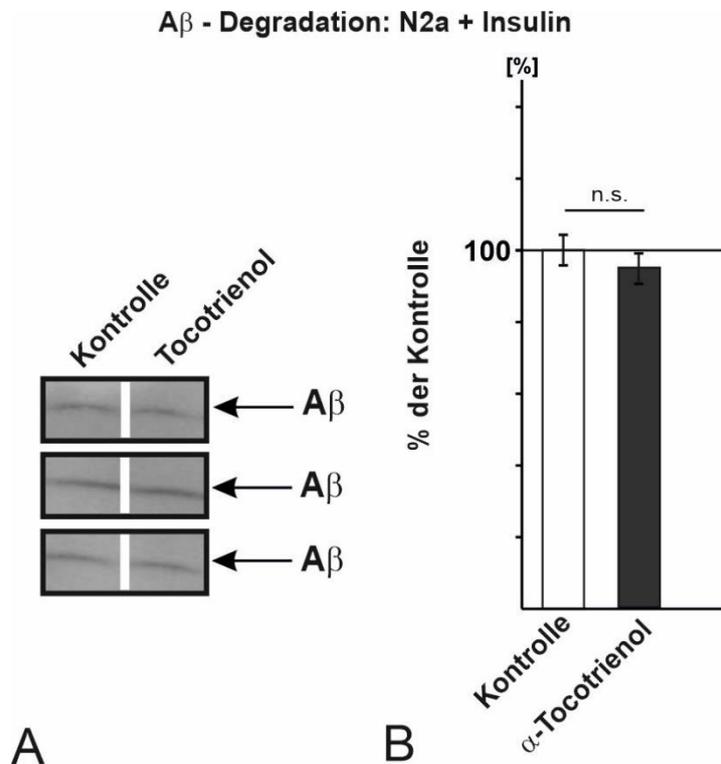


Abbildung 31 Einfluss von α -TT auf die IDE unabhängige A β -Degradation

Die mit α -TT und Insulin inkubierten Zellen zeigen keinen signifikanten Unterschied im verbleibenden A β (Abbildung 31 A) bzw. der A β -Degradation ($98,8\% \pm 2,3\%$, $p = 0,09$, $n = 6$) (Abbildung 31 B). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test (n.s. nicht signifikant).

Unter Anwesenheit des kompetitiven IDE Inhibitors Insulin zeigt sich kein signifikanter Effekt von α -TT auf die A β -Degradation ($98,8\% \pm 2,3\%$, $p = 0,09$, $n = 6$) (Abbildung 31). Da der A β -Abbau im vorangegangenen Versuch ohne Insulin jedoch signifikant reduziert war, lässt sich schlussfolgern, dass der Einfluss von α -TP über einen Mechanismus zustande kommt, bei welchem IDE eine entscheidende Rolle spielt.

4.2 Ergebnisse aus Kooperationen im Rahmen weiterer Projekte

4.2.1 Vitamin D und seine Analoga reduzieren die A β -Synthese und steigern die A β -Degradation

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten wurden im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert.

Marcus O. W. Grimm, Andrea Thiel, Anna A. Lauer, Jakob Winkler, Johannes Lehmann, **Liesa Regner**, Christopher Nelke, Daniel Janitschke, Céline Benoist, Olga Streidenberger, Hannah Stötzel, Kristina Endres, Christian Herr, Christoph Beisswenger, Heike S. Grimm, Robert Bals, Frank Lammert, Tobias Hartmann. Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, PMID: 29257109

Im Rahmen epidemiologischer Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und AD nachgewiesen werden [15]. Es zeigte sich ein reduzierter Vitamin D-Spiegel von AD-Patienten [225,297]. Zudem wird in der Literatur ein Einfluss von Vitamin D auf die A β -Homöostase diskutiert [142]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar.

Als zu untersuchende Analoga, wurden in dieser Studie Vitamin D-Analoga ausgewählt, die im Rahmen der Therapie von Vitamin D-Mangel Verwendung finden: Maxacalcitol, Calcipotriol, Afacalcidol, Paricalcitol, Doxercalciferol [39]. Diese wurden im Vergleich mit 25(OH) Vitamin D₃ untersucht, das im Vergleich zu 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃ eine längere Halbwertszeit im Serum aufweist [452]. Um den Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die A β -Homöostase zu untersuchen, erfolgte zunächst die Bestimmung des Gesamt-A β im Medium von SH-SY5Y APP Zellen, welche für 24h mit Vitamin D und den oben genannten Analoga inkubiert wurden. Die Inkubationskonzentration betrug hierbei 100nM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität der behandelten Zellen im Vergleich mit den Kontrollzellen detektiert werden.

Die Bestimmung des Gesamt-A β erfolgte in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Céline Benoist. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion von Gesamt-A β nach Inkubation mit 25(OH) Vitamin D₃ (Calcifediol: $55,1 \pm 4,2\%$, $p \leq 0,001$). Sowohl die Vitamin D₃, als auch Vitamin D₂ Analoga führten zu einer signifikanten Reduktion des Gesamt-A β (Maxacalcitol: $78,2 \pm 3,1\%$, $p = 0,031$; Calcipotriol: $68,2 \pm 7,2\%$, $p = 0,017$, Afacalcidol: $60,3 \pm 4,3\%$, $p = 0,002$, Paricalcitol: $56,3 \pm 8,2\%$, $p = 0,005$; Doxercalciferol: $70,9 \pm 8,6\%$, $p = 0,037$). Eine ANOVA Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede der A β -Spiegel zwischen den einzelnen Vitamin D-Analoga.

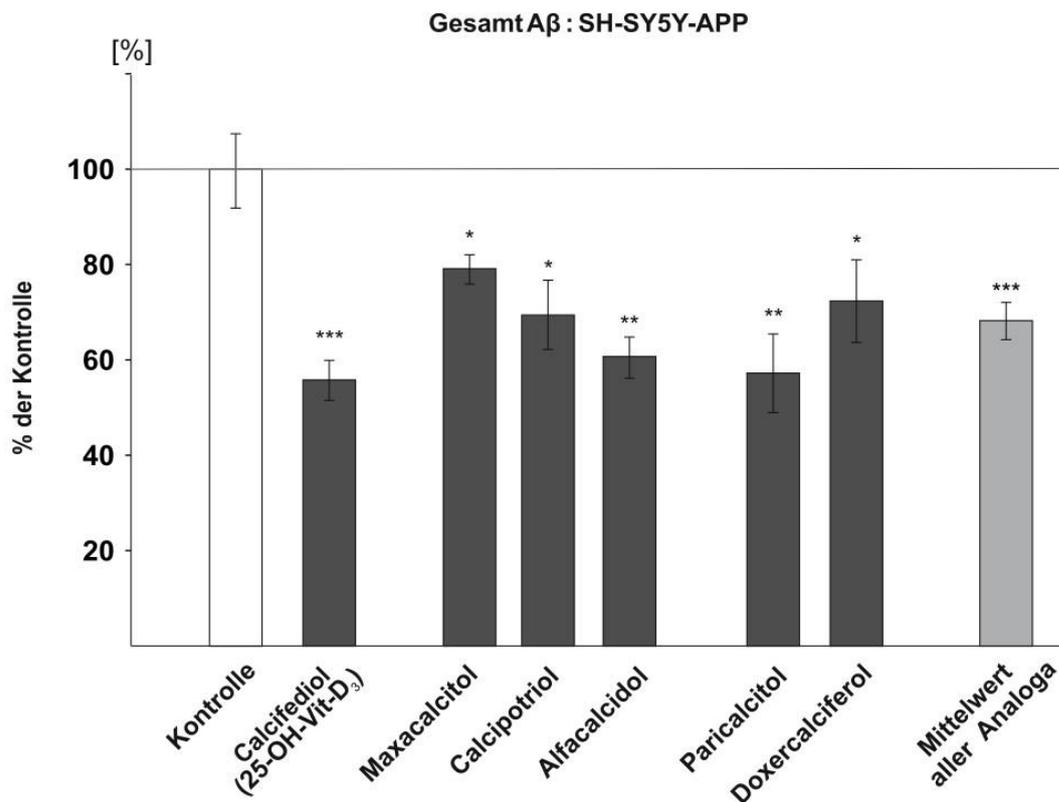


Abbildung 32 Einfluss von Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol auf Gesamt-A β aus SH-SY5Y-APP Zellen

Die mit Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol behandelten SH-SY5Y-APP Zellen zeigten eine signifikante Reduktion des Gesamt-A β (Calcifediol: $55,1 \pm 4,2\%$, $p \leq 0,001$; Maxacalcitol: $78,2 \pm 3,1\%$, $p = 0,031$; Calcipotriol: $68,2 \pm 7,2\%$, $p = 0,017$; Alfacalcidol: $60,3 \pm 4,3\%$, $p = 0,002$; Paricalcitol: $56,3 \pm 8,2\%$, $p = 0,005$; Doxercalciferol: $70,9 \pm 8,6\%$, $p = 0,037$; Mittelwert aller: $66,8 \pm 3,9\%$, $p \leq 0,001$). Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte durch post hoc ANOVA (***) $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$).

Um den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der α -Sekretaseaktivität auf lebenden SH-SY5Y WT Zellen in Anwesenheit von 25(OH) Vitamin D₃ sowie der Vitamin D₃- und D₂-Analoga. Hier zeigten 25(OH) Vitamin D₃ und Paricalcitol eine signifikante Reduktion der α -Sekretaseaktivität (Calcifediol: $114,5 \pm 4,5\%$, $p = 0,015$; Paricalcitol: $113,9 \pm 4,7\%$, $p = 0,023$). Zudem erfolgte eine Untersuchung der β -Sekretaseaktivität auf post-nukleären Fraktionen von SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation dieser mit 25(OH) Vitamin D₃ und Vitamin D₂- sowie D₃ Analoga. Mit Ausnahme von Calcifediol ergab sich eine signifikante Reduktion der β -Sekretaseaktivität in allen Vitamin D-Analoga (Maxacalcitol: $91,7 \pm 2,3\%$, $p = 0,016$; Calcipotriol: $94,7 \pm 1,0\%$, $p = 0,023$; Alfacalcidol: $94,1 \pm 1,3\%$, $p = 0,018$; Paricalcitol: $93,2 \pm 1,6\%$, $p = 0,013$; und Doxercalciferol: $90,7 \pm 1,0\%$, $p \leq 0,001$). Im Rahmen einer Bestimmung der β -Sekretaseaktivität auf lebenden SH-SY5Y Zellen in Anwesenheit von 25(OH) Vitamin D₃ sowie den Vitamin D₃- und D₂-Analoga ergab sich eine signifikante Reduktion der β -Sekretaseaktivität durch und die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol und

Alfacalcidol (Calcifediol: $74,4 \pm 6,3\%$, $p = 0,009$; Maxacalcitol: $69,2 \pm 5,0\%$, $p = 0,0014$; Alfacalcidol: $67,5 \pm 7,1\%$, $p = 0,004$). Hieraus lässt sich schließen, dass neben dem direkten Effekt auf die β -Sekretase, ein über Genexpression oder Proteinstabilität erfolgender, indirekter Effekt durch die Vitamin D Analoga vorliegt.

Um den Effekt auf die β -Sekretase durch Calcifediol im Rahmen eines weiteren experimentellen Ansatzes zu verifizieren, wurde sAPP β im Medium von mit Calcifediol inkubierten SH-SY5Y APP Zellen bestimmt. Hier zeigte sich eine Reduktion des sAPP β auf 76,9 % (sAPP β : $76,9 \pm 1,8\%$, $p = 0,0018$), wodurch die Ergebnisse der fluorometrischen β -Sekretaseaktivitätsbestimmung gestützt werden. Um den Effekt der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase in einem *ex vivo* Modell zu untersuchen, erfolgte die fluorometrische Analyse von Vitamin D-defizienten, homogenisierten Maushirnen. Die Vitamin D defizienten Maushirne enthielten einen 23%ig reduzierten Spiegel von 25(OH) Vitamin D3 im Vergleich mit den Kontrollen. Ein Homogenat der Vitamin D-defizienten-, sowie Kontroll-Maushirne wurde verwendet um die Aktivität der β -Sekretase mit und ohne Zusatz von Vitamin D Analoga zu bestimmen. Auch hier zeigte sich eine höhere β -Sekretaseaktivität in Vitamin D-defizienten Maushirnen im Vergleich mit der Kontrolle. In den mit Calcifediol und Doxercalciferol behandelten Vitamin D-defizienten Homogenaten ergab sich eine signifikante Reduktion der β -Sekretaseaktivität für Calcifediol und Doxercalciferol (Calcifediol, $p = 0,026$; Doxercalciferol: $p = 0,040$). Calcifediol, Alfacalcidol und Maxacalcitol zeigten zudem eine signifikante Reduktion der β -Sekretaseaktivität in den Homogenaten der Kontroll-Maushirne (Calcifediol, $p = 0,028$; Alfacalcidol, $p = 0,050$; Maxacalcitol, $p = 0,015$).

Um den Effekt von 25(OH) Vitamin D3 sowie der Vitamin D3- und D2-Analoga auf die Genexpression der β -Sekretase zu untersuchen, erfolgte eine Echtzeit Polymerasekettenreaktion von BACE1 aus SH-SY5Y WT Zellen. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der BACE1-Genexpression durch Calcifediol, Calcipotriol, und Alfacalcidol (Calcifediol: $80,8 \pm 2,9\%$, $p = 0,003$; Calcipotriol: $75,4 \pm 8,1\%$, $p = 0,040$; Alfacalcidol: $70,3 \pm 5,4\%$, $p = 0,006$). Im Einklang mit diesen Ergebnissen kam es zudem zu einer signifikanten Reduktion des mittels Western Blot Analyse bestimmten Proteinlevels für BACE1 in SH-SY5Y WT Zellen, welche mit Calcifediol, sowie den Vitamin D3- und D2-Analoga mit Ausnahme von Alfacalcidol behandelt wurden (Calcifediol: $54,1 \pm 5,7\%$, $p = 0,004$, Maxacalcitol: $71,4 \pm 5,8\%$, $p = 0,020$; Calcipotriol: $68,9 \pm 2,8\%$, $p = 0,009$; Alfacalcidol: $77,6 \pm 8,4\%$, $p = 0,099$, Paricalcitol: $63,2 \pm 4,2\%$, $p = 0,005$; Doxercalciferol: $74,3 \pm 5,4\%$, $p = 0,025$).

Um den Effekt von Vitamin D3- und D2-Analoga auf die A β -Degradation zu untersuchen, erfolgte die Behandlung muriner Neuroblastomzellen, N2a Zellen, mit den entsprechenden Substanzen und humanem, synthetischem A β . 25(OH) Vitamin D3, Calcifediol, sowie die Vitamin D3- und D2-Analoga zeigten eine signifikante Steigerung der A β -Degradation (Calcifediol: $119,6 \pm 4,5\%$, $p = 0,034$; Maxacalcitol: $164,5 \pm 6,3\%$, $p = 0,009$; Calcipotriol $202,1 \pm 4,2\%$, $p = 0,002$; Alfacalcidol: $123,5 \pm 3,5\%$, $p = 0,046$; Paricalcitol: $168,7 \pm 2,6\%$, $p = 0,002$; Doxercalciferol: $158,2 \pm 2,8\%$, $p = 0,003$). Zudem wurde der Einfluss der Vitamin D3- und D2-Analoga auf die A β -Degradation in Vitamin D-

defizienten Maushirnen untersucht. Hierfür erfolgte die Inkubation der Vitamin D-Analoga im Rahmen eines *ex vivo* Experiments. Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol und Paricalcitol zeigten auch hier eine signifikante Steigerung der A β -Degradation (Maxacalcitol: $128,3 \pm 1,3\%$, $p = 0,001$; Calcipotriol: $123,8 \pm 6,2\%$, $p = 0,041$; Alfacalcidol: $120,0 \pm 4,5\%$, $p = 0,027$; Paricalcitol: $112,2 \pm 3,1\%$, $p = 0,043$).

Im Rahmen einer Echtzeit Polymerasekettenreaktion von SH-SY5Y WT Zellen, die mit den Vitamin D-Analoga behandelt wurden, konnte eine Erhöhung der Expression von NEP, welches eines der dominanten Proteine der A β -Degradation darstellt [183] nachgewiesen werden. Eine signifikante Steigerung der NEP-Expression ergab sich bei Zellen, die mit Alfacalcidol, Maxacalcitol, und Paricalcitol behandelt wurden (Alfacalcidol: $113,8 \pm 5,0\%$, $p = 0,021$; Maxacalcitol: $119,1 \pm 7,3\%$, $p = 0,026$; Paricalcitol $111,6 \pm 3,0\%$, $p = 0,003$).

Für Alfacalcidol und Paricalcitol zeigte sich zudem eine signifikante Steigerung der NEP-Aktivität (Alfacalcidol: $165,2 \pm 16,5\%$, $p = 0,029$; Paricalcitol: $201,8 \pm 35,3\%$, $p = 0,029$).

Da Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielen, erfolgte zudem die Untersuchung des Effekts der Vitamin D-Analoga auf den Interleukin-1 β (IL-1 β)-Spiegel [425]. Dieses wurde ausgewählt, da es in der Literatur als Initiator von Entzündungsprozessen beschrieben wird [82] und in erhöhtem Maße in den Hirnen von AD-Patienten festgestellt werden konnte [46]. Hierfür erfolgte die Bestimmung des IL-1 β -Spiegels mittels ELISA Analyse. Maxacalcitol, Calcipotriol, und Alfacalcidol zeigten eine signifikante Reduktion der IL-1 β -Spiegel auf 71,4%, 84,4%, und 76,6%, (Maxacalcitol: $71,4 \pm 9,3\%$, $p = 0,044$; Calcipotriol: $84,4 \pm 4,6\%$, $p = 0,050$; Alfacalcidol: $76,6 \pm 2,7\%$, $p = 0,005$). Calcifediol und Doxercalciferol demonstrierten ebenfalls eine Tendenz zur Reduktion der IL-1 β -Spiegel (Calcifediol: $84,7 \pm 8,4\%$, $p = 0,167$; Doxercalciferol: $73,1 \pm 9,4\%$, $p = 0,054$). Paricalcitol hingegen führte zu einer Erhöhung der IL-1 β -Spiegel (Paricalcitol: $121,7 \pm 6,8\%$, $p = 0,044$).

4.2.2 Der Effekt von Koffein und anderen Methylxanthinen auf die A β -Homöostase in SH-SY5Y Zellen

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten wurden im Journal *Biomolecules* publiziert.

Daniel Janitschke, Christopher Nelke, Anna A. Lauer, **Liesa Regner**, Jakob Winkler, Andrea Thiel, Heike S. Grimm, Tobias Hartmann, Marcus O. W. Grimm. Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on A β -Homeostasis in SH-SY5Y Cells. *Biomolecules*, 2019, PMID: 31684105

Methylxantine sind Alkaloide, die sich von der Purin-Base Xanthin ableiten. In der Literatur wird den Methylxanthinen eine positive Wirkung auf neurodegenerative Erkrankungen zugesprochen, wobei der genaue Mechanismus dieses Effekts noch nicht vollständig bekannt ist.

Im Rahmen dieses Projekts wurde der Effekt von natürlichem Koffein, Theobromin, Theophyllin und

dem synthetischen Propentofyllin und Pentoxifyllin auf Prozesse der amyloidogenen Prozessierung getestet.

Zunächst wurde determiniert, ob die Methylxanthine einen Effekt auf das Gesamt-A β aufweisen. Hierfür erfolgte die Inkubation von SH-SY5Y APP Zellen für 8+16h mit 100 μ M Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin oder Pentoxifyllin bzw. H₂O als Kontrolle. Dabei ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation, die mittels XTT Assay bestimmt wurde. Auch die Bestimmung der Zellviabilität, mittels LDH-Messung, blieb unbeeinflusst. Im Hinblick auf das Gesamt-A β zeigten alle getesteten Methylxanthine, mit Ausnahme von Theobromin eine signifikante Reduktion des A β -Spiegels (Koffein: 84,5% \pm 5,4% p = 0,0205; Theophyllin 80,2% \pm 7,6% p = 0,0310; Theobromin 83,9% \pm 7,7% p = 0,0730; Propentofyllin 80,2% \pm 6,6% p = 0,0168; Pentoxifyllin: 66,2% \pm 3,9% p \leq 0,001).

Es folgte die Analyse der nicht-amyloidogenen Prozessierung, um zu untersuchen, ob der Gesamt-A β -senkende Effekt der Methylxanthine ggf. durch eine Hochregulierung des nicht-amyloidogenen-Wegs erreicht wird. Hierfür wurde zunächst sAPP α aus SH-SY5Y APP Zellen bestimmt, die zuvor mit den Methylxanthinen für 8+16h inkubiert worden waren. Koffein, Theophyllin und Propentofyllin zeigten eine signifikante Steigerung des sAPP α -Spiegels (Koffein: 131,3% \pm 9,5% p = 0,0070; Theophyllin: 122,8% \pm 8,8% p = 0,0256; Propentofyllin: 143,1% \pm 13,3% p = 0,0117). Pentoxifyllin und Theobromin zeigten ebenfalls eine Steigerung des sAPP α -Spiegels, welche jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Pentoxifyllin: 129,2% \pm 14,8%, p = 0,0741; Theobromin: 122,8% \pm 16,3%, p = 0,1915). Um den Einfluss der Methylxanthine auf die α -Sekretase in einem weiteren experimentellen Ansatz zu bestätigen, erfolgte die fluorometrische Bestimmung der α -Sekretaseaktivität in lebenden SH-SY5Y WT Zellen. Auch hier ergab sich eine signifikante Steigerung der α -Sekretaseaktivität in den mit Methylxanthinen behandelten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle (Koffein: 112,3% \pm 3,0% p = 0,0195; Theophyllin: 122,1% \pm 3,8% p = 0,0026; Pentoxifyllin 114,9% \pm 5,2% p = 0,0385; Theobromin: 130,9% \pm 1,1% p \leq 0,001; Propentofyllin 119,6% \pm 4,9% p = 0,0021).

Um zu determinieren auf welchem Weg die untersuchten Methylxanthine zu einer Steigerung der α -Sekretaseaktivität führen erfolgte die Bestimmung des ADAM10-Proteinlevels. Hier zeigten alle mit Methylxanthinen inkubierte SH-SY5Y WT Zellen eine signifikante Steigerung des ADAM10-Proteinlevels (Koffein: 229,3% \pm 22,4% p \leq 0,001; Theophyllin: 177,0 \pm 18,1%, p = 0,0037; Pentoxifyllin: 179,5% \pm 17,9%, p = 0,0028; Theobromin: 148,8% \pm 8,1%, p = 0,0024; Propentofyllin: 168,8% \pm 9,8%, p = 0,204). Eine Echtzeit Polymerasekettenreaktion von ADAM10 aus mit Methylxanthinen inkubierten SH-SY5Y WT Zellen zeigte eine Reduktion der ADAM10-Genexpression. Koffein erzielte hierbei im Gegensatz zu den anderen untersuchten Methylxanthinen eine statistisch signifikante Reduktion (Koffeine: 88,4% \pm 8,8%, p = 0,2186; Theophyllin: 89,4% \pm 4,6%, p = 0,0876; Pentoxifyllin: 92,9% \pm 4,5%, p = 0,1067; Theobromin: 89,7% \pm 6,1%, p = 0,1226; Propentofyllin: 94,5% \pm 8,5%, p = 0,5321). Die beobachtete Steigerung des ADAM10 Proteinlevels ist

hiernach vermutlich eher auf eine Beeinflussung der Proteinstabilität als der Genexpression zurückzuführen. Um diese Hypothese zu verifizieren, erfolgte eine Analyse der Proteinstabilität mittels Cycloheximid-Behandlung von SH-SY5Y WT Zellen. Da Koffein den stärksten Effekt auf das ADAM10 Proteinlevel gezeigt hatte, wurde es für die Analyse der Proteinstabilität ausgewählt. Im Vergleich mit den Kontrollzellen stellte sich das ADAM10-Proteinlevel in Anwesenheit von Koffein signifikant gesteigert dar ($138,5\% \pm 9,2\%$ $p = 0,0347$), was auf eine Proteinstabilisierung von ADAM10 durch Koffein hinweist.

Neben dem indirekten Effekt der Methylxanthine auf die α -Sekretaseaktivität, wurde mittels post-nukleärer Fraktionen von SH-SY5Y WT Zellen auch der direkte Effekt dieser auf die α -Sekretaseaktivität untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Effekt durch die Methylxanthine (Koffeine: $97,7\% \pm 0,9\%$, $p = 0,1790$; Theophyllin: $97,5\% \pm 3,2\%$, $p = 0,4904$; Pentoxifyllin: $93,6\% \pm 2,4\%$, $p = 0,0628$; Theobromin: $97,9\% \pm 3,1\%$, $p = 0,5708$; Propentofyllin: $97,6\% \pm 2,3\%$, $p = 0,3980$). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Methylxanthine im Hinblick auf die α -Sekretaseaktivität vorwiegend einen indirekten Einfluss ausüben.

Neben der Steigerung der nicht-amyloidogenen Prozessierung kann auch die Reduktion der amyloidogenen Prozessierung zu einer Reduktion des Gesamt-A β führen. Um den Effekt der Methylxanthine auf die amyloidogene Prozessierung zu untersuchen, erfolgte in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Nelke die Bestimmung von sAPP β als Indikator für die Aktivität der β -Sekretase. Hierfür wurden SH-SY5Y APP Zellen für 8+16h mit den zu untersuchenden Methylxanthinen bzw. H₂O inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Western Blot Analyse mittels eines sAPP β -Antikörpers. Koffein, Pentoxifyllin und Propentofyllin zeigten eine signifikante Reduktion des sAPP β -Spiegels (Koffein: $73,7\% \pm 8,9\%$ $p = 0,0110$; Pentoxifyllin: $82,3\% \pm 7,2\%$, $p = 0,0298$; Propentofyllin: $86,0\% \pm 3,1\%$, $p \leq 0,001$). Theophyllin und Theobromin hingegen zeigten keinen signifikanten Effekt (Theophyllin: $109,7\% \pm 9,2\%$, $p = 0,3085$; Theobromin: $98,7\% \pm 8,2\%$, $p = 0,8765$). Eine Bestimmung der β -Sekretaseaktivität auf lebenden SH-SY5Y WT Zellen ergab, abgesehen von Theobromin, eine signifikante Reduktion der β -Sekretaseaktivität durch die untersuchten Methylxanthine (Koffeine: $85,7\% \pm 2,3\%$, $p \leq 0,001$; Theophyllin: $86,4\% \pm 3,0\%$, $p \leq 0,001$; Pentoxifyllin: $79,9\% \pm 2,8\%$, $p \leq 0,001$; Propentofyllin: $74,0\% \pm 2,7\%$, $p \leq 0,001$, Theobromin: $95,2\% \pm 2,6\%$ $p = 0,1051$).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten auch post-nukleäre Fraktionen von den Hirnen von Wildtypmäusen, die mit Koffein behandelt wurden, eine Reduktion der β -Sekretaseaktivität ($93,6\% \pm 1,0\%$ $p = 0,0032$).

Um zu untersuchen, ob die Methylxanthine einen indirekten Effekt auf die β -Sekretase aufweisen, erfolgte die Bestimmung der BACE1 Genexpression mittels Echtzeit Polymerasekettenreaktion in SH-SY5Y WT Zellen. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der Genexpression von BACE1 und des mRNA-Spiegels durch Koffein. Theophyllin, Pentoxifyllin and Theobromin führten zu einer Reduktion der BACE1 Genexpression (Theophyllin: $82,1\% \pm 4,9\%$, $p \leq 0,001$; Pentoxifyllin: $82,2\% \pm 4,4\%$, $p \leq$

0,001; Theobromin: $77,8\% \pm 3,7\%$, $p \leq 0,001$).

Um den Effekt der untersuchten Methylxanthine auf die amyloidogene Prozessierung zu verifizieren, erfolgte die Bestimmung von β -CTF unter dem Einfluss von Koffein, in An- und Abwesenheit eines γ -Sekretase Inhibitors. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des β -CTF in SH-SY5Y APP Zellen, die mit Koffein inkubiert wurden, in Abwesenheit eines γ -Sekretase-Inhibitors ($79,5\% \pm 2,7\%$ $p = 0,0040$). Auch in Anwesenheit eines γ -Sekretase-Inhibitors war eine signifikante Reduktion von β -CTF in den mit Koffein behandelten Zellen zu beobachten ($90,9\% \pm 2,0\%$ $p = 0,0307$). Die unterschiedliche Effektstärke in An- und Abwesenheit eines γ -Sekretase-Inhibitors suggeriert einen möglichen Effekt der Methylxanthine auf die γ -Sekretaseaktivität.

Eine Bestimmung der γ -Sekretaseaktivität in lebenden SH-SY5Y WT Zellen zeigte eine signifikante Steigerung dieser durch Koffein ($108,9\% \pm 2,7\%$ $p = 0,0062$). Theobromin und Propentofyllin hingegen führten zu einer signifikanten Reduktion der Sekretaseaktivität (Theobromin: $84,6\% \pm 2,9\%$ $p \leq 0,001$; Propentofyllin $84,7\% \pm 4,6\%$ $p \leq 0,001$).

Zusammenfassend ergab sich ein stärkerer Effekt der Methylxanthine auf die nicht-amyloidogene Prozessierung als auf die amyloidogene Prozessierung.

Neben der APP-Prozessierung spielen weitere Faktoren eine entscheidende Rolle in der A β -Homöostase, wie die A β -Degradation oder die Expression von APP. Zur Bestimmung der APP-Genexpression erfolgte eine Echtzeit Polymerasekettenreaktion von SH-SY5Y WT Zellen. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Genexpression von APP durch alle getesteten Methylxanthine, mit Ausnahme von Propentofyllin (Koffein: $90,8\% \pm 2,9\%$ $p = 0,0349$; Theophyllin: $83,2\% \pm 3,2\%$, $p \leq 0,001$; Pentoxifyllin: $93,3\% \pm 2,7\%$, $p = 0,0148$; Theobromin: $88,8\% \pm 2,5\%$, $p = 0,0015$; Propentofyllin: $100,6\% \pm 13,0\%$, $p = 0,9614$). Auch das Proteinlevel von APP wurde in den mit Koffein, Theobromin und Propentofyllin behandelten Zellen signifikant reduziert (Koffein: $85,4\% \pm 3,6\%$ $p = 0,0118$; Theobromin: $85,5\% \pm 5,7\%$, $p = 0,0483$; Propentofyllin: $86,1\% \pm 5,0\%$, $p = 0,0437$).

Zur Untersuchung der A β -Degradation erfolgte die Behandlung muriner Neuroblastomzellen, N2a, mit den untersuchten Methylxanthinen sowie humanem, synthetischem A β . Koffein und die weiteren Methylxanthine zeigten keinen Effekt auf das verbleibende A β und somit die A β -Degradation.

Oxidativer Stress spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD. Um die Auswirkung von Methylxanthinen auf die Produktion von ROS zu untersuchen, wurden SH-SY5Y WT Zellen und APF verwendet. Alle untersuchten Methylxanthine demonstrierten eine signifikante Reduktion von ROS (Koffein: $48,3\% \pm 1,6\%$ $p \leq 0,001$; Theophyllin: $54,5\% \pm 4,8\%$, $p \leq 0,001$; Pentoxifyllin: $48,8\% \pm 3,2\%$, $p \leq 0,001$; Theobromin: $39,6\% \pm 2,7\%$, $p \leq 0,001$; Propentofyllin: $34,4\% \pm 7,4\%$, $p \leq 0,001$). Hohe Cholesterinwerte werden ebenfalls als Risikofaktor für AD gewertet. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse eines Einflusses auf den Cholesterinspiegel durch die Methylxanthine mittels eines Amplex red basierten Assays. Hier konnte durch Koffein und Propentofyllin eine signifikante Reduktion des Cholesterinspiegels gezeigt werden (Koffein: $82,8\% \pm 3,7\%$ $p \leq 0,001$; Propentofyllin: $70,1\% \pm 2,8\%$ $p \leq 0,001$).

Um einen Einfluss der Methylxanthine auf die A β 42 Aggregation zu untersuchen, wurde ein Thioflavin-T-basierter Assay verwendet. Als Positivkontrolle erfolgte die Verwendung von Epigallocatechin Gallat, welches bekannt für eine Inhibition der A β -Aggregation ist. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der A β -Aggregation durch alle getesteten Methylxanthine (Koffein: 46,7% \pm 9,6% $p \leq 0,001$; Theophyllin: 47,0% \pm 9,8%, $p \leq 0,001$; Pentoxifyllin: 42,4% \pm 10,3%, $p \leq 0,001$; Theobromin: 37,3% \pm 7,7%, $p \leq 0,001$; Propentofyllin: 54,7% \pm 11,8%, $p = 0,0043$).

5 Diskussion

5.1.1 Bedeutung des Vitamin E Metabolismus im Kontext der Alzheimer Krankheit

Im ersten Teil der Diskussion wird auf den Metabolismus von Vitamin E-Derivaten und dessen Bedeutung im Rahmen chronischer Erkrankungen sowie AD eingegangen.

5.1.1.1 *Biologisches Potenzial der E Vitamine*

Die biologische Aktivität der Vitamin E-Derivate wird maßgeblich durch ihre Struktur determiniert. α -TP stellen hierbei die biologisch aktivste Form im Menschen dar. Die hohe biologische Aktivität der α -TP lässt sich durch die bevorzugte Affinität des α -TP-bindenden-Proteins (α -TPP), das im Zytosol von Leberzellen in Menschen und Tieren vorkommt, zu der entsprechenden Vitamin E-Form erklären. Das α -TPP sorgt für den Transport von TPs zwischen Zellmembranen und trägt damit maßgeblich zur Verteilung von Vitamin E im Gewebe bei [169]. Aus diesen Gründen ist α -TP die dominanteste Vitamin E Form im humanen Blut und Gewebe [289]. Bei der synthetischen Herstellung von Vitamin E besteht dieses aus acht Stereoisomeren, wobei RRR- α -TP die biologisch aktivste Form bildet [96].

Die epidemiologische Studienlage und kontroverse Literatur waren ausschlaggebend für die Entscheidung α -TP in dieser Arbeit zu untersuchen. Zudem spielt α -TP eine entscheidende Rolle in der Gesundheit des zentralen Nervensystems (ZNS). Dies zeigt sich an der klinischen Erscheinung von Vitamin E-Mangelzuständen, die mit neuromuskulären Problemen, wie beispielsweise Myopathien, Ataxien oder Dysarthrien einhergehen [37]. Ein weiterer Aspekt, der die Untersuchung von Vitamin E-Derivaten im Rahmen von AD so ausschlaggebend macht, ist das antioxidative Potenzial der Substanzen. Oxidativer Stress ist ein relevanter Bestandteil der Pathologie zahlreicher neurologischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Ataxien und auch AD [429]. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Evaluation der potenziell protektiven Potenz von Vitamin E-Derivaten von wissenschaftlichem Interesse.

Insbesondere α -TP lag aus diesen und weiteren Gründen bisher im Fokus der Forschung, während zum Zeitpunkt der Verfassung der Arbeit der Zusammenhang zwischen den anderen Vitamin E-Derivaten und AD weitgehend ungeklärt war. Die zweite große Gruppe der Vitamin E-Derivate, die TT, die sich durch drei zusätzliche Doppelbindungen strukturell von den TP unterscheiden, weisen andere biologische Eigenschaften auf. Besonders hervorzuheben ist hier die Beeinflussung der Biosynthese von Isoprenoiden ausgehend von Acetyl-CoA. TT blockieren im Gegensatz zu TP die Prozessierung und Verlagerung von SREBP-2 in den Nukleus und verstärken so die Degradation der HMG CoA-Reduktase [401]. Dies reduziert die Menge an Farnesyl-Pyrophosphat und Geranylgeranyl-Pyrophosphat, die Zwischenprodukte der Steroidsynthese darstellen und reduziert damit womöglich die prenylierungsabhängige Pathogenese der AD (2.1.5) [222]. Diese Eigenschaften machen TT ebenfalls zu einer interessanten Stoffgruppe im Rahmen der Erforschung der AD. Eine Zielsetzung der Arbeit war, ob auch diese Derivate, insbesondere die TT, ein potenzielles therapeutisches Potential besitzen

und wie diese im Vergleich mit dem besser untersuchten α -TP einzuordnen ist.

Die zum Teil synergistischen, zum Teil unterschiedlichen Eigenschaften von TP und TT stellen zudem die Frage nach der Überlegenheit einer Stoffgruppe in Bezug auf protektive Effekte im Rahmen von AD. Insbesondere die antioxidativen Eigenschaften sowie der Einfluss der Stoffgruppen auf die Cholesterinbiosynthese sind hierbei von Interesse.

Boccardi *et al.* zeigten die unterschiedlichen Eigenschaften der TP und TT auf. Auch die verschiedenen biologischen Effekte der jeweiligen α -Formen der Derivate wurden dargestellt [31].

Tabelle 14 Biologische Eigenschaften von Tocopherolen und Tocotrienolen, Tabelle übersetzt und ergänzt nach Boccardi *et al.* 2016

Vitamin E	Biologische Eigenschaften
Tocopherole (alle Formen)	Antioxidation
	Cholesterin-senkend
α -TP	Anti-Inflammation
γ -Tocopherol	Anti-Inflammation
	Anti-neoplastisch
δ -Tocopherol	Anti-neoplastisch
Tocotrienole (alle Formen)	Antioxidation
	Cholesterin-senkend
	Anti-Inflammation
	Anti-neoplastisch
α -TT	Immunostimulation
	Neuroprotektiv
β -Tocotrienol	Neuroprotektiv
γ -Tocotrienol	Neuroprotektiv
δ -Tocotrienol	Immunostimulation

Wie schon zuvor erläutert, bildet α -TP die biologisch aktivste Form der TP im menschlichen Organismus. Im humanen Blutplasma und Lipoproteinen liegt die Konzentration der TT signifikant unter der von α -TP. Jedoch ist insbesondere α -TT für seine neuroprotektiven Eigenschaften, die sich bereits in nanomolaren Konzentrationen der Substanz zeigen, bekannt. Zudem zeigte sich, dass α -TT das am meisten vorhandene TT-Isomer in humanem Plasma und Lipoproteinen ist, nach der Supplementation TT-reicher Vitamin E-Substrate [102]. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf einen Vergleich von α -TT mit α -TP gelegt. Dies ermöglicht gleichzeitig den Effekt der Sättigung der Isoprenoid-Einheiten unabhängig vom Methylierungsgrad des Chromanringes zu untersuchen.

5.1.1.2 Einfluss des Metabolismus der E Vitamine auf chronische Erkrankungen

Bis heute gibt es keine einheitliche Empfehlung bezüglich der täglichen Vitamin E Aufnahme, da zur Bestimmung der Recommended Dietary Allowance (RDA) in verschiedenen Ländern unterschiedliche Methoden verwendet werden. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt derzeit eine Menge von 11mg pro Tag für Frauen und 12mg pro Tag für Männer im Alter von 65 Jahren und älter. Für schwangere und stillende Frauen gilt ein Wert von 13mg bzw. 17mg pro Tag. Unabhängig vom Geschlecht steigt der Vitamin E-Bedarf zunächst von der Neugeborenenperiode bis zur Adoleszenz an und fällt anschließend mit dem Alter wieder ab [78].

Es wird empfohlen die Aufnahme von Vitamin E mit der Menge an ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung zu korrelieren, da die antioxidativen Eigenschaften der Vitamin E-Derivate unter anderem beim Schutz ungesättigter Lipide vor oxidativen Schäden eine entscheidende Rolle spielen [337]. Dabei sollte ein Gramm Diensäuren, also Fettsäuren die eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung enthalten, mit 0,5mg RRR- α -TP aufgenommen werden [374].

Eine reichhaltige Quelle für E Vitamine stellen Pflanzensamen und Nüsse dar. Nicht jedes TP-Derivat ist in diesen Nahrungsmitteln in gleichwertiger Konzentration vorhanden. So findet sich α -TP vorwiegend in Erdnüssen, Mandeln und Sonnenblumenkernen. γ -TP wiederum ist in großen Anteilen in Walnüssen, Sesamkernen, Pekannüssen und Pistazien enthalten. δ -TP findet sich vorwiegend in Tomatensamen, Reiskeimen und Sojaöl [252]. Im Gegensatz zu TP sind TT geringer in Nüssen enthalten. So enthalten beispielsweise Mandeln 3,26 mg/kg TT und 215,44 mg/kg TP [402]. TT sind hingegen in Palmöl, Gerste, Annatto (Samen des Orleanstrauchs) und bestimmten Getreidekörnern zu finden [61,115]. In vielen dieser Nahrungsquellen wird Vitamin E mit Fetten aufgenommen. Aus diesem Grund ist eine hohe Vitamin E Aufnahme oft mit einer erhöhten Aufnahme bestimmter Fettsäuren assoziiert. So enthalten Nussarten, die reich an γ -TP sind, oft mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFAS). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren spielen eine entscheidende Rolle in Entzündungsprozessen, die wiederum Grundlage vieler chronischer Erkrankungen bilden. Die vierfach ungesättigte Arachidonsäure bildet den Metaboliten für die Synthese von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen. Gegenspieler hierzu bilden n- δ

ungesättigte Fettsäuren, die den Anteil der für die Metabolisierung zur Verfügung stehenden Arachidonsäure in der Zellmembran reduzieren. In den heute am häufigsten konsumierten Lebensmitteln liegt bezüglich der Aufnahme von PUFAs der Anteil der n-6 ungesättigten Fettsäuren jedoch weit über dem der n-3 ungesättigten Fettsäuren [49]. Es konnte gezeigt werden, dass die mehrfach ungesättigte Fettsäure Docosahexaensäure die amyloidogene Prozessierung von APP in Richtung der nicht-amyloidogenen Prozessierung lenkt und somit zu einer Reduktion der A β -Freisetzung führt [138]. Durch die Oxidation von DHA kommt es zu einem Aufheben dieses Effekts und einer konsekutiven Erhöhung der A β -Freisetzung [144]. Im A β -induzierten Mausmodell konnte ein protektiver Effekt von DHA auf die Reduktion der Lernfähigkeit gezeigt werden. Es ergab sich zudem eine Reduktion von ROS und Lipidperoxidationen im cerebralen Kortex und Hippocampus der Mäuse [162]. Dies lässt die Frage offen, inwieweit klinische Ergebnisse zum Einfluss Vitamin E-reicher Ernährung auf dem Effekt der dabei mit zugeführten mehrfach ungesättigten Fettsäuren beruhen.

α -TP-reiche Öle sind mit einem größeren Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren (engl. monounsaturated fatty acids, MUFA) assoziiert. Ebenso wie ω 3 PUFAs sind auch MUFAs mit einem verringerten Risiko des Gedächtnisverlustes und der Entwicklung einer Demenz assoziiert [399]. Somit sind sowohl die Vitamin E-Derivate als auch die häufig in denselben Lebensmitteln enthaltenen Fettsäuren mit einer verringerten Inzidenz der Entwicklung von AD in epidemiologischen Studien assoziiert. Aufgrund dieses Zusammenhangs sollten Fettsäuren bei der Assoziation von Vitamin E-Derivaten mit Erkrankungen in epidemiologischen Kohorten oder Fall-Kontroll-Studien als zu berücksichtigender, die Studie beeinflussender Faktor, beachtet werden [189].

Während viele Hypovitaminosen gerade in Entwicklungsländern ein Problem darstellen, wird Vitamin E auch in den westlichen Industrienationen häufig nicht ausreichend aufgenommen. So erreichen beispielsweise Neugeborene und Kinder bis 12 Jahre in Deutschland häufig nicht den empfohlenen Vitamin E Spiegel, wie verschiedene Studien, unter anderem die Verzehrstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen und Kleinkindern, zeigten [257]. Das gleiche Problem besteht auch für die Bevölkerung ab einem Alter von 60 Jahren in Deutschland [377]. In den Vereinigten Staaten wurde ermittelt, dass 75% der Menschen weit weniger Vitamin E als empfohlen zu sich nehmen [424]. Circa 90% des Körpergehalts an Vitamin E wird im Fettgewebe gespeichert. Somit ist ein Defizit bei durchschnittlicher Körperstatur und nur kurzzeitiger verminderter Vitamin E-Aufnahme unwahrscheinlich. Da Vitamin E aus dem Fettgewebespeicher mobilisiert werden kann, werden Mangelzustände häufig erst nach vielen Jahren bemerkbar [421]. Trotz des Fettgewebes als Speicherort ist Adipositas mit einem Mangel an Vitamin E assoziiert [148]. Adipositas stellt zudem einen Risikofaktor für Demenz dar [229]. Eine Komponente dieses multifaktoriellen Risikos könnte der damit zusammenhängende Vitamin E-Mangel sein. Grund für diesen könnte die verlangsamte Mobilisation des Vitamins aus den Lipozyten darstellen [85]. Bei Patienten, die vom metabolischen Syndrom betroffen sind, konnte zudem gezeigt werden, dass die Blutplasmakonzentration an α -TP geringer war

im Vergleich zu gesunden Probanden. Dies wurde auf vermehrte Entzündungsgeschehen und oxidativen Stress zurückgeführt, welche dafür sorgen, dass die intestinale Absorption oder möglicherweise auch der Transport von α -TP im Organismus eingeschränkt ist. Die Bioverfügbarkeit des Vitamins ist zwar unabhängig von den zugleich zugeführten Fetten, wird jedoch durch eingeschränkten Metabolismus im Rahmen von Adipositas beeinflusst. Hieraus lässt sich schließen, dass übergewichtige Patienten eine Vitamin E Supplementation über den empfohlenen Nahrungsaufnahmewerten benötigen [238]. Diese Erkenntnis ist besonders für die Verwendung von Vitamin E im Rahmen einer multimodalen AD Therapie von Bedeutung. Die Menge der Supplementation sollte sich hier unter anderem nach dem Körperfettanteil der Patienten richten.

Liegt ein manifestes Defizit vor, so präsentiert sich dieses klinisch als Neuropathie und Myopathie, was durch die zentrale Rolle zu erklären ist, die Vitamin E in der Erhaltung des Nervensystems spielt [428]. Ein Vitamin E-Mangel lässt sich generell in ein primäres Defizit, welches durch reine Veränderung des Vitamin E-Spiegels zustande kommt und ein sekundäres Defizit, welches durch, den gesamten Organismus beeinflussende Veränderungen, wie Lipid-Malabsorption oder Störungen des Lipid-Transports und Metabolismus in Erscheinung tritt, unterscheiden [427]. Abgesehen von Ernährungsgewohnheiten kann ein Vitamin E-Mangel oder eine mangelhafte Bioverfügbarkeit auch durch genetische Faktoren verursacht werden [239]. Natürlich vorkommende Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) beeinflussen den Vitamin E-Metabolismus im Menschen. Viele genomweite Assoziationsstudien konnten einen Zusammenhang zwischen diesen Genvarianten und dem Plasmaspiegel oder der Bioverfügbarkeit von Vitamin E herstellen [239,453]. Hierdurch könnte sich auch die zum Teil widersprüchliche Literatur in Bezug auf die therapeutische Wirksamkeit der Vitamin E-Supplementation erklären lassen. Vermutlich könnten Patienten mit entsprechenden genetischen Profilen, die geringe Vitamin E-Plasmaspiegel verursachen, von einer Supplementation profitieren [53]. Hier spielt jedoch die Auswirkung der entsprechenden Genvariante eine entscheidende Rolle, da eine genetisch bedingte verminderte Bioverfügbarkeit der Vitamin E-Derivate vermutlich weniger von einer Supplementation profitiert als eine genetisch bedingte verminderte Vitamin E Aufnahme, welche ausgeglichen werden könnte. Einzelnukleotid-Polymorphismen sind zudem mit einer Reduktion der kognitiven Fähigkeiten bei der Konversion milder kognitiver Einschränkungen (engl. mild cognitive impairment, MCI) zu AD assoziiert. Drei SNPs konnten in dem Gen *ST6 Beta-Galactosid Alpha-2,6-Sialyltransferase 1 (ST6Gal 1)* identifiziert werden. Dieses spielt eine entscheidende Rolle in der A β -Synthese [215]. Die Sialyltransferase ST6Gal 1 wird durch BACE1 proteolytisch geschnitten, was wiederum zu einer Herunterregulierung der Transferaseaktivität dieser führt. In *ST6Gal1*-überexprimierenden N2a Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten α -2,6-Sialylierung von endogenem APP und damit zu einer Erhöhung der extrazellulären APP-Metabolite kommt [281].

Aktuell wird eine α -TP-Konzentration von unter 12mmol/L für Frauen und unter 9mmol/L bei Männern als Mangel angesehen [423]. Da symptomatische Defizite jedoch so selten auftreten, wurde von Traber *et al.* in Frage gestellt, ob die aktuellen Vitamin E-Aufnahmeempfehlungen zu hoch angesetzt sind und eine geringe diätische Aufnahme überhaupt eine signifikante biologische Konsequenz nach sich zieht [423]. Der Gebrauch von Vitamin E-Ernährungszusätzen zur erleichterten Einhaltung der diätischen Vorgaben birgt wiederum die Gefahr der Intoxikation.

Eine physiologische Vitamin E-Aufnahme von 100mg/d kann um das Dreifache auf 300mg/d erhöht werden ohne dass Komplikationen auftreten [466]. Dies gilt auch für kurzzeitig zugeführte hohe Dosen. Bei oral zugeführten Dosierungen von 2g/kg/d zeigte sich in Tierstudien jedoch nach 90 Tagen eine Beeinflussung der Blutgerinnung. Zudem wurde eine Assoziation zu hämorrhagischen Schlaganfällen festgestellt [480]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass bei einer hohen Vitamin E-Aufnahme (≥ 400 IU/d) für mindestens ein Jahr die totale Mortalitätsrate steigt [266]. Aufgrund dieser negativen Eigenschaften wurde die maximal tolerable Aufnahmegrenze für Erwachsene auf 1000mg/d α -TP gesetzt [178].

Abgesehen von der Ernährung ist die Verfügbarkeit von Vitamin E auch von weiteren Faktoren wie Alter, Geschlecht und Lebensstil abhängig [125]. Die altersabhängigen Unterschiede des Vitamin E-Gehalts im Serum wurden in zahlreichen Studien diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass der Vitamin E-Serum Spiegel bei Personen ab dem Alter von 80 Jahren sinkt. Dies wurde jedoch mit der generell reduzierten Nahrungsaufnahme von älteren Menschen in Verbindung gebracht [50]. Auch dies spricht für eine zusätzliche medikamentöse Vitamin E-Supplementation, da der Bedarf durch die verminderte Lebensmittelaufnahme im Alter nicht mehr ausreichend gedeckt wird. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass der Vitamin E-Gehalt der Leber keinen signifikanten altersabhängigen Schwankungen unterliegt [270]. Diese in der Literatur widersprüchlichen Aussagen machen deutlich, dass zusätzliche Studien zu Veränderung des Vitamin E-Metabolismus in geriatrischen Patienten notwendig sind, um den Einflussmechanismus des Alterungsprozesses auf diesen zu bestimmen.

Ein weiterer durch den Lebensstil beeinflusster Faktor stellt der Körperfettanteil dar, welcher wie oben bereits erläutert, wiederum einen Einfluss auf den Vitamin E-Metabolismus hat. Doch auch hier ist die Literatur nicht einheitlich. So konnte in mehreren klinischen Studien demonstriert werden, dass unabhängig vom Alter ein gegenläufiger Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und α -TP-Konzentration im Serum besteht [7,148]. Ein gegenteiliges Ergebnis wurde anhand der Malmö Diät and Cancer Study Kohorte gezeigt. Hier stand der α -TP-Spiegel im Serum in positiver Korrelation mit der zentralen Fettleibigkeit nach Korrektur für das Körperfett [436]. Worin sich diese Unterschiede begründen und inwieweit Adipositas die Bioverfügbarkeit von Vitamin E-Derivaten beeinflusst wurde bereits diskutiert.

Ein weiterer Einflussfaktor für die biologische Verfügbarkeit von Vitamin E ist das Rauchen, welches maßgeblich den Gehalt an Antioxidantien im Serum beeinflusst. So stellten einige Studien eine geringere α -TP Serumkonzentration bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern fest [7,385]. Bei der

Bewertung dieser Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass sich die Ernährungsmuster von Rauchern und Nichtrauchern unterscheiden, was wiederum eine unterschiedliche Vitamin E-Aufnahme zur Folge haben kann [80,91]. Mezzetti *et al.* hingegen konnten keinen Unterschied in dem Plasma Vitamin E-Spiegel zwischen diesen beiden Gruppen feststellen. Es zeigte sich jedoch ein signifikant geringerer Gehalt an Vitamin E in arteriellem Gewebe von Rauchern verglichen mit Nichtrauchern [259]. Diese Erkenntnisse lassen wiederum darauf schließen, dass Vitamin E als fettlösliches Antioxidans Arterien vor Schäden durch Oxidation schützt [80]. Auch für AD stellt Rauchen einen bekannten Risikofaktor dar, wenn auch hier die Literatur nicht einheitlich ist. So konnte ein Zusammenhang zwischen starkem Rauchverhalten und der Entwicklung von Demenz im Allgemeinen sowie auch AD im Speziellen hergestellt werden [361]. In einer prospektiven Kohorten-Studie, die Personen ab einem Alter von 65 Jahren über 10 Jahre beobachtete, zeigte sich hingegen ein positiver Effekt des Rauchens auf die kognitive Funktion, da die Gruppen der aktuell und früheren Raucher bessere Ergebnisse in kognitiven Tests erzielten [437]. Die heterogene Literatur verdeutlicht, dass weitere Studien notwendig sind, um zu determinieren, inwieweit Rauchen das Demenzrisiko beeinflusst. Auch die Rolle von Vitamin E als möglichen Mediator der negativen Auswirkungen des Rauchens auf kognitive Fähigkeiten bedarf genauerer Erforschung.

Wie auch bei Rauchern vermutet, begründet sich bei chronischem Alkoholkonsum ein geringerer Serum- α -TP-Gehalt vorwiegend in dem Ernährungsmuster dieser Patientengruppe. Hier kommt es schnell zu Malnutritionen, die den Vitamin E Mangel begründen [30]. *In vivo* Studien zeigten, dass die chronische Aufnahme von Alkohol zu einer signifikant geringeren α -TP-Konzentration in der Leber führt [29,30]. Die Behandlung alkoholabhängiger Patienten mit Vitaminkomplexpräparaten gehört bereits zur Standardtherapie dieser Erkrankung. Insbesondere im Fall der Demenzprävention und Therapie sollte jedoch eine Supplementation von Vitamin E stärker in den Vordergrund rücken. Während chronischer Alkoholkonsum einen fraglichen Risikofaktor für AD darstellt [118,321], zeigt geringer bis moderater Alkoholkonsum protektive Effekte im Rahmen von AD. So zeigte eine Kohortenstudie von Luchsinger *et al.* eine Assoziation zwischen dem Konsum von bis zu drei Gläsern Wein täglich und einem reduzierten Risiko an AD zu erkranken. Dies galt für Personen über 65 Jahre und ohne APOE ϵ 4-Allele [232]. Eine weitere Studie von Orgogozo *et al.*, welche Probanden im Alter von 65 und älter aus der Region um Bordeaux in Frankreich untersuchte, zeigte eine inverse Beziehung zwischen moderatem Weinkonsum, welcher hier mit >250 bis 500ml täglich definiert wurde, und der Inzidenz von Demenz [300]. Eine generelle Empfehlung zu moderatem Alkoholkonsum wäre zu diesem Zeitpunkt jedoch fahrlässig, da negative Effekte auf andere Erkrankungspathogenesen nicht auszuschließen sind.

TP bilden weltweit den größten Anteil der aufgenommenen E Vitamine. Dabei gibt es regionale Unterschiede in der Präferenz der TP-Derivate. So wird in Amerika vornehmlich γ -TP konsumiert [188] und in Europa vornehmlich α -TP [322]. Die jährliche Inzidenz (je 1000 Einwohner) von AD beträgt 10,5

für Nordamerika 9,2 für Lateinamerika und 8,8 für Westeuropa [247]. Ein Zusammenhang zwischen den regionalen Ernährungsgewohnheiten und der Inzidenz von AD lässt sich somit vermuten.

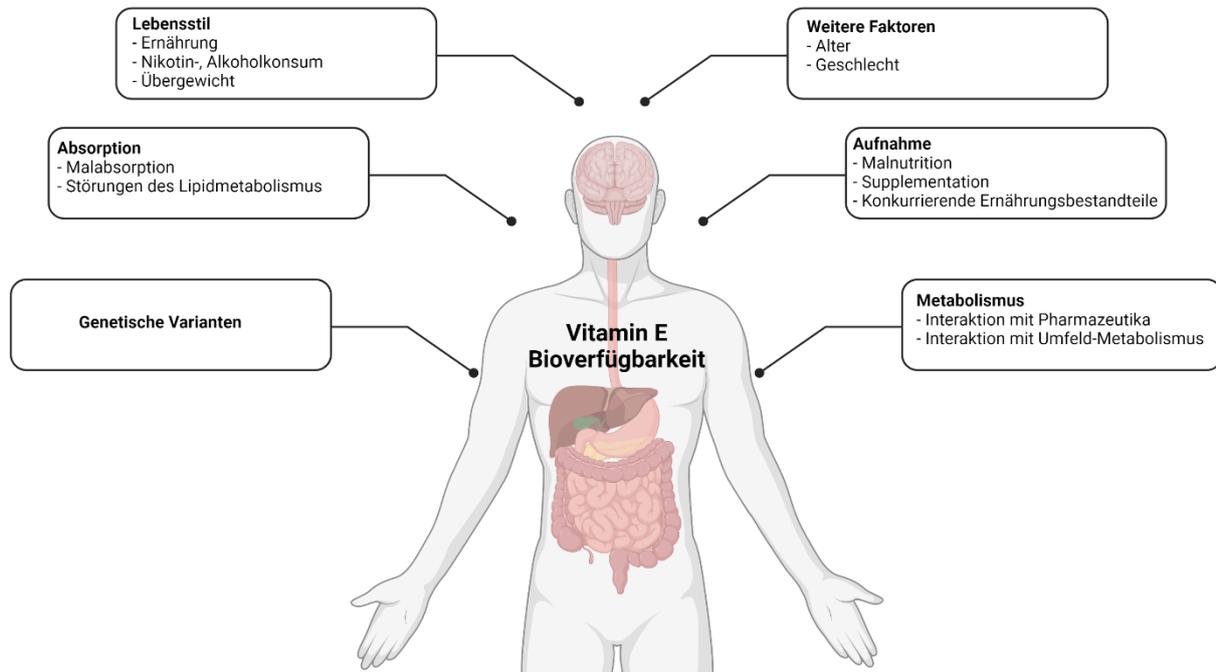


Abbildung 33 Einflussfaktoren der Bioverfügbarkeit von Vitamin E.

Abbildung übersetzt, ergänzt und modifiziert nach Schmölz *et al.* 2016

Wie bereits in 2.3.2 erläutert erfolgt die Verteilung von Vitamin E in extrahepatische Gewebe durch VLDL und LDL [32]. In einer Studie von Kuo *et al.* konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem LDL und der Menge von A β 1-42 im Hirn von AD-Patienten hergestellt werden. So wiesen die Seren von AD-Patienten einen signifikant höheren Anteil an LDL, ApoB, A β N-40 und A β N-42 auf. Es konnte eine positive Korrelation zwischen dem Serum LDL Spiegel und dem A β N-42 Anteil in Gehirnen jedoch nicht dem A β N-40 gezeigt werden [207]. Lesser *et al.* zeigten, dass Patienten, bei welchen *post mortem* die Diagnose von AD gestellt werden konnte, ein signifikant höheren Serumspiegel für Gesamtcholesterin und LDL aufwiesen, im Vergleich zu Kontrollen welche nicht die pathophysiologischen Kriterien für AD erfüllten [218]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte eine Metaanalyse von Sáiz-Vazquez *et al.*, welche den Zusammenhang zwischen AD und Cholesterin untersuchte, ein erhöhtes Risiko für AD bei erhöhten LDL-Serum-Spiegeln [362].

Eine verbesserte Distribution von Lipiden wie auch dem lipophilen Vitamin E durch eine erhöhte Menge an LDL könnte den Anteil an TP und TT im Hirngewebe erhöhen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl α -TT als auch α -TP zu einer Erhöhung des Gesamt-A β in humanen Neuroblastomzellen, welche APP₆₉₅ überexprimieren, führen. Die mit α -TT behandelten SH-SY5Y-APP Zellen zeigen eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β (116,7% \pm 3,1%, $p \leq 0,001$, $n=16$), ebenso

die mit α -TP behandelten SH-SY5Y-APP Zellen ($114,7\% \pm 3,2\%$, $p \leq 0,01$, $n=16$). Für α -TT wurde zusätzlich die Auswirkung auf die Freisetzung in SHSY5Y WT Zellen, welche eine natürliche endogene APP Expression aufweisen getestet. Hier zeigte sich eine noch deutlichere Erhöhung des Gesamt-A β als bei den APP₆₉₅ transfizierten Zellen ($146,7\% \pm 2,3\%$, $p \leq 0,001$, $n=4$). Grund hierfür könnten die Unterschiede in der Degradation von A β -Proteinen darstellen, da dieser Prozess in den SHSY5Y APP₆₉₅ vermutlich an die höhere A β -Synthese angepasst ist, wohingegen SHSY5Y WT nicht in der Lage sind die plötzlich gesteigerte Synthese durch eine gesteigerte Degradation zu kompensieren.

5.1.2 Die biologischen Eigenschaften von Vitamin E im Rahmen der Pathogenese der Alzheimer Krankheit

Im zweiten Teil der Diskussion wird auf die Eigenschaften von Vitamin E-Derivaten und ihre Bedeutung im Rahmen von AD eingegangen.

5.1.2.1 Die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften der E Vitamine

In den ersten Jahren der Vitamin E-Forschung wurde sich vorwiegend auf den Einfluss von α -TP konzentriert, da dieses die höchste biologische Aktivität im menschlichen Organismus aufweist [37]. Wie bereits erläutert, ist der Grund hierfür, dass das α -TP-Transfer-Protein (TTP), welches für den Transport von Vitamin E im Blut verantwortlich ist, für α -TP die höchste Affinität aufweist [201]. Mit der Zeit konnte jedoch festgestellt werden, dass andere Vitamin E-Formen ebenso ausgeprägte und zum Teil sogar stärkere biologische Eigenschaften besitzen [189]. So hat γ -TP beispielsweise ausgeprägte antioxidative Eigenschaften, und ist in diesem Hinblick α -TP überlegen [188].

Generell verfügen alle Vitamin E-Formen über potente antioxidative Eigenschaften. Da Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen [8], stellt Vitamin E einen potenziellen therapeutischen Ansatz für diese dar. Als potentes Antioxidans ist es z.B. in der Lage freie Radikale zu neutralisieren bevor diese zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor Kappa-B (engl. nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells, NF κ B) führen, wodurch wiederum die Produktion von Zytokinen, welche für die Pathogenese von Entzündungsreaktionen relevant sind, unterdrückt wird [284].

Doch neben antioxidativen Eigenschaften zeigen TP und TT auch entzündungshemmende Effekte. Entzündungsreaktionen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vieler chronischer Erkrankungen, wie beispielsweise Asthma bronchiale [163] oder Rheumatoider Arthritis [397]. Die Entzündungsreaktion ist essenziell für die Verteidigung des menschlichen Organismus gegen Verletzungen und Krankheitserreger. Durch die Interaktion der Bestandteile des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie Entzündungsmediatoren werden akute, sowie chronische Entzündungen reguliert [224]. Hervorgerufen wird eine Inflammation als Reaktion des Immunsystems. Diese Reaktion besteht aus verschiedenen Prozessen. Neben der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

ist die Synthese von Mediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen oder Zytokinen von Bedeutung [253].

5.1.2.1.1 Einfluss von Vitamin E als Antioxidans auf die Alzheimer Erkrankung

Reaktive Sauerstoff und Stickstoffspezies können in biologischen Organismen sowohl günstige als auch schädliche Folgen haben [431]. In geringer oder moderater Konzentration haben reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine physiologische Rolle in der Abwehr von Noxen wie Infektionserregern, oder in zellulären Signalwegen. Paradoxe Weise schützen viele durch reaktive Sauerstoffspezies mediierte Abläufe Zellen vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies. Es wird hierbei von einer ROS-Balance oder -Homöostase gesprochen [204]. Eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies hingegen führt zu oxidativem Stress, welcher wiederum zur Schädigung von Zellstrukturen wie Lipiden, Proteinen und DNS führt [86].

Die antioxidativen Eigenschaften von Vitamin E kommen durch die am Chromanolring enthaltene Phenol-Gruppe zustande. Durch den hiervon freigesetzten Wasserstoff werden Radikale eingefangen und ein Vitamin E-Radikal entsteht. Dieses wird wiederum mit Hilfe von Ascorbinsäure reduziert. Das entstandene Ascorbatradikal wird anschließend durch Glutathion regeneriert [96]. Im Rahmen struktureller Unterschiede ist die antioxidative Potenz der Vitamin E Formen zum einen von den Gruppen am Chromanol-Ring und zum anderen von der Seitenkette abhängig. Außerhalb der Lipiddoppelmembran ist die Reaktionshäufigkeit von der Anzahl der Methylgruppen am Chromanolring und innerhalb der Lipiddoppelmembran von der hydrophoben Seitenkette und somit der Beweglichkeit innerhalb der Membran abhängig. Aufgrund dieser strukturellen Abhängigkeit zeigt sich beim Vergleich von α -TP mit α -TT eine deutlich höhere antioxidative Potenz des letzteren. Diese ist auf sein schnelleres Recycling nach Abgabe von Wasserstoff, seine homogenere Verteilung innerhalb der Lipidmembran sowie die Auflockerung der Membranlipide und die hierdurch hervorgerufenen besseren Reaktionsbedingungen mit Radikalen zurückzuführen [382]. Vitamin E-Formen, welche keine Gruppe an ihrer fünften Position enthalten, wie γ -TP, sind zusätzlich in der Lage Elektrophile einzufangen und somit auch reaktive Stickstoff-Verbindungen zu eliminieren. Somit ist γ -TP dem mit einer Methylgruppe in Position 5 ausgestatteten α -TP in Bezug auf die Eliminierung von NO_2 und Peroxynitrit überlegen [188].

Oxidativer Stress entsteht im Allgemeinen durch eine Imbalance der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der Entfernung dieser [160]. Viele Schäden, welche aus oxidativem Stress resultieren, wie eine hohe Protein- und Lipidoxidation, Oxidation von DNS oder die Entstehung toxischer Endprodukte wie Ketonen, kommen im Rahmen von AD vor. Diese finden sich sowohl im Hirngewebe, als auch dem Liquor, Blut und Urin von AD-Patienten [231]. Das im Rahmen der amyloidogenen Prozessierung hergestellte A β ist in der Lage freie Radikale zu bilden wie Hensley *et al.*

mithilfe der Massenspektrometrie und paramagnetischem Resonanz-Spin-Tapping zeigten [165]. Senile Plaques, welche sich aus A β und Metallionen wie Kupfer, Eisen und Zink zusammensetzen, können über die reoxidativen Fähigkeiten der Metall-Ionen die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies katalysieren. Der hierdurch entstandene oxidative Stress führt zu einer Schädigung von A β -Peptiden als auch umliegenden Proteinen und Lipiden [57]. Auch Mikroglia produzieren unter dem Einfluss von A β , reguliert über Ionenkanäle reaktive Sauerstoffspezies [372]. Insgesamt ergibt sich aus der aktuellen Studienlage eine deutliche Evidenz, die die Hypothese von erhöhtem oxidativem Stress im Rahmen von AD unterstützt. So kommen Metallionen wie Kupfer, Zink und Eisen vermehrt in neuritischen Plaques in Hirnen von AD-Patienten vor [366]. Zudem zeigte sich im Vergleich mit gesunden Kontrollen eine erhöhte Lipidperoxidation in den Gehirnen von AD-Patienten. In selbiger Studie erfolgte darüber hinaus eine Quantifizierung der Spalt- und Endprodukte 4-Hydroxy-2-nonenal, Acrolein, Isoprostane und Neuroprostane [271]. Auch DNS- und Proteinoxidationen zeigen sich in erhöhtem Maß im Gehirn von AD-Patienten [237]. Darüber hinaus zeigte sich ein Mangel an dem Enzym Cytochrom c Oxidase, welches in der mitochondrialen Atmungskette vorkommt, sowohl im Hirngewebe als auch den Thrombozyten von AD-Patienten. Die Tatsache, dass dieser Mangel auch unabhängig von Hirngewebe vorkommt, suggeriert eine Pathogenese welche unabhängig von Neurodegeneration ist [52]. Zudem zeigt sich in neurodegenerativen Erkrankungen wie auch AD ein erhöhtes Vorkommen von Glykationen [368]. Als Glykation wird die enzymlose Reaktion von Kohlenhydraten mit Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren bezeichnet, welche gehäuft im Rahmen von Hyperglykämien und oxidativem Stress vorkommt [371]. Endprodukte der Glykation kommen sowohl bei Diabetes mellitus als auch bei AD vor und können als Marker des Erkrankungsprogresses genutzt werden [343]. Durch Hyperglykämien, die sowohl bei Diabetes mellitus Typ 1 als auch Typ 2 vorkommen, kommt es zu einer Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies [199]. Wie bereits in 2.1.4.1 erläutert, stellt Übergewicht, welches häufig mit Diabetes mellitus assoziiert ist, einen Risikofaktor für AD dar [234]. Ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und AD wurde auf die Glycotoxizität und damit einhergehende strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung von Neuronen, intrakranielle Blutungen sowie eine erhöhte A β -Aggregation zurückgeführt [216]. Aber auch oxidativer Stress wird als Verbindung zwischen den beiden Erkrankungen vermutet. Mitochondrien sind ein zentraler Bestandteil des zellulären Energiemetabolismus und sowohl eine Quelle als auch Ziel reaktiver Sauerstoffspezies [272]. Es zeigen sich Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von zellulärem oxidativem Stress, mitochondrialen Anomalien und dem Mangel an antioxidativen Abwehrmechanismen besteht [72]. Die Schädigung von Mitochondrien stellt eine mögliche Folge des mit Diabetes mellitus und AD assoziieren abnormalen Insulinspiegels und Glukosemetabolismus im Hirngewebe dar [343]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer Inhibition der zellulären Energieproduktion und einer Reduktion der Insulin Sekretion und Sensitivität führt [128]. Störungen des Insulin Metabolismus führt wiederum zu einem Energiemangel in Neuronen, was diese

vulnerabler gegenüber oxidativer Schädigung macht, welche wiederum strukturelle Veränderungen an Mitochondrien begünstigen[72].

Aufgrund des Einflusses von oxidativem Stress auf AD ist die Frage nach einer therapeutischen Potenz von Antioxidanzien wie Vitamin E-Derivaten naheliegend. Yatin *et al.* zeigten dahingehend, dass Vitamin E in der Lage ist die durch A β 1-42 hervorgerufene Proteinoxidation sowie die Produktion von ROS und Neurotoxizität in Zellkulturen hippokampaler Neuronen von Rattenembryonen zu verhindern. Dies geschieht vermutlich durch die Entfernung A β -induzierter freier Radikale [467]. Fukui *et al.* untersuchten die kognitive Funktion und Apoptose hippokampaler Zellen in Ratten unterschiedlichen Alters mit oder ohne Vitamin E-Mangel nach 48h oxidativem Stress. Hier zeigte sich eine Reduktion der kognitiven Fähigkeiten der alten und Vitamin E-defizienten jungen Mäuse unabhängig davon, ob diese oxidativem Stress ausgesetzt waren. Eine Supplementation von Vitamin E bei jungen Ratten verhinderte Erinnerungsdefizite und die induzierte Apoptose vom verzögertem Typ. Dies lässt vermuten, dass eine Supplementation von Vitamin E die altersabhängige Schädigung hippokampaler Neurone durch antioxidative Effekte verhindern kann [122]. Eine Studie von Rota *et al.* zeigte jedoch, dass der neuroprotektive Effekt von Vitamin E auch durch dessen Einfluss auf die Expression von Genen, welche in den A β -Katabolismus involviert sind, zurückgeführt werden kann. Männliche Albino-Ratten wurden hierfür über 9 Monate mit einer Standard- oder Vitamin E-defizienten Ernährung gefüttert. Anschließend wurde die Genexpression im Hippocampus der Versuchstiere untersucht. Hier stellte sich ein starker Einfluss von Vitamin E auf die Expression von Genen des A β -Metabolismus wie des Insulin-Wachstumsfaktors I (engl., Insulin growth factor I, IGF-I) dar. Die Expression dieser Gene wurde verdreifacht [358]. Der multifaktorielle Wirkmechanismus von Vitamin E auf die A β -Homöostase fordert die Durchführung detaillierter molekularbiologischer Studien zur Aufschlüsselung des genauen Ablaufs neuroprotektiver und antioxidativer Effekte.

Es ist entscheidend hervorzuheben, dass der oxidative Stress im Rahmen der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung bereits vor der Formation von A β -Plaques stattfindet. In verschiedenen AD-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Lipidoxidation, die einen Hinweis auf das Vorliegen von oxidativem Stress darstellt, der Bildung seniler Plaques vorausgeht [324,348]. Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen erhöhten Markern für oxidativen Stress und einem reduzierten Vitamin E- und Glutathion-Spiegel hergestellt werden [348]. Hieraus ergibt sich die Frage des therapeutischen Potenzials antioxidativer Stoffe wie Vitamin E.

Sowohl auf zellkultureller Ebene als auch in AD-Mausmodellen konnte eine Reduktion A β -induzierter freier Radikale durch Vitamin E gezeigt werden [45,460]. Yamada *et al.* zeigten in ihrer Studie einen protektiven Effekt von α -TP auf einzelne kognitive Fähigkeiten der mit A β behandelten Mäuse. Es ergab sich jedoch kein Unterschied der Lipidoxide in den verschiedenen Gruppen [460]. Ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin E-Serum Spiegel und der kognitiven Leistung wurde in zahlreichen Studien

untersucht [95,242,338]. So konnte ein Zusammenhang zwischen der Gedächtnisleistung im Alter und der Menge an Antioxidantien im Serum gezeigt werden. So zeigten Probanden in einer Studie von Perrig *et al.* welche, 65 Jahre und älter waren und eine hohen Spiegel Ameisensäure und beta-Carotin im Serum hatten, eine bessere Merkfähigkeit [317]. Kryscio *et al.* hingegen zeigten in einer Kohortenstudie mit 7540 Teilnehmern keinen Effekt einer Supplementation der Antioxidantien Vitamin E, Selen oder der Kombination beider [205].

Hinsichtlich klinischer Studien zeigt sich noch keine hinreichende Evidenz für das therapeutische Potenzial von Vitamin E als Antioxidans im Rahmen von AD, obwohl *in vitro* und *in vivo* ein Effekt auf die oxidative Pathogenese der Erkrankung nachvollzogen werden kann.

In Übereinstimmung mit den bisher in der Literatur dargestellten *in vivo* Daten konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass α -TT α -TP in der Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies überlegen ist. Dies gilt sowohl für hROS, bei welchen durch die Behandlung der Zellen mit α -TT eine Reduktion auf 84,9% ($\pm 2,6\%$, $p=0,021$, $n=16$) erzielt werden konnte, während durch α -TP nur eine Abnahme auf 88,3% ($\pm 3,6\%$, $p=0,07$, $n=16$) gezeigt wurde, als auch für H_2O_2 induzierte ROS (α -TP: $9,6\% \pm 3,2\%$; $p = 0,029$, α -TT: $89,1\% \pm 2,3\%$, $p = 0,006$).

α -TP stellt das mit Abstand reichhaltigste Antioxidans des menschlichen Körpers dar. Es ist besonders effektiv als kettenbrechendes Antioxidans, wodurch es Lipidperoxidationen verhindert und somit eine entscheidende Rolle in der Prävention atherogener LDL-Modifikationen spielt [116]. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass α -TP durch Vitamin C nach der Oxidation regeneriert werden kann. Dies geschieht durch Ascorbat und NADH/Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängige Reduktasen [43,166]. Der Nachweis dieses Effekts *in vivo* bleibt kontrovers diskutiert [44,117]. Im Vergleich mit α -TP konnte gezeigt werden, dass α -TT eine höhere Potenz bei der Abwehr oxidativen Stresses durch freie Radikale hat. In einem Phospholipidmembran-Modell konnte gezeigt werden, dass α -TT in Phosphatidylcholin-Liposomen signifikant besser Peroxyl-Radikale einfängt als α -TP. In Hexanen hingegen zeigte sich eine gleiche antioxidative Potenz der beiden Vitamin E-Derivate. Dies lässt vermuten, dass die antioxidative Aktivität von α -TT von einer Membran abhängig ist [412]. In einer späteren Studie wurde hingegen gezeigt, dass TPs im Vergleich mit TTs die gleichen Reaktionen mit Radikalen durchführen und auch dieselbe antioxidative Aktivität in Bezug auf Lipidperoxidation in Lösung und in liposomalen Membranen besitzen [470]. Beim Vergleich TT-reicher-Fraktionen von Palmöl mit α -TP, in Bezug auf durch Kupfer induzierte Oxidation von LDL *in vitro*, zeigten TT-reiche-Fraktionen von Palmöl eine höhere antioxidative Potenz [278]. In einer weiteren Studie konnte bei Behandlung von Erythrozyten mit α -TP und α -TT ein positiver Effekt auf die Deformierbarkeit der Zellen sowie die Membranlipidperoxidation nachgewiesen werden. Auch hier überwog der Effekt von α -TT [22]. Der antioxidative Effekt von TT konnte zudem bei Supplementationsexperimenten mit Ratten sowie Menschen bestätigt werden [287,298].

5.1.2.1.2 Die Wirkung von Vitamin E auf Inflammationsprozesse im Rahmen der Alzheimer Krankheit

Chronische Entzündungsreaktionen tragen maßgeblich zu der Entstehung chronischer Erkrankungen bei [249]. Sie resultieren aus einer übersteigerten Antwort des Immunsystems, die mit der Produktion einer Vielzahl reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie proinflammatorischer Mediatoren einhergeht. Zu diesen Mediatoren gehören z.B. Lipidmediatoren, Prostaglandine [432], Leukotriene [468] und Zytokine. Zu den Zytokinen zählen unter anderem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IL-6 [23] welche die Entzündungsreaktion ihrerseits verstärken und zur Schädigung des entsprechenden Entzündungsgewebes führen.

1990 ergaben große epidemiologische Studien und Beobachtungsstudien einen Zusammenhang zwischen Nicht-steroidalen-Antirheumatika (NSAR), die in der Behandlung von Entzündungserkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Anwendung finden und einem verminderten Risiko an AD zu erkranken [21,36,350,455]. Hierauf folgten Studien, welche anhand von AD-Mausmodellen eine Reduktion der Alzheimer Pathologie durch NSAR zeigten [250]. Klinische Studien konnten jedoch keinen Effekt der Behandlung von Probanden mit NSAR nachweisen [263]. Dennoch kam durch diese Ergebnisse die Erkenntnis, dass Neuroinflammation eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von AD zu spielen scheint. Entzündungsreaktionen des Hirngewebes werden jedoch als eine Folge, der Pathophysiologie des A β - und Tau-Metabolismus angesehen, weniger als Ursache dieser [481]. Grund hierfür ist die Tatsache, dass auch periphere chronisch entzündliche Erkrankungen selten mit einer Entzündungsreaktion beginnen, da diese zunächst durch ein Ereignis hervorgerufen werden muss [355]. Ein entscheidender Anteil der Neuroinflammation ist auf Mikroglia und Makrophagen des Hirngewebes zurückzuführen, welche Entzündungsmediatoren wie Zyto- und Chemokine, freie Radikale und Komplementfaktoren ausschütten. Sie produzieren jedoch ebenfalls Anti-A β -Antikörper und fördern den A β -Katabolismus. Da A β seinerseits wiederum zur Aktivierung von Mikroglia führt, ergibt sich ein Zirkel durch A β -Akkumulation, Mikroglia-Aktivierung und der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, welche wiederum A β -Aggregation und Neuroinflammation fördern [48].

Der Einfluss von Vitamin E auf die Neuroinflammation setzt an unterschiedlichen Stellen dieses Zirkels an. Dies demonstrierten Li *et al.* in einer *in vitro* Studie anhand von Mikroglia welche durch Lipopolysaccharide aktiviert wurden. Nach Aktivierung wurden diese mit differenzierten Neuronen kultiviert, welche daraufhin eine verminderte Lebenszeit aufwiesen. Dieser Effekt konnte durch eine Inkubation der Mikroglia mit Vitamin E vor Aktivierung dieser vermindert werden, was wiederum einen Einfluss von Vitamin E auf den Signalweg der Aktivierung von Mikroglia vermuten lässt [223]. Flanary und Streit wiederum zeigten *in vitro* eine ausgeprägte, induzierende Wirkung von Vitamin E auf die Proliferation von Mikroglia, welcher den Effekt des bekannten Mitogens Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor (engl. macrophage-colony stimulating factor, MCS) übersteigt [110].

Neben den vorwiegend durch Mikroglia ausgeschütteten Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- α , spielen auch Prostaglandine und Leukotriene eine entscheidende Rolle in der inflammatorischen Pathogenese von AD [4]. Während Prostaglandine in allen zellkernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus gebildet werden [69], ist die vorwiegende Quelle von Leukotrienen im Hirngewebe noch unklar [260]. Teilweise werden sie ebenfalls durch Mikroglia produziert [4]. Prostaglandine und Leukotriene werden aus der Arachidonsäure synthetisiert. So entsteht im Rahmen der Oxidation der Arachidonsäure durch COX-1 (Cyclooxygenase-1) und COX-2 (Cyclooxygenase-2) Prostaglandin E₂, welches eine Rolle in der Entstehung von Schmerz und Fieber spielt [432]. Das Zwischenprodukt dieser Synthese ist Prostaglandin H₂ (PGH₂), aus welchem neben Prostaglandin E₂ (PGE₂) auch die Prostaglandine D₂ (PGD₂), F₂ und I₂ gebildet werden [432]. Jiang *et al.* konnten zeigen, dass Vitamin E-Formen verschieden stark in die Synthese von PGE₂ und PGD₂ eingreifen. Dies erfolgt über direkte kompetitive Suppression der COX-2, durch welche PGH₂ gebildet wird, aus denen wiederum PGE₂ und PGD₂ durch die Prostaglandin-Synthase entstehen. Diese Suppression erfolgte abhängig von der Vitamin E-Form mit unterschiedlich starker Potenz. So wirkten δ -TP und γ -TT etwa gleich stark, γ -TP etwas schwächer und α -TP am schwächsten. Dieser Effekt war allerdings nur auf zellulärer Ebene nachweisbar. Eine Wirkung auf isolierte COX-2 konnte nicht gezeigt werden [187].

Auch Wu *et al.* konnten zeigen, dass TT-reiche Anteile von Palmöl die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und PGE₂ innerhalb von mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelten humanen monozytären Zellen inhibieren. Dieser Effekt wurde durch die Suppression der induzierbaren Stickstoffmonooxygenase und COX-2 Expression erreicht. Zudem konnten die Produktionen von Il-4 und Il-8 sowie TNF- α durch die Behandlung mit TT-reichen Anteilen des Palmöls unterdrückt werden [454]. Auch in LPS behandelten peritonealen Makrophagen von Mäusen konnte demonstriert werden, dass TT-reiche Fraktionen die Produktion von Stickstoffmonoxid, PGE₂ und proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , Interferon- γ , Inl-1 β und Il-6, in diesen Zellen inhibieren. Dieser Effekt trägt zur reduzierten Proteinexpression von induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase, COX und NF κ B bei. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die antiinflammatorischen Effekte von TT-reichen Anteilen stärker waren als jene von α -TP und α -Tocopheryl-Acetat [288]. In einer weiteren Studie wurde der antiinflammatorische Effekt von α -TP, TT-reichen Anteilen und den TT-Isomeren, α -, γ - und δ -TT in LPS behandelten RAW 264,7 Mausemakrophagen verglichen. Es zeigte sich, dass TT-reiche Fraktionen und alle drei TT-Isomere Interleukin-6 (IL-6) und die Stickstoffmonoxidproduktion inhibieren. Die Bildung des TNF- α konnte jedoch ausschließlich durch α -TT inhibiert werden. Die Produktion von PGE₂ wurde durch TT-reiche Anteile, α - und δ -TT reduziert. Die Genexpression von COX-2 wurde durch TT-reiche Anteile und die TT-Isomere, jedoch nicht durch α -TP herunterreguliert [459]. Auch durch Wang *et al.* konnte gezeigt werden, dass γ -TT die LPS induzierte Il-6-Produktion in murinen RAW267,4 Makrophagen inhibiert. Dies geschieht durch die Blockade der Aktivierung des NF κ B. Auch die LPS induzierte Hochregulation des CCAAT/Verstärker-bindenden-proteins β (eng. CCAAT/enhancer-binding-proteine β , C/EBP β), welche für die IL-6 Produktion und Expression seines

Zielgens, dem Granulozytenkolonien stimulierenden Faktor, benötigt wird, wird gehemmt [440]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des NF κ B durch γ -TT über die Hochregulation von A20, einem Inhibitor des NF κ B, durch Modulation der in die Entzündungsreaktion involvierten Sphingolipidsynthese abläuft [441].

Auch in *in vivo* Studien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So zeigten Qureshi *et al.*, dass sowohl bei alten als auch jungen Mäusen, welche eine vierwöchige Diät mit δ -TT aus Annatto-Samen (100ppm/2kg Nahrung) erhielten, die LPS induzierte Entzündungsreaktion inhibiert werden konnte. Dieser Effekt konnte auch bei der Kombination der LPS-induzierten Entzündungsreaktion mit INF- γ oder INF- β beobachtet werden. Deutlich wurde dieser Effekt durch die Reduktion der Stickstoffmonoxid und TNF- α -Spiegel in der behandelten Gruppe. Ursache hierfür war die Suppression von genabhängigen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-1 α , IL-1 Rezeptor-Antagonist, IL-6, IL-12, COX-2, TNF- α und weiteren [335]. In einer weiteren *in vivo* Studie wurde der antiinflammatorische Effekt von α -, γ - und δ -TT in LPS behandelten immundefizienten Mäusen verglichen. Alle mit TT behandelten Gruppen zeigten eine dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Synthese, wobei die effektstärkste Gruppe die mit δ -TT behandelte Gruppe war [334].

Neben dem Einfluss auf die Prostaglandinsynthese konnte durch Goetzl *et al.* demonstriert werden, dass TP die Aktivität der Lipoxygenase modulieren und somit die Synthese von Leukotrienen [130], welche ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Entzündungsreaktion spielen [468]. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Leukotrien B4 (LTB4) und Leukotrien C4 (LTC4) in aktivierten Neutrophilen durch verschiedene Vitamin E-Formen über eine Inhibition des zellulären Calcium-Einstroms und der Lipoxygenase-5 gehemmt wird. Hierfür waren unterschiedliche Konzentrationen der Vitamine notwendig, wodurch sich zeigte, dass γ -TP, δ -TP und γ -TT einen starken inhibitorischen Effekt hatten, wohingegen α -TP in höheren Konzentrationen verwendet werden musste, um den gleichen Effekt zu erreichen. In physiologischer Konzentration waren die Vitamin E Formen nicht in der Lage humane, rekombinante Lipoxygenase-5 zu inhibieren [190]. Des Weiteren konnte ausgeführt werden, dass δ -TP und γ -TP die ERK (engl. extracellular-signal regulating kinase, „A23187-stimulierte extrazelluläre Signal regulierende Kinase“) -Phosphorylierung und die Translokation der Lipoxygenase-5 vom Zytosol in den Nukleus inhibierten. Diese Vorgänge stellen entscheidende Schritte in der Aktivierung der Lipoxygenase für die Bildung von LTB4 in Neutrophilen dar [190].

Studien konnten zeigen, dass Vitamin E-Formen LPS-stimuliertes IL-6 in Makrophagen inhibieren. Dabei erwies sich γ -TT am potentesten. Die Inhibition erfolgte durch Suppression der LPS-induzierten Aktivierung von NF κ B und Hochregulierung von C/EBP β und C/EBP δ [440]. Eine Inhibition von NF κ B durch γ -TT konnte auch in entarteten Zellen dargestellt werden [5]. Auch auf Interleukin-13 (IL-13)/STAT6 (engl. signal transducer and activator of transcription, „Signalgeber und Aktivator der Transkription“-stimulierte *Eotaxin-3* wirkte γ -TT inhibierend, über eine Blockade der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und der DNS-Bindung dieser in humanen Lungenepithel

Zellen A549. Eotaxin-3 ist ein entscheidendes Chemokin in der Pathogenese von Asthma bronchiale, da es die Eosinophilie in den Luftwegen induziert [439]. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Vitamin E Formen auf ihre Eigenschaften in einem experimentellen Modell des durch Hausstaubmilben induzierten Asthmas getestet. Hier konnte nachgewiesen werden, dass γ -TT aufgrund seiner antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften einen protektiven Effekt zeigte und damit einen vielversprechenden Kandidaten für therapeutische Optionen darstellt. Dieser Effekt konnte mit der Blockade der nukleären Translokation von NF κ B und der Förderung des nukleären Faktors RF2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) Spiegels durch γ -TP erklärt werden [316]. Der protektive Effekt von γ -TT ist mit dem von Prednisolon, welches einen Teil der etablierten Asthma-Therapie darstellt, vergleichbar. γ -TT setzte zusätzlich jedoch noch die Infiltration von Neutrophilen, und mit diesen einhergehend Zytokinen in die Luftwege herab [182]. Werden all diese Einflüsse von γ -TT auf die Pathogenese des Asthmas bronchiale zusammengenommen, ergibt sich ein hohes therapeutisches Potenzial beispielsweise als Zusatztherapie, zusammen mit Corticosteroiden. Auf Interleukin-10 (IL-10), und antiinflammatorische Zytokine war jedoch kein signifikanter Effekt erkennbar [459]. Auch γ -TP brachte einen positiven Effekt auf entzündliche Krankheiten. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Ratten mit Ovalbumin-induziertem, allergischem Asthma und Rhinitis bei oraler γ -TP Supplementation eine Reduktion der Eosinophilie in der Lunge, Nase und den Sinus aufwiesen. Es setzte zudem inflammatorische Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13 in der bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit und dem Mucus der Atemwege außer Kraft [434].

5.1.2.1.3 Der Einfluss von Vitamin E auf die Cholesterinhomöostase im Rahmen der Alzheimer Krankheit

Neben den oben beschriebenen Qualitäten der Vitamin E-Derivate wie Antioxidation und Entzündungshemmung, werden sie auch mit einer Senkung des Serum Cholesterins in Zusammenhang gebracht [380].

Hypercholesterinämie stellt einen Risikofaktor für chronische Erkrankungen wie AD, die koronare Herzerkrankung und arteriellen Hypertonie dar [311]. Sie führt sowohl zu oxidativem Stress [323] als auch zu Entzündungsreaktionen [408], welche wiederum eine entscheidende Rolle in der Entstehung von AD spielen [4]. Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine ernährungsbedingte Hypercholesterinämie zu einem erhöhten A β -Spiegel des ZNS führt [344]. Somit bilden Cholesterinsenkende Stoffe wie Statine einen therapeutischen Ansatz im Rahmen von AD, welcher in den letzten Jahren in den Fokus der AD-Forschung geriet [393]. Ein Statin, welches die Blut-Hirnschranke überwinden kann, könnte zu einem geringeren Cholesterin-Spiegel im Gehirn führen [230]. Fassbender *et al.* zeigten, dass Meerschweinchen, welche eine mit Simvastatin angereicherte Nahrung erhielten, einen geringeren Serum-Cholesterin-Spiegel hatten, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, welche kein Simvastatin erhielten. Der Cholesterinspiegel des Gehirns blieb jedoch unbeeinflusst. Kulturen muriner hippokampaler Zellen, welche über vier Tage mit 4 μ M Lovastatin oder Simvastatin behandelt wurden,

zeigten hingegen geringere Cholesterin- und A β -Spiegel. Im Vergleich mit unbehandelten Zellen ergab sich eine Reduktion des intrazellulären A β 40 und A β 42 der mit Lovastatin behandelten Zellen auf 50% \pm 13% und 29% \pm 10% [104]. Sparks *et al.* hingegen sprechen sich gegen Statine, die die Blut-Hirn-Schranke überschreiten, aus. Diese Position basiert auf den folgenden drei Hypothesen auf Basis einer doppelt-verblindeten Therapie-Studie mit 120 Alzheimer Patienten: 1. Überschüssiges Cholesterin inhibiert die Cholesterinsynthese und stimuliert dadurch die A β -Freisetzung, 2. A β wirkt zytotoxisch durch die Inhibition der Cholesterinsynthese, 3. die Statin-Wirkung auf neuronaler Ebene könnte Neurodegeneration durch weitere Inhibition der Cholesterinsynthese begünstigen [404]. Meske *et al.* zeigten zudem, dass durch Lovastatin neben der Cholesterinsynthese auch die Synthese von Geranylgeranylphosphaten unterdrückt wird, was wiederum die Phosphorylierung von Tau und schließlich die Apoptose begünstigt. Ursache für diesen Effekt ist vermutlich das verminderte Vorkommen von der Membran-gebundenen-Fraktion der RAS Homolog A (RhoA)-GTPase in Neuronen, was wiederum zu einem verminderten Spiegel an funktioneller kleiner G-Proteine führt [258]. Gegensätzliche Effekte konnten in einer *in vitro* Studie anhand eines zellulären Tau-Modells sowie primärer neuronaler Zellkulturen gezeigt werden. Hier erfolgte durch Pitavastatin eine Reduktion des totalen und phosphorylierten Taus, welche durch das Hinzufügen von Mevalonat und Geranylgeranylphosphat wieder aufgehoben werden konnte. Erklärt wurde dieser Effekt durch die Unterbrechung der Reifung kleiner G Proteine wie RhoA und der Aktivität der Glycogen-Synthase-Kinase 3 β , einer Tau Kinase, durch Pitavastatin [156].

Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Ernährungsformen und Lebensmittelbestandteile auf den Cholesterinspiegel im Rahmen von AD in zahlreichen Studien untersucht [233]. Quershi *et al.* isolierten 1986 eine Struktur aus Gerste, welche *in vitro* als auch *in vivo* einen Cholesterinsenkenenden Effekt aufwies. Im Rahmen einer massenspektrometrischen Analyse konnte diese als α -TP identifiziert werden. Bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus der Cholesterin-Senkung wurde vermutet, dass eine Inhibition der HMG-CoA-Reduktase erfolgt. Diese Vermutung basierte auf der Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität [330]. Die HMG-CoA-Reduktase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese, in welcher Acetat zu Cholesterin umgewandelt wird [40].

Der Cholesterin-senkende Effekt von Vitamin E konnte im Verlauf anhand verschiedener Studienmodelle dargestellt werden. *In vivo* zeigte sich anhand von Kaninchen, welche mit einer cholesterinreichen Nahrung gefüttert wurden eine 50%ige Reduktion des Cholesterinspiegels nach einer Supplementation mit 2100I.E. Vitamin E für acht Wochen [320]. Im Rahmen einer randomisierten doppelt-verblindeten Studie mit 32 Probanden mit Hypercholesterinämie konnte gezeigt werden, dass eine Supplementation von 300mg Tocotrieneol täglich für sechs Monate zu einer Reduktion des gesamten aber auch LDL Serumcholesterins führt [472]. Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen Vitamin E-Derivate, welche wie in 5.1.1.1 dargestellt bezüglich ihrer Eigenschaften und Wirkungen

variieren, konnte anhand einer Bestimmung der Inhibitionsaktivität der HMG-CoA-Reduktase festgestellt werden. In Rattenhepatozyten und kultivierten HepG2 Zellen, einer Zelllinie aus vom hepatozellulären Karzinom betroffenen Lebergewebe, wies γ -TT im Vergleich mit α -TT eine 30-fach höhere Aktivität bezüglich der Inhibition der Cholesterin-Biosynthese auf [314,315]. Song und DeBose-Boyd *et al.* untersuchten in einer Studie ob γ - und δ -TT die Anforderungen der Sterol oder Nicht-Sterol HMG-CoA Reduktase-Degradation erfüllen. Hierfür wurden Zellen mit Sterol-Mangel entweder mit 25-Hydroxycholesterin, γ -TT und δ -TT oder mit diesen Substanzen in Kombination mit 10mM Mevalonat behandelt. Ohne Mevalonat zeigten alle Substanzen einen Anstieg der Degradation der Reduktase. Mevalonat allein ergab jedoch keinen Effekt. In Kombination von Mevalonat mit den entsprechenden Substanzen stellte sich eine Beschleunigung der Degradation der Reduktase dar. Im Gegensatz hierzu zeigte α -TT keinen Effekt auf die Reduktase-Degradation unabhängig von dem Zusatz von Mevalonat [401].

Auch Teoh *et al.* demonstrierten in ihrer Studie einen positiven Effekt von Vitamin E-Derivaten auf den Lipidhaushalt. Hierfür wurden Kaninchen für 12 Wochen mit Cholesterin und Kokosnussöl angereichertem Futter ernährt und erhielten zusätzlich, abgesehen von der Kontrollgruppe, TP (50mg/d) oder TT (50mg/d). Bereits nach 10 Tagen konnte innerhalb der Vitamin E-Gruppen verzeichnet werden, dass ein protektiver Effekt auf die Bildung atheromatöser Plaques in der Aorta der Kaninchen bestand. Zudem zeigte sich ein reduzierter Anstieg des LDL und Cholesterins im Serum der Kaninchen. TT zeichnete sich hierbei durch einen signifikant stärkeren Effekt in der Suppression eines Cholesterinspiegel-Anstiegs im Vergleich mit TP aus. γ -TT erzeugt eine 30-fach größere Aktivität als Inhibitor der Cholesterin-Biosynthese im Vergleich mit α -TT [417].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass sowohl α -TT als auch α -TP zu einer Reduktion des Gesamt- als auch des freien Cholesterins in SH-SY5Y WT Zellen führen. Hierbei zeigte sich im Fall von α -TT eine stärkere Reduktion des Gesamtcholesterins als des freien Cholesterins. Dies lässt vermuten, dass der Cholesterin-senkende Effekt dieses Vitamin E-Derivats im Zusammenhang mit verestertem Cholesterin steht. Cholesterinester stellen die Speicherform von überschüssigem Cholesterin dar. Sie sind in den meisten Geweben nur in geringer Menge vorhanden und liegen in Form von zytoplasmatischen Lipidtropfen vor. 24-Hydroxycholesterin kommt insbesondere im Hirngewebe vor. Seine Synthese wird als Möglichkeit der Entfernung von überschüssigem Cholesterin aus Neuronen vermutet [28]. Es konnte gezeigt werden, dass der 24-Hydroxycholesterin Spiegel bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen reduziert ist [13]. Berussi *et al.* zeigten darüber hinaus, dass auch 24-Hydroxycholesterinester vermindert im Blut und Liquor von AD-Patienten vorkommen. Anhand von Kaplan-Meier-Kurven konnte zudem gezeigt werden, dass die Zeit bis zum Auftreten der Erkrankung bei AD-Patienten und MCI-Patienten, welche zu AD-Patienten konvertieren vom 24-Hydroxycholesterinester-Spiegel abhängig war. Hierdurch werden Cholesterinester zu möglichen Biomarkern im Rahmen von AD [24]. Eine Studie, in welcher der Anteil von Cholesterinestern in den Hautfibroblasten von AD-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht wurde, zeigte ein erhöhtes

Vorkommen dieser in an AD erkrankten Probanden. Dies zeigt zum einen, dass die Veränderungen der Cholesterinhomöostase im Rahmen von AD über das zentrale Nervensystem hinaus gehen [310]. Des Weiteren lässt sich vermuten, dass bei einem reduzierten Vorkommen der Cholesterinester extrazellulär und einem erhöhten Vorkommen intrazellulär eine Umverteilung dieser im Rahmen der Pathogenese von AD eine Rolle spielt. Inwieweit die Reduktion insbesondere von Cholesterinestern durch α -TT einen protektiven Effekt oder eine Wirkung auf die Erkrankung oder eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufs hervorruft, lässt sich anhand der aktuellen Studienlage nicht sagen.

Neben den direkten Effekten der Vitamin E-Derivate auf die Lipidhomöostase, welche zeitnah nachzuweisen sind, spielen auch indirekte Effekte, wie die Beeinflussung der Transkription von Genen, welche den Lipidhaushalt regulieren, eine entscheidende Rolle. In einer Studie, in der Hepatozyten mit 100 μ M α -TP behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass dieses einen Effekt auf die Expression multipler Gene aufweist. Darunter solche, die Schlüsselenzyme der de novo Cholesterin-Biosynthese kodieren. Dieser Effekt wurde durch die Abschwächung der post-translationalen Prozessierung des Transkriptionsfaktors SREBP-2 erreicht, was wiederum zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität der Sterol-responsiven Elemente der Promotor Regionen der Zielgene führt. Um zu determinieren, ob der Effekt von α -TP auf einer Inhibition der Transkription oder einer Degradation der mRNA beruht, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D behandelt. Es zeigte sich, in diesem Fall kein Effekt auf die Transkripte, woraus sich schließen lässt, dass α -TP die mRNA Spiegel der Cholesterinhomöostase-Gene durch eine Inhibition der Transkription beeinflusst [430].

Bezüglich des Cholesterin-senkenden Effekts der Vitamin E-Derivate auf den Menschen ist die aktuelle Literatur nicht eindeutig. So zeigten Qureshi *et al.* anhand einer doppelt-verblindeten, gekreuzten Studie einen signifikanten Effekt von TT auf die Serumlipide der Testpersonen. In dieser erhielten Testpersonen über acht Wochen 200mg Palmvitee eine TT-reiche Fraktion von Palmöl oder 300mg Kornöl täglich. Bereits in den ersten vier Wochen konnte in der TT-Gruppe eine signifikante Reduktion des totalen Cholesterins (-15%), LDL Cholesterins (-8%), Apo B (-10%), Thromboxan (-25%), Plättchenfaktor 4 (-16%) und Glucose (-12%) im Serum nachgewiesen werden. Bei drei Probanden der Studie konnte keine signifikante Reduktion des Cholesterins durch Palmvitee erzielt werden. Diese drei Probanden, sowie vier weitere Probanden mit einem initialen Cholesterinspiegel $>7,84$ mmol/L wurden mit 200mg reinem γ -TT täglich, welches aus Palmöl gewonnen wurde, behandelt. Nach vier Wochen zeigte sich eine signifikante Reduktion des LDL-Cholesterins. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass γ -TT den potentesten Inhibitor der Cholesterin-Biosynthese im Rahmen der Palmvitee Kapseln bildet [331]. Eine über den Verlauf von zwei Jahren erhobene Studie von Kooyenga *et al.*, in welcher 50 Probanden 300mg Kapseln mit entweder 16mg α -TP, 40mg γ - und α -TT und 240mg Palm Superolein oder nur 300mg Palm Superolein als Placebo erhielten, zeigte sich wiederum keine signifikante

Reduktion des Serum Cholesterins, LDL Cholesterins und der Triglyceride [203]. Für eine fundierte Aussage bezüglich des therapeutischen Effekts von Vitamin E-Derivaten auf den humanen Lipidhaushalt sind weitere Studien mit umfassenderen Probanden-Zahlen notwendig. Generell weisen Ernährungs-Studien eine große Breite möglicher Störfaktoren auf, weshalb eine strenge einheitliche Diät sowie die Verabreichung der Vitamin E-Derivate möglichst ohne Trägerstoffe gewährleistet sein sollte. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich aufgrund der inkohärenten Studienlage keine eindeutige Aussage zur Wirkung von Vitamin E-Derivaten auf den humanen Lipidhaushalt machen.

5.1.2.2 Der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung

Während zu der antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkung von Vitamin E im Rahmen der Pathogenese von AD bereits zahlreiche Studien existieren, ist der Einfluss von Vitamin E auf die amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung von APP noch gering untersucht. Auch aus diesem Grund steht die Untersuchung des Effekts von α -TP und α -TT auf den A β -Anabolismus im Fokus dieser Arbeit.

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften liegt Vitamin E zu kleinem Anteil in Zellmembranen vor, wo es vorwiegend durch seine antioxidativen Eigenschaften die mehrfach ungesättigten Membranlipide vor freien Radikalen schützt. Zudem stabilisiert es die Membran indem es Komplexe mit Produkten der Membranlipidhydrolyse wie Lysophospholipiden und freien Fettsäuren bildet [438]. Wie bereits in 2.2.1 erläutert, stellt eine Besonderheit der amyloidogenen Prozessierung von APP der Ablauf des Prozesses an der Zellmembran und insbesondere der innerhalb der Membran erfolgende Schnitt der γ -Sekretase dar. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die Lipid-Zusammensetzung der umgebenden Membran eine entscheidende Rolle in der Prozessierung von APP spielt [137,139,140,479]. Die Hypothese des Einflusses von Vitamin E auf die Prozessierung von APP ist daher naheliegend. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Vitamin E Expressionsmuster unterschiedlicher Proteine im Hirngewebe beeinflusst [358,360]. Somit stellt sich auch die Frage einer möglichen Beeinflussung der Expression von Genen, welche im Rahmen der APP-Prozessierung eine Rolle spielen.

Grimm *et al.* untersuchten in einer *in vitro* Studie den Effekt von α -, γ - und δ -TP auf die Synthese und die Degradation von A β in SH-SY5Y Zellen. Bei der Bestimmung des Gesamt-A β von SH-SY5Y APP Zellen nach einer Inkubation mit 10 μ M der entsprechenden Vitamin E-Derivate ergab sich eine signifikante Erhöhung des Gesamt-A β durch alle Derivate. Diese Ergebnisse suggerierten einen möglichen, nachteiligen Effekt der Vitamin E-Supplementation im Rahmen von AD [143]. Arrozi *et al.* hingegen zeigten eine Reduktion der A β 42 Konzentration in SH-SY5Y APP SWE Zellen durch α - und γ -TP [307]. Während durch den von Grimm *et al.* verwendeten W02-Antikörper die Aminosäuren vier bis zehn von A β und somit nicht nur A β 42 erkannt wird, kann eine unterschiedliche Wirkung von Vitamin E-Derivaten auf die Freisetzung von A β Peptiden mit variablem C-Terminus verschiedener A β -Formen diskutiert werden. Zur genaueren Analyse der gesteigerten Gesamt-A β -Synthese erfolgte durch Grimm *et al.* zudem die Untersuchung des Effekts von α -, γ - und δ -TP auf das Gesamt-A β aus SH-

SY5Y C99 Zellen und auf die γ -Sekretase-Aktivität in lebenden SH-SY5Y WT Zellen. Hier ergaben sich ein jeweils signifikanter Effekt durch γ - und δ -TP sowohl auf die Steigerung des Gesamt-A β als auch auf die Sekretase-Aktivität, wohingegen der Effekt von α -TP deutlich geringer ausfiel. Zur Analyse eines direkten Effekts der Vitamin E-Derivate auf die γ -Sekretase erfolgte zudem die Untersuchung der Sekretaseaktivität in post-nukleären Fraktionen. Hier ergab sich kein Effekt der TP, was vermuten lässt, dass der Einfluss auf die Sekretaseaktivität von zellulären Prozessen abhängt, welche das Vorliegen intakter, lebender Zellen voraussetzen. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich in der Analyse der beta-Sekretaseaktivität. Hier zeigten γ - und δ -TP im Gegensatz zu α -TP einen signifikanten Effekt auf eine gesteigerte sAPP β -Freisetzung in SH-SY5Y APP Zellen sowie auf die β -Sekretaseaktivität in lebenden SH-SY5Y WT Zellen. Auch hier war kein direkter Effekt der Vitamin E-Derivate auf die β -Sekretaseaktivität in post-nukleären Fraktionen feststellbar. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Genexpression der γ -Sekretase erfolgte die Bestimmung von Presenilin 1, welches einen Teil des aktiven Zentrums der γ -Sekretase bildet [167]. Hier kam es zu einer signifikanten Steigerung des Proteinspiegels nach der Inkubation mit α -TP, nicht jedoch im Fall von γ - und δ -TP. Auch die Genexpression von BACE1, dem Protein welches der β -Sekretase im Hirngewebe entspricht [47], wurde unter dem Einfluss der TP-gesteigert, wenn auch kein signifikanter Effekt erreicht wurde [143]. Gaedicke *et al.* wiesen in einer *in vivo* Studie hingegen keinen Einfluss von Vitamin E auf die Genexpression von BACE 1, ADAM-10 und anderen Proteinen der A β -Synthese nach [124]. Da es sich hier jedoch nicht um ein AD Mausmodell handelte, lässt sich vermuten, dass ein Einfluss der E Vitamine auf Genexpressionsebene erst bei einer gesteigerten A β -Synthese deutlich wird.

Die Ergebnisse von Grimm *et al.* haben maßgeblich diese Arbeit inspiriert, da das Vorliegen eines nachteiligen Effekts durch Vitamin E-Derivate auf die Pathogenese von AD von großer Relevanz gerade im Hinblick auf therapeutische Ansätze durch Supplementation ist. Insbesondere das häufig in Rahmen dessen eingesetzte α -TP [81] ist aufgrund dessen und der in 5.1.1 erläuterten Gründe von großem Interesse. Auch in dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass sowohl α -TP, als auch α -TT neben ihren positiven antiinflammatorischen und antioxidativen Effekten auch nachteilige Mechanismen im Rahmen der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP bewirken. So konnte auch hier eine Steigerung des Gesamt-A β nach Inkubation von SH-SY5Y APP Zellen durch die Vitamin E-Derivate gezeigt werden (α -TP 114,7% \pm 3,2%, $p \leq 0,01$, $n=16$; α -TT 116,7% \pm 3,1%, $p \leq 0,001$, $n=16$). Wie bereits erläutert, lässt sich dieser Effekt durch die generell gesteigerte Synthese von APP₆₉₅ in SH-SY5Y APP Zellen begründen, welche möglicherweise durch eine ebenfalls gesteigerte A β -Degradation kompensiert wird. Diese Vermutung wird durch den deutlich ausgeprägteren Effekt auf das Gesamt-A β in SH-SY5Y WR Zellen bestärkt. Auch wenn eine Steigerung auf 114,7% bzw. 116,7% nicht gravierend erscheinen mag, sollte berücksichtigt werden, dass aufgrund der langen präklinischen Phase von AD bereits eine geringe Steigerung der A β -Freisetzung zu einem früheren Beginn der Erkrankungssymptomatik führen kann [88]. Um den Einfluss von α -TP und α -TT in einem Zellsystem mit physiologischem A β -Metabolismus zu untersuchen, erfolgte die Inkubation auf SH-SY5Y WT

Zellen. Aufgrund des prägnanten Effekts im SH-SY5Y APP-Zell-Modell erfolgte dies mit α -TT. Es zeigte sich ein noch deutlicherer Effekt auf die Synthese von A β ($146,7\% \pm 2,3\%$, $p \leq 0,001$, $n=4$). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass aufgrund des erhöhten A β -Vorkommens in SH-SY5Y APP Zellen auch die A β -Degradation geseigert verläuft und somit eine Steigerung der A β -Synthese schneller ausgleichen kann. Möglicherweise kommt es bei langfristig erhöhtem A β -Vorkommen zu einer Steigerung des A β -Katabolismus, was die Diskrepanz zu den von Arrozi *et al.* gezeigten Ergebnissen erklären würde. Hier wurden die Mäuse über sechs Monate mit einer Vitamin E-reichen Ernährung gefüttert [307], was einen deutlich längeren Supplementationszeitraum darstellt. Paul *et al.* konnten zeigen, dass katalytische Antikörper, welche die Degradation von A β katalysieren, vermehrt bei Patienten, die an AD leiden, vorhanden sind [313]. Auch Neprilysin und das IDE, welche eine entscheidende Rolle im A β -Katabolismus spielen, sind im Hirngewebe von AD-Patienten, in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung erhöht [268].

Zur weiteren Aufschlüsselung des Einflusses von α -TP und α -TT auf den A β -Anabolismus erfolgte in dieser Arbeit die fluorometrische Bestimmung der β - und γ -Sekretaseaktivität in lebenden SH-SY5Y WT Zellen. Durch den Schnitt der β -Sekretase wird die proteolytische Freisetzung von A β aus APP initiiert. Sowohl unter dem Einfluss von α -TP, als auch α -TT zeigte sich eine Steigerung der β -Sekretaseaktivität (α -TT: $117,5\% \pm 3,9\%$, $p < 0,001$, $n = 21$, α -TP: $121,8\% \pm 2,4\%$, $p < 0,001$, $n = 21$). Gleiches gilt für die Aktivität der γ -Sekretase. Auch hier ergibt sich eine Steigerung unter dem Einfluss der Vitamin E-Derivate (α -TT: $130,8\% \pm 4,6\%$, $p < 0,001$, $n = 20$, α -TP: $133,0\% \pm 2,2\%$, $p < 0,001$, $n = 20$). Da im Rahmen der Sekretaseaktivitätsbestimmung in lebenden Zellen sowohl direkte Effekte, als auch Auswirkungen auf die Genexpression oder zelluläre Mechanismen ursächlich für Veränderungen sein können erfolgte, zudem die Bestimmung der Sekretaseaktivität in post-nukleären Fraktionen. Auch hier erfolgt eine Steigerung der β -Sekretaseaktivität durch α -TP und α -TT (α -TT: $116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,007$, $n = 6$; α -TP: $116,3\% \pm 3,3\%$, $p = 0,008$, $n = 6$), sowie der γ -Sekretaseaktivität (α -TT: $118,3\% \pm 4,5\%$, $p = 0,02$, $n = 6$; α -TP: $122,6\% \pm 5,1\%$, $p = 0,008$, $n = 6$). Diese Ergebnisse suggerieren einen möglichen direkten Effekt der Vitamin E-Derivate auf die Sekretasen. Neben den oben beschriebenen Ergebnissen von Grimm *et al.* finden sich in der aktuellen Literatur nahezu keine Studien zum direkten Einfluss von Vitamin E-Derivaten auf die Aktivität der Sekretasen des A β -Anabolismus, was den Ergebnissen dieser Arbeit zusammen mit derjenigen von Grimm *et al.* noch mehr Bedeutung beimisst. Zur Verifizierung der Ergebnisse der fluorometrischen Sekretaseaktivitätsbestimmung erfolgte zudem die Bestimmung des Gesamt-A β aus SH-SY5Y- β -CTF Zellen, deren Medium-A β ausschließlich auf den Schnitt der γ -Sekretase zurückzuführen ist, da die Zelllinie nur die letzten 99 C-terminalen Aminosäuren von humanem APP₆₉₅ (β -CTF) exprimiert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Gesamt-A β von SH-SY5Y- β -CTF Zellen durch die Vitamin E-Derivate (α -TT: $133,6\% \pm 2,8\%$, $p \leq 0,001$, $n = 12$; α -TP: $114,7\% \pm 3,1\%$, $p \leq 0,05$, $n = 15$). Auch für die β -Sekretase konnten die fluorometrischen Ergebnisse anhand einer Western Blot Analyse von sAPP β bestätigt werden. Es konnte eine Erhöhung des sAPP β -Spiegels durch die Vitamin E-Derivate (α -TP $108,8\% \pm 3,4\%$, $p = 0,06$, $n =$

10; α -TT: $136,8\% \pm 3,3\%$, $p = 0,004$, $n = 3$) verzeichnet werden.

Im Gegensatz zum direkten Effekt von Vitamin E auf die Sekretasen der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung gibt es in Bezug auf den Einfluss von Vitamin E auf transkriptioneller Ebene bereits mehrere Studien. Dennoch ist die Aussage der bestehenden Daten heterogen. Während Gaedicke *et al.* keinen Einfluss von Vitamin E auf die Expression von Enzymen der APP-Prozessierung nachwies [124], ergab eine transkriptionelle Studie durch Gugliandolo *et al.* Evidenz für eine Hochregulation von Genen der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP und Runterregulierung von Genen der amyloidogenen Prozessierung [147].

Um die Auswirkung von Vitamin E auf die Genexpressionsebene weiter zu untersuchen, erfolgte in dieser Arbeit die Analyse der Genexpression in SH-SY5Y WT Zellen, welche zuvor mit α -TP und α -TT inkubiert worden waren. Hier stellten sich im Rahmen der Inkubation mit α -TT keine signifikanten Unterschiede der Expression von *BACE1* im Vergleich zum Haushaltsgen *Aktin β* dar. Auch die Gene des γ -Sekretasekomplexes blieben mit Ausnahme von *APH1b* ($85,2\% \pm 3,4\%$, $p \leq 0,001$, $n = 9$) dessen Expression signifikant reduziert wurde, weitgehend unbeeinflusst. Für α -TP zeigten sich ähnliche Ergebnisse für Gene des γ -Sekretasekomplexes. *APH1b* blieb hier jedoch unbeeinflusst. Für *BACE 1* war eine signifikante Reduktion der Expression ($83,4\% \pm 5,4\%$, $p = 0,007$, $n = 8$) erkennbar.

5.1.2.3 Der Einfluss von Vitamin E auf die A β -Degradation

Die Pathogenese von AD hinsichtlich des vermehrten Vorkommens von A β wird zum einen durch eine verstärkte Synthese des Proteins erklärt, aber auch ein verminderter Abbau trägt zur Akkumulation der A β -Proteine bei. Anhand eines AD-Mausmodells untersuchten Nishida *et al.* die Mechanismen der A β -Akkumulation. Die α -TP Transfer Protein APP sw doppel-knockout Mäuse wiesen eine gesteigerte A β -Deposition im Hirngewebe auf, welche durch α -TP Supplementation reduziert wurde. Hinsichtlich des Einflusses der Vitamin E-Defizienz auf die A β -Degradation blieb Nepriylsin unbeeinflusst. IDE hingegen, welches einen Großteil der A β -Degradation übernimmt, zeigte sich reduziert. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf die erhöhte Lipidperoxidation aufgrund des α -TP-Mangels, welche wiederum die A β -Beseitigung beeinflusst [290].

Um die Reduktion von IDE in α -TP Transfer Protein APP sw doppel-knockout Mäusen zu untersuchen, führten Yui *et al.* eine DNS Mikroarray Analyse durch. Hier stellten sich deutliche Unterschiede der Expression von Phospholipase A2 dar. Darüber hinaus fand sich die Expression von Phospholipase A2 in humanen Astrozyten von AD-Patienten erhöht, im Vergleich mit Kontrollzellen. Diese Ergebnisse suggerieren eine entscheidende Rolle der Phospholipase A2 im Rahmen der IDE-Reduktion und somit der Initiation und Progression von AD [473].

Dennoch steht die bisherige Literatur zum Einfluss von Vitamin E auf die A β -Degradation im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. Hier zeigte sich eine verminderte A β -Degradation als

Resultat einer Inkubation von N2a Zellen mit α -TP und α -TT (α -TP: $77,6\% \pm 2,5\%$, $p = 0,001$, $n = 6$; α -TT: $82,1\% \pm 3,7\%$, $p = 0,003$, $n = 6$). Unter gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit dem IDE-Inhibitor Insulin und α -TT war die Degradation nicht beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass IDE im Rahmen des Effekts der Vitamin E-Derivate auf die A β -Degradation eine entscheidende Rolle zukommt.

5.1.2.4 *Vitamin E in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen*

Hinsichtlich der entscheidenden Rolle von oxidativem Stress, chronischen Entzündungen und Hypercholesterinämie in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen stellt Vitamin E aufgrund seiner biologischen Eigenschaften ein naheliegendes, vielversprechendes Therapeutikum dar. Epidemiologische Studien mit Patienten im Alter von 65 Jahren und älter zeigten eine Reduktion der Inzidenz von AD bei hoher Aufnahme von Vitamin E über die Ernährung. Dieser Effekt ist besonders deutlich beim Konsum verschiedener Vitamin E-Derivate in Kombination [274]. Bei Patienten mit MCI oder AD hingegen folgt bei einer Supplementation vom α -TP keine Verbesserung der kognitiven Funktion oder Milderung der Krankheitsprogression [103]. Im Vergleich mit Donepezil, welches in der aktuellen klinischen Therapie von AD verwendet wird, kam es durch die Einnahme von 20.000IU Vitamin E täglich zu keinem Effekt bei Patienten mit MCI, während Donepezil mit einer Reduktion der Progression der AD in den ersten 12 Behandlungsmonaten assoziiert war [318]. Grund für die Inkohärenz der Ergebnisse von epidemiologischen und interventionellen Studien könnten genetische Varianten mit Auswirkung auf den Vitamin E-Metabolismus sein. Zur Evaluation dieser Hypothese sind weitere Interventionsstudien mit vorheriger Festlegung des genetischen Profils der Probanden notwendig.

Bei Morbus Parkinson (engl. Parkinson's disease, PD) ergab sich ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen Vitamin E-Aufnahme über die Ernährung und der Inzidenz von Morbus Parkinson. Dieser Zusammenhang ergibt sich unabhängig von Alter und Geschlecht [373]. In einer doppelt-verblindeten Placebo-kontrollierten Studie mit 60 Patienten mit Morbus Parkinson führte die tägliche Gabe von 1000mg Omega-3-Fettsäuren und 400IU Vitamin E zu einer Verbesserung der Symptomatik im Rahmen der einheitlichen Morbus Parkinson Bewertungs-Scala (engl. Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS), der totalen antioxidativen Kapazität und Glutathion-Konzentration im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion des hoch-sensitiven C-reaktiven Proteins (CRP) sowie Biomarkern des Insulinmetabolismus [414]. In einer weiteren Placebo-kontrollierte Studie wurden Patienten mit frühem PD mit 10mg/d Depernyl und/oder 2000IU/d TP behandelt. Primärer Endpunkt war die Dauer bis zur Notwendigkeit einer Behandlung der Patienten mit Levodopa. Im Gegensatz zu Depernyl ergab TP dahingehend keinen Effekt [482]. Im Rahmen einer weiteren Interventionsstudie, in welcher α -TP in Kombination mit Ascorbat verabreicht wurde, verlängerte sich die Zeit bis zu Notwendigkeit einer Levodopa-Therapie um 2,5 Jahre [100]. Unabhängig von diesen Studienergebnissen ist Vitamin E bisher kein Bestandteil der PD Therapie.

Bezüglich Vitamin E im Kontext weiterer neurodegenerativer Erkrankungen besteht eine begrenzte Literaturlage. Im Rahmen der Pathogenese des Morbus Huntington (engl. Huntington's disease, HD) wird vermutet, dass eine starke Aktivierung von Glutamat-gesteuerten Ionen-Kanälen zum Zelltod durch oxidativen Stress führt. Die Untersuchung von Vitamin E als mögliches Therapeutikum aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften scheint daher naheliegend [319]. Eine Behandlung von 73 HD Patienten mit hohen Dosen von α -TP zeigte selektive positive Effekte bezüglich der neurologischen Symptomatik der Patienten [319].

Auch hinsichtlich der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) erfolgten bereits Studien mit Vitamin E Supplementation. Im ALS-Mausmodell konnte eine Besserung des Beginns sowie Progresses der Erkrankung unter Vitamin E Supplementation nachgewiesen werden [150]. In einer doppelverblindeten, Placebo-kontrollierten Studie mit 289 ALS Patienten, welche weniger als fünf Jahre an der Erkrankung litten, ergab sich aus der Supplementation von α -TP kein Effekt auf den Abbau der Funktionen, welche durch die Norris-Glieder-Skala überprüft wurden. Es zeigte sich jedoch eine verminderte Progression vom Stadium A der Erkrankung zu dem schwereren Stadium B der ALS Gesundheitsstand-Skala [77]. In einer weiteren Studie wurde α -TP als Zusatztherapie zu Riluzol untersucht, jedoch konnten hier keine Effekte hinsichtlich Überlebensrate, Zeit bis zum Tod, Tracheostomie oder Beatmungspflicht erzielt werden [136].

5.1.2.4.1 α -TP, α -TT in der Therapie und Diagnostik der Alzheimer Erkrankung

In zahlreichen Studien konnte dargestellt werden, dass ein erhöhter Plasmaspiegel von TP- und TT-Derivaten mit einem reduzierten Risiko kognitiver Einschränkungen assoziiert sind. Dieser Effekt wird auf die Cholesterin-senkenden Eigenschaften der Vitamin E-Derivate zurückgeführt [244], aber auch auf ihre antioxidativen [95] und anti-inflammatorischen Effekte [42]. Auch in der Diagnostik der AD ist dieser Zusammenhang entscheidend. So konnte gezeigt werden, dass bei der Evaluation von Atrophie-Mustern in MRT-Bildern und zusätzlicher Untersuchung des Serum-Spiegels verschiedener Vitamin E Derivate zur Differenzierung zwischen Patienten mit MCI oder AD zur gesunden Kontrolle eine signifikante Genauigkeit bei der Diagnose AD erzielt werden konnte [245]. In einer prospektiven Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Probanden mit einem TP-, TT- oder Vitamin E-Spiegel oberhalb des höchsten Terzils ein reduziertes Risiko hatten an AD zu erkranken, im Vergleich mit Probanden deren Plasmaspiegel sich im niedrigsten Terzil befand. Bei Betrachtung der einzelnen Vitamin E-Derivate in diesem Zusammenhang hatte besonders β -TP einen protektiven Effekt, wohingegen α -TP, α -TT und β -TT einen nur geringfügigen Effekt zeigten [242]. In Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Probanden mit AD oder MCI niedrigere TP-, TT- und Vitamin E-Plasmaspiegel aufwiesen im Vergleich mit gesunden Probanden [243].

Inwieweit α -TP allein protektive Auswirkungen auf die Inzidenz von AD hat, zeigte sich in einer Studie von Morris *et al.* Es wurde untersucht wie sich die Aufnahme von Vitamin E, also allen acht Vitamin E-Formen oder einzelnen TP, auf das Risiko an AD zu erkranken, auswirkt. Es war in allen Fällen eine

inverse Assoziation zwischen einer erhöhten Vitamin E-Aufnahme und der Inzidenz von AD erkennbar. Dennoch besteht ein größerer Vorteil von der Aufnahme verschiedener Vitamin E-Derivate, als ausschließlich α -TP [274]. Als Ursache für diesen Effekt lassen sich die unterschiedlichen biologischen Effekte der verschiedenen Vitamin E-Formen diskutieren. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht eine weitere prospektive Kohortenstudie, welche ebenfalls einen inversen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Vitamin E Aufnahme über die Ernährung und der Inzidenz von AD festgestellt hatte. Hier hatte sich jedoch zudem gezeigt, dass dieser Zusammenhang bei der Verwendung von Vitamin E in Form von Nahrungsergänzungsmitteln fehlte. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Erhebung des Essverhaltens anhand eines Fragebogens stattfand. So gaben zu Beginn der Studie 8,7% der Teilnehmer an Vitamin E Nahrungsergänzungsmittel zu sich zu nehmen. Drei Jahre später waren es 17,4%. Somit ist nicht auszuschließen, dass der ausbleibende Effekt im Zusammenhang mit einer zu kurzen oder inkonsequenten Einnahme der Nahrungsergänzungsmittel steht [273]. Zudem könnte sich aber auch vermuten lassen, dass der ausbleibende Effekt der Vitamin E Nahrungsergänzungsmittel auf die Inzidenz von AD darin begründet ist, dass der singuläre Effekt von α -TP auf die Protektion von AD weniger ausgeprägt ist als der mehrerer TPs in Kombination. Vitamin E Nahrungsergänzungsmittel bestehen jedoch meist hauptsächlich aus α -TP [274]. Eine Supplementation mit α -TP zeigte keine Prävention der Demenzprogression und auch keine Verbesserung der kognitiven Funktion bei Patienten mit MCI oder Demenz im Rahmen von AD [103]. Die fehlende Wirkung von α -TP auf den Verlauf von AD wurde in weiteren Studien zudem durch die Wirkung von diesem auf die Bioverfügbarkeit anderer protektiv wirkender TPs erklärt. So ergab eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie eine Reduktion des Serum- γ -TP-Spiegels bei den Teilnehmern, welche über zwei Monate eine Supplementation mit RRR- α -Tocopheryl Acetat (400IU/d) erhalten hatten [172]. Neben den kontroversen Ergebnissen zum protektiven Effekt von Vitamin E-Derivaten auf AD wurden zudem negative Auswirkungen einer hohen Vitamin E-Supplementation nachgewiesen. So zeigte eine Metaanalyse, die den dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Vitamin E und der totalen Mortalität untersuchte, dass eine Vitamin E-Supplementation von größer, gleich 400IU pro Tag eine Erhöhung der Gesamtsterblichkeit begünstigt und aus diesem Grund vermieden werden sollte [266].

5.2 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten die in der Literatur diskutierten, cholesterinsenkenden und antioxidativen Eigenschaften von α -TP und α -TT bestätigt werden. Da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Cholesterin-Depletion mit einem positiven Effekt auf die A β -Produktion, einer verminderten Bildung von A β , einhergeht, wären ähnliche Ergebnisse bei der durch α -TP und α -TT induzierten Cholesterinsenkung zu erwarten [104,137,394]. Entgegen dieser Erwartung war eine Erhöhung des A β -Spiegels in APP₆₉₅ transfizierten SH-SY5Y Zellen, die mit α -TP oder α -TT inkubiert wurden, zu sehen. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass die Vitamin E-Derivate neben ihrem Effekt auf den Cholesterin-Spiegel einen direkten Effekt auf die Aktivität der Sekretasen, welche durch die proteolytische Prozessierung von APP das A β -Protein freisetzen, aufweisen. Eine Untersuchung der Gentranskription und Proteinspiegel von BACE1 sowie Komponenten des γ -Sekretase Komplexes zeigte jedoch keine Veränderungen. In der vorliegenden Arbeit erwies sich der direkte Effekt auf die Sekretasen mutmaßlich stärker ausgeprägt als die protektive Cholesterin-senkende Wirkung. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter anderen experimentellen Bedingungen der Effekt auf Cholesterin stärker im Vordergrund steht (Abbildung 34).

Neben dem direkten Effekt auf die Aktivität der Sekretasen wiesen α -TP und α -TT zudem eine Wirkung auf die Degradation von A β auf. Diese wurde reduziert, was wiederum in einem erhöhten A β -Spiegel resultierte. Der ungünstige Effekt von Vitamin E-Derivaten auf die Sekretasen der amyloidogenen Prozessierung sowie der Degradation von A β wurde bereits in vorherigen Studien gezeigt. Hier stellte sich δ -TP als das TP mit der stärksten Wirkung auf die A β -Produktion heraus [143].

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungseffekte von Vitamin E-Derivaten ist der Nutzen einer Supplementation kritisch abzuwägen, denn nicht jeder Patient profitiert von einer Vitamin E Supplementation. Gemäß dem Prinzip der personalisierten Medizin müssen der metabolische Status, das genetische Profil sowie Komorbiditäten der Patienten in diese Therapieentscheidung einfließen. Aufgrund des aktuellen Standes der klinischen Praxis ist die Umsetzung einer derartig detaillierten Analyse auch unter Berücksichtigung des hohen Kostenpunktes noch nicht möglich. Dennoch kann eine Translation der hier dargestellten Ergebnisse in die klinische Praxis erfolgen. Eine Bestimmung des Cholesterinspiegels vor Beginn einer Supplementation mit Vitamin E könnte als wegweisender Faktor genutzt werden. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse lässt sich vermuten, dass Patienten mit Hypercholesterinämie von dem Cholesterin-senkenden Effekt des Vitamin E profitieren könnten, wohingegen bei Patienten mit normalem oder erniedrigtem Cholesterinspiegel die amyloidogenen Folgen der Supplementation überwiegen.

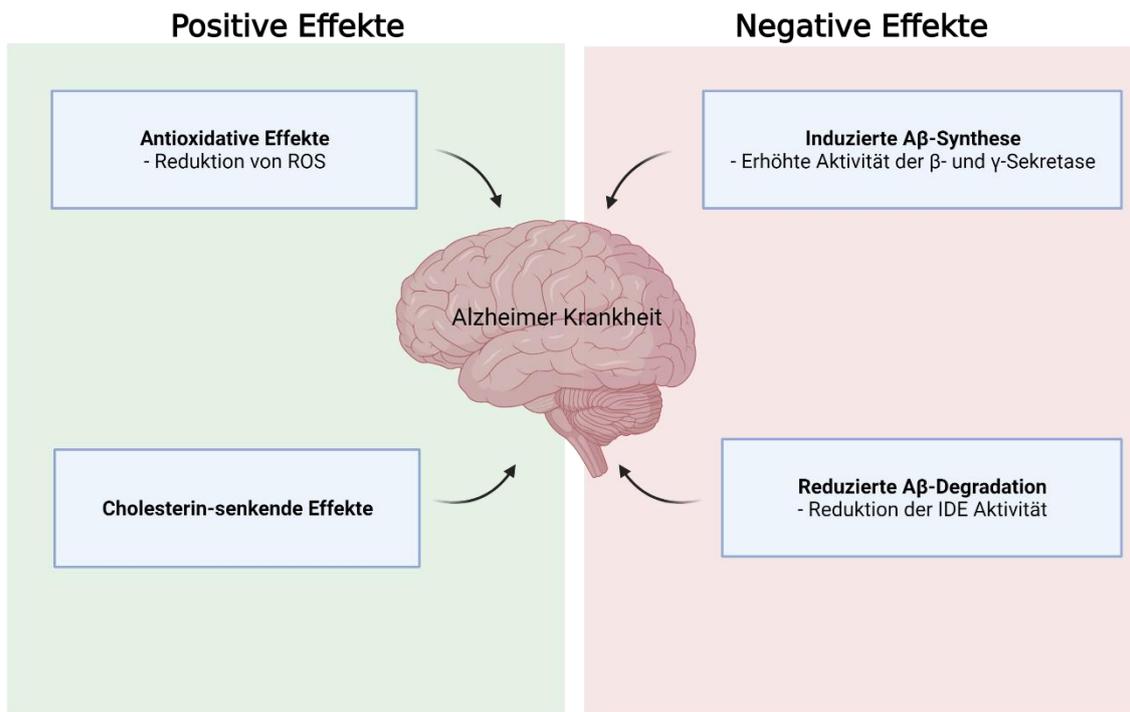


Abbildung 34 Positive und negative Effekte von α -Tocopherol und α -Tocotrienol auf die Alzheimer Krankheit

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H, Price DL, Cork LC (1989) α 1-Antichymotrypsin is present together with the β -protein in monkey brain amyloid deposits. *Neuroscience* 32:715–720
2. Abraham CR (2001) Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:931–936
3. Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL (2004) Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem* 279:52772–52780
4. Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C (2010) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16:2766–2778
5. Ahn KS, Sethi G, Krishnan K, Aggarwal BB (2007) γ -Tocotrienol Inhibits Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway through Inhibition of Receptor-interacting Protein and TAK1 Leading to Suppression of Antiapoptotic Gene Products and Potentiation of Apoptosis *. *Journal of Biological Chemistry* 282:809–820
6. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008) Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 65:1509–1517
7. Al-Azemi MK, Omu AE, Fatinikun T, Mannazhath N, Abraham S (2009) Factors contributing to gender differences in serum retinol and α -tocopherol in infertile couples. *Reproductive BioMedicine Online* 19:583–590
8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7915
9. Anwar K, Iqbal J, Hussain MM (2007) Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *Journal of Lipid Research* 48:2028–2038
10. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770–776
11. Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP α -secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301:231–235
12. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26–35
13. Bahrami A, Barreto GE, Lombardi G, Pirro M, Sahebkar A (2019) Emerging roles for high-density lipoproteins in neurodegenerative disorders. *BioFactors* 45:725–739
14. Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM (1989) Tau and ubiquitin immunoreactivity at different stages of formation of Alzheimer neurofibrillary tangles. *Prog Clin Biol Res* 317:837–848

15. Banerjee A, Khemka VK, Ganguly A, Roy D, Ganguly U, Chakrabarti S (2015) Vitamin D and Alzheimer's Disease: Neurocognition to Therapeutics. *Int J Alzheimers Dis* 2015:192747
16. Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2015) Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12:32–46
17. Barlowe C, Schekman R (1993) SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365:347–349
18. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77:895–907
19. Bates KA, Verdile G, Li Q-X, Ames D, Hudson P, Masters CL, Martins RN (2009) Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* 14:469–486
20. Baulac S, LaVoie MJ, Kimberly WT, Strahle J, Wolfe MS, Selkoe DJ, 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
21. Beard CM, Waring SC, O'Brien PC, Kurland LT, Kokmen E (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc* 73:951–955
22. Begum AN, Terao J (2002) Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:398–403
23. Belardelli F (1995) Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 103:161–179
24. Benussi L, Ghidoni R, Dal Piaz F, Binetti G, Di Iorio G, Abrescia P (2017) The level of 24-Hydroxycholesteryl Esters is an Early Marker of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 56:825–833
25. Bernstein H-G, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Ernst T, Stauch R, Trübner K, Steiner J, Dobrowolny H, Bogerts B (2008) Regional and cellular distribution patterns of insulin-degrading enzyme in the adult human brain and pituitary. *J Chem Neuroanat* 35:216–224
26. Beydoun MA, Beydoun HA, Wang Y (2008) Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9:204–218
27. Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M (2005) Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol* 171:919–924
28. Björkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:806–815
29. Bjørneboe A, Bjørneboe GE, Hagen BF, Drevon CA (1987) Acute and chronic effects of ethanol on secretion of alpha-tocopherol from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 922:357–363

30. Bjørneboe A, Bjørneboe GE, Drevon CA (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 120:233–242
31. Boccardi V, Ruggiero C, Patrìti A, Marano L (2016) Diagnostic Assessment and Management of Dysphagia in Patients with Alzheimer’s Disease. *J Alzheimers Dis* 50:947–955
32. Bowry VW, Ingold KU, Stocker R (1992) Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J* 288 (Pt 2):341–344
33. Braak F, Braak H, Mandelkow E-M (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87:554–567
34. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
35. Braak H, Feldengut S, Del Tredici K (2013) [Pathogenesis and prevention of Alzheimer’s disease: when and in what way does the pathological process begin?]. *Nervenarzt* 84:477–482
36. Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, Anthony JC (1994) Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer’s disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 44:227–232
37. Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal* 13:1145–1155
38. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A (2000) A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 5:207–216
39. Brown AJ (2001) Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am J Kidney Dis* 38:S3–S19
40. Brown MS, Goldstein JL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 21:505–517
41. Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11041–11048
42. Browne D, McGuinness B, Woodside JV, McKay GJ (2019) Vitamin E and Alzheimer’s disease: what do we know so far? *Clin Interv Aging* 14:1303–1317
43. Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300:535–543
44. Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU (1990) Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not “spare” vitamin E in vivo. *Lipids* 25:199–210
45. Butterfield DA, Koppal T, Subramaniam R, Yatin S (1999) Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer’s disease. *Rev Neurosci* 10:141–149
46. Cacabelos R, Alvarez XA, Fernández-Nova L, Franco A, Manges R, Pellicer A, Nishimura T (1994) Brain interleukin-1 beta in Alzheimer’s disease and vascular dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:141–151

47. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233–234
48. Cai Z, Hussain MD, Yan L-J (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 124:307–321
49. Calder PC (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 61:345–358
50. Campbell D, Bunker VW, Thomas AJ, Clayton BE (1989) Selenium and vitamin E status of healthy and institutionalized elderly subjects: analysis of plasma, erythrocytes and platelets. *Br J Nutr* 62:221–227
51. Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll J a. R, Perry VH, Weller RO (2008) Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:131–144
52. Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25:105–110
53. Cervantes B, Ulatowski LM (2017) Vitamin E and Alzheimer's Disease-Is It Time for Personalized Medicine? *Antioxidants (Basel)* 6:
54. Chambers CM, Ness GC (1997) Translational regulation of hepatic HMG-CoA reductase by dietary cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 232:278–281
55. Chang TY, Limanek JS (1980) Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 255:7787–7795
56. Chang T-Y, Li B-L, Chang CCY, Urano Y (2009) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1-9
57. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2017) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 14:450–464
58. Cheng Z, Sattler S, Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, DellaPenna D (2003) Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* 15:2343–2356
59. Chobor KL, Brown JW (1990) Semantic deterioration in Alzheimer's: the patterns to expect. *Geriatrics* 45:68–70, 75
60. Chouinard J (2000) Dysphagia in Alzheimer disease: a review. *J Nutr Health Aging* 4:214–217
61. Chun J, Lee J, Ye L, Exler J, Eitenmiller RR (2006) Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:196–204
62. Cohn CA, Pedigo CE, Hylton SN, Simon SR, Schoonen MA (2009) Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochemical Transactions* 10:8

63. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921–923
64. Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ (2003) Exclusively targeting β -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β -site processing of the amyloid precursor protein. *PNAS* 100:11735–11740
65. Craft NE, Haitema TB, Garnett KM, Fitch KA, Dorey CK (2004) Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain. *J Nutr Health Aging* 8:156–162
66. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335:1503–1506
67. Crouse NR, Ajit D, Udan MLD, Nichols MR (2009) Oligomeric amyloid-beta(1-42) induces THP-1 human monocyte adhesion and maturation. *Brain Res* 1254:109–119
68. Cruz L, Urbanc B, Buldyrev SV, Christie R, Gómez-Isla T, Havlin S, McNamara M, Stanley HE, Hyman BT (1997) Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7612–7616
69. Cudaback E, Jorstad NL, Yang Y, Montine TJ, Keene CD (2014) Therapeutic Implications of the Prostaglandin Pathway in Alzheimer's Disease. *Biochem Pharmacol* 88:565–572
70. Cummings JL, Houlihan JP, Hill MA (1986) The pattern of reading deterioration in dementia of the Alzheimer type: Observations and implications. *Brain and Language* 29:315–323
71. Dar NJ, Glazner GW (2020) Deciphering the neuroprotective and neurogenic potential of soluble amyloid precursor protein alpha (sAPP α). *Cell Mol Life Sci* 77:2315–2330
72. de la Monte SM (2009) Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep* 42:475–481
73. de Wilde MC, Vellas B, Girault E, Yavuz AC, Sijben JW (2017) Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 3:416–431
74. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV (2009) Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:16–30
75. DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99:703–712
76. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE (2010) Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285:12463–12468
77. Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A (2001) A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2:9–18

78. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (2000) Vitamin E. URL: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/vitamin-e/?L=0>
79. Devanand DP, Jacobs DM, Tang MX, Del Castillo-Castaneda C, Sano M, Marder K, Bell K, Bylsma FW, Brandt J, Albert M, Stern Y (1997) The course of psychopathologic features in mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 54:257–263
80. Dietrich M, Block G, Norkus EP, Hudes M, Traber MG, Cross CE, Packer L (2003) Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 77:160–166
81. Dimenstein R, Lira L, Medeiros ACP, Cunha LRF, Stamford TLM (2011) [Effect of vitamin E supplementation on alpha-tocopherol levels in human colostrum]. *Rev Panam Salud Publica* 29:399–403
82. Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117:3720–3732
83. Dobrowolska JA, Michener MS, Wu G, Patterson BW, Chott R, Ovod V, Pyatkovskyy Y, Wildsmith KR, Kasten T, Mathers P, Dancho M, Lennox C, Smith BE, Gilberto D, McLoughlin D, Holder DJ, Stamford AW, Yarasheski KE, Kennedy ME, Savage MJ, Bateman RJ (2014) CNS amyloid- β , soluble APP- α and - β kinetics during BACE inhibition. *J Neurosci* 34:8336–8346
84. Drachman DA, Swearer JM (1993) Driving and Alzheimer's disease: the risk of crashes. *Neurology* 43:2448–2456
85. Drevon CA (1991) Absorption, Transport and Metabolism of Vitamin E. *Free Radical Research Communications* 14:229–246
86. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
87. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavedo E, Crutch S, Dartigues J-F, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert M-O, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo J-L, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack CR (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 12:292–323
88. Duering M, Grimm MOW, Grimm HS, Schröder J, Hartmann T (2005) Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiol Aging* 26:785–788
89. Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 272:12778–12785
90. Duncan EA, Davé UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS (1998) Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* 273:17801–17809
91. Duthie GG, Arthur JR, James WP (1991) Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 53:1061S-1063S

92. Eckert GP, Hooff GP, Strandjord DM, Igbavboa U, Volmer DA, Müller WE, Wood WG (2009) Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients. *Neurobiol Dis* 35:251–257
93. Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB (2003) Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 278:2081–2084
94. el Hachimi KH, Foncin JF (1994) Do microglial cells phagocytose the beta/A4-amyloid senile plaque core of Alzheimer disease? *C R Acad Sci III* 317:445–451
95. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenber A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JCM, Breteler MMB (2002) Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 287:3223–3229
96. Engin KN (2009) Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis* 15:855–860
97. Espenshade PJ, Li W-P, Yabe D (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11694–11699
98. Evans HM, Bishop KS (1922) ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION. *Science* 56:650–651
99. Fagan AM, Mintun MA, Shah AR, Aldea P, Roe CM, Mach RH, Marcus D, Morris JC, Holtzman DM (2009) Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 1:371–380
100. Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K, Parkinson Study Group (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498–2508
101. Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R (2000) Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Ann N Y Acad Sci* 920:215–222
102. Fairus S, Nor RM, Cheng HM, Sundram K (2012) Alpha-tocotrienol is the most abundant tocotrienol isomer circulated in plasma and lipoproteins after postprandial tocotrienol-rich vitamin E supplementation. *Nutr J* 11:5
103. Farina N, Llewellyn D, Isaac MGEKN, Tabet N (2017) Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD002854
104. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856–5861
105. Fedrizzi L, Carafoli E (2011) Ca²⁺ dysfunction in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Biofactors* 37:189–196
106. Feldman HH, Doody RS, Kivipelto M, Sparks DL, Waters DD, Jones RW, Schwam E, Schindler R, Hey-Hadavi J, DeMicco DA, Breazna A, LEADe Investigators (2010) Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology* 74:956–964

107. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112–2117
108. Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ (2012) Increased Ceramide in Brains with Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* 29:537–547
109. Fisk L, Nalivaeva NN, Boyle JP, Peers CS, Turner AJ (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
110. Flanary BE, Streit WJ (2006) Alpha-tocopherol (vitamin E) induces rapid, nonsustained proliferation in cultured rat microglia. *Glia* 53:669–674
111. Förstl H, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Schreiter-Gasser U (1993) Psychotic features and the course of Alzheimer's disease: relationship to cognitive, electroencephalographic and computerized tomography findings. *Acta Psychiatr Scand* 87:395–399
112. Förstl H, Kurz A (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249:288–290
113. Förstl H, Bickel H, Kurz A, Herausgeber (1999) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
114. Franssen EH, Kluger A, Torossian CL, Reisberg B (1993) The neurologic syndrome of severe Alzheimer's disease. Relationship to functional decline. *Arch Neurol* 50:1029–1039
115. Frega N, Mozzon M, Bocci F (1998) Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. *J Amer Oil Chem Soc* 75:1723–1727
116. Frei B, Gaziano JM (1993) Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation. *J Lipid Res* 34:2135–2145
117. Frei B (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97:5S-13S; discussion 22S-28S
118. Freund G, Ballinger WE (1992) Alzheimer's disease and alcoholism: Possible interactions. *Alcohol* 9:233–240
119. Friesen JA, Rodwell VW (2004) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 5:248
120. Fritsche S, Wang X, Jung C (2017) Recent Advances in our Understanding of Tocopherol Biosynthesis in Plants: An Overview of Key Genes, Functions, and Breeding of Vitamin E Improved Crops. *Antioxidants* 6:99
121. Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res* 43:39–56

122. Fukui K, Takatsu H, Shinkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S (2005) Appearance of amyloid beta-like substances and delayed-type apoptosis in rat hippocampus CA1 region through aging and oxidative stress. *J Alzheimers Dis* 8:299–309
123. Funamoto S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Hirotsu N, Saido TC, Ihara Y (2004) Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42. *Biochemistry* 43:13532–13540
124. Gaedicke S, Zhang X, Huebbe P, Boesch-Saadatmandi C, Lou Y, Wiswedel I, Gardemann A, Frank J, Rimbach G (2009) Dietary vitamin E, brain redox status and expression of Alzheimer's disease-relevant genes in rats. *Br J Nutr* 102:398–406
125. Galan P, Viteri FE, Bertrais S, Czernichow S, Faure H, Arnaud J, Ruffieux D, Chenal S, Arnault N, Favier A, Roussel A-M, Hercberg S (2005) Serum concentrations of beta-carotene, vitamins C and E, zinc and selenium are influenced by sex, age, diet, smoking status, alcohol consumption and corpulence in a general French adult population. *Eur J Clin Nutr* 59:1181–1190
126. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63:168–174
127. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JRW, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M (2014) Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer* 111:1021–1046
128. Gerbitz KD, Gempel K, Brdiczka D (1996) Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 45:113–126
129. Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS (1985) Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41:249–258
130. Goetzl EJ (1980) Vitamin E modulates the lipoxygenation of arachidonic acid in leukocytes. *Nature* 288:183–185
131. Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430
132. Gong X, Li J, Shao W, Wu J, Qian H, Ren R, Espenshade P, Yan N (2015) Structure of the WD40 domain of SCAP from fission yeast reveals the molecular basis for SREBP recognition. *Cell Res* 25:401–411
133. Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoernli F, Pennanen L, Kurosinski P, Chen F (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry* 9:664–683
134. Götz J, Eckert A, Matamales M, Ittner LM, Liu X (2011) Modes of A β toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 68:3359–3375
135. Gouras GK, Xu H, Jovanovic JN, Buxbaum JD, Wang R, Greengard P, Relkin NR, Gandy S (1998) Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J Neurochem* 71:1920–1925
136. Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC, Becker G, Osterhage J, Jost WH, Schrank B, Stein C, Kostopoulos P, Lubik S, Wekwerth K, Dengler R, Troeger M, Wuerz A, Hoge A, Schrader C, Schimke N, Krampfl K, Petri S, Zierz S, Eger K, Neudecker S, Traufeller K, Sievert M, Neundörfer B, Hecht M, German vitamin E/ALS Study

- Group (2005) High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm (Vienna)* 112:649–660
137. Grimm MOW, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:11302–11311
 138. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Friess P, Wilde MC de, Broersen LM, Penke B, Péter M, Vígth L, Grimm HS, Hartmann T (2011) Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid β Production via Multiple Pleiotropic Mechanisms *. *Journal of Biological Chemistry* 286:14028–14039
 139. Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T (2011) From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:7713–7722
 140. Grimm MOW, Rothhaar TL, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Kins S, Grimm HS, Hartmann T (2012) Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem* 23:1214–1223
 141. Grimm MOW, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grösgen S, Hundsdörfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013) Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 14:5879–5898
 142. Grimm MOW, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2014) Impact of Vitamin D on Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid- β Peptide Degradation in Alzheimer's Disease. *NDD* 13:75–81
 143. Grimm MOW, Stahlmann CP, Mett J, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Lehmann J, Hundsdörfer B, Endres K, Grimm HS, Hartmann T (2015) Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of α -, γ - and δ -Tocopherol on A β Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19:646–656
 144. Grimm MOW, Hauptenthal VJ, Mett J, Stahlmann CP, Blümel T, Mylonas NT, Endres K, Grimm HS, Hartmann T (2016) Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegener Dis* 16:44–54
 145. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert J-C, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J, Alzheimer Genetic Analysis Group (2013) TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368:117–127
 146. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E (2017) Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models. *Int J Mol Sci* 18:
 147. Gugliandolo A, Chiricosta L, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E (2019) α -Tocopherol Modulates Non-Amyloidogenic Pathway and Autophagy in an In Vitro Model of Alzheimer's Disease: A Transcriptional Study. *Brain Sci* 9:

148. Gunanti IR, Marks GC, Al-Mamun A, Long KZ (2014) Low serum concentrations of carotenoids and vitamin E are associated with high adiposity in Mexican-American children. *J Nutr* 144:489–495
149. Gureje O, Ogunniyi A, Baiyewu O, Price B, Unverzagt FW, Evans RM, Smith-Gamble V, Lane KA, Gao S, Hall KS, Hendrie HC, Murrell JR (2006) APOE epsilon4 is not associated with Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Ann Neurol* 59:182–185
150. Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED (1996) Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:147–157
151. Haag MDM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BHC, Breteler MMB (2009) Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:13–17
152. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322–325
153. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695:109–116
154. Haass C, Selkoe DJ (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75:1039–1042
155. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268:3021–3024
156. Hamano T, Yen S-H, Gendron T, Ko L, Kuriyama M (2012) Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK. *Neurobiology of Aging* 33:2306–2320
157. Hamer M, Chida Y (2009) Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med* 39:3–11
158. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356
159. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185
160. Harman D (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7124–7128
161. Hartmann T, Kuchenbecker J, Grimm MOW (2007) Alzheimer's disease: the lipid connection. *Journal of Neurochemistry* 103:159–170
162. Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibashi Y, Oka J-I, Shido O (2002) Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *Journal of Neurochemistry* 81:1084–1091
163. Hastie AT, Steele C, Dunaway CW, Moore WC, Rector BM, Ampleford E, Li H, Denlinger LC, Jarjour N, Meyers DA, Bleecker ER, NHLBI Severe Asthma Research Program (SARP) (2018) Complex association patterns for inflammatory mediators in induced sputum from subjects with asthma. *Clin Exp Allergy* 48:787–797

164. Haupt M, Pollmann S, Kurz A (1991) Disoriented Behavior in Familiar Surroundings Is Strongly Associated with Perceptual Impairment in Mild Alzheimer's Disease. *DEM* 2:259–261
165. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3270–3274
166. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28:1456–1462
167. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000) Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2:461–462
168. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28:8354–8360
169. Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997) Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409:105–108
170. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H (2001) Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem* 276:47863–47868
171. Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS (1996) Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage-Activating Protein. *Cell* 87:415–426
172. Huang H-Y, Appel LJ (2003) Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J Nutr* 133:3137–3140
173. Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38:7609–7616
174. Hulse RE, Ralat LA, Wei-Jen T (2009) Chapter 22 Structure, Function, and Regulation of Insulin-Degrading Enzyme. Academic Press URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672908006225>
175. Hur J-Y, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Frånberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO (2008) Active γ -secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *The FEBS Journal* 275:1174–1187
176. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419–427
177. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zerfass R, Förstl H, Sandbrink R, Masters CL, 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
178. Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds (2000) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press (US), Washington (DC)

179. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7:656–664
180. Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J (2000) Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J* 19:819–830
181. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24:173–182
182. Ito K, Herbert C, Siegle JS, Vuppusetty C, Hansbro N, Thomas PS, Foster PS, Barnes PJ, Kumar RK (2008) Steroid-Resistant Neutrophilic Inflammation in a Mouse Model of an Acute Exacerbation of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:543–550
183. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* 292:1550–1552
184. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13:45–53
185. Jansen AHP, Reits EAJ, Hol EM (2014) The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci* 7:
186. Jensen SK, Lauridsen C (2007) Alpha-tocopherol stereoisomers. *Vitam Horm* 76:281–308
187. Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN (2000) gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11494–11499
188. Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN (2001) γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74:714–722
189. Jiang Q (2014) Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med* 72:76–90
190. Jiang Z, Yin X, Jiang Q (2011) Natural forms of vitamin E and 13'-carboxychromanol, a long-chain vitamin E metabolite, inhibit leukotriene generation from stimulated neutrophils by blocking calcium influx and suppressing 5-lipoxygenase activity, respectively. *J Immunol* 186:1173–1179
191. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345:91–104
192. Jost BC, Grossberg GT (1996) The evolution of psychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a natural history study. *J Am Geriatr Soc* 44:1078–1081
193. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A β protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736
194. Kang J, Müller-Hill B (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A β precursor RNA in rat tissues: PreA β (695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166:1192–1200

195. Karrer P, Fritzsche H, Ringier BH, Salomon H (1938) Synthesis of α -Tocopherol (Vitamin E). *Nature* 141:1057–1057
196. Kawas CH, Corrada MM (2006) Alzheimer's and Dementia in the Oldest-Old: A Century of Challenges. *Current Alzheimer Research* 3:411–419
197. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486–489
198. Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC, Spiegelman BM (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* 15:2582–2588
199. King GL, Loeken MR (2004) Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 122:333–338
200. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322:1447–1451
201. Kono N, Arai H (2015) Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic* 16:19–34
202. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269:17386–17389
203. Kooyenga DK, Geller M, Watkins TR, Gapor A, Diakoumakis E, Bierenbaum ML (1997) Palm oil antioxidant effects in patients with hyperlipidaemia and carotid stenosis-2 year experience. *Asia Pac J Clin Nutr* 6:72–75
204. Kovacic P, Jacintho JD (2001) Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8:773–796
205. Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, Yee M, Crowley J, Schmitt FA (2017) Association of Antioxidant Supplement Use and Dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADVISE). *JAMA Neurol* 74:567–573
206. Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, Sagi SA, Weggen S, Smith TE, Ladd T, Khan MA, Kache R, Beard J, Dodson M, Merit S, Ozols VV, Anastasiadis PZ, Das P, Fauq A, Koo EH, Golde TE (2005) Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat Med* 11:545–550
207. Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE (1998) Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252:711–715
208. Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang H-C, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee H-K, Wong PC (2005) BACE1, a Major Determinant of Selective Vulnerability of the Brain to Amyloid- β Amyloidogenesis, is Essential for Cognitive, Emotional, and Synaptic Functions. *J Neurosci* 25:11693–11709

209. Larsen GR, Henson K, Blue Y (1988) Variants of human tissue-type plasminogen activator. Fibrin binding, fibrinolytic, and fibrinogenolytic characterization of genetic variants lacking the fibronectin finger-like and/or the epidermal growth factor domains. *J Biol Chem* 263:1023–1029
210. Lauer D, Reichenbach A, Birkenmeier G (2001) Alpha 2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta 1--42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism. *Exp Neurol* 167:385–392
211. Lauridsen C, Leonard SW, Griffin DA, Liebler DC, McClure TD, Traber MG (2001) Quantitative analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples. *Anal Biochem* 289:89–95
212. Lauter H (1968) Zur Klinik und Psychopathologie der Alzheimerschen Krankheit. *PSP* 1:85–108
213. Lawrence CM, Rodwell VW, Stauffacher CV (1995) Crystal structure of *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution. *Science* 268:1758–1762
214. Lee CYD, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)* 117:949–960
215. Lee E, Giovanello KS, Saykin AJ, Xie F, Kong D, Wang Y, Yang L, Ibrahim JG, Doraiswamy PM, Zhu H (2017) Single-nucleotide polymorphisms are associated with cognitive decline at Alzheimer's disease conversion within mild cognitive impairment patients. *Alzheimers Dement (Amst)* 8:86–95
216. Lee HJ, Seo HI, Cha HY, Yang YJ, Kwon SH, Yang SJ (2018) Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clin Nutr Res* 7:229–240
217. Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authelet M, Héraud C, Pierrot N, Yilmaz Z, Octave J-N, Brion J-P (2012) Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *Am J Pathol* 181:1928–1940
218. Lesser G, Kandiah K, Libow LS, Likourezos A, Breuer B, Marin D, Mohs R, Haroutunian V, Neufeld R (2001) Elevated serum total and LDL cholesterol in very old patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12:138–145
219. Letenneur L, Larrieu S, Barberger-Gateau P (2004) Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomed Pharmacother* 58:95–99
220. Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, Mai S, Jendrach M, Eckert GP, Kruse SE, Palmiter RD, Brandt U, Dröse S, Wittig I, Willem M, Haass C, Reichert AS, Müller WE (2012) Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxid Redox Signal* 16:1421–1433
221. Li C, Ebrahimi A, Schluesener H (2013) Drug pipeline in neurodegeneration based on transgenic mice models of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12:116–140
222. Li F-J, Shen L, Ji H-F (2012) Dietary Intakes of Vitamin E, Vitamin C, and β -Carotene and Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease* 31:253–258
223. Li Y, Liu L, Barger SW, Mrazek RE, Griffin WST (2001) Vitamin E Suppression of Microglial Activation Is Neuroprotective. *J Neurosci Res* 66:163–170
224. Libby P (2007) Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 65:S140-146

225. Licher S, de Bruijn R FAG, Wolters FJ, Zillikens MC, Ikram MA, Ikram MK (2017) Vitamin D and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study. *J Alzheimers Dis* 60:989–997
226. Linn RT, Wolf PA, Bachman DL, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, Kaplan EF, D'Agostino RB (1995) The „preclinical phase“ of probable Alzheimer's disease. A 13-year prospective study of the Framingham cohort. *Arch Neurol* 52:485–490
227. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
228. Locascio JJ, Growdon JH, Corkin S (1995) Cognitive test performance in detecting, staging, and tracking Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52:1087–1099
229. Loef M, Walach H (2013) Midlife obesity and dementia: meta-analysis and adjusted forecast of dementia prevalence in the United States and China. *Obesity (Silver Spring)* 21:E51-55
230. Longenberger J, Shah ZA (2011) Simvastatin and other HMG-CoA reductase inhibitors on brain cholesterol levels in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8:434–442
231. Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35:7497–7504
232. Luchsinger JA, Tang M-X, Siddiqui M, Shea S, Mayeux R (2004) Alcohol intake and risk of dementia. *J Am Geriatr Soc* 52:540–546
233. Luchsinger JA, Noble JM, Scarmeas N (2007) Diet and Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:366–372
234. Luchsinger JA, Gustafson DR (2009) Adiposity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16:693–704
235. Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231–232
236. Lushchak VI, Semchuk NM (2012) Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiol Plant* 34:1607–1628
237. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2061–2069
238. Mah E, Sapper TN, Chitchumroonchokchai C, Failla ML, Schill KE, Clinton SK, Bobe G, Traber MG, Bruno RS (2015) α -Tocopherol bioavailability is lower in adults with metabolic syndrome regardless of dairy fat co-ingestion: a randomized, double-blind, crossover trial. *Am J Clin Nutr* 102:1070–1080
239. Major JM, Yu K, Wheeler W, Zhang H, Cornelis MC, Wright ME, Yeager M, Snyder K, Weinstein SJ, Mondul A, Eliassen H, Purdue M, Hazra A, McCarty CA, Hendrickson S, Virtamo J, Hunter D, Chanock S, Kraft P, Albanes D (2011) Genome-wide association study identifies common variants associated with circulating vitamin E levels. *Hum Mol Genet* 20:3876–3883

240. Mandrekar S, Jiang Q, Lee CYD, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE (2009) Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci* 29:4252–4262
241. Mandrekar-Colucci S, Landreth GE (2010) Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:156–167
242. Mangialasche F, Kivipelto M, Mecocci P, Rizzuto D, Palmer K, Winblad B, Fratiglioni L (2010) High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *J Alzheimers Dis* 20:1029–1037
243. Mangialasche F, Xu W, Kivipelto M, Costanzi E, Ercolani S, Pigliautile M, Cecchetti R, Baglioni M, Simmons A, Soininen H, Tsolaki M, Kloszewska I, Vellas B, Lovestone S, Mecocci P, AddNeuroMed Consortium (2012) Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 33:2282–2290
244. Mangialasche F, Solomon A, Kåreholt I, Hooshmand B, Cecchetti R, Fratiglioni L, Soininen H, Laatikainen T, Mecocci P, Kivipelto M (2013) Serum levels of vitamin E forms and risk of cognitive impairment in a Finnish cohort of older adults. *Exp Gerontol* 48:1428–1435
245. Mangialasche F, Westman E, Kivipelto M, Muehlboeck J-S, Cecchetti R, Baglioni M, Tarducci R, Gobbi G, Floridi P, Soininen H, Kłoszewska I, Tsolaki M, Vellas B, Spenger C, Lovestone S, Wahlund L-O, Simmons A, Mecocci P, AddNeuroMed consortium (2013) Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of α -/ γ -tocotrienols and γ -tocopherol. *J Intern Med* 273:602–621
246. Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93:263–275
247. Mayeux R, Stern Y (2012) Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:
248. Mazon JN, de Mello AH, Ferreira GK, Rezin GT (2017) The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci* 182:22–28
249. McGeer PL, McGeer EG (2001) Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58:1790–1792
250. McGeer PL, McGeer EG (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28:639–647
251. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:263–269
252. McLaughlin PJ, Weihrauch JL (1979) Vitamin E content of foods. *J Am Diet Assoc* 75:647–665
253. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–435
254. Melchor JP, Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 93:655–660

255. Mène-Saffrané L, Pellaud S (2017) Current strategies for vitamin E biofortification of crops. *Current Opinion in Biotechnology* 44:189–197
256. Meng X-F, Yu J-T, Wang H-F, Tan M-S, Wang C, Tan C-C, Tan L (2014) Midlife Vascular Risk Factors and the Risk of Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer’s Disease* 42:1295–1310
257. Mensink GBM, Richter A, Vohmann C, Stahl A, Six J, Kohler S, Fischer J, Hesecker H (2007) EsKiMo. *Ernährung* 1:225–229
258. Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG (2003) Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer’s disease. *European Journal of Neuroscience* 17:93–102
259. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costantini F, Riario-Sforza G, Imbastaro T, Neri M, Cuccurullo F (1995) Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 112:91–99
260. Michael J, Unger MS, Poupardin R, Scherthaner P, Mrowetz H, Attems J, Aigner L (2020) Microglia depletion diminishes key elements of the leukotriene pathway in the brain of Alzheimer’s Disease mice. *Acta Neuropathologica Communications* 8:129
261. Michalowsky B, Kaczynski A, Hoffmann W (2019) Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse. *Bundesgesundheitsbl* 62:981–992
262. Miettinen TA (1971) Cholesterol production in obesity. *Circulation* 44:842–850
263. Miguel-Álvarez M, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, Fiuza-Luces C, Pareja-Galeano H, Garatachea N, Lucia A (2015) Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a treatment for Alzheimer’s disease: a systematic review and meta-analysis of treatment effect. *Drugs Aging* 32:139–147
264. Miller E, Antonny B, Hamamoto S, Schekman R (2002) Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* 21:6105–6113
265. Miller EA, Schekman R (2013) COPII - a flexible vesicle formation system. *Curr Opin Cell Biol* 25:420–427
266. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E (2005) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142:37–46
267. Milosch N, Tanriöver G, Kundu A, Rami A, François J-C, Baumkötter F, Weyer SW, Samanta A, Jäschke A, Brod F, Buchholz CJ, Kins S, Behl C, Müller UC, Kögel D (2014) Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway. *Cell Death Dis* 5:e1391
268. Miners JS, Baig S, Tayler H, Kehoe PG, 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
269. Minter M, Taylor J, Crack P (2016) The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer’s disease. *Journal of neurochemistry*

270. Miyagi SJ, Brown IW, Chock JM-L, Collier AC (2009) Developmental changes in hepatic antioxidant capacity are age- and sex-dependent. *J Pharmacol Sci* 111:440–445
271. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD (2002) Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 33:620–626
272. Moreira PI (2012) Alzheimer's disease and diabetes: an integrative view of the role of mitochondria, oxidative stress, and insulin. *J Alzheimers Dis* 30 Suppl 2:S199-215
273. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS, Scherr PA (2002) Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA* 287:3230–3237
274. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS, Aggarwal NT, Scherr PA (2005) Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *Am J Clin Nutr* 81:508–514
275. Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R (2014) Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 62:493–503
276. Muresan V, Ladescu Muresan Z (2015) Amyloid- β precursor protein: Multiple fragments, numerous transport routes and mechanisms. *Exp Cell Res* 334:45–53
277. Murphy MP, LeVine H (2010) Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis* 19:311
278. Mutalib MSA, Khaza'ai H, Wahle KWJ (2003) Palm-tocotrienol rich fraction (TRF) is a more effective inhibitor of LDL oxidation and endothelial cell lipid peroxidation than α -tocopherol in vitro. *Food Research International* 36:405–413
279. Näär AM, Beaurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12:3020–3031
280. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM (2004) Cellular distribution of the endothelin system in the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 27:87–98
281. Nakagawa K, Kitazume S, Oka R, Maruyama K, Saido TC, Sato Y, Endo T, Hashimoto Y (2006) Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides. *J Neurochem* 96:924–933
282. Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2000) Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience* 101:441–449
283. Nakanishi H (2003) Microglial functions and proteases. *Mol Neurobiol* 27:163–176
284. Nazrun AS, Norazlina M, Norliza M, Nirwana SI (2012) The anti-inflammatory role of vitamin e in prevention of osteoporosis. *Adv Pharmacol Sci* 2012:142702
285. Neils J, Boller F, Gerdeman B, Cole M (1989) Descriptive writing abilities in Alzheimer's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 11:692–698

286. Neve RL, Finch EA, Dawes LR (1988) Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1:669–677
287. Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal N, Adeeb N (2003) Nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats: antioxidant protection by gamma-tocotrienol. *J Physiol Pharmacol* 54:319–327
288. Ng L-T, Ko H-J (2012) Comparative effects of tocotrienol-rich fraction, α -tocopherol and α -tocopheryl acetate on inflammatory mediators and nuclear factor kappa B expression in mouse peritoneal macrophages. *Food Chemistry* 134:920–925
289. Niki E, Traber MG (2012) A History of Vitamin E. *ANM* 61:207–212
290. Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage K-I, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saïdo TC, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T (2009) Depletion of vitamin E increases amyloid beta accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:33400–33408
291. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I (2017) Prevalence and incidence of Alzheimer’s disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia* 32:523–532
292. Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120:4081–4091
293. Nohturfft A, Hua X, Brown MS, Goldstein JL (1996) Recurrent G-to-A substitution in a single codon of SREBP cleavage-activating protein causes sterol resistance in three mutant Chinese hamster ovary cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13709–13714
294. Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL (1998) Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* 273:17243–17250
295. Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS (1999) Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11235–11240
296. Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, Espenshade PJ (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* 102:315–323
297. Nourhashemi F, Hooper C, Cantet C, Féart C, Gennero I, Payoux P, Salabert AS, Guyonnet S, De Souto Barreto P, Vellas B, Multidomain Alzheimer Preventive Trial/Data sharing Alzheimer (DSA) study group (2018) Cross-sectional associations of plasma vitamin D with cerebral β -amyloid in older adults at risk of dementia. *Alzheimers Res Ther* 10:43
298. O’Byrne D, Grundy S, Packer L, Devaraj S, Baldenius K, Hoppe PP, Kraemer K, Jialal I, Traber MG (2000) Studies of LDL oxidation following α -, γ -, or δ -tocotrienyl acetate supplementation of hypercholesterolemic humans. *Free Radical Biology and Medicine* 29:834–845
299. Oram JF, Vaughan AM, Stocker R (2001) ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 276:39898–39902
300. Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler MB (1997) Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)* 153:185–192

301. Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1985) 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* 42:203–212
302. Osborne TF, Gil G, Brown MS, Kowal RC, Goldstein JL (1987) Identification of promoter elements required for in vitro transcription of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *PNAS* 84:3614–3618
303. Osborne TF, Gil G, Goldstein JL, Brown MS (1988) Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J Biol Chem* 263:3380–3387
304. Osborne TF (1991) Single nucleotide resolution of sterol regulatory region in promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 266:13947–13951
305. Ott A, Slooter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Witteman JC, Van Broeckhoven C, van Duijn CM, Breteler MM (1998) Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* 351:1840–1843
306. Pacheco-Quinto J, Eckman EA (2013) Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *J Biol Chem* 288:5606–5615
307. Pahrudin Arrozi A, Shukri SNS, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA, Ahmad Damanhuri MH, Jaafar F, Makpol S (2020) Comparative Effects of Alpha- and Gamma-Tocopherol on Mitochondrial Functions in Alzheimer's Disease In Vitro Model. *Scientific Reports* 10:8962
308. Pai JT, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL (1998) Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 273:26138–26148
309. Palmert MR, Golde TE, Cohen ML, Kovacs DM, Tanzi RE, Gusella JF, Usiak MF, Younkin LH, Younkin SG (1988) Amyloid protein precursor messenger RNAs: differential expression in Alzheimer's disease. *Science* 241:1080–1084
310. Pani A, Dessì S, Diaz G, La Colla P, Abete C, Mulas C, Angius F, Cannas MD, Orru CD, Cocco PL, Mandas A, Putzu P, Laurenzana A, Cellai C, Costanza AM, Bavazzano A, Mocali A, Paoletti F (2009) Altered cholesterol ester cycle in skin fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18:829–841
311. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61:199–205
312. Parker RS, Sontag TJ, Swanson JE (2000) Cytochrome P4503A-dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. *Biochem Biophys Res Commun* 277:531–534
313. Paul S, Planque S, Nishiyama Y (2010) Immunological origin and functional properties of catalytic autoantibodies to amyloid beta peptide. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1:S43-49
314. Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Qureshi AA, Wright JJ (1992) Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J Med Chem* 35:3595–3606
315. Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Dischino DD, Gillespie E, Qureshi AA, Volk K, Wright JJ (1994) Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 2. Hypocholesterolemic and antioxidant activities

- of benzopyran and tetrahydronaphthalene analogues of the tocotrienols. *J Med Chem* 37:526–541
316. Peh HY, Ho WE, Cheng C, Chan TK, Seow ACG, Lim AYH, Fong CW, Seng KY, Ong CN, Wong WSF (2015) Vitamin E Isoform γ -Tocotrienol Downregulates House Dust Mite-Induced Asthma. *J Immunol* 195:437–444
 317. Perrig WJ, Perrig P, Stähelin HB (1997) The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *J Am Geriatr Soc* 45:718–724
 318. Petersen RC, Thomas RG, Grundman M, Bennett D, Doody R, Ferris S, Galasko D, Jin S, Kaye J, Levey A, Pfeiffer E, Sano M, van Dyck CH, Thal LJ, Alzheimer's Disease Cooperative Study Group (2005) Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 352:2379–2388
 319. Peyser CE, Folstein M, Chase GA, Starkstein S, Brandt J, Cockrell JR, Bylsma F, Coyle JT, McHugh PR, Folstein SE (1995) Trial of d-alpha-tocopherol in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 152:1771–1775
 320. Phonpanichrasamee C, Komaratat P, Wilairat P (1990) Hypocholesterolemic effect of vitamin E on cholesterol-fed rabbit. *Int J Vitam Nutr Res* 60:240–244
 321. Piazza-Gardner AK, Gaffud TJB, Barry AE (2013) The impact of alcohol on Alzheimer's disease: A systematic review. *Aging & Mental Health* 17:133–146
 322. Polito A, Intorre F, Andriollo-Sanchez M, Azzini E, Raguzzini A, Meunier N, Ducros V, O'Connor JM, Coudray C, Roussel AM, Maiani G (2005) Estimation of intake and status of vitamin A, vitamin E and folate in older European adults: the ZENITH. *Eur J Clin Nutr* 59 Suppl 2:S42-47
 323. Prasad K, Mantha SV, Kalra J, Lee P (1997) Hypercholesterolemia-induced oxidative stress in heart and its prevention by vitamin E. *International Journal of Angiology* 6:13–17
 324. Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21:4183–4187
 325. Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV (2010) Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* 67:505–512
 326. Purandare N, Burns A, Craig S, Faragher B, Scott K (2001) Depressive symptoms in patients with Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 16:960–964
 327. Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O (2014) Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* 88:450–467
 328. Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotani N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, Ihara Y (2005) Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25:436–445
 329. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273:32730–32738

330. Qureshi AA, Burger WC, Peterson DM, Elson CE (1986) The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J Biol Chem* 261:10544–10550
331. Qureshi AA, Qureshi N, Wright JJ, Shen Z, Kramer G, Gapor A, Chong YH, DeWitt G, Ong A, Peterson DM (1991) Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *Am J Clin Nutr* 53:1021S-1026S
332. Qureshi AA, Bradlow BA, Brace L, Manganello J, Peterson DM, Pearce BC, Wright JJ, Gapor A, Elson CE (1995) Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 30:1171–1177
333. Qureshi AA, Pearce BC, Nor RM, Gapor A, Peterson DM, Elson CE (1996) Dietary alpha-tocopherol attenuates the impact of gamma-tocotrienol on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in chickens. *J Nutr* 126:389–394
334. Qureshi AA, Reis JC, Papasian CJ, Morrison DC, Qureshi N (2010) Tocotrienols inhibit lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokines in macrophages of female mice. *Lipids Health Dis* 9:143
335. Qureshi AA, Tan X, Reis JC, Badr MZ, Papasian CJ, Morrison DC, Qureshi N (2011) Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by δ -tocotrienol and quercetin. *Lipids Health Dis* 10:239
336. Radhakrishnan A, Sun L-P, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 15:259–268
337. Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M (2015) Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *Br J Nutr* 114:1113–1122
338. Ravaglia G, Forti P, Lucicesare A, Pisacane N, Rietti E, Mangialasche F, Cecchetti R, Patterson C, Mecocci P (2008) Plasma tocopherols and risk of cognitive impairment in an elderly Italian cohort. *Am J Clin Nutr* 87:1306–1313
339. Rawson RB, Cheng D, Brown MS, Goldstein JL (1998) Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J Biol Chem* 273:28261–28269
340. Rea TD, Breitner JC, Psaty BM, Fitzpatrick AL, Lopez OL, Newman AB, Hazzard WR, Zandi PP, Burke GL, Lyketsos CG, Bernick C, Kuller LH (2005) Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol* 62:1047–1051
341. Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P (2006) Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54:8749–8755
342. Reboul E (2017) Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants (Basel)* 6:
343. Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA (2009) Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16:763–774
344. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321–331

345. Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE (2001) A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:890–899
346. Regner-Nelke L, Nelke C, Schroeter CB, Dziewas R, Warnecke T, Ruck T, Meuth SG (2021) Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition. *International Journal of Molecular Sciences* 22:10087
347. Rehm J, Ashley MJ, Dubois G (1997) Alcohol and health: individual and population perspectives. *Addiction* 92 Suppl 1:S109-115
348. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44:2051–2057
349. Ricciarelli R, Fedele E (2017) The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol* 15:926–935
350. Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF, Carson KA, Kawas C, Brandt J (1995) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:51–55
351. Ries M, Sastre M (2016) Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci* 8:
352. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F (2014) The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* 14:e157–e165
353. Robinson A, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Hauptenthal VJ, Hundsdörfer B, Stahlmann CP, Slobodskoy Y, Müller UC, Hartmann T, Stein R, Grimm MOW (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
354. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761–771
355. Rogers J, Shen Y (2000) A perspective on inflammation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924:132–135
356. Roitelman J, Olender EH, Bar-Nun S, Dunn WA, Simoni RD (1992) Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 117:959–973
357. Romanchik JE, Morel DW, Harrison EH (1995) Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *J Nutr* 125:2610–2617
358. Rota C, Rimbach G, Minihane A-M, Stoecklin E, Barella L (2005) Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. *Nutr Neurosci* 8:21–29
359. Roth M (1955) The natural history of mental disorder in old age. *J Ment Sci* 101:281–301

360. Roy S, Lado BH, Khanna S, Sen CK (2002) Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. *FEBS Lett* 530:17–23
361. Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Zhou J, Whitmer RA (2011) Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med* 171:333–339
362. Sáiz-Vazquez O, Puente-Martínez A, Ubillos-Landa S, Pacheco-Bonrostro J, Santabárbara J (2020) Cholesterol and Alzheimer's Disease Risk: A Meta-Meta-Analysis. *Brain Sciences* 10:386
363. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85:1037–1046
364. Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 272:20213–20221
365. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 2:505–514
366. Salvador GA, Uranga RM, Giusto NM (2010) Iron and mechanisms of neurotoxicity. *Int J Alzheimers Dis* 2011:720658
367. Sano M, Bell KL, Galasko D, Galvin JE, Thomas RG, van Dyck CH, Aisen PS (2011) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of simvastatin to treat Alzheimer disease. *Neurology* 77:556–563
368. Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, Hayashi Y, Yoshida T, Fujii N, Koike T, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto R, Amano N, Makita Z (1998) Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol* 153:1149–1155
369. Sato M, Sato K, Nakano A (1996) Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 134:279–293
370. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368–379
371. Schiekofer S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, Stefan N, Humpert P, Fritsche A, Stumvoll M, Schleicher E, Häring H-U, Nawroth PP, Bierhaus A (2003) Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes* 52:621–633
372. Schilling T, Eder C (2011) Amyloid- β -induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *J Cell Physiol* 226:3295–3302
373. Schirinzi T, Martella G, Imbriani P, Di Lazzaro G, Franco D, Colona VL, Alwardat M, Sinibaldi Salimei P, Mercuri NB, Pierantozzi M, Pisani A (2019) Dietary Vitamin E as a Protective Factor for Parkinson's Disease: Clinical and Experimental Evidence. *Front Neurol* 0:

374. Schmözl L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M (2016) Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem* 7:14–43
375. Schoenheimer R, Breusch F (1933) SYNTHESIS AND DESTRUCTION OF CHOLESTEROL IN THE ORGANISM. *Journal of Biological Chemistry* 103:439–448
376. Schwarzingler M, Pollock BG, Hasan OSM, Dufouil C, Rehm J, Baillot S, Guibert Q, Planchet F, Luchini S (2018) Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008–13: a nationwide retrospective cohort study. *The Lancet Public Health* 3:e124–e132
377. Schwarzpaul S, Strassburg A, Lührmann PM, Neuhäuser-Berthold M (2006) Intake of Vitamin and Mineral Supplements in an Elderly German Population. *ANM* 50:155–162
378. Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399:A23-31
379. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741–766
380. Sen CK, Khanna S, Roy S (2006) Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci* 78:2088–2098
381. Seppanen CM, Song Q, Saari Csallany A (2010) The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *J Am Oil Chem Soc* 87:469–481
382. Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med* 10:263–275
383. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 278:3170–3175
384. Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11:25–33
385. Shah AA, Khand F, Khand TU (2015) Effect of smoking on serum xanthine oxidase, malondialdehyde, ascorbic acid and α -tocopherol levels in healthy male subjects. *Pak J Med Sci* 31:146–149
386. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837–842
387. Shao W, Espenshade PJ (2014) Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage regulates Golgi-to-endoplasmic reticulum recycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *J Biol Chem* 289:7547–7557
388. Sharpe LJ, Brown AJ (2017) Identifying Sterol Response Elements Within Promoters of Genes. *Methods Mol Biol* 1583:185–191
389. Shie F-S, Jin L-W, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC (2002) Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13:455–459

390. Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD (1997) Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100:2115–2124
391. Shintani D, DellaPenna D (1998) Elevating the Vitamin E Content of Plants Through Metabolic Engineering. *Science* 282:2098–2100
392. Shirotani K, Edbauer D, Prokop S, Haass C, Steiner H (2004) Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem* 279:41340–41345
393. Shobab LA, Hsiung G-YR, Feldman HH (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4:841–852
394. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460–6464
395. Smith JR, Osborne TF, Brown MS, Goldstein JL, Gil G (1988) Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *J Biol Chem* 263:18480–18487
396. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
397. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K (2018) Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 4:18001
398. Soininen H, Solomon A, Visser PJ, Hendrix SB, Blennow K, Kivipelto M, Hartmann T, LipiDiDiet clinical study group (2017) 24-month intervention with a specific multinutrient in people with prodromal Alzheimer's disease (LipiDiDiet): a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Neurol* 16:965–975
399. Solfrizzi V, Panza F, Torres F, Mastroianni F, Del Parigi A, Venezia A, Capurso A (1999) High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline. *Neurology* 52:1563–1569
400. Soll J, Kemmerling M, Schultz G (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 204:544–550
401. Song B-L, DeBose-Boyd RA (2006) Insig-dependent Ubiquitination and Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Stimulated by δ - and γ -Tocotrienols *. *Journal of Biological Chemistry* 281:25054–25061
402. Sookwong P, Nakagawa K, Yamaguchi Y, Miyazawa T, Kato S, Kimura F, Miyazawa T (2010) Tocotrienol Distribution in Foods: Estimation of Daily Tocotrienol Intake of Japanese Population. *J Agric Food Chem* 58:3350–3355
403. Sparks DL, Kuo YM, Roher A, Martin T, Lukas RJ (2000) Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Ann N Y Acad Sci* 903:335–344

404. Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ, Lopez JE, Sabbagh MN (2002) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advise to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging* 6:324–331
405. Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE (2006) Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439:234–238
406. Stagg SM, LaPointe P, Balch WE (2007) Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Curr Opin Struct Biol* 17:221–228
407. Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R (1994) Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 271:1004–1010
408. Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN (2002) Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 33:1026–1036
409. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977–1981
410. Südhof TC, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1987) 42 bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter. *Cell* 48:1061–1069
411. Sun L-P, Li L, Goldstein JL, Brown MS (2005) Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem* 280:26483–26490
412. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L (1993) Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* 32:10692–10699
413. Swomley AM, Förster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, Butterfield DA (2014) Aβ, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta* 1842:1248–1257
414. Taghizadeh M, Tamtaji OR, Dadgostar E, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Abolhassani J, Aarabi MH, Kouchaki E, Memarzadeh MR, Asemi Z (2017) The effects of omega-3 fatty acids and vitamin E co-supplementation on clinical and metabolic status in patients with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurochemistry International* 108:183–189
415. Takada T, Suzuki H (2010) Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* 54:616–622
416. Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, Tolksdorf K, Heneka MT, Lütjohann D, Wunderlich P, 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
417. Teoh MK, Chong JM, Mohamed J, Phang KS (1994) Protection by tocotrienols against hypercholesterolaemia and atheroma. *Med J Malaysia* 49:255–262
418. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619

419. Tomlinson BE, Blessed G, Roth M (1970) Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* 11:205–242
420. Towbin H, Staehelin T, 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
421. Traber MG, Kayden HJ (1987) Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 46:488–495
422. Traber MG (2013) Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res* 54:2295–2306
423. Traber MG (2014) Vitamin E Inadequacy in Humans: Causes and Consequences. *Advances in Nutrition* 5:503–514
424. Troesch B, Hoefl B, McBurney M, Eggersdorfer M, Weber P (2012) Dietary surveys indicate vitamin intakes below recommendations are common in representative Western countries. *Br J Nutr* 108:692–698
425. Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289–305
426. Twamley EW, Ropacki SAL, Bondi MW (2006) Neuropsychological and neuroimaging changes in preclinical Alzheimer's disease. *J Int Neuropsychol Soc* 12:707–735
427. Ulatowski L, Manor D (2013) Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annu Rev Nutr* 33:87–103
428. Ulatowski LM, Manor D (2015) Vitamin E and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 84:78–83
429. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol* 7:65–74
430. Valastyan S, Thakur V, Johnson A, Kumar K, Manor D (2008) Novel transcriptional activities of vitamin E: inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochemistry* 47:744–752
431. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1–40
432. Vane JR (1976) Prostaglandins as mediators of inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2:791–801
433. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, Bu G, Frieden C, Holtzman DM (2013) ApoE influences amyloid- β ($A\beta$) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$ association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1807-1816
434. Wagner JG, Jiang Q, Harkema JR, Ames BN, Illek B, Roubey RA, Peden DB (2008) Gamma-tocopherol prevents airway eosinophilia and mucous cell hyperplasia in experimentally induced allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 38:501–511
435. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2002) Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9:11–23

436. Wallström P, Wirfält E, Lahmann PH, Gullberg B, Janzon L, Berglund G (2001) Serum concentrations of beta-carotene and alpha-tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *Am J Clin Nutr* 73:777–785
437. Wang C-C, Lu T-H, Liao W-C, Yuan S-C, Kuo P-C, Chuang H-L, Lee M-C, Yen C-H (2010) Cigarette smoking and cognitive impairment: a 10-year cohort study in Taiwan. *Arch Gerontol Geriatr* 51:143–148
438. Wang X, Quinn PJ (2000) The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol Membr Biol* 17:143–156
439. Wang Y, Moreland M, Wagner JG, Ames BN, Illek B, Peden DB, Jiang Q (2012) Vitamin E forms inhibit IL-13/STAT6-induced eotaxin-3 secretion by up-regulation of PAR4, an endogenous inhibitor of atypical PKC in human lung epithelial cells. *J Nutr Biochem* 23:602–608
440. Wang Y, Jiang Q (2013) Gamma-tocotrienol inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte-colony stimulating factor by suppressing C/EBP- β and NF- κ B in macrophages. *J Nutr Biochem* 24:1146–1152
441. Wang Y, Park N-Y, Jang Y, Ma A, Jiang Q (2015) Vitamin E γ -Tocotrienol Inhibits Cytokine-Stimulated NF- κ B Activation by Induction of Anti-Inflammatory A20 via Stress Adaptive Response Due to Modulation of Sphingolipids. *J Immunol* 195:126–133
442. Wang Y, Mandelkow E (2016) Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17:5–21
443. Waring SC, Rosenberg RN (2008) Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65:329–334
444. Whittle JRR, Schwartz TU (2010) Structure of the Sec13–Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *Journal of Cell Biology* 190:347–361
445. Wildsmith KR, Holley M, Savage JC, Skerrett R, Landreth GE (2013) Evidence for impaired amyloid β clearance in Alzheimer’s disease. *Alzheimers Res Ther* 5:33
446. Wilson RS, McCann JJ, Li Y, Aggarwal NT, Gilley DW, Evans DA (2007) Nursing home placement, day care use, and cognitive decline in Alzheimer’s disease. *Am J Psychiatry* 164:910–915
447. Winkler E, Kamp F, Scheuring J, Ebke A, Fukumori A, Steiner H (2012) Generation of Alzheimer Disease-associated Amyloid β 42/43 Peptide by γ -Secretase Can Be Inhibited Directly by Modulation of Membrane Thickness *. *Journal of Biological Chemistry* 287:21326–21334
448. Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC, Strydom A (2015) A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 16:564–574
449. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439–1443
450. Wolozin B, Wang SW, Li N-C, Lee A, Lee TA, Kazis LE (2007) Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson’s disease. *BMC Med* 5:20

451. Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4040–4043
452. Wootton AM (2005) Improving the Measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev* 26:33–36
453. Wright ME, Peters U, Gunter MJ, Moore SC, Lawson KA, Yeager M, Weinstein SJ, Snyder K, Virtamo J, Albanes D (2009) Association of variants in two vitamin e transport genes with circulating vitamin e concentrations and prostate cancer risk. *Cancer Res* 69:1429–1438
454. Wu S-J, Liu P-L, Ng L-T (2008) Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Mol Nutr Food Res* 52:921–929
455. Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH-T, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E (2002) Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10837–10842
456. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008) Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29:422–437
457. Xu W, Yu J-T, Tan M-S, Tan L (2015) Cognitive reserve and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 51:187–208
458. Xu Z (2008) Comparison of extraction methods for quantifying vitamin E from animal tissues. *Bioresour Technol* 99:8705–8709
459. Yam M-L, Abdul Hafid SR, Cheng H-M, Nesaretnam K (2009) Tocotrienols suppress proinflammatory markers and cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages. *Lipids* 44:787–797
460. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T (1999) Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 11:83–90
461. Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee J-M (2006) Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* 281:24566–24574
462. Yang T, Goldstein JL, Brown MS (2000) Overexpression of Membrane Domain of SCAP Prevents Sterols from Inhibiting SCAP·SREBP Exit from Endoplasmic Reticulum*. *Journal of Biological Chemistry* 275:29881–29886
463. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489–500
464. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279–282
465. Yap H-M, Lye K-L (2020) An Insight of Vitamin E as Neuroprotective Agents. *Progress In Microbes & Molecular Biology* 3:

466. Yap SP, Yuen KH, Wong JW (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of alpha-, gamma- and delta-tocotrienols under different food status. *J Pharm Pharmacol* 53:67–71
467. Yatin SM, Varadarajan S, Butterfield DA (2000) Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production. *J Alzheimers Dis* 2:123–131
468. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T (2001) Leukotriene B4: Metabolism and Signal Transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385:231–241
469. Yoon S-S, Jo SA (2012) Mechanisms of Amyloid- β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Biomol Ther (Seoul)* 20:245–255
470. Yoshida Y, Niki E, Noguchi N (2003) Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids* 123:63–75
471. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee J-H, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171:87–98
472. Yuen KH, Wong JW, Lim AB, Ng BH, Choy WP (2011) Effect of Mixed-Tocotrienols in Hypercholesterolemic Subjects. *FFHD* 1:106
473. Yui D, Nishida Y, Nishina T, Mogushi K, Tajiri M, Ishibashi S, Ajioka I, Ishikawa K, Mizusawa H, Murayama S, Yokota T (2015) Enhanced Phospholipase A2 Group 3 Expression by Oxidative Stress Decreases the Insulin-Degrading Enzyme. *PLOS ONE* 10:e0143518
474. Zaghi J, Goldenson B, Inayathullah M, Lossinsky AS, Masoumi A, Avagyan H, Mahanian M, Bernas M, Weinand M, Rosenthal MJ, Espinosa-Jeffrey A, de Vellis J, Teplow DB, Fiala M (2009) Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 117:111–124
475. Zhao X, Yang J (2010) Amyloid- β Peptide Is a Substrate of the Human 20S Proteasome. *ACS Chem Neurosci* 1:655–660
476. Zhao Y, Monahan FJ, McNulty BA, Brennan L, Gibney MJ, Gibney ER (2015) α -Tocopherol Stereoisomers in Human Plasma Are Affected by the Level and Form of the Vitamin E Supplement Used. *The Journal of Nutrition* 145:2347–2354
477. Zhou X-P, Wu K-Y, Liang B, Fu X-Q, Luo Z-G (2008) TrkB-mediated activation of geranylgeranyltransferase I promotes dendritic morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17181–17186
478. Zingg J-M (2007) Vitamin E: an overview of major research directions. *Mol Aspects Med* 28:400–422
479. Zinser EG, Hartmann T, Grimm MOW (2007) Amyloid beta-protein and lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768:1991–2001
480. Zondlo Fiume M (2002) Final report on the safety assessment of Tocopherol, Tocopheryl Acetate, Tocopheryl Linoleate, Tocopheryl Linoleate/Oleate, Tocopheryl Nicotinate, Tocopheryl Succinate, Dioleoyl Tocopheryl Methylsilanol, Potassium Ascorbyl Tocopheryl Phosphate, and Tocophersolan. *Int J Toxicol* 21 Suppl 3:51–116

481. Zotova E, Nicoll JA, Kalaria R, Holmes C, Boche D (2010) Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther* 2:1
482. (1989) DATATOP: A Multicenter Controlled Clinical Trial in Early Parkinson's Disease: Parkinson Study Group. *Archives of Neurology* 46:1052–1060
483. 2020 Alzheimer's disease facts and figures - 2020 - Alzheimer's & Dementia - Wiley Online Library. URL: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/alz.12068>

7 Publikationen

Erstautorenschaften

Grimm MO¹, **Regner L**¹, Mett J, Stahlmann CP, Schorr P, Nelke C, Streidenberger O, Stoetzel H, Winkler J, Zaidan SR, Thiel A, Endres K, Grimm HS, Volmer DA, Hartmann T. Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 29;17(11):1809. doi: 10.3390/ijms17111809. PMID: 27801864; PMCID: PMC5133810.

Regner L, Labeit B, Muhle P, Ruck T, Dziewas R, Warnecke T, Suntrup-Krueger S. Mind the gap: acute bilateral vocal cord palsy in CIDP after extending the IVIG treatment interval?. *Neuroimmunol Neuroinflammation* 2020;7:[Online First]. <http://dx.doi.org/10.20517/2347-8659.2020.49>

Regner-Nelke L, Nelke C, Schroeter C, Dziewas R, Warnecke T, Ruck T, and Meuth S Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition *International Journal of Molecular Sciences* 2021 Sep, 18: 10087. doi: 10.3390/ijms221810087

Mitautorenschaften

Grimm MOW, Thiel A, Lauer AA, Winkler J, Lehmann J, **Regner L**, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stötzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T. Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 19;18(12):2764. doi: 10.3390/ijms18122764. PMID: 29257109; PMCID: PMC5751363.

Janitschke D, Nelke C, Lauer AA, **Regner L**, Winkler J, Thiel A, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on A β -Homeostasis in SH-SY5Y Cells. *Biomolecules.* 2019 Nov 2;9(11):689. doi: 10.3390/biom9110689. PMID: 31684105; PMCID: PMC6920871.

Labeit B, Claus I, Muhle P, **Regner L**, Suntrup-Krueger S, Dziewas R, Warnecke T. Effect of cognitive and motor dual-task on oropharyngeal swallowing in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2021 Mar;28(3):754-762. doi: 10.1111/ene.14603. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33084118.

Poster

¹ equally contributed

Lauer A, Thiel A, Grimm MOW, **Regner L**, Hartmann T. et al. Vitamin D and their analogues: A mechanistical link to Alzheimer's disease. Lipids & Brain IV - Lipids in Alzheimer's disease, 2017, Nancy

Schorr P, **Regner L**, Grimm MOW, Hartmann T, Volmer D *et al.* Investigating the role of vitamin E in Alzheimer's disease using a new high-throughput extraction and LC-MS/MS method. European Mass Spectrometry Conference, 2018, Saarbrücken

Regner L, Labeit B, Muhle P, Ruck T, Dziewas R, Warnecke T, Suntrup-Krueger S. Intravenous immunoglobulin for treatment of bilateral vocal cord palsy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a case study. European Society for Swallowing Disorders, 2020, online virtual congress

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich jenen Menschen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Marcus Grimm für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die spannende Themenstellung und das ausgezeichnete Mentoring. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und motivierender, persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich fortlaufend für die Wissenschaft begeistert und ermutigt.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Tobias Hartmann für die Bereitstellung der räumlichen und finanziellen Möglichkeiten für die Durchführung, sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der Experimentellen Neurologie danken, für die gute und schöne Zusammenarbeit. Besonders Dank gilt hierbei Dr. Heike Grimm, Dr. Janine Mett, Anna Lauer und Dr. Christoph Stahlmann für die große Unterstützung und Betreuung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im Rahmen dieser Arbeit. Ich bedanke mich zudem für die verbundene und schöne Arbeitsatmosphäre, die die Durchführung dieser Arbeit zu einer so besonderen Erfahrung gemacht hat.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Annette und Thomas Regner sowie meiner Schwester Katrin Regner danken für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und meiner gesamten akademischen Laufbahn. Meinem Ehemann Christopher Nelke danke ich von ganzem Herzen für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine Geduld und Motivation.

Tag der Promotion: 27.11.2023

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichtersteller:

Prof. M. Grimm

Prof. D. Mick