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

**Der bidirektionale Zusammenhang zwischen Sulfatiden und den
molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von

Valerie-Christin Zimmer

geboren am 11.08.1989 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XII
KOOPERATIONEN	XII
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1 <i>Der bidirektionale Zusammenhang zwischen Sulfatiden und den molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Bidirectional link between sulfatides and the molecular mechanisms of Alzheimer's disease.....</i>	<i>3</i>
2 EINLEITUNG	5
2.1 <i>Die Alzheimer-Erkrankung.....</i>	<i>5</i>
2.2 <i>Molekulare Prozesse der Alzheimer-Erkrankung</i>	<i>6</i>
2.3 <i>Amyloides Vorläuferprotein und seine Prozessierung</i>	<i>8</i>
2.4 <i>Aβ-Homöostase: Degradation und Aggregation.....</i>	<i>12</i>
2.5 <i>Physiologische Funktionen von APP und seinen Prozessierungsprodukten</i>	<i>13</i>
2.6 <i>Lipide und die Alzheimer-Erkrankung</i>	<i>15</i>
2.7 <i>Sulfatide und ihre Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung</i>	<i>16</i>
2.8 <i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	<i>19</i>
3 MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 <i>Material.....</i>	<i>21</i>
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	21
3.1.2 Geräte	24
3.1.3 Verwendetes <i>in vivo</i> Material	26
3.1.3.1 Verwendetes humanes <i>post mortem</i> Gehirngewebe.....	26
3.1.3.2 Verwendetes murines <i>in vivo</i> Material.....	28
3.1.4 Verwendete Zelllinien	29
3.1.5 Zellkulturmedien	30
3.2 <i>Methoden.....</i>	<i>31</i>
3.2.1 Zellbiologische Techniken.....	31
3.2.1.1 Kultivieren eukaryotischer Zellen.....	31
3.2.1.2 Kryokonservieren eukaryotischer Zellen	31
3.2.1.3 Inkubation von Zellen mit unterschiedlichen Substanzen.....	32
3.2.1.3.1 Inkubation von Zellen mit Sulfatiden oder Galactosylceramid	32
3.2.1.3.2 Inkubation von Zellen mit γ -Sekretase-Inhibitor.....	33
3.2.1.3.3 Inkubation von Zellen mit Cycloheximid oder Chloroquin	34
3.2.1.3.4 Inkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten	34
3.2.1.3.4.1 Langzeitinkubation mit APP-Prozessierungsprodukten	34
3.2.1.3.4.2 Liposomen-vermittelte Inkubation von Zellen mit AICD	35
3.2.1.3.5 Inkubation von Zellen mit radioaktivem [35S]-Sulfat.....	35
3.2.1.4 Transfektion von Zellen	36
3.2.1.5 Selektion einer ARSA-KD-Zelllinie nach stabiler Transfektion mit shRNS	37
3.2.1.6 Analyse der Zytotoxizität.....	37
3.2.1.7 SEAP-Sekretionsversuch zur Bestimmung der Proteinsekretion.....	38
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	38
3.2.2.1 Isolation von RNS.....	38
3.2.2.2 Bestimmung der Reinheit und RNS-Konzentration nach RNS Isolation.....	39
3.2.2.3 Synthese von cDNS	39
3.2.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. qRT-PCR).....	40

3.2.2.5	Gal3st-Promotoraktivitätsmessung mittels Luciferase-Assay.....	42
3.2.3	Proteinchemische Arbeiten.....	42
3.2.3.1	Aufreinigung von konditioniertem Medium.....	42
3.2.3.2	Zellaufschluss.....	43
3.2.3.2.1	Mechanischer Zellaufschluss.....	43
3.2.3.2.2	Chemischer Zellaufschluss.....	44
3.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test.....	44
3.2.3.4	Immunpräzipitation.....	45
3.2.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	46
3.2.3.6	Proteintransfer mittels Western Blot-Methode.....	47
3.2.3.7	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	47
3.2.3.8	Bestimmung der Gesamtdegradation von A β	49
3.2.3.9	Biotinylierung von Proteinen an der Zelloberfläche.....	50
3.2.3.10	Untersuchung der Aggregation von A β -Peptiden.....	51
3.2.3.10.1	Monomerisierung von synthetischem A β_{42}	51
3.2.3.10.2	<i>In vitro</i> Inkubation von A β_{42} -Monomeren mit Sulfatiden und Ceramiden.....	52
3.2.3.10.3	Fluorometrische Bestimmung der A β_{42} -Aggregation mittels Thioflavin T.....	52
3.2.3.10.4	Detektion von A β_{42} -Aggregaten mittels Rasterkraft-Mikroskopie.....	53
3.2.3.10.5	Immunodetektion von A β_{42} -Aggregaten mittels Dotblot.....	54
3.2.3.11	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	54
3.2.3.11.1	Prinzip der Aktivitätsmessung mittels Fluorophor-markiertem spezifischem Substrat.....	54
3.2.3.11.2	Analyse von α -, β - und γ -Sekretase-Aktivitäten aus Membranpräparationen.....	55
3.2.3.11.2.1	Herstellung postnukleärer Fraktionen.....	55
3.2.3.11.2.2	<i>In vitro</i> Inkubation von PNFs mit Sulfatiden.....	55
3.2.3.11.2.3	Membranpräparation.....	56
3.2.3.11.2.4	Fluorometrische Messung von Enzymaktivitäten.....	56
3.2.3.11.3	Aktivitätsmessung der α -, β - und γ -Sekretase in lebenden Zellen.....	57
3.2.3.11.4	Bestimmung der Nephilysin-Aktivität.....	59
3.2.3.12	Isolation von Zellkompartimenten.....	60
3.2.3.12.1	Endosomen-Präparation.....	60
3.2.3.12.2	Isolation von Lipid Rafts.....	61
3.2.3.12.2.1	Detergenz-basierte Isolation von Lipid Rafts.....	61
3.2.3.12.2.2	Detergenz-freie Isolation von Lipid Rafts.....	62
3.2.4	Lipidanalytische Arbeiten.....	62
3.2.4.1	Massenspektrometrische Analyse von Sulfatiden.....	62
3.2.4.2	Lipidextraktion modifiziert nach Bligh und Dyer.....	65
3.2.4.3	Messung der Sulfatid- <i>de novo</i> -Synthese.....	65
3.2.4.4	Bestimmung des Cholesterin-Gehaltes in Lipid Rafts.....	66
3.2.5	Statistische Datenauswertung.....	67
4	ERGEBNISSE.....	68
4.1	<i>Sulfatid-Spiegel in humanem Alzheimer-Hirngewebe.....</i>	68
4.2	<i>Sulfatid-Gehalt im zerebralen Gewebe in Abhängigkeit vom Alter.....</i>	71
4.3	<i>Einfluss der APP-Prozessierung auf die Sulfatid-Synthese.....</i>	72
4.3.1	Beeinflussung des Sulfatid-Metabolismus durch die γ -Sekretase.....	72
4.3.2	Veränderungen der Sulfatid-Synthese durch APP.....	75
4.3.3	Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch den APP C-Terminus.....	78
4.3.4	Wirkung von synthetischem AICD auf die Sulfatid-Synthese.....	80
4.3.5	Einfluss von endogenem AICD auf die Sulfatid-Synthese.....	81
4.3.6	Auswirkung von Fe65 auf die Gal3st1-Genexpression.....	82
4.3.7	Effekt von AICD auf die Sulfatid-Synthese in neuronalem Gewebe.....	83
4.3.8	Sulfatid-Synthese im murinen Alzheimer-Modell.....	86
4.3.9	Sulfatid-Synthese und Sulfatid-Degradation bei der Alzheimer-Erkrankung.....	87
4.4	<i>Der Einfluss der Sulfatide auf die APP-Prozessierung im Zellkultur-Modell.....</i>	89
4.4.1	Massenspektrometrische Analyse der Sulfatid-Inkooperation im Zellkultur-Modell.....	89
4.4.2	Beeinflussung der Zytotoxizität und Sekretionsleistung der Zellen durch Sulfatide.....	90
4.4.3	Veränderung des A β -Gehaltes im Zellkulturmedium nach Zugabe von Sulfatiden.....	91
4.4.4	Einfluss der Sulfatide auf die Degradation von A β	93
4.4.5	Einfluss der Sulfatide auf die Prozessierungsprodukte sAPP α und sAPP β	94

4.4.6	Einfluss der Sulfatide auf die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP	95
4.4.7	Einfluss der Sulfatide auf die amyloidogene Prozessierung	97
4.4.7.1	Veränderung der β -Sekretase durch Sulfatide.....	97
4.4.7.1.1	Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität durch Sulfatide.....	97
4.4.7.1.2	Einfluss der Sulfatide auf den Metabolismus der β -Sekretase.....	98
4.4.7.1.3	Einfluss der Sulfatide auf die subzelluläre Lokalisation von BACE1	100
4.4.7.2	Veränderung der γ -Sekretase durch Sulfatide.....	102
4.4.7.2.1	Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität durch Sulfatide	103
4.4.7.2.2	Einfluss von Sulfatiden auf den Proteingehalt von Nicastrin und Presenilin 1	104
4.4.7.2.3	Veränderung der Lipid Raft-Mikrodomänen durch Inkubation mit Sulfatiden	105
4.4.7.2.4	Beeinflussung der APP-Prozessierung innerhalb der Lipid Raft-Mikrodomänen.....	107
4.4.8	Effekt von Galactosylceramid auf die APP-Prozessierung.....	108
4.4.9	Veränderung der Sekretase-Aktivität durch Beeinflussung der endogenen Sulfatide in SH-SY5Y-Zellen	110
4.5	<i>Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide in vivo</i>	112
4.5.1	Einfluss der Sulfatide auf die γ -Sekretase-Aktivität in humanem <i>post mortem</i> Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten	112
4.5.2	Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide <i>in vivo</i> im Mausmodell	113
4.6	<i>Einfluss der Sulfatide auf die Aβ-Aggregation</i>	115
4.6.1	Rasterkraft-Mikroskopie von A β ₄₂ -Aggregaten nach Sulfatid-Anreicherung	115
4.6.2	Quantifizierung der A β ₄₂ -Aggregation unter dem Einfluss von Sulfatiden	116
4.7	<i>Zusammenfassung von Kooperationsprojekten mit Beteiligung im Rahmen der vorliegenden Arbeit</i>	118
4.7.1	Effekt verschiedener Phospholipide auf die α -Sekretase-Aktivität des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweges der Alzheimer-Erkrankung	118
4.7.2	Sind Phytosterine das bessere Cholesterin bei der Alzheimer-Erkrankung? Eine mechanistische Studie.	119
4.7.3	Der Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und die A β -Degradation bei der Alzheimer-Erkrankung	120
4.7.4	Vitamin E: Fluch oder Segen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung? Eine systematische Analyse des Einflusses von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Synthese und die A β -Degradation.....	122
4.7.5	Die aus der amyloidogenen, β - und γ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP entstehende APP-intrazelluläre Domäne reguliert die Nephrilysin-Expression.	124
4.7.6	Die Presenilin-abhängige APP-Prozessierung reguliert die Glucosylceramid-Synthese und ist im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung verändert.	125
4.7.7	Steigerung der PGC1 α -Genexpression über einen mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten Stoffwechselweg: Presenilin 1/APP/AICD.	126
5	DISKUSSION	128
5.1	<i>Sulfatid-Gehalt im Gehirn während des physiologischen Alterungsprozesses</i>	128
5.2	<i>Zerebraler Sulfatid-Gehalt bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen</i>	129
5.3	<i>Sulfatid-Gehalt im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten</i>	130
5.4	<i>ApoE und Sulfatide im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung</i>	135
5.5	<i>Sulfatid-Synthese und -Degradation im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung</i>	137
5.6	<i>Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch die γ-Sekretase und APP-Proteinfamilie</i>	141
5.6.1	Genregulatorische Wirkung von AICD	145
5.6.2	Einfluss von AICD auf die Sulfatid-Synthese	148
5.7	<i>Beeinflussung der APP Prozessierung durch Sulfatide</i>	153
5.7.1	Dosis-abhängige Reduktion des A β -Gehaltes durch Sulfatide im Zellkulturmodell	153
5.7.2	A β -Degradation nach Inkubation mit Sulfatiden.....	156
5.7.3	Einfluss der Sulfatide auf die APP-Prozessierung.....	156
5.7.3.1	Sulfatide reduzieren die β -Sekretase-Aktivität über zwei unabhängige Mechanismen	158
5.7.3.2	Sulfatide hemmen die γ -Sekretase Aktivität	162
5.7.3.3	Sulfatide beeinflussen die amyloidogene Prozessierung innerhalb der Lipid Rafts	165
5.7.3.4	Spezifität und Reproduzierbarkeit der Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide	167
5.7.3.4.1	Die Reduktion der A β -Synthese ist spezifisch für Sulfatide.....	167
5.7.3.4.2	Endogene Sulfatide beeinflussen die amyloidogene APP-Prozessierung.....	168

5.7.3.5	Sulfatide reduzieren die amyloidogene Prozessierung <i>in vivo</i>	169
5.8	<i>Beeinflussung der Aβ-Aggregation durch Sulfatide und andere Lipide</i>	171
5.9	<i>Sulfatide als therapeutischer Ansatz bei der Alzheimer-Erkrankung</i>	172
5.10	<i>Fazit und Ausblick</i>	175
6	LITERATURVERZEICHNIS	179
7	ANHANG	201
7.1	<i>Publikationen</i>	201
7.2	<i>Posterpräsentationen</i>	202
7.3	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	202
8	DANKSAGUNG	204

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>engl.: <u>angiotensin-converting enzyme</u></i>)
AD	Alzheimer-Erkrankung (<i>engl.: <u>Alzheimer's disease</u></i>)
ADAM	Disintegrin und Metalloproteinase (<i>engl.: <u>A Disintegrin And Metalloproteinase</u></i>)
AICD	APP-Intrazelluläre-Domäne (<i>engl.: <u>APP intracellular domain</u></i>)
Ang II	Angiotensin II
Aph1	Anterior pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloides Vorläuferprotein (<i>engl.: <u>Amyloid Precursor Protein</u></i>)
ASA	Arylsulfatase A
Aβ	Amyloid-β-Peptid
BACE1	<i>engl.: <u>β-site APP cleaving enzyme 1</u></i>
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin, Bicinchoninsäure
BSA	Rinderalbumin (<i>engl.: <u>bovine serum albumin</u></i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	<i>engl. <u>collisionally activated dissociation gas</u></i>
cDNA	<i>engl.: <u>complementary DNA</u></i>
CE	<i>engl. <u>collision energy</u></i>
CERAD	<i>engl. <u>Consortium to Establish A Registry for Alzheimer's Disease</u></i>
CGT	Ceramid-Galactosyltransferase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CST	Cerebrosid-Sulfotransferase
CTF	C-terminales Fragment
CUR	<i>engl. <u>curtain gas</u></i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
CXP	<i>engl. <u>collision cell exit potential</u></i>
dd	bidestilliert
DHA	Docosahexaensäure (<i>engl.: <u>Docosahexaenoic acid</u></i>)
DMEM	„ <i>Dulbecco's modified Eagels Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnp	2,4-dinitrophenyl
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DP	<i>engl. <u>declustering potential</u></i>
ECE	Endothelin-konvertierendes Enzym (<i>engl.: <u>endothelin-converting enzyme</u></i>)
ECL	<i>engl.: <u>enhanced-chemo-luminescence</u></i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl.: <u>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</u></i>
engl.	englisch
EOAD	<i>engl. <u>early onset Alzheimer's disease</u></i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EP	<i>engl. <u>entrance potential</u></i>
EPA	Eicosapentaensäure (<i>engl. <u>eicosapentaenoic acid</u></i>)
ESI	<i>engl. <u>electrospray ionization</u></i>
<i>et al.</i>	und weitere
FAD	Familiäre Alzheimer-Erkrankung (<i>engl. <u>familial Alzheimer's disease</u></i>)
FCS	fetales Kälber-Serum (<i>engl. <u>fetal calf serum</u></i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FRET	<i>engl.: Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GalCer	Galactosylceramid
GD3S	GD3-Synthase
GlucCer	Glukosylceramid
GS1	<i>engl. Ion Source Gas 1</i>
GS2	<i>engl. Ion Source Gas 2</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie (<i>engl.: genome-wide association study</i>)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure; Puffersubstanz
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	<i>engl. high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.: Horseradish Peroxidase</i>)
IDE	Insulin-degradierendes Enzym (<i>engl.: insulin-degrading enzyme</i>)
ihe	<i>engl. interface heater</i>
Inh.	Inhibitor
IP	Immunpräzipitation
IS	<i>engl. ion spray</i>
JIP1	<i>engl. Janus kinase interacting protein 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KD	Knock-Down
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kDa	Kilodalton (atomare Masseinheit)
Kontr.	Kontrolle
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LOAD	<i>engl. late onset Alzheimer's disease</i>
LRP1	<i>engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
m	milli oder männlich
M	Molar
m/z	Masse durch Ladung
mA	Milliampere
MCI	<i>engl. mild cognitive impairment</i>
MEF	Embryonale Mausfibroblasten (<i>engl. mouse embryonic fibroblast</i>)
MEM	<i>engl. minimum essential medium</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
MINT1	<i>engl. neuronal munc18-1-interacting protein 1</i>
ml	Milliliter
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	<i>engl. matrix metalloproteinase</i>
MRM	<i>engl. multi reaction monitoring</i>
mRNS	Boten (<i>engl. messenger</i>)-Ribonukleinsäure
n. s.	nicht signifikant
N2a	Neuroblastomzelllinie-2a (Neuro-2a)
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nedd8	<i>engl. neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8</i>
NEM	N-Ethylmaleimide
NEP	Nepriylisin
NEXT	<i>engl. notch extracellular truncation</i>

NFTs	<i>engl. neurofibrillary tangles</i>
ng	Nanogramm
NICD	Intrazelluläre Domäne von Notch (<i>engl. notch intracellular domain</i>)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-40	<i>engl. Nonidet P40 Substitut</i>
Nr.	Nummer
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
OD	optische Dichte
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEN2	<i>engl. presenilin enhancer 2</i>
PGC1 α	<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNF	postnukleäre Fraktionen
PNPP	para-Nitrophenyl Phosphat
PPAR α	<i>engl. peroxisome proliferator-activated receptors α</i>
PS	Presenilin
PS	Phosphatidylserin
Psi	<i>engl. pound-force per square inch</i>
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren <i>engl. poly unsaturated fatty acids</i>
Q	Quadrupol
qRT-PCR	<i>engl. quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RIP	Regulierte-intramembranöse-Proteolyse (<i>engl. regulated intramembrane proteolysis</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: real-time PCR</i>)
sAPP α	<i>engl. soluble α-secreted APP</i>
sAPP β	<i>engl. soluble β-secreted APP</i>
SDS-PAGE	<i>engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
Sek	Sekunden
shRNS	<i>engl. short hairpin RNA</i>
siRNS	<i>engl. small interfering RNA, siRNA</i>
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
sog.	sogenannt
SPT	Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase
Std	Stunden
TBS	<i>engl. Tris-buffered saline</i>
TEM	<i>engl. temperature</i>
Tm	<i>engl. melting temperature</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
ü. N.	über Nacht
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v. a.	vor allem
v/v	Volumen / Volumen
w	weiblich
W	Watt
w/v	Gewicht / Volumen
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid
α -CTF	<i>engl. α-cleaved C-terminal fragment</i>
β -CTF	<i>engl. β-cleaved C-terminal fragment</i>

Nukleinbasen		Aminosäuren		Gensymbol	kodiertes Protein
A	Adenin	A	Alanin	<i>ACTB</i>	β-Aktin
C	Cytosin	R	Arginin	<i>APBB1</i>	Fe65
G	Guanin	N	Asparagin	<i>ARSA</i>	ASA
T	Thymin	D	Asparaginsäure	<i>BACE1</i>	BACE1
U	Uracil	C	Cystein	<i>GAL3ST1</i>	CST
		Q	Glutamin	<i>UGT8a</i>	CGT
		E	Glutaminsäure		
		G	Glycin		
		H	Histidin		
		I	Isoleucin		
		L	Leucin		
		K	Lysin		
		M	Methionin		
		F	Phenylalanin		
		P	Prolin		
		S	Serin		
		T	Threonin		
		W	Tryptophan		
		Y	Tyrosin		
		V	V Valin		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung	9
Abbildung 2: Darstellung der Sulfatid-Homöostase.	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zielsetzung der Arbeit.	20
Abbildung 4: Darstellung der prozentualen Veränderung der Sulfatide in humanen Proben aus dem Frontallappen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer Kontroll-Population.	69
Abbildung 5: Gesamt-Sulfatid-Gehalt in Abhängigkeit des Braak-Stadiums.	70
Abbildung 6: Massenspektrometrische Analyse der einzelnen Sulfatidspezies aus humanen Proben des Frontallappens von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer Kontroll-Population.	71
Abbildung 7: Darstellung des Sulfatid-Gehaltes in Abhängigkeit vom Alter der Patienten.	72
Abbildung 8: Massenspektrometrie der Sulfatid-Hauptspezies d18:1/24:1 in PS 1/2 ^{-/-} MEF Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe PSr.	73
Abbildung 9: Sulfatid-de novo-Synthese in Presenilin-defizienten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.	73
Abbildung 10: Genexpression der Ugt8a und Gal3st1 in MEF PSr im Vergleich zu MEF PS 1/2 ^{-/-}	74
Abbildung 11: Einfluss des γ -Sekretase Inhibitors DAPT auf die Genexpression der Gal3st1.	75
Abbildung 12: Einfluss der APP/APLP2-Defizienz auf den Sulfatid-Gehalt und die Sulfatid-de novo-Synthese.	76
Abbildung 13: Genexpression von Gal3st1 und Ugt8a in MEF wt-Zellen im Vergleich zu APP/APLP2-defizienten Zellen bzw. SH-SY5Y wt-Zellen im Vergleich zu APP-defizienten Zellen.	77
Abbildung 14: Einfluss von A β auf die Genexpression der Ugt8a und Gal3st1 in MEF APP/ APLP2 ^{-/-} -Zellen.	78
Abbildung 15: Einfluss des C-terminal verkürzten APP auf den Sulfatid d18:1/24:1-Spiegel in MEF-Zellen.	79
Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Änderung der Ugt8a- und Gal3st1-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu MEF wt-Zellen.	80
Abbildung 17: Ugt8a- und Gal3st1-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen nach Inkubation mit AICD.	80
Abbildung 18: Gal3st1-Promotoraktivität nach Inkubation von MEF APP Δ CT15-Zellen mit AICD.	81
Abbildung 19: Einfluss des APP-C50-Fragments auf die Sulfatid-Synthese.	82
Abbildung 20: Einfluss von Fe65 auf die Sulfatid-Synthese.	83
Abbildung 21: Gesamt Sulfatid-Spiegel aus murinem Hippocampus-Gewebe.	84
Abbildung 22: Gal3st1-Genexpression in murinem Hippocampus-Gewebe von APP ^{-/-} -Mäusen und APP Δ CT15-Mäusen.	85
Abbildung 23: Korrelation der Gal3st1-Genexpression mit dem APP-Proteingehalt in humanem post-mortem Gehirngewebe.	86
Abbildung 24: Analyse der Gal3st1-Genexpression im murinen Alzheimer-Modell.	87
Abbildung 25: Veränderung der Gal3st1- und Ugt8a-Genexpression in post mortem Gehirn-Gewebe aus dem Temporal- und Frontallappen von Alzheimer-Patienten.	88
Abbildung 26: Analyse der Genexpression der ARSA bei Alzheimer-Patienten.	89
Abbildung 27: Gesamt-Sulfatid-Gehalt nach Inkubation mit 20 μ M Sulfatid-Gemisch über 24 Std.	90
Abbildung 28: Bestimmung der Zellviabilität und SEAP-Sekretion nach Inkubation mit 20 μ M Sulfatid-Gemisch.	91
Abbildung 29: A β -Gehalt im Medium von SH-SY5Y APP-Zellen nach Inkubation mit Sulfatid-Gemisch.	92
Abbildung 30: Prozentuale Reduktion des A β ₄₀ und A β ₄₂ nach Inkubation mit Sulfatiden.	93
Abbildung 31: A β -Degradation nach Inkubation mit Sulfatiden 20 μ M.	94
Abbildung 32: sAPP α - und sAPP β -Proteinkonzentration nach Inkubation mit Sulfatiden.	95
Abbildung 33: Einfluss von Sulfatiden auf die α -Sekretase-Aktivität und Proteinlevel der α -Sekretase.	96
Abbildung 34: β -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Sulfatiden auf PNFs bzw. in lebenden Zellen.	98

Abbildung 35: Veränderung des BACE1-Proteingehaltes nach Inkubation mit Sulfatiden in Folge einer vermehrten lysosomalen Proteindegradation.	99
Abbildung 36: Reduzierte β -Sekretase-Aktivität und BACE1-Proteingehalt im endosomalen Kompartiment.	101
Abbildung 37: Verschiebung von BACE1 aus dem endosomalen Kompartiment in Richtung der Plasmamembran nach Inkubation mit Sulfatiden.....	102
Abbildung 38: Veränderung des β -CTF-Proteingehaltes durch Inkubation mit Sulfatiden.	103
Abbildung 39: Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität durch Inkubation mit Sulfatiden.	104
Abbildung 40: Auswirkung der Sulfatid-Inkubation auf den Proteingehalt der Komponenten der γ -Sekretase.	105
Abbildung 41: Einfluss von Sulfatiden auf die Raft-Fraktionen.	106
Abbildung 42: Einfluss der Inkubation von Sulfatiden auf das Raft/Non-Raft-Verhältnis von Sulfatiden und Cholesterin.	107
Abbildung 43: Amyloidogene Prozessierung in Raft- und Non-Raft-Fraktionen nach Inkubation mit Sulfatiden.	108
Abbildung 44: Auswirkung der Inkubation mit GalCer auf den A β -Gehalt im Medium und die Aktivität der β - und γ -Sekretase in lebenden Zellen.	109
Abbildung 45: Überprüfung der Effizienz der ARSA-KD (stabil) bzw. der Gal3st1-KD (transient) der verwendeten Zelllinien.....	110
Abbildung 46: Einfluss des ARSA- bzw. Gal3st1-KD auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase.....	111
Abbildung 47: γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit 20 μ M Sulfatiden auf PNFs von post mortem Alzheimer-Gehirngewebe.	112
Abbildung 48: Sulfatid-Gehalt im Gehirngewebe von ARSA ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu den heterozygoten ARSA ^{+/-} -Mäusen.....	113
Abbildung 49: Einfluss des ARSA-Knock-out auf die APP-Prozessierung im Maushirn-Homogenat.	114
Abbildung 50: Rasterkraft-Mikroskopie von A β ₄₂ -Fibrillen.....	116
Abbildung 51: Aggregation von synthetischem A β ₄₂ unter Einfluss von Sulfatiden bzw. Ceramiden.	117
Abbildung 52: Schematische Zusammenfassung des Effekts von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation.....	121
Abbildung 53: Zusammenfassende Darstellung der Effekte der Tocopherole auf die amyloidogene Prozessierung und die A β -Degradation.	123
Abbildung 54: Multifaktorielle Ursache des reduzierten Sulfatid-Gehaltes bei der Alzheimer-Erkrankung.	141
Abbildung 55: Schematische Darstellung der Unterschiede der verwendeten MEF-Zelllinien. Dargestellt werden die Unterschiede zwischen den MEF PS1/2 ^{-/-} -Zellen und den MEF APP/APLP2 ^{-/-} -Zellen...	143
Abbildung 56: Modell zur genregulatorischen Wirkung von AICD am Beispiel von NEP.....	147
Abbildung 57: Schematische Darstellung des Einflusses von AICD und A β auf den Sphingolipidstoffwechsel.....	153
Abbildung 58: Mechanismus der Inhibition der β -Sekretase durch Sulfatide.....	162
Abbildung 59: Gegenüberstellung der Strukturformeln von Sulfatiden im Vergleich zu PI-Diphosphat...	164
Abbildung 60: Positiver Einfluss der Sulfatide auf die pathophysiologischen Prozesse der Alzheimer-Erkrankung.....	173
Abbildung 61: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Sulfatiden und der APP-Prozessierung.	178

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle I:</i> Kooperationen die zum Inhalt dieser Arbeit beigetragen haben.....	XII
Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	21
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.....	24
Tabelle 3: Spezifikationen der verwendeten humanen <i>post mortem</i> Gehirnproben	26
Tabelle 4: Murines in vivo Material.....	28
Tabelle 5: Zelllinien	29
Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien.....	30
Tabelle 7: Inkubationsbedingungen für APP-Prozessierungsprodukte:	35
Tabelle 8: qRT-PCR Protokoll.....	41
Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen.	41
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Konzentration für die jeweilige Immunpräzipitation.....	46
Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper inkl. Inkubationsbedingungen für den immunologischen Proteinnachweis.....	48
Tabelle 12: Filtersystem für A β -Monomere.....	51
Tabelle 13: Fluorometer-Einstellungen für ThT-Analyse	53
Tabelle 14: Antikörper zur Detektion von A β ₄₂ -Aggregaten	54
Tabelle 15: Konzentration des Substrates und eingesetzte Proteinmenge bei der fluorometrischen Messung der unterschiedlichen Sekretase-Aktivitäten.....	56
Tabelle 16: Einstellung des Fluorometers zur Detektion der unterschiedlichen Sekretase-Aktivitäten.....	57
Tabelle 17: Substrat-Konzentration und Einstellungen für die fluorometrische Messung der Sekretase-Aktivitäten von lebenden Zellen	58
Tabelle 18: Substratkonzentration und Einstellung des Fluorometers zur Analyse von Neprilysin	60
Tabelle 19: Einstellungen des Massenspektrometers zur Detektion von Sulfatiden.....	63
Tabelle 20: Molekülspezifische Parameter für die MRM-Analyse von Sulfatidspezies.....	64
Tabelle 21: Gegenüberstellung der Gewebeeigenschaften der Kontroll- und der Alzheimergruppe. Alle Proben wurden dem Kortex des Frontallappen entnommen. Statistische Analyse mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Tests (n. s. $p > 0,05$).....	68
Tabelle 22: Literatur-Zusammenfassung: Sulfatid-Gehalt im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten. Zusammenfassung der bisherigen Literatur über die Veränderungen des zerebralen Sulfatid-Gehaltes im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung.....	131

Kooperationen

Die Erhebung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, wäre ohne die enge Kooperation in unserer Arbeitsgruppe nicht in diesem Umfang möglich gewesen. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die experimentellen Beiträge der einzelnen Personen. Sind Ergebnisse in Rahmen von Kooperationen entstanden findet dies zusätzlich namentliche Erwähnung in der jeweiligen Abbildungsunterschrift des Ergebnisteils, sowie unter den entsprechenden Kapiteln des Methodenteils.

Tabelle I: Kooperationen die zum Inhalt dieser Arbeit beigetragen haben. Dargestellt werden die jeweiligen Tätigkeiten der beteiligten Personen in chronologischer Abfolge der Abbildungen (Abbildung) des Ergebnisteils.

Abbildung	Tätigkeit	Beteiligte Personen
<i>allgemein</i>	Betreuung, Versuchsplanung Korrekturlesen Bereitstellung von murinem Material	Prof Dr. Marcus Grimm, Dr. Heike Grimm, Dr. Janine Mett Prof Dr. Marcus Grimm, Dr. Daniel Grün Prof. Dr. U. Müller, PD. Dr. K. Endres, PD. Dr. M. Eckhardt
<i>Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6 & Abbildung 7</i>	Gewebeaufbereitung Massenspektrometrische Messung	Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann, Dr. Sven Grösgen
<i>Abbildung 8</i>	Zellkultur & Probenvorbereitung Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 9</i>	Zellkultur und Inkubation Sulfatid-Synthese Versuch	Valerie Zimmer Valerie Zimmer, Dr. Benjamin Hundsdörfer
<i>Abbildung 10 & Abbildung 11</i>	Zellkultur RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 12a</i>	Zellkultur & Probenvorbereitung Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 12b</i>	Zellkultur und Inkubation Sulfatid-Synthese Versuch	Valerie Zimmer Valerie Zimmer, Dr. Benjamin Hundsdörfer
<i>Abbildung 13</i>	Zellkultur & Probenvorbereitung RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 14</i>	Zellkultur und Inkubation RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Sven Grösgen Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 15</i>	Zellkultur & Probenvorbereitung Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 16</i>	Zellkultur RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Anna Lauer, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 17</i>	Zellkultur und Inkubation RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Benjamin Hundsdörfer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 18</i>	Zellkultur und Promotoraktivitätsversuch	Dr. Janine Mett, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 19</i>	Zellkultur Massenspektrometrische Messung RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 20</i>	Zellkultur RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 21</i>	Gewebeaufbereitung Massenspektrometrische Messung	Dr. Christoph Stahlmann, Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann

Abbildung	Tätigkeit	Beteiligte Personen
<i>Abbildung 22</i>	Gewebeaufbereitung RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Christoph Stahlmann, Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 23</i>	Gewebeaufbereitung, Proteingehalt RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Anna Lauer Anna Lauer, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 24</i>	Gewebeaufbereitung RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 25</i> & <i>Abbildung 26</i>	Gewebeaufbereitung RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer Dr. Sven Grösgen, Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 27</i>	Zellkultur und Inkubation Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 28</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung der Zytotoxizität SEAP-Sekretionsversuch	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 29</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des A β -Gehaltes	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 30</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des A β_{40} - und A β_{42} -Gehaltes	Valerie Zimmer Dr. Janine Mett, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 31</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung der A β -Degradation	Valerie Zimmer Dr. Janine Mett, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 32</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des sAPP α - und sAPP β -Proteingehaltes	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 33</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität ADAM 10- und ADAM 17-Proteingehaltes	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 34</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 35</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des BACE1-Proteingehaltes Inkubation mit Cyloheximid bzw. Chloroquin RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Valerie Zimmer Valerie Zimmer, Dr. Viola Hauptenthal Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 36</i>	Zellkultur und Inkubation Endosomenpräparation Bestimmung des Proteingehaltes Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität	Valerie Zimmer Dr. Tatjana Rothhaar Dr. Tatjana Rothhaar, Valerie Zimmer Zimmer Dr. Tatjana Rothhaar
<i>Abbildung 37</i>	Zellkultur und Inkubation Biotinylierung von BACE1 an der Plasmamembran BACE1 in den Endosomen	Valerie Zimmer Valerie Zimmer Dr. Tatjana Rothhaar, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 38</i>	Zellkultur und Inkubation β -CTF-Gehalt mit und ohne Inhibitor	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 39</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität	Valerie Zimmer

Abbildung	Tätigkeit	Beteiligte Personen
<i>Abbildung 40</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des Presenilin- bzw. Nicastrin-Proteingehaltes	Valerie Zimmer Valerie Zimmer, Dr. Janine Mett
<i>Abbildung 41</i>	Zellkultur und Inkubation Lipid Raft-Präparation und Bestimmung des Proteingehaltes	Valerie Zimmer Dr. Viola Haupenthal, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 42</i>	Zellkultur und Inkubation Lipid Raft-Präparation und Bestimmung des Cholesteringehaltes Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Viola Haupenthal, Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 43</i>	Zellkultur und Inkubation Lipid Raft-Präparation, Bestimmung des Proteingehaltes und der Sekretase-Aktivität	Valerie Zimmer Dr. Viola Haupenthal, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 44</i>	Zellkultur und Inkubation Bestimmung des A β -Gehaltes Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 45</i>	Zellkultur und Transfektion von ARSA-KD Transiente Transfektion für Gal3st1-KD RNS-Isolation, cDNS-Synthese, RT-PCR	Valerie Zimmer Dr. Janine Mett Dr. Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 46</i>	Zellkultur und Transfektion von ARSA-KD Transiente Transfektion für Gal3st1-KD Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten	Valerie Zimmer Dr. Janine Mett Dr. Viola Haupenthal, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 47</i>	<i>In vitro</i> Inkubation mit Sulfatiden Bestimmung der Sekretase-Aktivität	Valerie Zimmer Dr. Tatjana Rothhaar, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 48</i>	Gewebeaufbereitung Massenspektrometrische Messung	Valerie Zimmer Dr. Christoph Stahlmann
<i>Abbildung 49</i>	Gewebeaufbereitung Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten Bestimmung des Proteingehaltes	Valerie Zimmer
<i>Abbildung 50</i>	<i>In vitro</i> Inkubation mit Sulfatiden Monomerisierung von synthetischem A β ₄₂ ÁFM-Aufnahmen	Valerie Zimmer Dr. Benjamin Hundsdörfer, Valerie Zimmer Dr. Benjamin Hundsdörfer
<i>Abbildung 51a und 51b</i>	Monomerisierung von synthetischem A β ₄₂ <i>In vitro</i> Inkubation mit Sulfatiden ThT-Messung	Lukas Schwarz Valerie Zimmer, Lukas Schwarz, Valerie Zimmer
<i>Abbildung 51c</i>	Dot Blot-Analyse	Lukas Schwarz, Valerie Zimmer

1 Zusammenfassung

1.1 Der bidirektionale Zusammenhang zwischen Sulfatiden und den molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung die durch Ablagerung von extrazellulären senilen Plaques gekennzeichnet ist. Den Hauptbestandteil dieser Plaques bildet das Peptid Amyloid- β (A β), welches durch die sequentielle Proteolyse des Amyloiden Vorläufer Proteins (APP) entsteht (MASTERS et al., 1985). Die amyloidogene Prozessierung von APP erfolgt im ersten Schritt durch die β -Sekretase BACE1. Die nicht-amyloidogene Prozessierung wird alternativ durch den Schnitt der α -Sekretase initiiert (ZHANG et al., 2012). Die in der Membran verbliebenen Fragmente werden anschließend durch den Multienzymkomplex der γ -Sekretase geschnitten. Dabei entstehen bei der amyloidogenen Prozessierung A β -Peptide unterschiedlicher Länge, während durch die nicht-amyloidogene Prozessierung die Entstehung von A β verhindert wird (DULIN et al., 2008). In beiden Fällen wird zusätzlich die APP-intrazelluläre-Domäne (AICD) gebildet. APP und seinen Prozessierungsprodukten, insbesondere AICD, werden neben der pathologischen Bedeutung bei der Alzheimer-Erkrankung auch wichtige physiologische Funktionen zugeschrieben (LI et al., 1997; ROBINSON et al., 2014), wobei insbesondere die genregulatorische Funktion von AICD vielfach diskutiert wurde (LAUER et al., 2020). APP und die an der Proteolyse beteiligten Enzyme gehören zur Gruppe der Transmembranproteine, sodass durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membranen die APP-Prozessierung beeinflusst werden kann. Dies konnte für einige Lipide bereits gezeigt werden (GRIMM et al., 2011b; PUGLIELLI et al., 2003). Umgekehrt wirken sich die Prozessierungsprodukte von APP auch auf den Metabolismus verschiedener Lipide aus (GRIMM et al., 2005; GRIMM et al., 2011a).

Sulfatide gehören zur Gruppe der Sphingolipide und sind ein wichtiger Membranbestandteil insbesondere der Lipid Rafts des Zentralnervensystems (BLOMQVIST et al., 2002). Die Sulfatid-Synthese erfolgt durch die beiden Enzyme Ceramid-Galactosyltransferase (CGT) und Cerebrosid-Sulfotransferase (CST), wobei letztere den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert (HIRAHARA et al., 2000). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass der Sulfatid-Gehalt im Gehirn von Alzheimer-Patienten bereits in frühen Stadien der Erkrankung reduziert ist, während andere dies nicht bestätigen konnten (CHENG et al., 2013; HAN et al., 2002; GÓNZALEZ DE SAN ROMÁN et al., 2017). Es blieb dabei unklar, ob dies Ursache oder Konsequenz der Alzheimer-Erkrankung ist was im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert wurde.

Diese Arbeit untersuchte zunächst verschiedene Zellkulturmodelle, welche eine Defizienz für die APP-Proteinfamilie oder Presenilin aufwiesen. Es ließ sich dort eine Steigerung der Sulfatid-Synthese, des

Sulfatid-Gehaltes und der Genexpression der beteiligten Enzyme CGT und CST nachweisen. Diese Veränderungen konnten mit Hilfe verschiedener Methoden dem Effekt von AICD zugeordnet werden. Eine Erhöhung von AICD in der Zelle, sowohl durch Zugabe von synthetischem AICD als auch durch Überexpression dieses APP-Fragments, führte dabei zu einer Reduktion der Genexpression der CST. Im Promotoraktivitätsversuch ließ sich zudem eine reduzierte Promotoraktivität der CST in Folge einer Inkubation mit AICD verzeichnen. In einem Mausmodell konnte die *in vivo* Relevanz dieser Ergebnisse in murinem Gehirngewebe bestätigt werden. Die APP-Prozessierung scheint somit einen direkten Einfluss auf die Sulfatid-Synthese zu besitzen.

Sulfatide führten umgekehrt im Zellkulturversuch zur Reduktion des sezernierten A β . Ursächlich zeigte sich dabei eine verringerte amyloidogene Prozessierung, während die nicht-amyloidogene Prozessierung und die A β -Degradation nicht durch Sulfatide beeinflusst wurden. Mechanistisch konnte beobachtet werden, dass Sulfatide den BACE1-Proteingehalt und die β -Sekretase-Aktivität durch eine verstärkte Degradation des Enzyms und eine Reduktion des endosomalen BACE1 vermindern können. Sulfatide inhibieren außerdem die γ -Sekretase-Aktivität direkt, sowie indirekt durch eine Umverteilung aus den Raft-Regionen in die non-Raft-Regionen. Die Beeinflussung der β - und γ -Sekretase durch Sulfatide ließ sich zusätzlich *in vivo* in murinem Hirngewebe bestätigen. *In vitro* bewirkte außerdem ein erhöhter Sulfatid-Gehalt eine Verzögerung der A β ₄₂-Aggregation und eine Reduktion der toxischen Oligomere.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der zerebralen Sulfatide im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung eine verstärkte amyloidogene Prozessierung und gesteigerte A β ₄₂-Aggregation bedingen sodass die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung gefördert werden könnten. Die daraus resultierende gesteigerte Bildung von AICD könnte zusätzlich den Verlust der Sulfatide durch eine Hemmung der Synthese verstärken, sodass ein *circulus vitiosus* die Folge wäre. Umgekehrt könnte somit die Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine therapeutische Option darstellen.

1.2 Bidirectional link between sulfatides and the molecular mechanisms of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease characterized by the deposition of extracellular senile plaques. The main component of these plaques is amyloid- β ($A\beta$) peptide, which is formed by the sequential proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) (MASTERS et al., 1985). Two different processing pathways exist. In the amyloidogenic processing β -secretase BACE1 starts the cleavage, whereas the non-amyloidogenic pathway is initiated by the α -secretase (ZHANG et al., 2012). The multi-enzyme complex of the γ -secretase then catalyzes the subsequent proteolysis of the remaining membrane fragments. During the amyloidogenic processing $A\beta$ -peptides of different lengths are formed by the γ -secretase, while the non-amyloidogenic processing prevents the formation of $A\beta$ (DULIN et al., 2008). In both cases, the APP-intracellular domain (AICD) is released to the cytosol. APP and its processing products, particularly AICD, are believed to have important physiological functions beside their relevance in Alzheimer's disease (LI et al., 1997; ROBINSON et al., 2014). In this context AICD is discussed to influence transcriptional gene regulation (LAUER et al., 2020). Both, APP and the former mentioned secretases, are transmembrane proteins, suggesting that APP processing is influenced by lipid composition of the cellular membranes. This has already been proofed for some lipids (GRIMM et al., 2011b; PUGLIELLI et al., 2003). Conversely, the processing products of APP also affect the metabolism of various lipid classes like cholesterol or sphingolipids (GRIMM et al., 2005; GRIMM et al., 2011a).

Sulfatides belong to the group of sphingolipids and are important membrane components, especially in the lipid rafts of the central nervous system (BLOMQVIST et al., 2002). Sulfatide synthesis is mediated by the enzymes ceramide galactosyltransferase (CGT) and cerebroside sulfotransferase (CST), the latter catalyzing the rate-limiting step of the sulfatide synthesis (HIRAHARA et al., 2000). Several studies reported that sulfatide content in the brain of Alzheimer's patients is already reduced in the early stages of the disease (CHENG et al., 2013; HAN et al., 2002; GÓNZALEZ DE SAN ROMÁN et al., 2017). Nevertheless, it remains unclear whether this is cause or consequence of Alzheimer's disease. Investigating this controversy was one of the aims of this project.

This work first investigated various cell culture models with deficiency for the APP protein family or presenilin. An increase in sulfatide synthesis, sulfatide content and gene expression of the involved enzymes CGT and CST was detected. Using various methods, these changes could be attributed to the effect of AICD. Increased AICD level, through the addition of synthetic AICD as well as overexpression of the APP fragment, led to a reduced CST gene expression. Moreover, promoter assays revealed a decrease of CST promoter activity in the presence of AICD. Similar findings were also obtained when analyzing murine brain tissue, pointing at the great *in vivo* relevance and thus indicating that sulfatide synthesis is directly influenced by APP-processing.

On the other hand, we observed that, through an inhibition of the amyloidogenic processing, sulfatides reduce the A β level in cell culture experiments, whereas the non-amyloidogenic pathway and A β degradation remained unaffected. Mechanistically, sulfatides decreased BACE1 protein levels and β -secretase activity by accelerating enzyme degradation and reducing endosomal BACE1. Furthermore, sulfatides inhibited γ -secretase activity directly as well as indirectly by shifting the secretase from raft regions to non-raft regions. The effect of sulfatides on β - and γ -secretase was also confirmed *in vivo* in murine brain tissue. In addition, elevated sulfatide level caused a delay in A β_{42} aggregation and reduction of toxic oligomers *in vitro*.

In conclusion, the loss of cerebral sulfatides in Alzheimer's disease could result in enhanced amyloidogenic processing and A β_{42} aggregation and consequently accelerate the disease pathophysiological processes. The increased formation of AICD could further promote the loss of sulfatides, resulting in a vicious circle. Raising cerebral sulfatide concentration in Alzheimer's patients therefore represents a promising therapeutic option.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Es wird geschätzt, dass derzeit ca. 55 Millionen Menschen weltweit an Demenz erkrankt sind, wobei jeder siebte Tod mit einer Demenz assoziiert ist (GAUTHIER, 2021). Circa 60–80 % der Demenzkranken leiden dabei an der Alzheimer-Erkrankung, womit diese die häufigste Ursache der Demenz darstellt (PRINCE et al., 2015). Im Rahmen des Demographischen Wandels schätzt man, dass die Zahl der Erkrankungen bis zum Jahr 2050 auf 131 Millionen ansteigen wird (PRINCE et al., 2015).

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine langsam fortschreitende, neurodegenerative Erkrankung die zu einem stetigen Abbau der kognitiven Leistungen führt. Frühe Symptome der Erkrankung zeigen sich häufig in Form von Wortfindungsstörungen, Einschränkungen des Kurzzeitgedächtnisses und der räumlichen Orientierung (MCKHANN et al., 2011). Im späteren Verlauf verschlechtern sich insbesondere die kortikalen Funktionen, sodass typische Symptome wie Apraxie, Agnosie und eine langsam progrediente Aphasie auftreten (ATRI, 2019). Nach einem jahrelangen Prozess stellen Sekundärerkrankungen im Rahmen der Bettlägerigkeit, beispielsweise Pneumonien oder Harnwegsinfekte, die häufigste Todesursache dar (BRUNNSTRÖM, ENGLUND, 2009; DASCH et al., 2018). Man unterteilt die Erkrankung heute in drei Stadien. Die präklinische Alzheimer-Erkrankung, die ohne spürbare Symptome einhergeht, kann schon Jahre vor Symptombeginn mit Hilfe von Biomarkern und radiologischer Bildgebung diagnostiziert werden (DUBOIS et al., 2016; JACK et al., 2009). Das sich anschließende Stadium des „Mild Cognitive Impairment“, kurz MCI, ist gekennzeichnet durch geringfügige Defizite der Patienten, diese dürfen den Alltag jedoch noch nicht merklich beeinflussen (MUKADAM, 2018). In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass etwa 50 % der MCI-Patienten innerhalb von vier Jahren eine Alzheimer-Demenz entwickeln (PETERSEN et al., 1999). Die kognitive Leistungsfähigkeit der MCI-Patienten zeigt sich bei neuropsychologischen Testungen insbesondere in der Gedächtnissfunktion beeinträchtigt, während die Patienten mit einer Alzheimer-Demenz auch in anderen Leistungsbereichen schlecht abschnitten (PETERSEN et al., 1999). Im dritten Stadium der Erkrankung, der manifesten Alzheimer-Demenz, sind die Patienten nicht mehr in der Lage ihren Alltag ohne fremde Hilfe alleine zu bewältigen (JACK et al., 2009). Wegen der hohen Pflegebedürftigkeit der Patienten ist der sozioökonomische Aspekt der Erkrankung groß.

Aufgrund dieser Umstände beschäftigt sich die Forschung seit vielen Jahren mit der Therapie der Erkrankung. Die einzige bis heute zugelassene Therapie besteht in einer symptomatischen Behandlung mit dem NMDA-Rezeptorantagonist Memantin oder Acetylcholinesterase-Inhibitoren (z. B. Rivastigmin oder Donepezil) (KIM, FACTORA, 2018), wodurch der Zeitpunkt des Verlustes der Selbstständigkeit um wenige Monate herausgezögert werden kann. Eine Kombinationstherapie erscheint dabei der Monotherapie überlegen zu sein (GUO et al., 2020). Obwohl zahlreiche Studien mit dem Ziel einer kausalen

Therapiemöglichkeit initiiert wurden, waren die Ergebnisse der Forschungsarbeiten der letzten Jahre meist negativ ausgefallen (DOODY et al., 2013; SALLOWAY et al., 2014). Eine erst kürzlich publizierte Arbeit konnte zwar durch die Gabe eines speziellen gegen Amyloid β gerichteten Antikörper den kognitiven Abbau leicht verzögern, jedoch traten hierunter auch merkliche Nebenwirkungen auf (VAN DYCK et al., 2022). Maßgeblich für die häufig fehlende Wirksamkeit scheint u. a. der zu späte Beginn der Therapie bei bereits erkrankten Patienten zu sein (SPERLING et al., 2011). Das Erkennen von behandelbaren Risikofaktoren und frühen Vorzeichen der Alzheimer-Erkrankung spielt somit eine entscheidende Rolle. Neben den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren wie Alter, familiäre Belastung und dem Apolipoprotein E ϵ 4 (ApoE ϵ 4) -Genotyp, wurde zunehmend auch für modifizierbare Faktoren wie Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und Hypertonie eine Erhöhung des Alzheimer-risikos nachgewiesen (BAUMGART et al., 2015; BLECKWENN et al., 2017; KEHOE, WILCOCK, 2007; WHITMER, 2007). Interessanterweise zeigen neuere Studien, dass die Inzidenz der Alzheimer-Erkrankung durch die Optimierung der vaskulären Risikofaktoren in den letzten Jahren bereits gesunken ist. Unter den über 65-Jährigen konnte dabei eine Reduktion der Inzidenz um ca. 20 % innerhalb von 20 Jahren beobachtet werden (MATTHEWS et al., 2016). Dies unterstreicht die Relevanz von frühzeitigen, präventiven Maßnahmen zur Verminderung der Erkrankungshäufigkeit.

Die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung, auch „late onset Alzheimer Disease“ (LOAD), macht mit über 95 % den weit größten Teil der Erkrankten aus. Neben dieser Form gibt es auch eine familiäre Form der Erkrankung, die sogenannte (sog.) „early onset Alzheimer Disease“ (EOAD), die sich durch einen früheren Erkrankungsbeginn in der Regel deutlich vor dem 65. Lebensjahr, auszeichnet (CAMPION et al., 1999). Ursächlich für diese seltene Form der Erkrankung sind Mutationen im Amyloiden Vorläuferprotein (engl.: Amyloid precursor protein, APP) oder im Presenilin (PS), Proteine denen in der Pathogenese der Erkrankung eine entscheidende Funktion zugeschrieben wird (FILLEY et al., 2007; GROUP, 1995).

2.2 Molekulare Prozesse der Alzheimer-Erkrankung

In der neuropathologischen Untersuchung des Gehirns von Alzheimer-Patienten findet sich makroskopisch und radiologisch eine Erweiterung sowohl der äußeren als auch der inneren Liquorräume, welche auf eine ausgeprägte, kortikale Atrophie im Rahmen des neuronalen Zellverlustes zurückzuführen sind (TEN KATE et al., 2018). Zu den am frühesten betroffenen Hirnregionen gehören dabei der Hippocampus sowie der temporale- und parietale Kortex. In diesen Hirnregionen sind die entscheidenden Strukturen für den Erhalt einer regelrechten Gedächtnisfunktion lokalisiert (DICKERSON et al., 2001; HUBBARD, ANDERSON, 1981). Histopathologisches Merkmal der Alzheimer-Erkrankung sind die extrazellulären senilen Plaques und die intraneuronalen Bündel aus sog. Neurofibrillen (BEYREUTHER, MASTERS, 1997; GRUNDKE-IQBAL et al., 1986). Diese aus hyperphosphorylier-

tem Tau-Protein bestehenden Neurofibrillen (NFTs, *engl. neurofibrillary tangles*) können auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielweise der Frontotemporalen Demenz oder der Kortikobasalen Degeneration nachgewiesen werden, weswegen diese Erkrankungen auch unter dem Begriff der Tauopathien zusammengefasst werden (SAHA, SEN, 2019). Tau-Proteine dienen unter physiologischen Bedingungen insbesondere der Stabilisierung der Mikrotubuli, wobei diese Wechselwirkung in Folge der Hyperphosphorylierung im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse gestört wird (DRUBIN, KIRSCHNER, 1986; GOEDERT et al., 1993). Folge hieraus sind gestörte axonale Transportprozesse und die Ablagerung der NFTs was im Verlauf zu einem progredienten Zelluntergang führt (CONGDON, SIGURDSSON, 2018; IQBAL et al., 2005). Die Tauopathien unterscheiden sich insbesondere durch die unterschiedlichen Lokalisationen der Ablagerung, welche jeweils charakteristisch für eine bestimmte Erkrankung sind. Bei der Alzheimer-Erkrankung können NFTs zunächst im Entorhinalen-Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden. Mit fortschreitender Erkrankung weitet sich die Ablagerung auch auf andere Hirnregionen wie den Neocortex aus (BRAAK, BRAAK, 1991, 1997). Entsprechend dieser für die Alzheimer-Erkrankung typischen Verteilung, erfolgt auch die *post mortem* durchgeführte pathologische Einteilung in die sog. Braak-Stadien. Es gibt insgesamt sechs Braak-Stadien, wobei ein höheres Braak-Stadium mit einer stärkeren Tau-Pathologie einhergeht (BRAAK, BRAAK, 1991). Im Rahmen früherer Studien konnte ein enger Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von NFTs und der Schwere der Erkrankung nachgewiesen werden (ARRIAGADA et al., 1992).

Amyloid β ($A\beta$) stellt den Hauptbestandteil der extrazellulären senilen Plaques dar (MASTERS et al., 1985). Während Studien zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von $A\beta$ zu einer vermehrten Bildung von NFTs führt, kann umgekehrt durch die Steigerung der Tau-Synthese keine Ausbildung von senilen Plaques provoziert werden (GÖTZ et al., 2001; ODDO et al., 2007). Die Hypothese der Amyloid-Kaskade, die die gesteigerte Bildung von $A\beta$ an den Beginn der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung stellt, gewinnt daher zunehmend wissenschaftliche Evidenz (HURTADO et al., 2010). Mit der Ausbildung von senilen Plaques kommt es während des Krankheitsprozesses zu einer vermehrten Aktivierung der Gliazellen und gesteigerten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in deren Umgebung (BOLÓS et al., 2017; HANSEN et al., 2018). Neben der direkten neurotoxischen Wirkung von $A\beta$ und den NFTs führt dies zu einer zusätzlichen Schädigung der Neurone und schließlich zum Zelluntergang (KOWALL, 1994; TUPPO, ARIAS, 2005).

Während die häufigste Form von $A\beta$ das 40 Aminosäure lange $A\beta_{40}$ bildet, kann innerhalb der senilen Plaques als dominante Form $A\beta_{42}$ nachgewiesen werden (TAMAOKA et al., 1994). Dieses Peptid, welches nur etwa ein Zehntel des Gesamt- $A\beta$ bildet, besitzt die beiden zusätzlichen Aminosäuren Isoleucin und Valin. Die hierdurch bedingte Zunahme der Hydrophobizität bewirkt eine gesteigerte Tendenz zur

Aggregation (BURDICK et al., 1992). Die verschiedenen A β -Spezies entstehen dabei infolge der sequenziellen Proteolyse von APP. Wie oben beschriebenen, lassen sich auch die EOAD-Fälle auf Mutationen in eben diesen Proteinen zurückführen (FILLEY et al., 2007; GROUP, 1995).

2.3 Amyloides Vorläuferprotein und seine Prozessierung

APP ist ein hochkonserviertes Protein dessen Homologe bei verschiedensten Spezies nachgewiesen werden konnten (DAIGLE, LI, 1993; LUO et al., 1990). Dies legt eine wichtige physiologische Funktion des Proteins nahe. Gemeinsam mit den beiden APP-ähnlichen Proteinen (engl. APP-like protein; APLP) APLP1 und APLP2 bildet APP eine Proteinfamilie. Durch alternatives Splicen entstehen mindestens 10 verschiedene Isoformen des Proteins die gewebeabhängig nachgewiesen werden können (SANDBRINK et al., 1996). Das in Neuronen synthetisierte APP695 gehört gemeinsam mit dem in Gliazellen und peripherem Gewebe gebildetem APP751 und APP770 zu den häufigsten Isoformen (SANDBRINK et al., 1994). APP ist ein Typ I-Transmembranprotein und unterteilt sich in einen großen, extrazellulären N-terminalen Bereich, eine Transmembrandomäne und einen kurzen, intrazellulären C-Terminus (KANG et al., 1987).

APP wird in der Zelle durch sequenzielle Proteolyse gespalten. Dieser Vorgang kann auf zwei unterschiedlichen Wegen stattfinden: der amyloidogenen- oder der nicht-amyloidogenen Prozessierung (ZHANG et al., 2012). Entscheidend ist dabei der erste Schritt der Proteolyse von APP. Die nicht-amyloidogene Prozessierung wird durch den Schnitt der α -Sekretase eingeleitet. Dieser führt zu einer N-terminalen Freisetzung des sekretorischen APP α (sAPP α), sodass dieses extrazellulär nachgewiesen werden kann (LICHTENTHALER, 2012). Der in der Membran verbleibende Anteil des APP umfasst 83 Aminosäuren und wird als α -Carboxy-terminales Fragment (α CTF) bezeichnet (LE BROCCQUE et al., 1998). Die katalytische Aktivität der α -Sekretase wird durch Metalloproteasen der sog. ADAM-Familie (engl.: *a disintegrin and metalloproteinase*) gebildet. Die beiden Vertreter ADAM 10 und ADAM 17 besitzen dabei die größte physiologische Bedeutung im Gehirn (ALLINSON et al., 2003; SLACK et al., 2001).

Zu Beginn der amyloidogenen Prozessierung wird APP im Gegenzug durch die β -Sekretase geschnitten, was in Analogie zur nicht-amyloidogenen Prozessierung, die Freisetzung des sekretorischen APP β (sAPP β) bewirkt. Das membrangebundene β -carboxy-terminale Fragment (β -CTF) besteht aus 99 Aminosäuren (LE BROCCQUE et al., 1998). Die Proteolyse von APP im Bereich der β -Schnittstelle wird durch das Enzym BACE1 (engl. *β -site APP converting enzyme*) katalysiert (VASSAR et al., 1999). Sowohl α -CTF als auch β -CTF werden anschließend innerhalb der Transmembrandomäne durch die γ -Sekretase geschnitten. Dabei wird in beiden Fällen vom C-Terminus die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) abgespalten, während sich die in den Extrazellularraum freigesetzten N-terminalen Fragmente unterscheiden (KAKUDA et al., 2006; LE BROCCQUE et al., 1998). Der γ -Sekretase-Schnitt des β -CTF

bewirkt die Entstehung von A β , aus α -CTF wird das extrazelluläre Fragment p3 durch die Spaltung gebildet (DULIN et al., 2008). Das Peptid p3 besitzt im Gegensatz zu A β keine erhöhte Aggregations-tendenz weswegen die negativen Effekte auf die synaptische Funktion und erhöhte Zelltoxizität entfal-len (DULIN et al., 2008). Abbildung 1 stellt die APP-Prozessierung noch einmal schematisch dar.

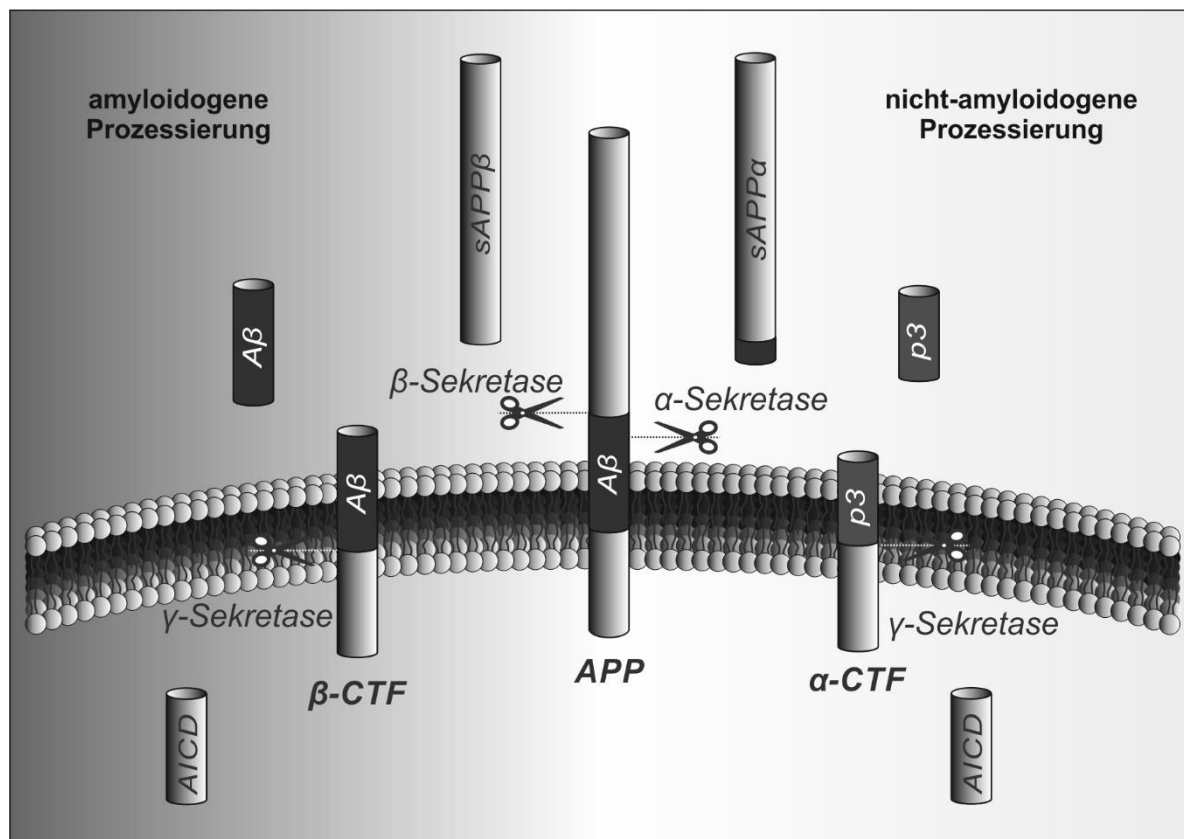


Abbildung 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung. Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung der APP-Prozessierung. Hierbei wird die amyloidogene- von der nicht-amyloidogenen Prozessierung unterschieden. Der erste Schritt der amyloidogenen Prozessierung wird durch die β -Sekretase katalysiert, wobei sAPP β freigesetzt wird. Die α -Sekretase schneidet im Gegenzug bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung APP innerhalb der A β -Domäne, das sekretorische Fragment sAPP α wird freigesetzt. Die in der Membran verbleibenden Fragmente α - bzw. β -CTF werden im zweiten Schritt der APP-Prozessierung durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten, wobei auf dem Weg der amyloidogenen Prozessierung die Fragmente A β und AICD, im Falle der nicht-amyloidogenen Prozessierung die Fragmente p3 und AICD, gebildet werden.

Die Kenntnis über die molekularbiologischen Vorgänge insbesondere der amyloidogenen Prozessierung ist für das bessere Verständnis der Alzheimer-Erkrankung essentiell. Schlüsselrolle kommt dabei den beiden Enzymen β - und γ -Sekretase zu, deren Aktivitäten die Entstehung von A β und somit den Gesamtgehalt von A β im Gehirn, direkt beeinflussen (BODENDORF et al., 2002; COOK et al., 2010). Im Folgenden soll auf diese beiden Enzyme noch einmal näher eingegangen werden.

Die β -Sekretase BACE1 ist eine Aspartatprotease und gehört ebenso wie APP zu den Typ I-Transmembranproteinen. Ihr katalytisches Zentrum besteht aus zwei Aspartat-Resten und befindet sich im Bereich

der Ektodomäne (zusammengefasst in KOELSCH et al., 2017). Die proteolytische Aktivität von BACE1 beschränkt sich dabei nicht nur auf APP, sondern auch andere Transmembranproteine können BACE1 als Substrat dienen. Hierzu zählen beispielsweise LRP (*engl. low-density lipoprotein receptor-related protein*), die β 2-Untereinheit spannungsabhängiger Natriumkanäle und Neuregulin I (VON ARNIM et al., 2005; WILLEM et al., 2006; WONG et al., 2005). Neuregulin I spielt eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung von Nerven. Es wird deshalb für den Phänotyp von BACE1-Knock-Out-Mäusen verantwortlich gemacht, die ebenfalls eine Beeinträchtigung der Myelinisierung aufweisen (FLECK et al., 2012; WILLEM et al., 2006).

BACE1 wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach posttranslationaler Reifung entsteht im Golgi-Apparat durch Abspaltung der Prodomäne die aktive Form des Enzyms, welches von dort an die Plasmamembran transportiert wird (BENNETT et al., 2000; CAPELL et al., 2000; KOELSCH, 2017). Die β -Sekretase unterliegt anschließend einem ständigen Recycling zwischen der Plasmamembran, dem späten Trans-Golgi-Netzwerk und den frühen endosomalen Kompartimenten (WALTER et al., 2001). Die Aktivität und die Substratspezifität von BACE1 werden dabei durch die Lokalisation stark beeinflusst. Die größte Aktivität, insbesondere auf APP, besitzt BACE1 auf Grund seines pH-Optimums im sauren Bereich innerhalb der frühen endosomalen Kompartimente (CHOY et al., 2012; TESCO et al., 2007). Die Bedeutung seiner Lokalisation in den Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen der Membranen, sog. Lipid Rafts, für die APP-Prozessierung wird bis heute kontrovers diskutiert (CORDY et al., 2003; VETRIVEL et al., 2009). Die Degradation von BACE1 erfolgt überwiegend in den lysosomalen Kompartimenten (KANG et al., 2010; KOH et al., 2005). Der proteasomale Abbau des Enzyms ist aufgrund der inkongruenten Studienlage noch umstritten (KANG et al., 2010; QING et al., 2004).

Aufgrund der vielen physiologischen Funktionen von BACE1 wurde für die Alzheimer-Erkrankung als therapeutische Strategie eine unvollständige Inhibition des Enzyms diskutiert (SATIR et al., 2020). Im Mausmodell konnten Chow et al. zeigen, dass dabei die simultane Inhibition der β - und γ -Sekretase mittels heterozygoten Knock-outs einen deutlich stärkeren Effekt auf die A β -Last und die kognitiven Funktionen hatte, als die Reduktion nur eines Enzyms (CHOW et al., 2010). Hierdurch wäre in der klinischen Anwendung auch eine Verbesserung des Nebenwirkungsprofils denkbar. Eine Vielzahl von Medikamentenstudien beschäftigte sich in den letzten Jahren mit der Anwendung von BACE1-Inhibitoren in der Therapie der Alzheimer-Erkrankung (KENNEDY et al., 2016; WESSELS et al., 2020). Die ersten Studien zur Wirksamkeit dieser Therapien zeigten bisher jedoch keine positiven Effekte auf die kognitiven Funktionen (EGAN et al., 2018; EGAN et al., 2019). Als Ursache hierfür wird oft der zu späte Therapiebeginn diskutiert. Noch gesunde Probanden, im präklinischen Stadium der Erkrankung, könnten jedoch nur ohne das Auftreten relevanter Nebenwirkungen medikamentös behandelt werden.

Hier wäre eine geringe Inhibition des Enzyms über einen langen Zeitraum, beispielsweise durch Beeinflussung der intrazellulären Verteilung oder der Degradation von BACE1, ein möglicher therapeutischer Ansatz.

Die für den letzten Schritt der A β -Produktion verantwortliche γ -Sekretase wird durch einen Multienzymkomplex gebildet. Dieser kann unterschiedlich zusammengesetzt sein, beinhaltet jedoch immer vier Proteine. Die katalytische Einheit der γ -Sekretase wird dabei durch Presenilin gebildet, welches in den beiden Subtypen 1 oder 2 (PS 1, PS 2) Bestandteil der Sekretase sein kann (KIMBERLY et al., 2000). Essentielle Komponenten der γ -Sekretase sind außerdem Nicastrin, PEN2 (engl. *Presenilin enhancer 2*) und eines der beiden Enzyme Aph1a oder Aph1b (engl. *Anterior pharynx defective 1*) (DE STROOPER, 2003). Presenilin besitzt insgesamt neun Transmembrandomänen, wobei zwei Aspartatreste innerhalb der 6. und 7. Domäne für seine proteolytische Funktion verantwortlich sind (WOLFE et al., 1999). Nicastrin wird eine Bedeutung bei der Erkennung und Bindung des Substrates zugeschrieben und stabilisiert den Multienzymkomplex (SHAH et al., 2005). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass die Produktion der verschiedenen A β -Subspezies unter anderem (u. a.) auch von der Zusammensetzung des γ -Sekretase-Komplexes abhängig ist (SHAH et al., 2005). Interessanterweise scheint des Weiteren die Membrandicke für die Entstehung der verschiedenen A β -Spezies entscheidend. Dabei werden einer Studie zufolge vermehrt A β_{42} -Peptide in dünneren Membranen gebildet (GRZIWA et al., 2003). Veränderungen der Lipidkomposition können dabei die Membrandicke beeinflussen, was sich folglich auch auf das A β_{42} /A β_{40} -Verhältnis auswirken würde. Neben APP wurden über 90 weitere Transmembranproteine beschrieben die dem Enzymkomplex als Substrat dienen können (MEDORO et al., 2018). Besonders hervorzuheben ist dabei das Notch-Protein, welches als Rezeptor an der Zelloberfläche dient. Nach Einleitung des Notch-Signalweges wird die durch die γ -Sekretase gebildete intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) freigesetzt. Diese besitzt wichtige genregulatorische Funktionen (KOPAN et al., 1996) und ist während der zerebralen Entwicklung beispielsweise bei der Entstehung neuronaler Netzwerke und der synaptischen Plastizität beteiligt (ALBERI et al., 2013).

Die γ -Sekretase besitzt die Besonderheit ihre Substrate in der Mitte der Membran zu schneiden, ein Prozess der als RIP (engl. *regulated intramembrane proteolysis*) bezeichnet wird. Im Gegensatz zu anderen proteolytischen Vorgängen scheint durch die spezielle Lage der Proteolyse innerhalb der Membran nicht die Aminosäuresequenz des Proteins entscheidend zu sein (BROWN et al., 2000). Stattdessen spielt die Zusammensetzung der Lipide in der Membran eine wichtige Rolle in der Funktion des Enzyms (OSENKOWSKI et al., 2008). Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung wird die unterschiedliche Lokalisation der γ -Sekretase innerhalb der Membran als entscheidender Faktor für die Substratspezifität angesehen. Dabei wird diskutiert, dass die amyloidogene Prozessierung des β CTF insbesondere in den Lipid Raft-Regionen der Membranen stattfindet, während andere Substrate der γ -Sekretase, u. a.

auch α CTF, vorwiegend in den Non-Raft-Domänen geschnitten werden (BHATTACHARYYA et al., 2013; HUR et al., 2008).

Betrachtet man die beiden Schritte der amyloidogenen Prozessierung in Zusammenschau ist besonders auffällig, dass es sich bei allen beteiligten Proteinen um Transmembranproteine handelt und die γ -Sekretase sogar innerhalb der Lipiddoppelschicht ihr Substrat umsetzt. Dies legt nahe, dass die Funktion und Lokalisation der Proteine durch die Lipidkomposition der Membranen beeinflusst werden könnte. Mehrere Studien zeigten, dass sowohl für die β -Sekretase als auch für die γ -Sekretase Änderungen ihrer Aktivität durch Lipide möglich sind (GRIMM et al., 2005; PUGLIELLI et al., 2003).

2.4 A β -Homöostase: Degradation und Aggregation

Neben der Synthese von A β ist auch die Kenntnis über die Degradation und Aggregation von A β wichtig für das Verständnis der Alzheimer-Erkrankung. Die Degradation von A β kann sowohl intra- als auch extrazellulär stattfinden. Die meisten A β -degradierenden Enzyme sind Metalloproteasen, wobei die größte Bedeutung und Relevanz *in vivo* das intrazelluläre IDE (engl. *insulin degrading enzyme*) und das membrangebundene Neprilysin (NEP) besitzen (FARRIS et al., 2003; IWATA et al., 2000). Im IDE- bzw. NEP-Knock-Out Mausmodell, sowie Tierversuchen mit NEP-Inhibitoren, konnte eine signifikante Steigerung des zerebralen A β -Gehaltes beobachtet werden (FARRIS et al., 2003; HUANG et al., 2006; IWATA et al., 2000). Gleichzeitig ließen sich auch eine reduzierte synaptische Plastizität und schlechtere Resultate bei der räumlichen Orientierung nachweisen (HUANG et al., 2006). Vergleichbare Veränderungen spielen auch im Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle, weswegen ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der A β -Degradation und der Alzheimer-Erkrankung vermutet wurde. Anabolismus und Katabolismus von A β stehen unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht und verhindern so einen A β -Überschuss (BARANELLO et al., 2015). Neben einer verstärkten Produktion könnte also auch ein verringerter Abbau von A β zur Entwicklung der Erkrankung beitragen. Tatsächlich ließ sich bei Alzheimer-Patienten eine Reduktion von NEP und der A β -Degradation in den am stärksten von der Pathologie betroffenen Hirnregionen nachweisen (MAWUENYEGA et al., 2010; YASOJIMA et al., 2001). Auch für einige APP-Mutationen, die für die EOAD verantwortlich sind, konnte eine verringerte Aktivität von NEP nachgewiesen werden (TSUBUKI et al., 2003). Eine Mitbeteiligung der A β -Degradation an der Krankheitsentstehung scheint daher möglich. In diesem Zusammenhang könnte das in den letzten Jahren vermehrt zum Einsatz kommende Medikament Sacubitril eine besondere Relevanz besitzen. Der zur Herzinsuffizienztherapie eingesetzte NEP-Inhibitor konnte im Tierversuch auch im Liquor nachgewiesen werden und führte zu Beginn der Therapie bei Affen zu einem Anstieg der verschiedenen A β -Spezies im Gehirn. Im weiteren Verlauf von 30 Tagen normalisierte sich der A β -Gehalt jedoch wieder, sodass gefolgert wurde, dass die anderen A β -degradierenden Enzyme in der Lage sind den Funktionsverlust von NEP auszugleichen (SCHOENFELD et al., 2017). Es existieren bisher jedoch keine Langzeitstudien mit einer Medikamenten-Exposition über mehrere

Jahre, sodass hier weitere Studien zeigen müssen, ob sich das Alzheimer-Risiko für diese Patienten über die Jahre hinweg erhöht.

Während sich die bisherigen Ausführungen mit der monomeren Form von A β beschäftigten, spielt insbesondere auch die A β -Aggregation für die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung eine wichtige Rolle. Wie unter Abschnitt 2.2 erwähnt findet sich in den Senilen Plaques, aufgrund seiner größeren Aggregationsneigung, insbesondere A β_{42} (TAMAOKA et al., 1994). Initiiert wird dieser Prozess der Aggregation durch eine Konformationsänderung von A β , wobei sich die zufällige α -helikale Struktur in eine β -Faltblattstruktur umwandelt (SOTO et al., 1994). Diese Änderung der Tertiärstruktur findet insbesondere bei A β_{42} statt, während die kürzeren A β -Peptide deutlich seltener β -Faltblattstrukturen ausbilden (BARROW, ZAGORSKI, 1991). Solche Monomere mit β -Faltblattstruktur lagern sich zunächst zu Dimeren zusammen, bevor sie zu Oligomeren aus 5–50 A β -Peptiden fusionieren (ROHER et al., 1996). Dieser Prozess ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der A β -Aggregation und führt schließlich zur Bildung eines Kerns der für die weitere Anlagerung von A β -Peptiden essentiell ist (LOMAKIN et al., 1996). Die darauffolgende Aggregation von A β verläuft über die Ausbildung von Protofibrillen schließlich zu reifen Fibrillen, welche den Hauptbestandteil der Senilen Plaques darstellen (ACX et al., 2014). Größtes wissenschaftliches Interesse gilt heute der Oligomer-Zwischenstufe. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass diese eine starke zytotoxische Wirkung besitzen, die deutlich größer ist als die der reifen Fibrillen (CLEARY et al., 2005; RESENDE et al., 2008). Neben neurotoxischen Effekten scheinen die A β -Oligomere auch die Synaptogenese zu beeinträchtigen und sich direkt auf die kognitiven Fähigkeiten von Mäusen auszuwirken (CLEARY et al., 2005; SHANKAR et al., 2007). Während die Menge der Senilen Plaques in Gehirnen von Alzheimer-Patienten nur gering mit dem Fortschritt der Erkrankung korreliert (TERRY et al., 1991), zeigten spätere Studien einen Zusammenhang zwischen löslichem A β und der Schwere der Erkrankung (MCLEAN et al., 1999). Betrachtet man diese Erkenntnisse in Zusammenschau wird deutlich, dass die oligomere Form von A β eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit besitzt.

2.5 Physiologische Funktionen von APP und seinen Prozessierungsprodukten

Die Forschung der letzten Jahre beschäftigte sich nicht nur mit den pathologischen Prozessen der Alzheimer-Erkrankung, sondern versuchte auch die physiologischen Funktionen von APP besser zu verstehen. In Knock-out-Experimenten wurde gezeigt, dass Mäuse, denen alle drei Mitglieder der APP-Familie fehlen, aufgrund einer schweren kortikalen Dysplasie bereits perinatal versterben (HERMS et al., 2004). Auch die Defizienz von APP und APLP2 führt zu schweren neuronalen Schäden beispielsweise im Bereich von Synapsen und neuromuskulären Endplatten (WANG et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Knock-out-Studien zeigen, dass die APP-Proteinfamilie eine essentielle Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt. Auch nach der Reifung des zentralen und peripheren Nervensystems scheint das Transmembranprotein wichtige Aufgaben zu übernehmen. Für einige Proteine wie beispielsweise F-Spondin

und LRP, konnte eine Bindung an die extrazelluläre Domäne des APP nachgewiesen werden, sodass man eine rezeptorähnliche Funktion des Proteins vermutet (HO, SÜDHOF, 2004; KNAUER et al., 1996). Neben dem Volllänge-APP konnte auch für seine Prozessierungsprodukte eine physiologische Rolle belegt werden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sAPP α das Wachstum von Neuriten stimuliert und neurotrophe sowie neuroprotektive Wirkungen besitzt (LI et al., 1997; MUCKE et al., 1996).

Mitunter das meiste Interesse der Forschung galt in den letzten Jahren dem sog. YENPTY-Motiv von APP. Diese im Bereich des C-terminalen Endes von APP liegende Aminosäuresequenz ist hochkonserviert und bis zum Fadenwurm nachweisbar, was seine essentielle Bedeutung in der Funktion des Proteins nahelegt (AYDIN et al., 2012). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Punktmutation innerhalb dieser Sequenz ein funktionsunfähiges APP-Molekül entsteht (BARBAGALLO et al., 2011). In anderen Studien an Knock-Out-Mauslinien hat man nachweisen können, dass ohne diesen C-terminalen Abschnitt von APP die Plastizität und Morphologie der Synapsen beeinträchtigt wird (KLEVANSKI et al., 2015). Viele verschiedene Proteine wurden beschrieben die in der Lage sind über diese Region mit APP zu interagieren, von denen einige der Internalisierung (z. B.: Dab2) oder Stabilisierung (z. B.: X11) von APP dienen (BORG et al., 1996). Am wichtigsten für das Verständnis der physiologischen Funktion von APP könnte dabei der Bindungspartner Fe65 sein. Nach der Spaltung von APP durch die γ -Sekretase bindet Fe65 an die im AICD befindliche YENPTY-Sequenz und wird gemeinsam mit diesem zum Zellkern transportiert. Es wird postuliert, dass durch die zusätzliche Bindung von Tip60 ein transkriptionell aktiver Komplex gebildet wird; der sog. AFT-Komplex (CAO, SÜDHOF, 2001; PROBST et al., 2021). AICD wird somit eine genregulatorische Wirkung ähnlich der oben beschriebenen Funktion von NICD zugesprochen. Fe65 scheint dabei eine Rolle bei der Stabilisierung von AICD während des intrazellulären Transports zu spielen (CUPERS et al., 2001). Die molekularbiologischen Vorgänge der Translokation in den Nukleus und die zeitliche Zusammensetzung des AFT-Komplexes wird noch immer kontrovers diskutiert und wird Forschungsziel der nächsten Jahre sein. Interessanterweise scheint insbesondere durch die amyloidogene Prozessierung gebildetes AICD transkriptionell aktiv zu sein (BELYAEV et al., 2010; GOODGER et al., 2009). In den letzten Jahren wurden immer mehr Gene detektiert die einer Regulation durch AICD unterliegen (JIANG et al., 2020). Hierzu zählen neben BACE1, IDE und NEP auch einige Schlüsselenzyme des Lipidstoffwechsels (GRIMM et al., 2015a; VON ROTZ et al., 2004). Insbesondere der Sphingolipidstoffwechsel scheint auf diesem Weg beeinflusst zu werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der für die Synthese aller Sphingolipide essentiellen Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase durch AICD inhibiert werden kann (GRIMM et al., 2011a). Auch die Aktivitäten der Glucosylceramidsynthase (GCS) und der GD3-Synthase (GD3S), Schlüsselenzyme des Gangliosid-Metabolismus, konnten durch AICD gesenkt werden (GRIMM et al., 2014a; GRIMM et al., 2012). Zusätzlich zu diesen AICD-abhängigen Effekten konnte auch für A β selbst eine Beteiligung an der Lipidhomöostase von Cholesterin und Sphingomyelin nachgewiesen werden

(GRIMM et al., 2005). Betrachtet man dies in Zusammenschau scheint eine wechselseitige Interaktion zwischen APP und den Membranlipiden wahrscheinlich.

2.6 Lipide und die Alzheimer-Erkrankung

Mit einem Lipidgehalt von etwa 50 % in Trockenmasse ist das Gehirn nach den Adipozyten das lipidreichste Gewebe des menschlichen Körpers (O'BRIEN, SAMPSON, 1965). Neben ihrer wichtigen Rolle als membranbildende Moleküle besitzen einige Lipidklassen auch spezielle Aufgaben im Bereich der Signaltransduktion oder der Funktion von Synapsen (LAUWERS et al., 2016; MENDELSON et al., 2014). Interessanterweise konnten Mutationen in Genen des Lipidstoffwechsels auch für einige neurodegenerative Erkrankungen im Kindesalter wie beispielsweise die Niemann-Pick- oder Krabbe-Erkrankung, verantwortlich gemacht werden (MIKULKA, SANDS, 2016; WHEELER, SILLENCE, 2020). Aufgrund der bereits beschriebenen engen Beziehung der APP-Prozessierung zu den Membranlipiden, wurde auch die Rolle der Lipide bei der Entstehung und dem Progress der Alzheimer-Erkrankung untersucht.

Zusätzliche Hinweise auf eine Beteiligung der Lipidhomöostase bei der Alzheimer-Erkrankung ergaben sich, als das ApoE ϵ 4-Allel als genetischer Risikofaktor für die Entstehung der sporadischen Alzheimer-Erkrankung gefunden wurde (PANPALLI ATEES et al., 2016). Corder et al. zeigten, dass Probanden ohne ein ϵ 4-Allel nur ein Risiko von etwa 20 % aufweisen an Alzheimer zu erkranken, während homozygote Träger des ApoE ϵ 4-Allels in etwa 90 % der Fälle erkranken (CORDER et al., 1993). Im Durchschnitt litten die homozygoten ϵ 4-Träger etwa 16 Jahre früher an der Erkrankung, sodass der ApoE-Phänotyp heute als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die LOAD angesehen wird (CORDER et al., 1993). ApoE-Lipoproteine dienen im Gehirn vor allem dem Transport von Cholesterin und anderen Lipiden zwischen Astrozyten und Neuronen (NUNES et al., 2018). Der ApoE ϵ 4-Phänotyp scheint dabei mit einer verringerten Bindung von Cholesterin und anderen Lipiden assoziiert zu sein, was bei Trägern dieses Allels zu einer Hypercholesterinämie führt (BOER et al., 1997). In den letzten Jahren konnten weitere in Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung stehende Gene identifiziert werden die ebenfalls an der Lipidhomöostase des Gehirns beteiligt sind. Hierzu zählen u. a. das Clustrin-Gen, welches für ein lipidbindendes Protein kodiert, sowie das ABCA7-Gen, welches eine Rolle in der Übertragung von Cholesterin auf ApoE spielt (NUUTINEN et al., 2009; SAKAE et al., 2016).

Diese Beobachtungen wurden durch epidemiologische Studien unterstützt in denen eine Hypercholesterinämie im mittleren Lebensalter mit dem späteren Auftreten der Alzheimer-Erkrankung assoziiert wurde (KIVIPELTO et al., 2002; SOLOMON et al., 2009). Molekularbiologische Studien zeigten, dass durch eine Reduktion des Cholesterinspiegels in der Zelle die Aktivität der β - und γ -Sekretase gesenkt werden kann (GRIMM et al., 2008). Dabei spielt die Kolokalisation von APP mit der β - und γ -Sekretase innerhalb der Lipid Raft-Domänen vermutlich eine entscheidende Rolle. Diese könnte durch eine direkte

Bindung von Cholesterin an β -CTF bzw. APP verstärkt werden und somit eine gesteigerte amyloidogene Prozessierung bewirken (BARRETT et al., 2012).

Neben Cholesterin konnte aber auch für andere Lipide ein möglicher Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung gezeigt werden (BURG et al., 2013; GRIMM et al., 2016; KOIVISTO et al., 2014). Insbesondere die Sphingolipidhomöostase scheint im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung gestört zu sein. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Ceramide im Gehirn von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen deutlich höher konzentriert vorliegen (FILIPPOV et al., 2012; HAN et al., 2002). Erhöhte Ceramid-Spiegel im Serum wurden zusätzlich mit dem Auftreten von Alzheimer im späteren Lebensverlauf korreliert (MIELKE et al., 2012). Ceramide bilden dabei eine Lipidgruppe die den wichtigsten Vorläufer aller Sphingolipide darstellt. Sie besitzen in höheren Konzentrationen eine neurotoxische Wirkung und können eine verstärkte Apoptose induzieren (DAWSON et al., 1998). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch die durch A β -Peptide induzierte Zytotoxizität über diesen Ceramid-abhängigen Weg verlaufen könnte (LEE et al., 2004). Des Weiteren wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass Ceramide durch Stabilisierung des BACE1-Proteins die amyloidogene Prozessierung steigern und somit die Bildung von A β stimulieren können (PUGLIELLI et al., 2003). Andererseits konnte in einer Studie gezeigt werden, dass durch einen erhöhten A β ₄₂-Gehalt der Abbau von Sphingomyelin verstärkt wird, sodass der Ceramid-Gehalt ansteigt (GRIMM et al., 2005). Ein Teufelskreis würde entstehen bei dem immer mehr Ceramid zu einer immer stärkeren Bildung von A β führen würde.

Neben der negativen Rolle von Ceramid wurden andere Sphingolipide eher positiv mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht. Mielke et al. konnten zeigen, dass hohe Sphingomyelin-Spiegel im Plasma mit einer langsameren Progression der Erkrankung assoziiert sind (MIELKE et al., 2011). In Zellkulturstudien wurde zudem nachgewiesen, dass durch die Erhöhung des Sphingomyelins die A β -Produktion reduziert werden kann (GRIMM et al., 2005). Eine weitere Sphingolipidklasse, auf die im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung ein besonderes Augenmerk gelegt werden sollte, sind die Sulfatide. Ihr Stoffwechsel, ihre Funktion im Zentralnervensystem und ihre Rolle bei der Alzheimer-Krankheit werden aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit im folgenden Abschnitt näher erläutert.

2.7 Sulfatide und ihre Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung

Sulfatide gehören wie oben beschrieben zur Gruppe der Sphingolipide. Ihre Synthese beginnt am Endoplasmatischen Retikulum. Die dort vorhandenen Ceramide dienen als Grundgerüst. Mit Hilfe der UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) wird zunächst ein Galaktoserest auf die C1-Hydroxylgruppe von Ceramid transferiert (BASU et al., 1971). Die so synthetisierten Galaktosylceramide (GalCer) werden zum Golgi-Apparat transportiert, wo der zweite, geschwindigkeitsbestimmende Schritt

der Sulfatid-Synthese durch die Cerebrosidsulfotransferase (CST) katalysiert wird (HIRAHARA et al., 2000). Hierbei wird mit Hilfe des Coenzym 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) eine Sulfat-Gruppe an die C3-Hydroxylgruppe der Galaktose gekoppelt wodurch die Sulfatide gebildet werden. Der Abbau der Sulfatide erfolgt innerhalb der Lysosomen. Dort werden durch das Coenzym Sphingolipid-Aktivator-Protein B (Saposin B) die Sulfatide aus der Membran herausgelöst um die anschließende Hydrolyse der Sulfatgruppe durch die Arylsulfatase A (ASA) zu ermöglichen (ECKHARDT, 2008; HIRAHARA et al., 2000). GalCer wird schließlich durch die Galaktocerebrosid- β -Galaktosidase wieder in Galaktose und Ceramid gespalten. In Abbildung 2 ist die Sulfatid-Homöostase noch einmal schematisch dargestellt.

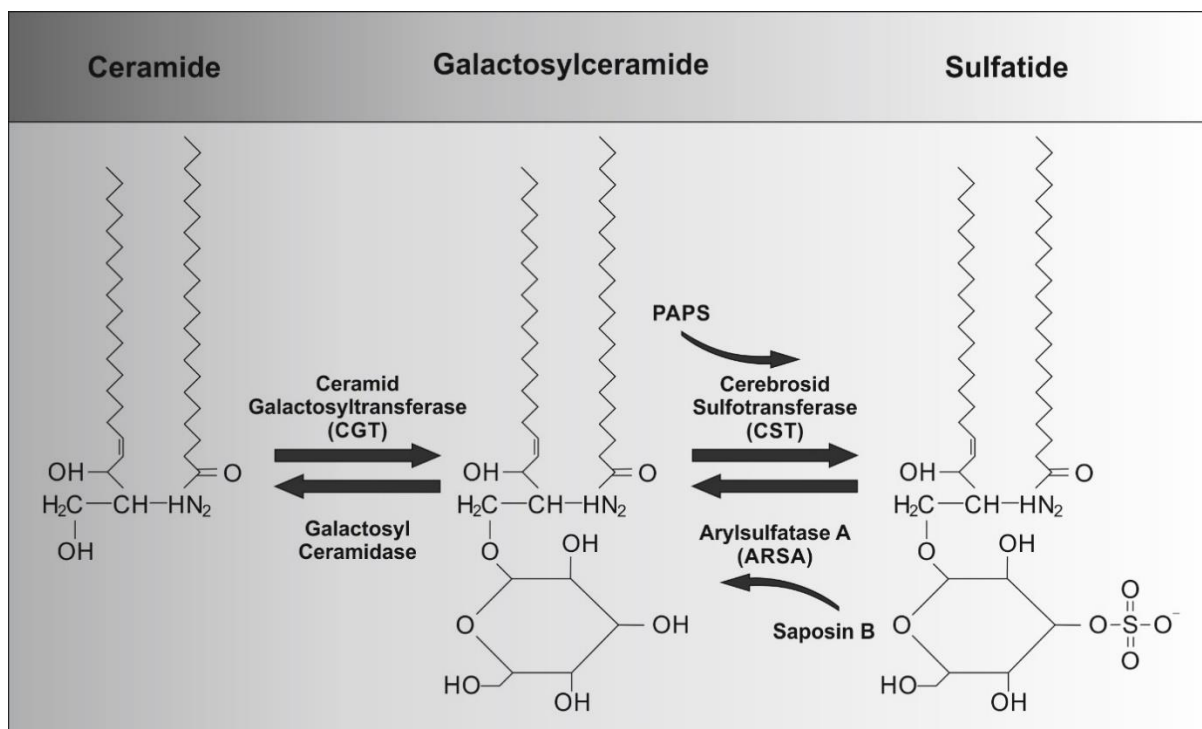


Abbildung 2: Darstellung der Sulfatid-Homöostase. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung des Sulfatid-Metabolismus. Ceramide werden durch die CGT in Galactosylceramide umgewandelt. Unter Einfluss des Coenzym PAPS werden anschließend im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese aus GalCer mit Hilfe des Enzyms CST die Sulfatide gebildet. Durch das lysosomale Enzym ARSA erfolgt schließlich mit Hilfe des Coenzym Saposin B der Abbau von Sulfatiden zu GalCer, welche durch die Galactosyl-Ceramidase wieder in Ceramide umgewandelt werden können.

Sulfatide spielen insbesondere im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle. Dabei machen sie etwa 5 % der Lipide innerhalb der, aus Oligodendrozyten gebildeten, Myelinscheiden aus, wo sie folglich eine besonders große Bedeutung besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass sie dabei sowohl an der Differenzierung der Zellen beteiligt sind als auch an der Ausbildung der Axo-Glialen-Verbindungen (HONKE, 2018). Die langkettigen Sulfatide, die vorwiegend eine Kettenlänge von C22–C26 aufweisen, von denen C24 die häufigste Form darstellt, befinden sich in den Oligodendrozyten vor allem im äußeren

ren Blatt der Lipiddoppelschicht der Plasmamembranen. Neben ihrer Funktion innerhalb der Myelinscheiden konnten Sulfatide aber auch in Astrozyten und Neuronen nachgewiesen werden (PERNBER et al., 2002). Die dort vorkommenden Sulfatide scheinen sich von den myelinassoziierten Sulfatiden zu unterscheiden: mit einer Kettenlänge von C16–C20 (häufigste Form C18) sind sie deutlich kürzer was sich auf das innerhalb von Neuronen dominant vorkommende Ceramid C18 als Vorläufer zurückführen lässt (ECKHARDT, 2008). Sulfatide sind dabei wie Cholesterin und andere Sphingolipide in den Lipid Raft-Domänen angereichert (BLOMQVIST et al., 2002). Neben der Synthese von Sulfatiden durch Neuronen selbst könnte auch der Transport von umliegenden Astrozyten zu den neuronalen Zellen mit Hilfe von Lipoproteinen für ihre Verteilung wichtig sein. Interessanterweise scheint für diesen Transport das ApoE-Lipoprotein verantwortlich zu sein, dem wie oben beschrieben auch eine große Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben wird (HAN et al., 2003a).

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Alzheimer-Erkrankung und den Sulfatiden konnten Han et al. nachweisen (HAN et al., 2002). In einer massenspektrometrischen Studie korrelierten sie den Sulfatid-Gehalt in der Grauen bzw. Weißen Substanz von Alzheimer-Patienten mit dem Progress der Erkrankung. Es wurden deutlich reduzierte Sulfatid-Spiegel nachgewiesen, wobei insbesondere die Sulfatide in der grauen Substanz von einer 93%igen Reduktion betroffen waren, während sich in der weißen Substanz nur eine 58%ige Verringerung der Sulfatide zeigte. Besonders auffällig war, dass diese Veränderungen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung, im Stadium des MCI, beobachtet wurden (HAN et al., 2002). Die Ergebnisse weiterer Studien erbrachten jedoch inhomogene Ergebnisse. Während einige Studien keine Verringerung der Sulfatide bei Alzheimer-Patienten nachweisen konnten (CHAN et al., 2012; CUTLER et al., 2004), konnte die Reduktion der Sulfatide im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung von anderen besätigt werden (GÓNZALEZ DE SAN ROMÁN et al., 2017; MICHNO et al., 2019). Bandaru et al. fanden eine Abnahme der Sulfatide in der Weißen Substanz, jedoch ohne Veränderungen in der Grauen Substanz (BANDARU et al., 2009). In einer neueren Studie konnte auch eine Abnahme der Sulfatide im Bereich der Amyloid-Plaques nachgewiesen werden (MICHNO et al., 2022). Es zeigten sich auch reduzierte Sulfatid-Spiegel im Liquor von Alzheimer-Patienten, wobei das Verhältnis aus Sulfatiden zu Phosphatidyl-Inositol, einer weiteren Lipidklasse, als möglicher Biomarker für das Frühstadium der Erkrankung diskutiert wurde (HAN et al., 2003a). In Folge dieser Erkenntnisse aus humanem Gewebe erfolgten auch Untersuchungen der Sulfatid-Lipidklasse in verschiedenen Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung. Während sich in einer Studie von Chan et al. eine leichte Reduktion der Sulfatide in Mausmodellen mit FAD Mutationen im APP oder PS1 zeigte (CHAN et al., 2012), ließen sich in einer anderen Arbeit an einem Modell mit einer PS1/APP Doppelmutation keine Veränderungen der Sulfatide detektieren (BARRIER et al., 2010).

Um die molekularen Mechanismen dieser Veränderungen zu untersuchen wurden im Zellkultur- und Mausmodell weitere Studien durchgeführt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit

dem ApoE ϵ 4-Genotyp im Vergleich zu anderen ApoE-Genotypen einen deutlich stärkeren Verlust der Sulfatide im Gehirn aufwiesen (HAN et al., 2003a). Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass durch die Supplementierung von Sulfatiden in der Zellkultur der A β -Gehalt gesenkt werden kann (ZENG, HAN, 2008). Dies wurde auf eine erhöhte Bindungsaffinität von A β zu Sulfatid-enthaltenden ApoE-Lipoproteinen zurückgeführt, die beim ϵ 4-Genotyp am meisten gesteigert werden konnte (ZENG, HAN, 2008). Diese Untersuchungen zeigen einen möglichen Mechanismus, wie es im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung zur Reduktion des Sulfatid-Gehaltes kommen könnte und wie sich Sulfatide gleichzeitig auf die Alzheimer-Pathologie auswirken könnten. Ein Großteil der molekularen Mechanismen, die zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Sulfatid-Homöostase und der Alzheimer-Pathologie führen könnten, wurde bisher jedoch nicht untersucht.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Prävalenz der Alzheimer-Erkrankung wird in Folge der stetig steigenden Lebenserwartung in den kommenden Jahren weiter zunehmen. Ihre individuelle Bedeutung für die Vielzahl der Betroffenen, sowie die sozioökonomischen Auswirkungen werden daher in Zukunft eine immer größere Rolle spielen. Das Verständnis für die Pathogenese der Erkrankung, sowie die physiologische Funktion der beteiligten Proteine, ist dabei essentiell um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Als entscheidendes Protein in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung wird heute A β , der Hauptbestandteil der Senilen Plaques, sowie sein Vorläuferprotein APP angesehen. Die Synthese von A β zu inhibieren oder die Entstehung seiner toxischen Oligomere zu vermeiden könnten wichtige therapeutische Ansätze darstellen. Aufgrund der Vielzahl der physiologischen Funktionen scheint eine vollständige Inhibition der beteiligten Enzyme ohne das Auftreten von komplizierenden Nebenwirkungen nicht möglich. Eine nur moderate Beeinflussung, beispielsweise durch kombinierte Effekte auf verschiedene Enzyme, könnte somit zukünftig eine größere Rolle spielen. Dies wäre beispielweise durch Veränderungen der direkten Lipid-Umgebung der Enzyme möglich.

In einigen Studien konnten bereits Veränderungen der Sulfatide in frühen Stadien der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden. Bisher wurde jedoch kaum untersucht, ob diese Veränderungen eher als Folge der pathologischen Prozesse zu werten sind oder ob Sulfatide selbst die bei der Krankheitsentstehung beteiligten molekularen Vorgänge verändern. Die wechselseitige Beeinflussung der Sulfatid-Homöostase und der APP-Prozessierung sollte daher in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Aufgrund der bisher kontroversen Ergebnisse war es Ziel dieser Arbeit den Sulfatid-Gehalt im Gehirn von Alzheimer-Patienten in einer größeren *post mortem* Kohorte zu analysieren und mögliche Ursachen für diese Veränderungen nachzuweisen. In der Vergangenheit wurde postuliert, dass durch verschiedene an der APP-Prozessierung beteiligte Proteine die Homöostase von Lipiden beeinflusst werden kann. Diese Arbeit hatte daher zum Ziel zu untersuchen, ob solche Effekte auch bei der Sulfatid-Synthese eine

Rolle spielen und welche Enzyme hierbei betroffen sind. Die Bedeutung dieser Ergebnisse unter pathophysiologischen Bedingungen wurde im Verlauf mit Hilfe von Alzheimer-Mausmodellen und humanen *post mortem* Proben untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob sich ein veränderter Sulfatid-Gehalt im Gehirn von Alzheimer-Patienten auf die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung auswirken könnte. Um dieses Ziel zu verfolgen wurde der Einfluss des Sulfatid-Gehaltes auf die APP-Prozessierung und A β -Aggregation untersucht. Hierzu wurden Versuche *in vitro*, an verschiedenen Zellkulturmodellen und *in vivo* in einem Mausmodell durchgeführt. Die ursächlichen molekularen Mechanismen aufzudecken war Ziel der weiterführenden Versuche und gliederte sich daran an. Abbildung 3 fasst die Ziele der Arbeit nochmals schematisch zusammen

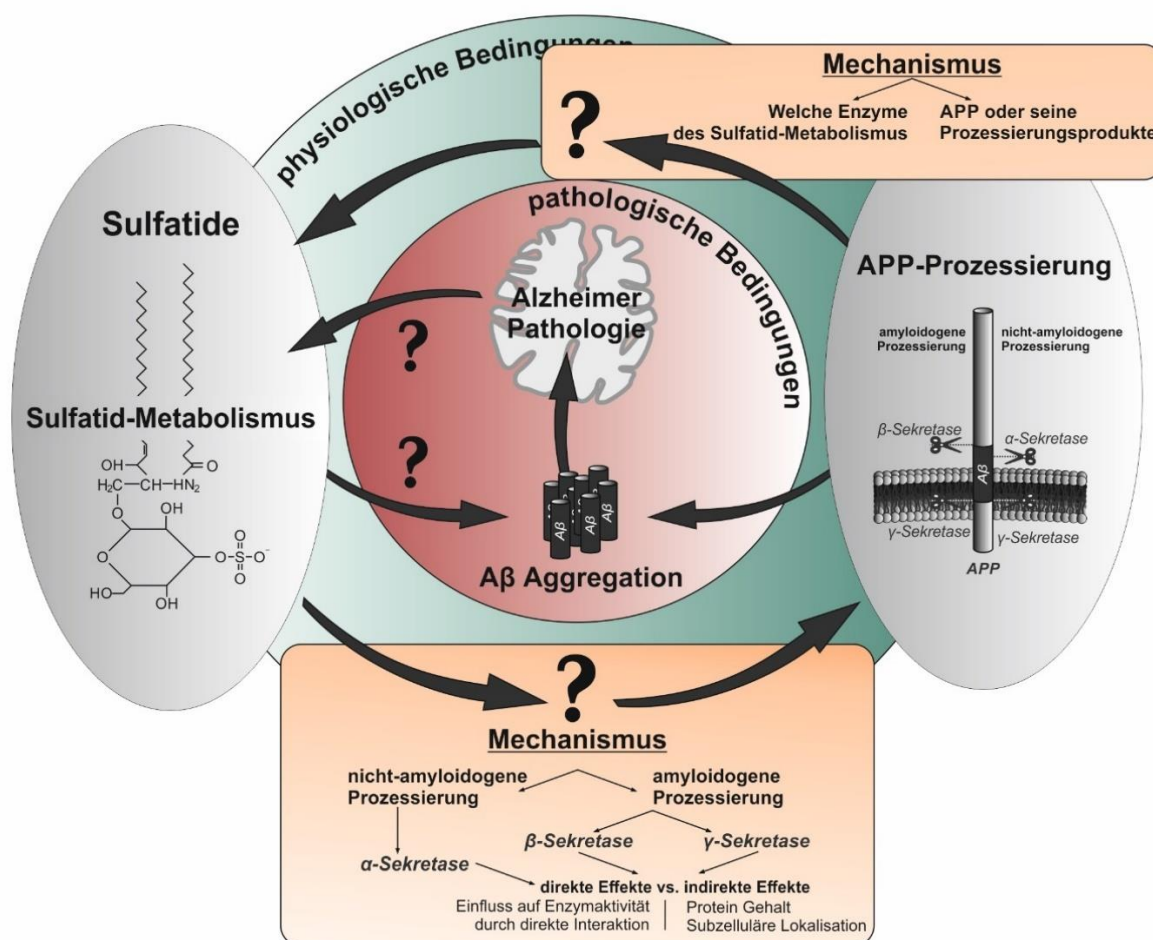


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zielsetzung der Arbeit. Ziel dieser Arbeit ist es die gegenseitige Wechselwirkung des Sulfatid-Metabolismus und der APP-Prozessierung näher zu untersuchen. Zum einen sollte die Auswirkung der APP-Prozessierung auf die Sulfatid-Homöostase beurteilt werden. Dabei sollte im Weiteren auch untersucht werden wie die APP-Prozessierung einen Einfluss auf den Sulfatid-Metabolismus besitzen könnte. Auf der anderen Seite sollte analysiert werden wie sich Sulfatide auf die APP-Prozessierung und A β -Aggregation auswirken. Die zugrundeliegenden Mechanismen sollten im weiteren Verlauf erarbeitet werden. Diese Zusammenhänge sollten weiteren Aufschluss über die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.

Material/Chemikalien	Bezugsquelle
1-Step PNPP	Thermo Scientific
[35S]-Sulfat	PerkinElmer
96-Well-Platte (schwarz) für Fluoreszenz-Messung	Costar
96-Well-Platte (transparent) für OD-Messung	Falcon
96-Well-Platte (RT-PCR; 8x12)	Life Technologies
96-Well-Sammelplatte	Nunc
96-Well-Sterilfilterplatte	Millipore
AICD-Peptid	GenScript
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Life Technologies
A β ₄₀ -Peptid	Botond Penke
A β ₄₂ -Peptid	Yale University
BCA-Lösung (Bicinchoninsäure)	Sigma
Bromphenolblau Na-Salz	Serva
BSA (Fettsäure frei)	Sigma
CaCl ₂ x H ₂ O	Merck
Chloroform, HPLC grade	Merck
Chloroquin	Sigma
Ceramid d18:1/12:0	Avanti Polar Lipids
Complete Proteaseinhibitor-Tabletten (\pm EDTA)	Roche Diagnostics
Cryo Tube Vials	Nunc
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	J.T.Baker
Cycloheximid	Sigma
Cytotoxicity Detection Kit	Roche
DAPT	Merck Millipore
DMEM	Sigma
DMSO	Sigma
96-Loch-Dotblotter DHM96	Scie-Plas
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösungen 1/2	Amersham
EDTA (Titrplex III)	Merck
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol, HPLC grade	J.T.Baker
Falconröhrchen, 15 und 50 ml	Sarstedt
FCS	PAN

Material/Chemikalien	Bezugsquelle
Filterpapier	Whatman
Fixiererpflösung	Kodak
Fluoreszierendes Peptid Substrat, Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH	R&D Systems
Fotokopierfolien TypeC A4	XEROX
Galactosylceramid d18:1/12:0	Avanti Polar Lipids
Glasflaschen, 2ml	NeoLab
Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator 0,5mm	Peqlab
Gluc-ON (m) Gal3st1 promoter reporter clone	GeneCopoeia
Glycerin	J. T. Baker
Glycin	AppliChem
Glaspipette	NeoLab
Glasröhrchen	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein
HBS-Puffer	Synvolux Therapeutics
HCL, rauchend	Merck
HEPES, pH 7,4	Carl Roth
High Capacity cDNA RT Kit	Life Technologies
Hygromycin B	PAN
Isopropanol	J.T.Baker
Imidazol pH 7,0	Sigma
Kanülen 10 x 27Gx ³ / ₄ Nr.20 0,4 mm x 19 mm	Becton Dickinson
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄ x 3H ₂ O	Merck
Keramikkügelchen für Minilys-Homogenisator 1,4 mm	Peqlab
L-Glutamin	Sigma
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen
MEM Aminosäure Lösung	Sigma
Methanol, HPLC grade	VWR
MgCl ₂	Sigma
Milchpulver blotting grade	Roth
Multitip Aufsätze für Multistep-Pipette	Eppendorf
Na ₂ CO ₃	Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Roth
NaCl	AppliChem
NaOH	Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
NEM	Santa Cruz
Nitrozellulosemembran Porengröße 0,2 µm und 0,45 µm	Whatman
Nonidet P40 Substitute	Fluka

Material/Chemikalien	Bezugsquelle
Novex Pre-Cast gels 10–20 % Tricine 1,0 mm x 10 well, 12 well, 16 well	Invitrogen
OptiMEM	Gibco
Pasteurpipetten	VWR
Penicillin-Streptomycin	Sigma
Pepstatin A	Sigma
pEZX-PG04-GAL3ST1-GLuc	GeneCopoeia
Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF	Calbiochem
Protein Rainbow-Marker full-range	Amersham
Protein-G-Sepharose	Sigma
Quartzglas-Küvette 105.251-QS	Hellma
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf
Saccharose	Sigma
Saint PhD	Synvolux Therapeutics
SDS	Sigma
Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit Gal3St1-Promotor	GeneCopoeia
shRNS Plasmid ARSA (suresilencing)	Quiagen
siRNS Plasmid Gal3st1	Santa Cruz
Streptavidin-Agarose 50%ig	Thermo
Sulfatid-Gemisch aus Schweinehirn Extrakt	Avanti Polar Lipids
Sulfatid d18:1/12:0	Avanti Polar Lipids
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo
SYBR-Green Master Mix	Applied Biosystems
Szintillationslösung Ultima Gold	Perkin Elmer
Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer
Thioflavin T	Sigma
Tricin	Biomol
Tris/HCl	Sigma
Tris-Tricin-Gele (10–20%)	Anamed Gelektrophorese
Triton X-100	Merck
Trizma Base	Sigma
Trizol Reagenz	Invitrogen
Trypsin-EDTA-solution (1x)	Sigma
Tween-20	Sigma
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Well-Platten	Peqlab
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Scientific
Wasser, HPLC grade	VWR
Wasser, RNase-frei	Qiagen

Material/Chemikalien	Bezugsquelle
Wheaton-Röhrchen	Wheaton
Zellkultur 6-Well-Platte	Falcon
Zellkultur 24-Well-Platte	Falcon
Zellkultur 96-Well-Platte	Falcon
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt
Zellkulturschale 500 cm ²	Thermo Scientific
Zeocin	Life Technologies
ZnCl ₂	Merck
α -Sekretase-Substrat (#565767)	Calbiochem
β -Mercaptoethanol	Sigma
β -Sekretase-Inhibitor II (#565749)	Calbiochem
β -Sekretase-Substrat (#565758)	Calbiochem
γ -Sekretase-Inhibitor X (# 565771)	Calbiochem
γ -Sekretase-Substrat (#565764)	Calbiochem

3.1.2 Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
8-Kanal-Multipette	Eppendorf
Axiovert 200 mit Kamera HAL 100	Zeiss
Analysenwaage ABS 80-4	Kern
Blotkammer Trans-Blot Cell	BioRad
Brutschrank 37 °C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipette M4	Eppendorf
Fluorometer Infinite M1000Pro	Tecan
Fluorometer Safire ²	Tecan
Gefrierschrank -20 °C Premium	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Xcell SureLock Novex Mini-Cell	Invitrogen
Gwyddion 2.29	Gwyddion
Hamilton Pipette	Hamilton
Heizblock Thermoshaker	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer	Heidolph
Massenspektrometer 4000 QTRAP	AB Sciex
Mikrowelle	Continent

Gerät	Hersteller
Minilys-Homogenisator	Peqlab
Multipette plus	Eppendorf
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific
NanoWizard II AFM	JPK Instruments
OD Lesegerät für 96-Lochplatten	Thermo Scientific
PCR-Cycler PRIMUS 25 Advanced	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
Pipetten-Set Research	Eppendorf
Potter-Röhrchen	B. Braun
PotterS Homogenisator	B. Braun
Power-Supply Consort EV231 für Gelelektrophorese	Sigma Aldrich
Reagenzglasschüttler Multi-Reax	Heidolph Instruments
Rotor SW40	Beckmann Coulter
Rotor SW41	Beckmann Coulter
Rotor TLA-55	Beckmann Coulter
Rotor TLA-100 für Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Software Analyst 1.5	AB Sciex
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software JPK NanoWizard Control v.4	JPK Instruments
Software Piko Real 2.1	Thermo Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Software Zetasizer 7.0 I	Malvera Instruments Ltd.
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Stickstoff-Abdampfvorrichtung	VLH
Stickstofftank -196 °C GT 140	Air Liquide
Szintillationszähler Tri-Carb 2800TR	Perkin Elmer
Teflonschaber	neolab
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf
TranBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Turbo Spray-Ionenquelle	AB Siex
Überkopfschüttler Reax2	Heidolph
Ultraschallbad USR I	Julabo
Ultrazentrifuge Optima LE-80k	Beckman Coulter
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Wärmeschrank UT12	Heraeus
Wasserbad	GFL
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	EMLI
Zentrifuge 5415D	Eppendorf

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL	Heraeus
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Zetasizer Nano	Malvera Instruments Ltd

3.1.3 Verwendetes *in vivo* Material

3.1.3.1 Verwendetes humanes *post mortem* Gehirngewebe

Die verwendeten humanen *post mortem* Gehirnproben wurden von BrainNet in München zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei dem verwendeten Gehirngewebe für die massenspektrometrische Untersuchung um Anteile des Kortexbandes des Frontallappens. Für die qRT-PCR wurden sowohl Proben aus dem Kortexband von Frontallappen als auch Temporallappen des gleichen Gehirngewebes untersucht. Die Reinheit der Grauen Substanz wurde mit Hilfe einer Analyse des Protein/Nassgewicht-Verhältnisses i. R. einer vorangehenden Arbeit überprüft (MYLONAS, 2015). In der Grauen Substanz kann mit etwa 71 mg Protein/g Nassgewicht ein deutlich höherer Protein-Gehalt gemessen werden als in der Weißen Substanz (ca. 11 mg Protein/g Nassgewicht). Konnte in Proben ein Verhältnis von weniger als 55,8 mg Protein/g Nassgewicht (einfache Standardabweichung) gemessen werden, wurden diese unter der Annahme eines zu hohen Anteils Weißer Substanz exkludiert (MYLONAS, 2015).

Tabelle 3: Spezifikationen der verwendeten humanen *post mortem* Gehirnproben.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Spezifikationen der unterschiedlichen *post mortem* Gehirnproben. Abkürzungen: w = weiblich, m = männlich. CERAD = "The consortium to establish a registry for AD". Unter Verwendungszweck sind die Methoden aufgeführt, für welche die genannte Probennummer verwendet wurde. Die Patienten der Kontrollgruppe zeigten zum Todeszeitpunkt keine klinischen Symptome einer Alzheimer-Erkrankung. Das angegebene Alter beschreibt das Alter zum Todeszeitpunkt. Die verschiedenen Braak-Stadien wurden entsprechend Braak et. al. neuropathologisch bestimmt (BRAAK, BRAAK, 1991). Bei der CERAD-Einteilung handelt es sich um eine semiquantitative Bestimmung der Häufigkeit neuritischer Plaques, welche im Gegensatz zu den Braak-Stadien alterskorreliert wird (MIRRA et al., 1991).

Probe	Verwendungszweck	Diagnose	Geschlecht	Alter	Braak Stadium	CERAD
# 1	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	88	I-II	B
# 2	RT-PCR	Kontrolle	w	77	II	C
# 3	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	m	75	II	0
# 4	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	75	III-IV	B

Probe	Verwendungszweck	Diagnose	Geschlecht	Alter	Braak Stadium	CERAD
# 5	RT-PCR	Kontrolle	w	76	III-IV	C
# 6	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	m	63	I	0
# 7	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	m	71	0-I	0
# 8	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	m	85	III-IV	B
# 9	RT-PCR	Kontrolle	m	87	I-II	0
# 10	RT-PCR	Kontrolle	m	61	0	0
# 11	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	85	I	0
# 12	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	80	III-IV	0
# 13	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	77	II	A
# 14	RT-PCR + Massenspektrometrie	Kontrolle	w	83	II	0
# 15	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	83	VI	C
# 16	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	82	V	C
# 17	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	80	V	C
# 18	RT-PCR	Alzheimer	m	73	V-VI	C
# 19	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	65	V-VI	C
# 20	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	67	V-VI	C
# 21	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	74	V-VI	C
# 22	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	75	VI	C
# 23	RT-PCR	Alzheimer	m	83	VI	C
# 24	RT-PCR	Alzheimer	w	82	V-VI	C
# 25	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	68	VI	C
# 26	RT-PCR	Alzheimer	w	78	V-VI	C
# 27	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	85	III	C
# 28	RT-PCR	Alzheimer	m	62	VI	C
# 29	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	85	IV	C

Probe	Verwendungszweck	Diagnose	Geschlecht	Alter	Braak Stadium	CERAD
# 30	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	73	V-VI	C
# 31	RT-PCR	Alzheimer	w	76	V-VI	C
# 32	RT-PCR	Alzheimer	m	87	V	C
# 33	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	88	VI	C
# 34	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	78	VI	C
# 35	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	87	V	C
# 36	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	83	V	C
# 37	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	78	VI	C
# 38	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	76	V	B
# 39	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	88	V	C
# 40	RT-PCR	Alzheimer	m	80	V	C
# 41	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	w	80	V	C
# 42	RT-PCR + Massenspektrometrie	Alzheimer	m	70	VI	C
# 43	RT-PCR	Alzheimer	w	75	VI	C
# 44	RT-PCR	Alzheimer	w	79	V	C

3.1.3.2 Verwendetes murines *in vivo* Material

Das verwendete murine *in vivo* Material wurde im Rahmen von Kooperationsprojekten durch andere Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die genaue Herkunft kann nachfolgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4: Murines *in vivo* Material

Genotyp	Gewebeart	Beschreibung	Herkunft
Wildtyp (wt)	Gehirn	Vergleichsgruppe aus den entsprechenden Laboren	Siehe folgende Zeilen
APP ^{-/-}	Gehirn/ Hippocampus	Mausmodell mit homozygotem APP Knock-Out	Zucht, Fütterung und Tötung durch das Labor von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg) (RING et al., 2007)

Genotyp	Gewebeart	Beschreibung	Herkunft
APP Δ CT15	Gehirn/ Hippocampus	Deletion der letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus von APP durch homologe Rekombination	etabliert und gezüchtet im Labor von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg);(RING et al., 2007)
5xFAD	Gehirn	Mausmodell mit kombinierter Expression 5 verschiedener humaner FAD-APP- und PS 1-Mutationen: APP K670N/M671L (MULLAN et al., 1992), APP I716V (ECKMAN et al., 1997), APP V717I (GOATE et al., 1991), PS1 M146L und PS1 L286V (SHERRINGTON et al., 1995)	für diese Arbeit zur Verfügung gestellt durch das Labor von Dr. Kristina Endres (Mainz) (REINHARDT et al., 2014)
ASA ^{-/-}	Gehirn	Mausmodell mit homozygotem Knock-Out der Arylsulfatase A	für diese Arbeit zur Verfügung gestellt durch das Labor von Prof. Dr. Volkmar Gieselmann (Bonn) (HESS et al., 1996)
ASA ^{+/-}	Gehirn	Mausmodell mit heterozygotem Knock-Out der Arylsulfatase A, Phänotyp entspricht dem von Wildtyp Mäusen, Kontrollgruppe für ASA ^{-/-} Maus	für diese Arbeit zur Verfügung gestellt durch das Labor von Prof. Dr. Volkmar Gieselmann (Bonn) (HESS et al., 1996)

3.1.4 Verwendete Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung / Herkunft
MEF wt	Embryonale Mausfibroblasten (MEF) Wildtyp; zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. U. Müller (Heidelberg)
MEF PS 1/2 ^{-/-}	Presenilin 1 und 2 defiziente embryonale Mausfibroblasten; zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Bart de Strooper (Leuve,Belgien) (HERREMAN et al., 2000)
MEF PS res	MEF PS 1/2 ^{-/-} Zellen (s. o.) stabil retransfiziert mit humanem PS1 Wildtyp; hergestellt durch Dr. Eva Hesser; Klonierung des Plasmids durch Dr. Marcus Grimm (GRIMM et al., 2005)
MEF APP/APLP2 ^{-/-}	APP/APLP2 defiziente embryonale Mausfibroblasten; zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. U. Müller (Heidelberg) (HEBER et al., 2000)
MEF APP Δ CT15	Embryonale Mausfibroblasten mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus von APP; zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. U. Müller (Heidelberg) (RING et al., 2007)

Bezeichnung	Beschreibung / Herkunft
MEF APP Δ CT15 C50	MEF APP Δ CT15 Zellen (s. o.) stabil transfiziert mit den letzten 50 Aminosäuren des C-Terminus von APP; Klonierung des Plasmids und Herstellung durch Dr. Christoph Stahlmann
MEF APP Δ CT15 (mock)	MEF APP Δ CT15 Zellen (s. o.) stabil transfiziert mit einem mock-Plasmid als Kontrollzelllinie für MEF APP Δ CT15 C50; Klonierung des Plasmids und Herstellung durch Dr. Christoph Stahlmann
N2a wt	Wildtyp einer murinen Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y wt	Wildtyp einer humanen Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y APP	SH-SY5Y wt mit stabiler Überexpression von APP ₆₉₅ ; hergestellt durch Dr. Heike Grimm
SH-SY5Y APBB1-KD (Fe65-KD)	SH-SY5Y wt stabil transfiziert mit APBB1-shRNS zur Generierung eines Fe65-Knock-Down; hergestellt durch Dr. Sven Grösgen
SH-SY5Y ARSA-KD	SH-SY5Y wt stabil transfiziert mit Arylsulfatase A (Genname: ARSA)-shRNS zur Generierung eines ARSA-Knock-Down im Rahmen dieser Arbeit generiert durch Valerie Zimmer
SH-SY5Y C50	SH-SY5Y wt Zellen stabil transfiziert mit den letzten 50 Aminosäuren des C-Terminus von APP; Klonierung des Plasmids und Herstellung der Zelllinie durch Dr. Christoph Stahlmann
SH-SY5Y mock	SH-SY5Y wt Zellen (s. o.) stabil transfiziert mit einem mock-Plasmid als Kontrollzelllinie für SH-SY5Y C50; Klonierung des Plasmids und Herstellung durch Dr. Christoph Stahlmann
SH-SY5Y wt (mock)	SH-SY5Y wt stabil transfiziert mit mock-shRNS als Kontrollzelllinie für SH-SY5Y ARSA KD im Rahmen dieser Arbeit generiert durch Valerie Zimmer Bzw. als Kontrollzelllinie für SH-SY5Y APBB1-KD generiert durch Dr. Sven Grösgen

3.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium
SH-SY5Y-Wildtyp (SH-SY5Y wt)	DMEM, 10 % FCS, 1 % MEM
SH-SY5Y-APP SH-SY5Y-ARSA KD SH-SY5Y-FE65 KD SH-SY5Y mock	DMEM, 10 % FCS, 1 % MEM, 400 μ g/ml Hygromycin B
SH-SY5Y-mock SH-SY5Y C50	DMEM, 10 % FCS, 1 % MEM, 300 μ g/ml Zeocin

Zelllinie	Medium
N2a-Zellen	DMEM, 10 % FCS, 1 % MEM, 1 % Penicillin-Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat
MEF Wildtyp (MEF wt)	DMEM, 10 % FCS
MEF APP/APLP2 ^{-/-}	DMEM, 10 % FCS
MEF APP Δ CT15	DMEM, 10 % FCS
MEF PS1/2 ^{-/-}	DMEM, 10 % FCS
MEF PS1 rescue (MEF PS1r) MEF APP Δ CT15 C50 rescue MEF APP Δ CT15 mock	DMEM, 10 % FCS, 300 μ g/ml Zeocin

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Techniken

3.2.1.1 Kultivieren eukaryotischer Zellen

Verwendete Medien:

Zellkulturmedium

10 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinien]

Die oben genannten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit auf Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90–100 % passagiert. Die Schalen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin für 5 Min bei 37 °C inkubiert. Durch die proteolytische Aktivität von Trypsin werden die Oberflächenproteine verdaut, sodass sich die adhärenen Zellen von der Kulturschale lösen und die Zell-Zell-Kontakte aufgeschlossen werden. Dieser Vorgang wurde durch die entstehenden Scherkräfte beim Pipettieren unterstützt und anschließend mit Hilfe von FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde je nach gewünschter Verdünnung gleichmäßig in Schalen mit frischem Medium überführt und die Zellen wie oben beschrieben weiter kultiviert.

3.2.1.2 Kryokonservieren eukaryotischer Zellen

Verwendete Medien:

Gefriermedium

20 % FCS, 10 % DMSO in DMEM

Zur dauerhaften Lagerung der hier verwendeten Zelllinien, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % während ihrer exponentiellen Wachstumsphase eingefroren. Nachdem die Zellen mit sterilem PBS gewaschen wurden erfolgte der Trypsinverdau wie unter Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben. Die entstandene Zellsuspension wurde mit 5 ml Kulturmedium versetzt und bei Raumtemperatur (RT) und 1500 rpm für 5 Min. in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Um das verbleibende Trypsin vor der Kryokonservierung zu entfernen wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 3 ml des DMSO-haltigen Gefriermediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Einfrierröhrchen verteilt, sodass ca. 5×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen weggefroren wurden. Zum Einfrieren wurden die Zellen in speziellen Boxen mit einer Abkühlrate von $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad erwärmt, die Zellsuspension mit 5 ml frischem Wachstumsmedium in einem Falcon-Röhrchen versetzt und dieses bei RT und 1500 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen um das DMSO-haltige Gefriermedium zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Kulturschale überführt. Vor der weiteren Verwendung der Zellen, wurden diese wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben weiterkultiviert und mindestens zweimal passagiert, um eine potentielle Beeinflussung der Versuche durch Veränderungen der Zellhomöostase im Rahmen des Einfrierprozesses zu vermeiden.

3.2.1.3 Inkubation von Zellen mit unterschiedlichen Substanzen

3.2.1.3.1 Inkubation von Zellen mit Sulfatiden oder Galactosylceramid

(etabliert im Rahmen dieser Arbeit)

Verwendete Medien:

Inkubationsmedium

0,1 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinien]

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Zellkulturschalen zu ermöglichen, wurden beim letztmaligen Passagieren der Zellen zunächst die Zellsuspensionen mehrerer Kulturschalen zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde durchmischt und gleichmäßig, je nach geplanten Versuchen, auf 10 cm Schalen, 6- oder 96-Loch Platten verteilt. Da durch den Trypsinverdau auch an der APP-Prozessierung beteiligte Plasmamembranproteine proteolytisch gespalten werden können wurden die Zellen anschließend für mindestens 24 Std. wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben kultiviert um eine Regeneration der Zellhomöostase zu ermöglichen. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90–100 % wurde das Wachstumsmedium abgenommen und die Zellen für 16 Std. mit FCS-reduziertem Inkubationsmedium kultiviert. Dieses

FCS-reduzierte Medium wurde auch während den folgenden Inkubationszeiten zum Kultivieren der Zellen verwendet, um eine Beeinflussung durch die im FCS enthaltenen Lipide zu vermeiden.

Die zur längerfristigen Lagerung eingedampften und in flüssigem Stickstoff gelagerten Sulfatide aus Schweinehirn-Extrakt wurden unmittelbar vor der Inkubation in Ethanol aufgenommen. Um die Löslichkeit der Sulfatide zu erhöhen wurden diese für 45 Sek. im 50 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend für 45 Sek. mittels Vortex durchmischt. Dieser Vorgang wurde bis zu drei Mal wiederholt, bis die Lösung klar und das Lipid vollständig gelöst war. Unter Bewegung des Mediums erfolgte die Zugabe der Sulfatide in das auf 37 °C erwärmte Inkubationsmedium, das Inkubationsmedium der Kontrollen wurde mit der gleichen Menge Ethanol behandelt. Nach dem die Zellen für 16 Std. mit FCS-reduziertem Medium inkubiert wurden, sind sie anschließend zunächst für 8 Std. und dann für weitere 16 Std. mit Sulfatiden bzw. Lösungsmittel angereichertem Inkubationsmedium inkubiert worden. Hierbei wurden für 10 cm-Schalen 5 ml Medium, für 6-Loch-Schalen 1,5 ml Medium und für 96-Loch-Schalen 100 µl Medium verwendet.

Die Inkubation mit Galactosylceramiden erfolgte nach dem gleichen zeitlichen Schema. Ein zusätzliches Erwärmen des Lipids war aufgrund der besseren Löslichkeit von GalCer in Ethanol nicht notwendig, sodass das in Ethanol gelöste Lipid dem Inkubationsmedium direkt zugegeben werden konnte.

3.2.1.3.2 Inkubation von Zellen mit γ -Sekretase-Inhibitor

(modifiziert nach (ROBINSON et al., 2014))

Verwendete Medien:

Inkubationsmedium

0,1 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinien]

Die Inhibition der γ -Sekretase erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des γ -Sekretase-Inhibitor X oder DAPT. Die Zellen wurden zunächst für 24 Std. mit Inkubationsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte für 24 Std. die Zugabe des in DMSO gelösten γ -Sekretase Inhibitor X, sodass eine Endkonzentration von 2 µM und eine DMSO-Konzentration von 2 ‰ vorlagen. Der γ -Sekretase-Inhibitor DAPT wurde für 72 Std. in einer Konzentration von 2,5 µM und einer DMSO-Konzentration von 1 ‰ inkubiert. Die Kontrollzellen wurden nur mit DMSO in der entsprechenden Konzentration und Dauer inkubiert.

3.2.1.3.3 Inkubation von Zellen mit Cycloheximid oder Chloroquin

(etabliert im Rahmen dieser Arbeit)

Verwendete Medien:

Inkubationsmedium

0,1 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend den verwendeten Zelllinien]

Die Inhibition der Translation zur Beurteilung des Einflusses der Sulfatide auf die BACE1-Stabilität und Proteindegradation erfolgte in dieser Arbeit durch Zugabe von Cycloheximid. Die Inhibition der Lysosomen wurde durch Zugabe von Chloroquin erreicht. Die Zellen wurden hierzu wie unter Abschnitt 3.2.1.3.1 mit Sulfatiden bzw. Lösungsmittel im Inkubationsmedium inkubiert. Dem Inkubationsmedium wurden während der 24-stündigen Inkubationszeit Cycloheximid (20 µg/ml) bzw. Chloroquin (30 µM) zugefügt. Das Medium wurde einmalig nach 8 Std. gewechselt, auch beim zweiten Inkubationsschritt wurden Cycloheximid bzw. Chloroquin in der o. g. Konzentration zugefügt. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Bestimmung untersucht und lag für beide Stoffe unter 3%. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität zwischen den mit Sulfatiden behandelten und den mit Ethanol behandelten Zellen nachweisen.

3.2.1.3.4 Inkubation von Zellen mit APP-Prozessierungsprodukten

3.2.1.3.4.1 Langzeitinkubation mit APP-Prozessierungsprodukten

(nach (GRIMM et al., 2012))

Verwendete Medien:

Zellkulturmedium

10 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinien]

Zur Analyse des Einflusses verschiedener APP-Prozessierungsprodukte auf die Sulfatid-Synthese erfolgte eine Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Produkten über 9 Tage. Hierbei wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit alle 48 Std. nach Erreichen der 90%igen Konfluenz 1:5 passagiert. Das Kulturmedium wurde um das jeweilige Peptid in der unten aufgeführten Menge ergänzt, wobei alle 12 Std. das Kulturmedium gewechselt wurde. Nach einer Gesamtzeit von 9 Tagen wurden die Zellen zur weiteren Verwendung geerntet.

Tabelle 7: Inkubationsbedingungen für APP-Prozessierungsprodukte:

APP-Prozessierungsprodukt	Konzentration	Inkubationsdauer [Tagen]
A β ₄₀	10 ng/ml	9
AICD	2 μ M	9

3.2.1.3.4.2 Liposomen-vermittelte Inkubation von Zellen mit AICD

(modifiziert nach (ROBINSON et al., 2014))

Verwendete Medien:

Inkubationsmedium

0,1 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinie]

Saint-PhD-Reagenz

Zur Untersuchung der Gal3st1-Promotoraktivität (siehe hierzu Abschnitt 0) wurde eine lipofektionsbasierte Inkubation mit AICD durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und durch 800 μ l frisches Medium ersetzt. Nun wurden 95 μ l des vom Hersteller gelieferten HBS-Puffers mit 2,5 μ l AICD-Peptid (1 mM in H₂O) bzw. die Kontrollen mit 2,5 μ l H₂O durchmischt. Es wurden 63 μ l Saint-PhD-Reagenz hinzugegeben und der Ansatz für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 160 μ l dieses Ansatzes tropfenweise zum Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen 30 Min. inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte entsprechend Abschnitt 0.

3.2.1.3.5 Inkubation von Zellen mit radioaktivem [35S]-Sulfat

(etabliert im Rahmen dieser Arbeit)

Verwendete Medien:

Inkubationsmedium

0,1 % FCS in DMEM [+ Zusätze entsprechend der verwendeten Zelllinie]

Zur Untersuchung der Sulfatid-*de novo*-Synthese wurden Zellen mit radioaktivem [35S]-Sulfat behandelt. Dieses wird durch das Co-Enzym PAPS und die CST in die Sulfatide eingebaut und kann nach der Lipidextraktion mittels Szintillationsmessung bestimmt werden.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90–100 % wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben kultiviert und anschließend für 16 Std. mit FCS-reduziertem Inkubationsmedium kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Medium gewechselt, pro Kulturschale mit 5 ml Inkubationsmedium wurden zusätzlich 100 μCi [35S]-Sulfat zugegeben und die Zellen für weitere 24 Std. kultiviert. Dies gewährleistet eine ausreichende Aufnahme des [35S]-Sulfates, sowie einen möglichst vollständigen Einschluss in PAPS und folglich auch in die Sulfatid-Biosynthese.

3.2.1.4 Transfektion von Zellen

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

Die Transfektion von Zellen erfolgte in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Plasmiden um die Genexpression spezifischer Gene gezielt zu reduzieren. Zum einen erfolgte eine Transfektion mit shRNS-Plasmid und Kontrollplasmid, um einen stabilen Knock-Down der ASA in SH-SY5Y wt-Zellen herzustellen. Zum anderen wurde eine transiente Transfektion mit siRNS-Plasmid bzw. Kontrollplasmid durchgeführt, um einen Knock-Down der CST in SH-SY5Y wt-Zellen zu generieren. ShRNS-Plasmide werden ebenfalls in der Zelle zu siRNS gespalten. Die Bindung der siRNS an die mRNA des Zielgens führt dabei zu einer Degradation dieser mRNA wodurch sich die Expression dieses Gens verringert (ELBASHIR et al., 2001). Nach transienter Transfektion kann die reduzierte Transkription des Zielgenes für ca. 48–72 Std. nachgewiesen werden. Die Kontrollplasmide haben dabei keine spezifische Auswirkung auf die Genexpression.

Die Transfektion von SH-SY5Y wt-Zellen erfolgte in einer 96-Loch-Zellkulturschale. Die Zellen wurden ca. 24 Std. zuvor in die Vertiefungen verteilt, sodass am Folgetag eine Konfluenz von 60–80 % erreicht wurde. Es wurden zwei Ansätze zur Transfektion hergestellt. Zum einen wurden 0,25 μg shRNS- bzw. siRNS-Plasmid mit 25 μl OptiMEM vermischt, zum anderen wurden 0,6 μl Transfektionsreagenz (Lipofectamin 2000) mit 25 μl OptiMEM versetzt. Nach ca. 5 Min. wurden die beiden Ansätze durchmischt und für 20 Min. bei RT inkubiert. Während dieser Zeit kommt es zu einer Komplexbildung der RNS mit dem Transfektionsreagenz, wodurch anschließend das Eindringen der Plasmide in die Zelle ermöglicht wird. Die Zellen werden einmal mit OptiMEM gewaschen und anschließend 50 μl des genannten Gemisches in je eine Vertiefung der 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -Gehalt für 6 Std. Nach dieser Zeit werden 50 μl des normalen Zellkulturmediums mit doppelter Serum-Konzentration hinzugegeben und die Zellen für weitere 18 Std. inkubiert. Das Transfektionsmedium wird schließlich restlos entfernt und die Zellen in normalem Kulturmedium weiter kultiviert. Ist eine Transfektion mit siRNS-Plasmid durchgeführt worden sind die weiteren Analysen der Zellen 24 Std. nach dem letzten Wechsel des Mediums erfolgt. Mit shRNS-Plasmid stabil transfizierte Zellen wurden entsprechend des folgenden Abschnitts selektioniert.

3.2.1.5 Selektion einer ARSA-KD-Zelllinie nach stabiler Transfektion mit shRNS

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

Es wurden insgesamt vier verschiedene shRNS-Plasmide zur Generierung des ARSA Knock-Down und ein Kontrollplasmid transfiziert. Die mit den shRNS-Plasmiden transfizierten Zellen wurden nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz auf 24-Loch-Zellkulturplatten verteilt, sodass nur eine geringe Konfluenz von ca. 10–20 % vorlag. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen durch Zugabe von Hygromycin B (400 µg/ml). Die Zellen wurden in regelmäßigem Abstand in größere Schalen überführt, sodass möglichst einzelne Klone generiert werden. Nachdem die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen 100%ige Konfluenz erreicht hatten wurde mittels RT-PCR ein geeigneter Klon bestimmt und wie unter Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben kryokonserviert.

3.2.1.6 Analyse der Zytotoxizität

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

Um eine schwere, zellschädigende Wirkung der inkubierten Substanzen auszuschließen erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität in dieser Arbeit mit Hilfe des „Cytotoxicity Detection Kit Plus“ der Firma Roche. Als Grundlage dieser Methode dient die Aktivitätsmessung der Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Zellkulturmedium. Als zytosolisches Enzym befindet sich die LDH nur bei Verlust der Zellintegrität im Medium, sodass die dort gemessene Aktivität direkt proportional zur Zytotoxizität ist.

Die photometrische Messung der LDH-Aktivität verläuft über zwei Reaktionsschritte: die LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat wodurch NAD^+ zu NADH und H^+ reduziert wird, dieses wird anschließend zur Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid zu Formazan durch die Diaphorase benötigt wird. Der durch die Entstehung von Formazan ausgelöste Farbumschlag von gelb nach rot kann mit Hilfe einer Absorptionsmessung bei 491 nm quantifiziert werden.

Durch das Abtöten der Zellen einer vergleichbaren Zellkulturschale mit 1 % (v/v) Triton-X100 wurde zunächst eine Standardreihe hergestellt, wobei das Medium dieser Schale schrittweise verdünnt wurde (100 % Zytotoxizität bis 0 % Zytotoxizität). Jeweils 100 µl dieser Standardreihe und 100 µl des Mediums der inkubierten Zellen wurden in eine transparente 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität entsprechend dem Herstellerprotokoll aus mindestens drei unabhängigen Inkubationen.

3.2.1.7 SEAP-Sekretionsversuch zur Bestimmung der Proteinsekretion

(nach (BURG et al., 2013), modifiziert nach Herstellerprotokoll 1-Step PNPP, Thermo Scientific)

Die Bestimmung der Proteinsekretion erfolgte mit Hilfe eines Sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP)-Sekretionsversuchs. Die SEAP wird wie andere Proteine über sekretorische Vesikel sezerniert. Der Nachweis ihrer Aktivität im Medium der zuvor entsprechend transfizierten Zellen, gibt somit indirekt Aufschluss über die Proteinsekretion dieser Zellen. para-Nitrophenylphosphat (p-NPP) dient der SEAP als Substrat, wobei bei der Umsetzung der wasserlösliche Farbstoff p-Dinitrophenol entsteht welcher photometrisch gemessen werden kann.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70–80 % kultiviert und anschließend mit dem SEAP-kodierenden Plasmid pVectOZ-SEAP transfiziert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.1.4). Nach 24 Std. wurden die Zellen auf eine 24-Loch-Platte verteilt und weitere 24 Std. später entsprechend Abschnitt 3.2.1.3.1 mit Sulfatiden inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und für 5 Min. bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend für 10 Min. in einem Heizblock bei 65 °C erhitzt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt und jeweils 100 µl in eine transparente 96-Loch-Platte überführt. Durch Zugabe von 100 µl 1-Step PNPP Lösung konnte die Reaktion gestartet werden. Nach 20 Min. Inkubation bei RT und 150 U/min konnte die Reaktion durch 100 µl 1M NaOH wieder gestoppt werden. Die relativ zueinander gebildete Menge des p-Dinitrophenols konnte im Platten-Photometer bei 405 nm gemessen werden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolation von RNS

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

Verwendete Puffer:

TRIzol Reagent

Die Isolation von RNS erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe von TRIzol. Dieses Reagenz enthält zum Lysieren der Zellen und zur Inaktivierung der RNAsen Guanidiniumthiocyanat, zusätzlich dient Phenol zum Lösen der RNS.

Zunächst wurde das Medium abgenommen, die Zellen von einer 10 cm²-Zellkulturschale mit 1 ml TRIzol abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde für 5 Min. bei RT inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform für 15 sek mittels Vortex durchmischt. Nach erneuter Inkubation für 3 Min. bei RT erfolgte die Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 15 Min. Hierbei

bilden sich drei Phasen: In der oberen wässrigen Phase ist dabei die RNS enthalten; die weißlich erscheinende Interphase und die untere rötliche Phase enthalten DNS, Proteine und Lipide. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol durchmischt und für 10 Min. bei RT inkubiert, wodurch es zu einem Ausfällen der RNS kommt. Anschließend wurden die Proben erneut für 10 Min. bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert um die RNS zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 7500 rpm und 4 °C für 5 Min. wurde der Überstand wie zuvor verworfen und das Pellet für 2 Min. getrocknet. Die RNS wurde in 100 µl RNase freiem H₂O aufgenommen und bei 55 °C für 10 Min. erwärmt.

Die Isolation von RNS erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen und Dr. Christoph Stahlmann.

3.2.2.2 Bestimmung der Reinheit und RNS-Konzentration nach RNS-Isolation

(nach Disseration (GRÖSGEN, 2013))

Die RNS-Konzentration sowie die Kontrolle der Reinheit der Isolation wurde mittels Extinktionsmessung bestimmt. Hierzu wurden die Proben zunächst mit RNase freiem H₂O 1:10 verdünnt und in Küvetten überführt. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Während Nukleinsäuren ihr Extinktionsmaximum bei 260 nm aufweisen, zeigen Proteine ihre stärkste Extinktion bei 280 nm. Durch die Bildung des Quotienten der Extinktionskoeffizienten OD 260 nm/OD 280 nm kann somit die Reinheit der Proben überprüft werden, wobei der optimale Quotient zwischen 2,0 und 2,2 liegt. In dieser Arbeit wurden nur Proben weiter verwendet die dieses Kriterium erfüllten.

Folgende Formel beruht auf der Erkenntnis, dass bei einem Extinktionskoeffizienten von 1 eine RNS-Konzentration von 40 µg/ml vorliegt und wurde zur Ermittlung der RNS-Konzentration verwendet:

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

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNS erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen und Dr. Christoph Stahlmann.

3.2.2.3 Synthese von cDNS

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

Die cDNS-Synthese aus der zuvor isolierten RNS wurde mittels Reverser Transkription mit Hilfe des *High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies)* durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Proben

gemäß ihrer RNS-Konzentration verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 0,2 µg/µl erreicht wurde und anschließend wie im Folgenden aufgeführt mit den Reagenzien durchmischt:

2 µl	10 x RT Buffer
0,8 µl	25 x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10 x RT Random Primer
1 µl	MultiScribe Reverse Transkriptase
4,2 µl	Nuclease-freies Wasser
10 µl	RNS (2 µg, ad 10 µl H ₂ O)

Der Ansatz wurde im Thermocycler in 3 Schritten inkubiert: 10 Min. bei 25 °C, 120 Min. bei 37 °C und schließlich für 5 Min. bei 85 °C. Die Proben wurden auf 4 °C heruntergekühlt, die entstandene cDNS 1:10 in Nuclease-freiem Wasser verdünnt und für weitere Versuche bei -80 °C gelagert.

Die Synthese der cDNS erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen und Dr. Christoph Stahlmann.

3.2.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. qRT-PCR)

(nach Dissertation (GRÖSGEN, 2013))

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion diente in dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung der mRNS und somit dem indirekten Nachweis der Transkriptionsrate verschiedener Gene zu einem definierten Zeitpunkt. Nach dem Umschreiben der RNS in cDNS gemäß Abschnitt 3.2.2.3. erfolgte die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion mit Hilfe der SYBR-green-Methode. Hierbei lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-green an die entstehende Doppelstrang-DNS an, wodurch eine Fluoreszenz initiiert wird, die während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Menge der doppelsträngigen DNS zunimmt. Die spezifische Bindung des Primers wurde mittels Schmelzkurvenanalyse der entstandenen Amplifikate evaluiert.

Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion wurde folgender Ansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert:

0,5 µl	Primer forward
0,5 µl	Primer reverse
4 µl	Nuclease-freies H ₂ O
10 µl	SYBR Green Master Mix
5 µl	cDNS

Anschließend wurden die Proben gemäß dem folgenden Protokoll im *Piko Real Cycler* der Firma *ThermoScientific* vermessen.

Tabelle 8: qRT-PCR Protokoll

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Sek.]	Zyklen
I	95	20	1
II	95	3	
III	60	30	40
IV	Schmelzkurvenanalyse		1

Anhand der Ergebnisse wurde zunächst der Schwellenwert (Ct-Wert) jedes spezifischen Gens festgelegt. Dieser entspricht dem Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal exponentiell wächst und erstmals das Hintergrundniveau überschreitet. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mittels der $\Delta/\Delta C_t$ -Methode nach Livak und Schmittgen (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). Dabei wird die relative Veränderung der Expression unterschiedlicher Gene in Bezug auf ein Referenz-Gen berechnet. Als Referenz-Gen diente hier β -Aktin, dessen Expression nur sehr gering reguliert wird und daher kaum Schwankungen durch exogene Faktoren unterliegt. Die Durchführung der qRT-PCR Versuche erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen und Dr. Christoph Stahlmann.

Folgende spezifische Primer wurden im Rahmen der Arbeit zur Analyse der Expression der vorgenannten Gene verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen.

Nukleinbasensequenzen der verwendeten Primer (A= Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin).

Gen	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
Humane Proben		
<i>β-Actin</i>	5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3'	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
<i>BACE1</i>	5'-AAT ACC TGC GGT GGA AGA TG-3'	5'-GCC CTC CAT GAT AAC AGC TC-3'
<i>Gal3st1</i>	5'-CTC AAG TTC GCC TTC CCT AA-3'	5'-TGT GGT TGC AGA TGA TGT TG-3'
<i>Ugt8a</i>	5'-ATG GGT AAA TGG TGC TAA TG-3'	5'-TCT GGT CAT AGT ATC ATA AT-3'
<i>ARSA</i>	5'-GGA CTA GAG GCC CGC TAC AT-3'	5'-GGG TGT GGT GAG AGG CAT AG-3'
Murine Proben		
<i>Gal3st1</i>	5'-TCC TGC AGT AGC ACC AAG TG -3'	5'-CCT GCT CTT CTT CGA TCT GG-3'
<i>Ugt8a</i>	5'-AGA TGG TGC TCA GGA GCA TG-3'	5'-TCG TGG CGA AGA ATG TAG TC-3'

3.2.2.5 Gal3st-Promotoraktivitätsmessung mittels Luciferase-Assay

(nach Dissertation (METT, 2017), modifiziert nach Herstellerprotokoll *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit, GeneCopoeia*)

Die Untersuchung der Promotoraktivität der CST (Genname: Gal3st1) erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines Luciferase-Assays. Hierbei werden Zellen zunächst mit einem Reporterplasmid transfiziert, welches für das Reporterenzym Gaussia-Luciferase kodiert, wobei die Transkription durch den Gal3st1-Promotor reguliert wird. Um den Einfluss der Transfektionseffizienz auszugleichen, wird ein zweites Reporter-Gen ko-transfiziert, wobei dieses unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht und somit seine Aktivität ausschließlich von der Effizienz der Transfektion abhängig ist (sog. Standard-reporterenzym). In diesem Fall handelte es sich hierbei um die SEAP.

MEF APPΔCT15-Zellen wurden bis zur Konfluenz in einer 10 cm Schale kultiviert und anschließend mit dem Plasmid pEZX-PG04-Gal3St1-GLuc wie unter Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben transfiziert, wobei die Mengen entsprechend der Größe der Zellkulturschale angepasst wurden. Die Zellen wurden für 24 Std. kultiviert und anschließend in einer 24-Well Platte ausgesät. Weitere 24 Std. später wurde zur Überprüfung des Einflusses von AICD auf die Gal3st1-Promotoraktivität eine Inkubation der Zellen mit AICD durchgeführt. Hierfür wurde zur Verbesserung der Aufnahme von AICD eine lipofektions-basierte Inkubation mit Saint PhD-Reagenz wie unter Abschnitt 3.2.1.3.4.2 beschrieben verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Min. erfolgte die Messung der Gaussia-Luciferase- und SEAP-Aktivität mit Hilfe des Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit entsprechend der Herstelleranweisung. Die Proben wurden auf einer weißen 96-Loch-Platte in einem Infinite M1000 Pro Fluorometer/Luminometer vermessen. Aufgrund der kurzen Inkubationsdauer war das ermittelte SEAP-Signal zu schwach, sodass eine Normierung hier nicht möglich war. Die Bestimmung der Gal3st-Promotoraktivität erfolgte in Kooperation mit Dr. Janine Mett.

3.2.3 Proteinchemische Arbeiten

3.2.3.1 Aufreinigung von konditioniertem Medium

(nach Dissertation (METT, 2017))

Nach vorheriger Inkubation wurde das Medium vollständig abgenommen und in geeignete Gefäße überführt. Vor der weiteren Verwendung von konditioniertem Medium wurde dieses für 5 Min. bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurden abgestorbene Zellfragmente sedimentiert; der Überstand wurde anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverwendet.

3.2.3.2 Zellaufschluss

3.2.3.2.1 Mechanischer Zellaufschluss

(nach Dissertation (METT, 2017))

Verwendete Puffer:

PBS	Saccharose-Puffer
137 mM NaCl	200 mM Saccharose
2,7 mM KCl	10 mM Tris/HCl pH 7,4
8,1 mM Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	
1,5 mM KH ₂ PO ₄	

Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte durch die Scherkräfte zwischen hochbeschleunigten Keramikkügelchen, wobei die Membranen im Vergleich zur detergentenbasierten Methode partiell intakt bleiben. Diese Methode des Zellaufschlusses eignet sich daher insbesondere zur anschließenden Messung der Enzymaktivität membranständiger Proteine.

Zur Reduktion der Proteaseaktivität wurden alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Das Medium der Zellkulturschalen wurde abgenommen und nach dem Waschen der Zellen mit 4 °C kaltem PBS wurden diese je nach Schalengröße in 500 µl (10cm²) oder 1500 µl (500cm²) Saccharose-Puffer abgelöst. In einem Reaktionsgefäß erfolgte anschließend unter Zugabe von Keramikkügelchen der Aufschluss der Zellen bei 5000 U/min für 30 Sek. in einem Minilys-Homogenisator.

Analog hierzu wurden Maushirnhemisphären, sowie Gewebeproben von humanen *post mortem* Gehirnen in 1 ml Saccharose-Puffer homogenisiert. Hierbei bleiben die Zellkerne intakt, sodass diese später mittels Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Die Homogenate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für weitere Versuche verwendet. Alternativ können die Proben bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Der Zellaufschluss von radioaktivmarkierten Zellen erfolgte mittels Precelly-Keramikkügelchen. Auch diese Methode beruht auf der mechanischen Reibung der Kügelchen untereinander, wobei der Durchmesser der Kügelchen im Vergleich zu den o. g. Kügelchen größer war. Die Zellen wurden in H₂O von den Schalen abgelöst und in einem in Eis eingebetteten Reaktionsgefäß für 60 Min. bei 4 °C auf einem Wheaton-Schüttler bei 2000 rpm aufgeschlossen. Diese Form der Kühlung war notwendig um die Aktivität der enthaltenen Enzyme trotz entstehender Reibungswärme zu minimieren. Die so entstandenen Zellhomogenate konnten bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt werden.

3.2.3.2 Chemischer Zellaufschluss

(nach Dissertation (BURG, 2014))

Verwendete Puffer:

PBS	Lyse-Puffer	Protease-Inhibitor-Gemisch
137 mM NaCl	150 mM NaCl	5 ml ddH ₂ O
2,7 mM KCl	50 mM Tris/HCl, pH7,4	1 Tablette Complete Protease
8,1 mM Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	2 mM EDTA	Inhibitorgemisch
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,1 % NP-40	
	0,1 % Triton X-100	

Der chemische Aufschluss von Zellen erfolgte mittels Lyse-Puffer, wobei die Zellmembranen durch die im Puffer enthaltenen Detergenzien NP-40 und Triton X-100 vollständig solubilisiert werden. Daher eignet sich diese Methode nicht für die anschließende Aktivitätsmessung membranständiger Enzyme, sondern diente dem Zellaufschluss vor Western Blot-Analysen.

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 4 °C kaltem PBS wurde der Puffer restlos entfernt, um die Lyse nicht durch Unterschiede in der Detergenzkonzentration zu beeinflussen. Die Proteaseaktivität wurde durch das 1:10 in Lysepuffer eingesetzte Proteaseinhibitorgemisch reduziert. Die Zellen wurden für 10 cm Schalen in 400 µl Lysepuffer abgelöst und für 45 Min. auf Eis inkubiert. Nicht lysierte Zellbestandteile wie beispielsweise der Nucleus wurden anschließend durch Zentrifugation der Proben bei 4 °C für 5 Min. mit 13000 rpm aus dem Lysat entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration unter Verwendung des BCA-Tests

(nach Dissertation (BURG, 2014), modifiziert nach (SMITH et al., 1985))

Verwendete Lösungen:

BCA-Arbeitslösung	Rinderserum-Albumin- Verdünnungsreihe
1 ml 4 % CuSO ₄ in H ₂ O	
39 ml BCA-Lösung	

Der BCA-Test ermöglicht die quantitative Analyse des Proteingehaltes einer Probe. Unter der Annahme eines nahezu konstanten Proteingehaltes aller Zellen diente er in dieser Arbeit zur Normierung der Proben.

Bei der Reaktion werden Cu^{2+} -Ionen durch Komplexierung mit den Peptidbindungen der enthaltenen Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert, die in einer zweiten Reaktion einen Komplex mit je zwei Bichinoninsäure-Molekülen bilden. Dies führt zu einem violetten Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Proteinmenge ist und photometrisch bestimmt werden kann.

Je 20 μl einer Rinderserum-Albumin-Verdünnungsreihe mit einer Proteinkonzentration von 0,0–1,1 mg/ml, sowie 5 μl der zuvor abhängig von ihrer erwarteten Proteinkonzentration verdünnten Proben, wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl der vorbereiteten BCA-Arbeitslösung gestartet und die Platte nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C für weitere 15 Min. bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm im Spektralphotometer. Die Proben wurden zur Reduktion der Varianz als Fünffachbestimmung aufgetragen und der Mittelwert der Proteinkonzentration konnte mit Hilfe der durch die Rinderserum-Albumin-Verdünnungsreihe ermittelten Eichgerade bestimmt werden.

3.2.3.4 Immunpräzipitation

(nach Dissertation (METT, 2017))

Verwendete Puffer:

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

Die Immunpräzipitation wurde in dieser Arbeit verwendet um Proteine anzureichern, die nur in geringer Konzentration in konditioniertem Medium oder Zellysate vorliegen. Spezifische Antikörper binden nur an das gewünschte Antigen und über ihre Fc-Region an Protein G. Dieses an Sepharose-adaptierte Protein ermöglicht anschließend die Aufreinigung mittels Zentrifugation.

Je 1 ml der zu vergleichenden Proben wurde mit Hilfe des BCA-Tests auf die gleiche Proteinkonzentration angeglichen. 20 μl Protein G-Sepharose und die in Tabelle 10 angegebene Antikörpermenge wurden hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopftaumler inkubiert, um so die Antigen-Antikörper-, sowie die Antikörper-Protein-G Bindung zu ermöglichen. Die Proben wurden bei 13000 rpm und 4 °C für 1 Min. zentrifugiert und das Pellet mit je 1 ml Waschpuffer A, B und C gewaschen. Waschpuffer C wurde mit Hilfe einer Hamilton-Kapillare abgenommen, um

eine Verdünnung der Proben durch den Puffer zu vermeiden und das Präzipitat anschließend mit 15 µl 3 x Proteinproben-Puffer bei 95 °C für 5 Min. im Thermomixer inkubiert. Durch diesen Vorgang werden die enthaltenen Proteine denaturiert und somit sowohl Antigen-Antikörper-Bindungen, als auch die Bindung an Protein G aufgelöst.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Konzentration für die jeweilige Immunpräzipitation

Antigen	Lokalisation	AK	Konzentration	Sepharose
Aβ	Medium	W02	10 µg/ml	Protein G-Sepharose
Aβ ₄₀	Medium	G210	12,5 µg/ml	Protein G-Sepharose
Aβ ₄₂	Medium	G211	17,3 µg/ml	Protein G-Sepharose

3.2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

(nach (SCHÄGGER, VON JAGOW, 1987), Ablauf nach Dissertation (METT, 2017)).

Verwendete Puffer:

3 x Protein-Probenpuffer	Kathodenpuffer
187,5 mM Tris/HCl, pH 6,8	100 mM Tris
6 % (w/v) SDS	100 mM Tricine
30 % (v/v) Glycerin	0,1 % (w/v) SDS
15 % (v/v) β-Mercaptoethanol	
0,03 % (w/v) Bromphenolblau	

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in dieser Arbeit mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl. SDS-PAGE*). Das Verfahren beruht darauf die mittels Natriumdodecylsulfat (*engl. SDS*) negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld durch ein geeignetes Trennmedium nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Als Trennmedium wurden Tris/Tricin-Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 10–20 % verwendet, da diese eine bessere Auftrennung der kleinen Proteine ermöglichen.

Die Proteine können mit Hilfe einer Immunpräzipitation angereichert werden. Alternativ können die Proben direkt auf ein Gel aufgetragen werden. Beim direkten Nachweis von Proteinen wurden die Proben mittels BCA-Test auf die gleiche Proteinkonzentration angeglichen, mit 3 x Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95 °C inkubiert. Die Proben zur Bestimmung von PS 1, BACE1 und

ADAM17 wurden nicht zusätzlich inkubiert, sondern direkt aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge war abhängig von der Expressionsstärke des zu bestimmenden Proteins und lag zwischen 30–60 µg Protein pro Tasche. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei RT und 120 V für 1 Std.

3.2.3.6 Proteintransfer mittels Western Blot-Methode

(nach (TOWBIN et al., 1979), Durchführung entsprechend Dissertation (METT, 2017))

Verwendete Puffer:

Transferpuffer

25 mM Trizma Base

157 mM Glycin

20 % Methanol + 0,025 % SDS

Die im Polyacrylamidgel zuvor aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wobei die durch SDS negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode wandern.

Die Nitrozellulosemembran und das Gel wurden auf zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt und durch zwei weitere Filterpapiere bedeckt. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer befüllten Kammer bei 380 mA und 4 °C. Die Dauer des Transfers war abhängig von der Größe der zu analysierenden Proteine. Für Aβ betrug diese 1 Std., für alle anderen Proteine 3 Std.

3.2.3.7 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach Dissertation (METT, 2017))

Verwendete Puffer:

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂PO₄ x 2H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

TBS-T

10 mM Tris/HCl pH8

150 mM NaCl

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

ECL-Lösung 1 und 2

Der Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels Immunodetektion. Ein spezifischer Antikörper bindet an das Antigen des nachzuweisenden Proteins und wird selbst durch einen

an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Chemolumineszenz-Reaktion des in der ECL (*engl. enhanced chemiluminescence*) -Lösung enthaltenen Luminols, wodurch es zur verstärkten Emission von Licht kommt.

Für die Detektion mit dem W02-Antikörper wurde die Membran zunächst für 5 Min. in PBS gekocht (IDA et al., 1996). Für alle anderen Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran direkt in 10 % Milchpulver (MP) oder 5 % BSA inkubiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu verringern. Die Membran wurde zweimal gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper inkubiert. Die verwendeten Puffer, die Konzentrationen der Antikörper sowie die Dauer der Inkubationen waren abhängig von dem primären Antikörper. Die genauen Inkubationsbedingungen können Tabelle 11 entnommen werden.

Zum Nachweis von unspezifischen Schwankungen, beispielsweise durch Fehler beim Auftragen der Proben, wurde ergänzend zu den gesuchten Proteinen auch der Proteingehalt eines konsekutiv exprimierten Proteins, z. B. Aktin oder Tubulin, bestimmt, da dieses nur gering durch exogene Faktoren reguliert wird. Es wurden nur Ergebnisse verwendet, bei denen kein Unterschied in diesem Referenzprotein bei den untersuchten Proben nachgewiesen wurde.

Nach vier weiteren Waschschrritten wurde die Nitrozellulosemembran für 60 Min. bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Zweitantikörper (1:5000) inkubiert, nochmals viermal gewaschen und anschließend für eine Minute in ECL-Lösung (1:1) inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei Klar-sichtfolien im Fotolabor mit einem lichtempfindlichen ECL-Hyperfilm exponiert. Die Intensität der Schwärzung des Filmes ist proportional zur Proteinmenge und wurde densitometrisch mit Hilfe des Programms Image Gauge quantifiziert.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper inkl. Inkubationsbedingungen für den immunologischen Proteinnachweis.

Protein/ Antigen	Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
	Bezeichnung [Firma] Konzentration	Inkubationsbedingungen	Bezeichnung [Firma] Konzentration	Inkubations- bedingungen
Aβ APP sAPPα β-CTF	W02 1 μ g/ml	1 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-mouse [Dako] 1:5000	in PBS, 60 min
sAPPβ	Anti-sAPP β [MyBio Source] 1:200	5 % MP (w/v) in PBS Über Nacht bei 4°C	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min

		Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper	
α-CTF	2214 1:5000	PBS Über Nacht bei 4°C	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
α-Tubulin	Anti- α -Tubulin [Ab7291 Abcam] 1:5000	3 % BSA (w/v) in PBS Über Nacht bei 4°C	Anti-mouse [Dako] 1:5000	in PBS, 60 min
ADAM 10	Anti-ADAM10 [422751Merck] 1:2000	1 % MP (w/v) in PBS Über Nacht bei 4°C	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
ADAM 17	Anti-ADAM17 [Ab39162 Abcam] 1:5000	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
β-Aktin	A 5441 1:5000	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-mouse [Dako] 1:5000	in PBS, 60 min
BACE1	Anti-BACE1 [B0806 Sigma] 1:1000	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
Cadherin	Anti-Cadherin [Ab6528 Abcam] 1:1000	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
EEA1	Anti-EEA1 [Ab2900 Abcam] 1:1000	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
Flotillin	Anti-Flotillin [610821 BD] 1:250	5 % MP (w/v) in PBS 1,5 Std. bei RT	Anti-mouse [Dako] 1:5000	in PBS, 60 min
Nicastrin	Anti-Nicastrin [N1660 Sigma] 1:500	5 % MP (w/v) in TBST Über Nacht bei 4°C	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min
PS1	Anti-Presenilin1 [sc-7860 Santa Cruz] 1:500	5 % MP (w/v) in PBS Über Nacht bei 4°C	Anti-rabbit [Promega] 1:10000	5 % MP (w/v) in PBS, 60min

3.2.3.8 Bestimmung der Gesamtdegradation von A β

(modifiziert nach (SUN et al., 2005), Durchführung nach Dissertation (METT, 2017))

Die Degradation von A β wurde in der Zellkultur auf N2a Zellen gemessen. Diese Neuroblastom-Zelllinie ist murinen Ursprungs, sodass mit dem W02-Antikörper lediglich das exogen zugefügte, synthetische humane A β detektiert wird, während das endogen produzierte A β durch den Antikörper nicht gebunden wird.

Die Zellen wurden zunächst wie in Abschnitt 3.2.1.3.1 beschrieben inkubiert, um den Einfluss des Lipides auf die Degradation zu bestimmen. Anschließend wurde das Medium rückstandslos entfernt und

durch frisches Inkubationsmedium ersetzt. Dieses enthielt ein synthetisch hergestelltes, der humanen Sequenz von A β 40-entsprechendes Peptid in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml. Nach 6 Std. wurde dieses Medium abgenommen, je 12 μ l mit 3 x Protein-Proben-Puffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung des nicht degradierten A β -Peptides erfolgte durch Immunodetektion mittels W02-Antikörper. Die Degradation ist dabei umgekehrt proportional zum verbliebenen A β -Peptid und wurde durch Bildung des Kehrwertes des gemessenen A β bestimmt.

Bei dieser Methode kann nicht zwischen der Degradation durch sezernierte, zytoplasmatische oder membranständige Proteine unterschieden werden, es ist lediglich eine Beurteilung der Gesamtdegradation möglich. Die Messung der Gesamtdegradation von A β erfolgte in Kooperation mit Dr. Janine Mett.

3.2.3.9 Biotinylierung von Proteinen an der Zelloberfläche

(nach Dissertation (BURG, 2014))

Verwendete Puffer:

Biotinylierungspuffer	TIN-Lyse-Puffer	Sulfo-NHS-SS Biotin
10 mM NaPi pH 8,0	0,5 % Triton-X100	50%ige
135 mM NaCl	50 mM Imidazol pH 7,0	Streptavidin-Agarose
10 mM KCl	150 mM NaCl	
	1 x Protease Inhibitor	

Die Biotinylierung von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit zur Markierung von Proteinen an der Zelloberfläche. Das Prinzip beruht darauf, dass NHS-Biotin nur an die Proteine der Zelloberfläche bindet und aufgrund seiner negativen Ladung nicht in das Zellinnere gelangt. In einem zweiten Schritt kann durch Zugabe von Streptavidin-Agarose, welches eine sehr hohe Bindungsaffinität an Biotin besitzt, eine Aufreinigung der biotinylierten Proteine erfolgen.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.1.3.1 beschrieben in 6-Well-Zellkulturschalen mit Sulfatiden inkubiert und anschließend zunächst viermal mit Biotinylierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in Biotinylierungspuffer gelöst und von diesem Ansatz je 1 ml pro Well auf die Zellen pipettiert. Die Zellkulturschalen wurden anschließend für 3 Std. bei 4 °C inkubiert und hiernach erneut fünfmal gewaschen. Die Zellen wurden in jeweils 150 μ l TIN-Lyse Puffer abgeschabt und je zwei Wells vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall für 30 Sek. bei minimaler Intensität und anschließend 60 Sek. bei mittlerer Intensität. Mittels BCA-Test wurde die Proteinkonzentration bestimmt und je 750 μ g Protein bei 20.000 g für 10 Min. zentrifugiert. Das Volumenäquiva-

lent von 700 µg Protein wurde mit PBS mit Protease-Inhibitor auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Die Präzitation der biotinylierten Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl 50%iger-Streptavidin-Agarose auf dem Überkopftaumler bei 4 °C über Nacht. Die Proben wurden erneut für eine Minute bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 20 µl Proteinprobenpuffer wurden die Proben für 5 Min. auf 98 °C erhitzt und die Proteine anschließend wie unter Abschnitt 0 beschrieben aufgetrennt, mittels Western-Blot-Methode transferiert (Kapitel 3.2.3.6) und anschließend immunodetektiert unter Verwendung des entsprechenden Antikörpers (Kapitel 3.2.3.7).

3.2.3.10 Untersuchung der Aggregation von Aβ-Peptiden

3.2.3.10.1 Monomerisierung von synthetischem Aβ₄₂

(nach Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014), modifiziert nach (EHRNHÖEFER et al., 2008))

Verwendete Puffer:

Verdünnungspuffer

10 µM NH₄OH

Die Aggregationstendenz von Aβ-Peptiden wurde in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden bestimmt. Vor der Verwendung des synthetisch hergestellten Peptides musste dieses aufbereitet werden, sodass zu Beginn aller Versuche die Peptide als Monomere vorlagen. Das als Feststoff vorliegende Aβ₄₂ wurde in Verdünnungspuffer gelöst und für 30 Min. bei RT im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurden die gelösten Peptide bei 4 °C entsprechend Tabelle 12 durch zwei Filtersysteme zentrifugiert, sodass schließlich nur die kleinen Aβ₄₂-Monomere im Verdünnungspuffer enthalten waren. Die Herstellung von Aβ₄₂-Monomeren erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsdörfer und Herr Lukas Schwarz.

Tabelle 12: Filtersystem für Aβ-Monomere

Filtersystem [Firma]	Geschwindigkeit [rpm]	Zeit [min]
0,22µm Ultrafree Durapore PVDF- Filter [Millipore]	13000	10
30k- Amicon Ultra-Filter [Millipore]	13000	90

3.2.3.10.2 *In vitro* Inkubation von A β ₄₂-Monomeren mit Sulfatiden und Ceramiden

(nach Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Zur Analyse der Aggregation von A β ₄₂-Monomeren wurde dieses in Protein Low Bind-Reaktionsgefäßen 1:1 mit 2 x PBS verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 18 μ M vorlag.

In mehreren Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von Lipiden verglichen mit dem Lösungsmittel Ethanol die Aggregationseigenschaften von A β ₄₂ stark beeinflusst. Daher wurden in den folgenden Versuchen Ceramide als Kontrollsubstanz verwendet, welche als Vorläufermoleküle und Abbauprodukte der Sulfatide im direkten Gleichgewicht mit diesen stehen. Die Inkubation der Lipide mit einer Endkonzentration von 10 μ M erfolgte bei 37 °C und 300 U/min über 24 Std. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Rasterkraft-Mikroskopie erfolgte ohne Einfrierprozess direkt aus den inkubierten Proben. Die *in vitro* Inkubation von A β ₄₂-Monomeren mit Lipiden erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsdörfer.

3.2.3.10.3 Fluorometrische Bestimmung der A β ₄₂-Aggregation mittels Thioflavin T

(modifiziert nach (KHURANA et al., 2005), Durchführung nach Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Verwendete Puffer:

Analysepuffer

5 μ M NH₄OH pH 8,0 in PBS

Die fluorometrische Bestimmung der Aggregation von A β erfolgte in dieser Arbeit mittels Thioflavin T (ThT), das durch die Bindung an amyloide Strukturen ein starkes Fluoreszenzsignal emittiert (VASSAR, CULLING, 1959). Die Bindung ist abhängig von der hydrophoben β -Faltblatt-Struktur (SINGH et al., 2009) und erfolgt daher nicht ausschließlich an A β -Fibrillen, sondern auch an Oligomere und Protofibrillen, wobei anzunehmen ist, dass dabei die Intensität der Fluoreszenz auf Grund der geringeren Bindung deutlich schwächer ist (WALSH et al., 1999).

Zur Messung der Proben wurde zunächst Analyse-Puffer in die Vertiefung einer schwarzen 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend 200 μ M ThT-Lösung hinzugegeben, sodass das Endvolumen 100 μ l betrug. Die in Ethanol gelösten Lipide wurden in einer Konzentration von 10 μ M ergänzt und nach Zugabe von 0,1 mg/ml A β ₄₂ konnte die Messung der Aggregationskinetik im Fluorometer unter den nachfolgend aufgeführten Einstellungen begonnen werden. Die fluorometrische Bestimmung der A β ₄₂-Aggregation mittels Thioflavin T erfolgte in Kooperation mit Dr. Benjamin Hundsdörfer und Herr Lukas Schwarz.

Tabelle 13: Fluorometer-Einstellungen für ThT-Analyse

Messwert	Einstellung
Temperatur	37 °C
Anregung	450 nm ± 5 nm
Emission	482 nm ± 5 nm
Messintervall	5 Min.
Bewegung	Orbitales Schütteln mittlere Intensität 280 Sek.
Ruhezeit	10 Sek.

3.2.3.10.4 Detektion von A β ₄₂-Aggregaten mittels Rasterkraft-Mikroskopie

(nach (BIESCHKE et al., 2010), Durchführung entsprechend Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Die Rasterkraft-Mikroskopie (*engl.: atomic force microscopy, AFM*) basiert auf der Interaktion zwischen der Oberfläche einer Probe und den Atomen einer Nadelspitze. Diese Nadel ist an einem beugbaren Träger (*engl.: cantilever*) befestigt, dessen Bewegung abhängig von der unter der Nadel befindlichen Oberfläche ist und mittels Reflektion eines Laserstrahls detektiert werden kann (TORRE et al., 2011). Die Probe wird im Raster durch die Nadel abgetastet und so die Probenoberfläche visualisiert.

Es erfolgte zunächst die *in vitro* Inkubation von A β ₄₂-Aggregaten mit den jeweiligen Lipiden entsprechend Abschnitt 3.2.3.10.2. Die anschließende Weiterverarbeitung der Proben wurde unmittelbar an die Inkubation angeschlossen. Die Mikroskopie erfolgt von 5x5 mm großen Glimmer-Stücken. Diese werden auf einem Objektträger befestigt, mit Hilfe eines Klebestreifens wird die oberste Schicht entfernt und 15 μ l der Proben für 5 Min. darauf inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probenflüssigkeit entfernt und der Glimmer mit HPLC-Wasser gewaschen. Die Aufnahmen werden mit einer Messfrequenz von 1 Hz und einer Z-Range von 3 μ m im Modus „*intermittend contact (Air)*“ aufgenommen. Die Einstellung der *Feedback Control* erfolgte mit IGain 450 Hz und PGain 0,05. Von jeder Probe wurden mindestens fünf Aufnahmen (10 x 10 μ m, 512 x 512 Pixel) aus unterschiedlichen Bereichen gefertigt. Die Aufnahmen wurden mit der Software Gwyddion 2.29 weiterbearbeitet. Die Detektion von A β ₄₂-Aggregaten mittels Rasterkraft-Mikroskopie erfolgte in Kooperation mit Dr. Benjamin Hundsdörfer.

3.2.3.10.5 Immunodetektion von A β ₄₂-Aggregaten mittels Dotblot

(nach Protokoll der Abteilung Neuroproteomics, Berlin, Prof. Erich Wanker, Durchführung entsprechend Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Der Nachweis von bestimmten Aggregationsformen von A β ₄₂ nach Lipid-Inkubation erfolgte mit Hilfe der Immunodetektion (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.3.7). Der verwendete Primär-Antikörper erkennt dabei spezifisch die A β ₄₂-Oligomere.

Die Proben wurden zur Analyse aufgetaut und zur Verringerung des Messfehlers jeweils fünffach aufgetragen. Mittels 96-Loch-Dot-Blotter wurden die Proben auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nach Inkubation der Antikörper entsprechend der untenstehenden Tabelle erfolgte die Detektion mit Hilfe der ECL-Methode gemäß Kapitel 3.2.3.7.

Die Immunodetektion von A β ₄₂-Aggregaten mittels Dotblot erfolgte in Kooperation mit Dr. Benjamin Hundsdörfer und Herr Lukas Schwarz.

Tabelle 14: Antikörper zur Detektion von A β ₄₂-Aggregaten

Protein/ Antigen	Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
	Bezeichnung <i>Konzentration</i>	Inkubationsbedin- gungen	Bezeichnung <i>Konzentration</i>	Inkubationsbedin- gungen
Oligomere	A11 1:1000	3 % MP (w/v) in TBS-T Über Nacht / 4°C	A10547 1:1000	3 % MP(w/v) in TBS-T RT für 60 min

3.2.3.11 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.2.3.11.1 Prinzip der Aktivitätsmessung mittels Fluorophor-markiertem spezifischem Substrat

Die Analyse der Aktivitäten erfolgte mit Hilfe von Fluorophor-markierten spezifischen Substraten auf Basis der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (Abk. FRET). Es handelt sich bei diesem Versuchsaufbau um intern gequenchte Peptide, bei denen der Fluoreszenzakzeptor bei intaktem Peptid die Emission des Fluoreszenzdonors weitestgehend absorbiert. Durch die Spaltung des Substrates entfällt das Quenching durch räumliche Trennung und die Emission, die proportional zur Aktivität des Enzyms ist, kann im Fluorometer gemessen werden.

Die Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in lebenden Zellen bestimmt, als auch nach Membranpräparationen von murinen sowie humanen Gehirnen und der Zellkultur.

3.2.3.11.2 Analyse von α -, β - und γ -Sekretase-Aktivitäten aus Membranpräparationen

3.2.3.11.2.1 Herstellung postnukleärer Fraktionen

(nach Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Verwendete Puffer:

Saccharose-Puffer

200 mM Saccharose

10 mM Tris/HCl pH 7,4

+ 1 mM EDTA für β -, γ -Sekretase Assay

Zunächst wurden aus Homogenaten von SH-SY5Y wt-Zellen sowie *post mortem* Gehirnproben und Maushirnhemisphären postnukleäre Fraktionen (PNFs) hergestellt. Die unterschiedlichen Gewebe wurden hierzu mit Keramikkügelchen wie unter Abschnitt 3.2.3.2.1 beschrieben mechanisch aufgeschlossen. Die Maushirnhemisphären und *post mortem* Gehirnproben wurden vor dem Aufschluss dreimal mit Saccharose-Puffer gewaschen. Der Proteingehalt der Homogenate wurde bestimmt und die Proben abhängig von dem zu analysierenden Enzym auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml (α -Sekretase), 2 mg/ml (β -Sekretase) oder 3 mg/ml (γ -Sekretase) verdünnt.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 900 g und 4 °C für 10 Min. um die Zellkerne, sowie größere Zellfragmente zu pelletieren. 1 ml des hierdurch entstehenden postnukleären Überstandes wurde in einem neuen Reaktionsgefäß vor der Membranpräparation bei -80 °C gelagert.

3.2.3.11.2.2 *In vitro* Inkubation von PNFs mit Sulfatiden

Um die direkte Beeinflussung der Enzymaktivität durch Sulfatide zu analysieren, wurden PNFs von unbehandelten SH-SY5Ywt-Zellen, bzw. humanen *post mortem* Gehirnproben *in vitro* mit Sulfatiden behandelt. Dabei werden lediglich Einflüsse durch Veränderungen der Membranzusammensetzung bzw. direkte Interaktion mit den Enzymen detektiert.

Um die Löslichkeit der Lipide zu verbessern, und eine Adhäsion der Lipide an das Plastik der Reaktionsgefäße zu vermeiden, wurden die PNFs nach dem Auftauen für 5 Min. in Glasgefäßen auf 37 °C erwärmt. Unter Bewegung erfolgte die Zugabe der Sulfatide bzw. des Lösungsmittels, sodass in den PNFs eine Endkonzentration von 20 μ M entsprechend der Konzentration im Medium der Zellkulturversuche vorlag. Die Proben wurden für 15 Min. bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend verarbeitet.

3.2.3.11.2.3 Membranpräparation

(nach Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Die membrangebundenen Enzyme α -, β - und γ -Sekretase wurden im nächsten Schritt mit Hilfe einer Membranpräparation angereichert und die Spezifität des Versuchs durch die Elimination zytoplasmatischer Proteine weiter erhöht. Die PNFs wurden für 75 Min. bei 55000 rpm und 4 °C zentrifugiert und somit die Membranen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend das Pellet in Saccharose-Puffer von der Wand gelöst. Zur Fragmentierung der Membranen wurden 2 mg Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,2 mm zu dem Ansatz hinzugegeben und anschließend die Proben im Minilys-Gerät der Firma Peqlab (Erlangen) 10 Sek. bei mittlerer Geschwindigkeit resolubilisiert.

3.2.3.11.2.4 Fluorometrische Messung von Enzymaktivitäten

(nach Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Die Membranpräparationen wurden zur fluorometrischen Analyse als Dreifachbestimmung in schwarze 96-Loch-Platten aufgetragen, wobei die eingesetzte Proteinmenge sich in Abhängigkeit von dem zu analysierenden Enzym und dem untersuchten Gewebe gemäß untenstehender Tabelle unterschieden hat. Für die Messung der β -Sekretase-Aktivität wurde durch 1:1 Verdünnung mit 1 x PBS (pH 4,5) der pH-Wert gesenkt um eine optimale Aktivität des Enzyms zu gewährleisten. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung betrug unabhängig von der zu vermessenden Sekretase 100 μ l. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde in jede Vertiefung Substrat hinzugegeben, sodass folgende Substratkonzentrationen erreicht wurden:

Tabelle 15: Konzentration des Substrates und eingesetzte Proteinmenge bei der fluorometrischen Messung der unterschiedlichen Sekretase-Aktivitäten

Substrat	Substratkonzentration [μ M]	Proteinmenge pro Vertiefung (SH-SY5Y wt / Gehirngewebe) [μ g]
α -Sekretase Substrat II (Calbiochem No. 565767)	3	100 / 50
β -Sekretase Substrat IV (Calbiochem No. 565758)	20	125 / 250
γ -Sekretase Substrat (Calbiochem No. 565764)	6,25	250 / 500

Die Messung erfolgte kontinuierlich unter Ausschluss von Licht, wobei zwischen den Zyklen die Platte nach einem automatischen Muster bewegt wurde um eine optimale Substrat-Enzym-Interaktion zu er-

reichen. Die in Tabelle 16 dargestellten Einstellungen des Fluorometers für Extinktions- und Emissionswellenlängen sowie Zykluslänge zeigten im Rahmen der Etablierung die höchste Sensitivität und Spezifität und wurden daher für die Ergebnisse dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 16: Einstellung des Fluorometers zur Detektion der unterschiedlichen Sekretase-Aktivitäten

Enzym	Extinktionswellenlänge / Emissionswellenlänge [nm]	Anzahl der Zyklen / Zyklusintervall [Sek.]
α -Sekretase	$340 \pm 10 / 490 \pm 10$	120 / 120
β -Sekretase	$345 \pm 5 / 500 \pm 2,5$	180 / 60
γ -Sekretase	$355 \pm 10 / 440 \pm 10$	50 / 180

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die gemessenen Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf in ein Punktdiagramm eingetragen und die Aktivität der Enzyme anhand der Steigung im linearen Bereich der Kurve bestimmt.

Die Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten erfolgte teilweise in Kooperation mit Dr. Tatjana Rothhaar und Dr. Viola Hauptenthal (siehe hierzu auch Tabelle I).

3.2.3.11.3 Aktivitätsmessung der α -, β - und γ -Sekretase in lebenden Zellen

(nach Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Verwendete Puffer:

HEPES-Zellkultur-Puffer

140 mM NaCl

2,5 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

20 mM HEPES, pH 7,4

Neben der oben beschriebenen Methode zur Messung der Enzymaktivitäten aus isolierten Membranen wurde auch die Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase direkt von intakten, metabolisch aktiven Zellen in der Zellkultur gemessen. Dies bedeutet, dass neben den direkten Effekten der Sulfatide auf die Sekretasen, zusätzlich die Beeinflussung der Aktivität durch Expressionseffekte, Proteinstabilität und veränderte Lokalisation der Enzyme in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle eine Rolle spielen.

Die SH-SY5Y wt-Zellen wurden auf 96-Loch-Zellkultur-Platten ausgesät und bis zu einer 95%igen Konfluenz kultiviert. Nach der Inkubation mit Sulfatiden wie unter Abschnitt 3.2.1.3.1 beschrieben, wurden die Zellen zunächst zweimal vorsichtig mit 37 °C warmem HEPES-Zellkultur-Puffer gewaschen um das Medium rückstandslos zu beseitigen. Die in Tabelle 15 bereits aufgeführten Substrate wurden in HEPES-Zellkultur-Puffer verdünnt und je 50 µl pro Vertiefung für den Versuch eingesetzt. Im Fluorometer wurde anschließend die Emission der gespaltenen Substrate über den zeitlichen Verlauf gemessen. Die Detektion erfolgte in Abhängigkeit der Lokalisation der Sekretasen (Plasmamembran oder überwiegend intrazellulär) in unterschiedlicher Tiefe (Z-Position). Die jeweiligen Einstellungen des Fluorometers sowie die Konzentrationen der Substrate sind nachfolgend aufgeführt. Die Emissions- und Extinktionswellenlängen wurden entsprechend Tabelle 16 gewählt.

Tabelle 17: Substrat-Konzentration und Einstellungen für die fluorometrische Messung der Sekretase-Aktivitäten von lebenden Zellen

Enzym	Substrat-Konzentration [µM]	Z-Position [µm]	Anzahl der Zyklen / Zyklusintervall [Sek.]
α-Sekretase	10	18000	180 / 60
β-Sekretase	30	18600	140 / 60
γ-Sekretase	12,5	18000	140 / 60

Aufgrund der geringeren Spezifität des Versuchsaufbaus, durch die fehlende Aufreinigung der Enzyme, wurden bei der Messung der β-Sekretase- bzw. γ-Sekretase-Aktivität in jedem Versuch mehrere Vertiefungen mit dem jeweiligen Sekretase-Inhibitor inkubiert. Die dort gemessenen Werte wurden als unspezifisches Hintergrundsignal von den anderen Messwerten abgezogen. Die Inhibitoren wurden 3 Std. vor Beginn der Messung, sowie während der Messung dem Medium zugegeben, zu den Kontrollen wurde das entsprechende Lösungsmittel hinzugegeben. Die β-Sekretase Aktivität wurde dabei durch die Zugabe von 1 µM β-Sekretase Inhibitor II (Calbiochem) gehemmt, die γ-Sekretase Aktivität wurde durch 2 µM γ-Sekretase Inhibitor X (Calbiochem) inhibiert. Die Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten erfolgte teilweise in Kooperation mit Dr. Tatjana Rothhaar und Dr. Viola Haupenthal (siehe hierzu auch Abschnitt D Kooperationen).

3.2.3.11.4 Bestimmung der Neprilysin-Aktivität

(modifiziert nach einem Protokoll von (MINERS et al., 2008), durchgeführt entsprechend Dissertation (METT, 2017))

Verwendete Puffer:

Assaypuffer	Waschpuffer	Lysepuffer
100 mM Tris/HCL pH 7,0	0,05% Tween20 in 1xPBS	0,5% Triton X-100
50 mM NaCl		10% Saccharose
10 μ M ZnCl ₂		20 mM Tris pH 7,4
1x Complete-Proteaseinhibitor ohne EDTA		Blocklösung
β -Sekretase-Inhibitor II (1 μ M)		10% BSA (Fettsäure frei) in 1xPBS
γ -Sekretase- Inhibitor IV (25 μ M)		
Bacitracin (10 μ M)		

Die Akitivitätsmessung von Neprilysin erfolgte mit Hilfe des Substrats Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH (R&D Systems) auf einer mit NEP-Antikörper beschichteten Platte. Dieses Substrat wird jedoch nicht nur von NEP, sondern auch von der β - und γ -Sekretase, ECE1, IDE und Matrixmetalloproteasen umgesetzt. Um die Unspezifität des Versuchsaufbaus zu reduzieren wurden ein Proteaseinhibitor sowie spezifische Inhibitoren gegen die β - und γ -Sekretase und IDE (Bacitracin) dem Assaypuffer zugesetzt.

Zu Beginn wurden 100 μ l des NEP-Antikörpers AF1182 (R&D Systems) in einer Konzentration von 1,6 μ g/ml in PBS pro Vertiefung in eine MaxiSorp-96-Loch-Platte pipetiert um diese zu beschichten. Die Platte wurde kurz bei 150 U/min auf einem Platten-Schüttler bewegt und anschließend mit einer Folie verschlossen für 24 Std. bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden insgesamt sechsmal mit Waschpuffer gewaschen, und anschließend pro Vertiefung 125 μ l der Blocklösung für 3 Std. bei RT inkubiert. Dies diente der Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen.

Unter Verwendung des o. g. Lysepuffers wurden die zu untersuchenden Proben entsprechend Abschnitt 3.2.3.2.2 über 60 Min. lysiert und die Proben auf eine Proteinkonzentration von 1,25 μ g/ μ l in Lysepuffer angeglichen. Es erfolgte ein erneuter Waschschritt wie oben beschrieben. Schließlich wurden pro Vertiefung 100 μ l der lysierten Proben bei 150 U/min und 20 °C für 90 Min. auf der mit Antikörper beschichteten Platte inkubiert. Die Proben wurden sechsmal mit Waschpuffer gewaschen, um während der Messung eine möglichst geringe Unspezifität zu verzeichnen. Nach diesen Schritten sollte nur noch das aufgereinigte, an die Antikörper gebundene NEP auf der Platte verbleiben. Es wurden zuletzt 100 μ l des Assaypuffers für 30 Min. bei RT und 150 U/min inkubiert, bevor durch die Zugabe des Substrats die

Reaktion gestartet wurde. Die Fluoreszenz wurde kontinuierlich im Safire2-Fluorometer gemessen. Die entsprechenden Einstellungen und die Substratkonzentration können nachfolgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 18: Substratkonzentration und Einstellung des Fluorometers zur Analyse von Neprilysin

Enzym	Substrat [Firma]	Substrat- konzentration [μ M]	Extinktionswellenlänge / Emissionswellenlänge [nm]
Neprilysin	Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH [R&D Systems]	5	320 ± 10 / 405 ± 10

3.2.3.12 Isolation von Zellkompartimenten

3.2.3.12.1 Endosomen-Präparation

(modifiziert nach einem Protokoll von Axis-Shield, durchgeführt entsprechend Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Verwendete Puffer:

Homogenisierungspuffer	Gradientenpuffer	Optiprep-Gradientenmedium
250 mM Saccharose	250 mM Saccharose	(60 % Iodixanol)
140 mM NaCl	140 mM NaCl	
1 mM EDTA	3 mM EDTA	
20 mM Tris/HCl, pH 8	60 mM Tris/HCl, pH 8	

Die Auftrennung der Zellorganellen zur Gewinnung von Endosomen erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines Iodixanol-Dichtegradienten.

Zur Herstellung der Gradienten wurde das Optiprep-Gradientenmedium mit dem Gradientenpuffer verdünnt, sodass Iodixanol in einer Endkonzentration von 40 %, 30 %, 20 % und 10 % enthalten war. Je 2,5 ml der Gradientenmedien wurden in absteigender Iodixanolkonzentration in einem Zentrifugen-Röhrchen überschichtet. Die Röhrchen wurden verschlossen und anschließend für 1 Std. bei RT horizontal gelagert um die Ausbildung eines kontinuierlichen Gradienten zu ermöglichen.

Zur Aufbereitung der Zellen wurden diese zunächst in Homogenisierungspuffer mechanisch aufgeschlossen. Um die Organellen vollständig intakt zu erhalten wurden die Proben lediglich mit 1000 Umdrehungen eines Teflonstößels und zwanzigmaliger Wiederholung homogenisiert. Der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt, 1100 μ l der Proben auf eine Konzentration von 5 mg/ml angeglichen und diese

für 10 Min. bei 4 °C und 700 g zentrifugiert. Je 1 ml des Überstands wurde anschließend vorsichtig auf die vorbereiteten Gradienten pipettiert und diese für 18 h bei 4 °C mit 48000 g in einem Swing-Out-Rotor zentrifugiert. Während dieser Ultrazentrifugation werden die Organellen entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Nacheinander wurden je 550 µl des Gradienten von oben abgenommen, sodass insgesamt 20 Fraktionen entstehen. Die Fraktionen mit den endosomalen Kompartimenten wurden mittels Immunodetektion gegen den endosomalen Marker EEA1 bestimmt und diese Fraktionen für weitere Versuche zusammengeführt.

3.2.3.12.2 Isolation von Lipid Rafts

Die Isolation von Lipid Rafts erfolgte in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden. Um die Aktivität der membranständigen Enzyme möglichst wenig durch Veränderungen der Membranintegrität zu beeinflussen, wurden die Lipid Rafts zunächst mit Hilfe eines detergenzfreien Saccharose-Dichtegradienten isoliert. Bei dieser Methode sind sehr hohe Natrium-Konzentrationen im Puffer notwendig welche in der Massenspektrometrie störend wirken. Zur Analyse des Sulfatid-Gehaltes in den Lipid Rafts wurde daher eine Detergenz-basierte Isolation verwendet.

3.2.3.12.2.1 Detergenz-basierte Isolation von Lipid Rafts

(nach Dissertation (ROTHHAAR, 2013))

Verwendete Puffer:

MBST	Saccharose-Gradientenpuffer
25 mM MES, pH 6,5	90 %, 35 % bzw. 5 %
150 mM NaCl	Saccharose in MBST
0,1 % Triton X-100	

Die Zellen wurden zunächst gewaschen, in MBST abgelöst und für 20 Sek. bei max. Intensität im Minilys mit Keramikkügelchen homogenisiert. Um den Zellaufschluss zu verbessern, wurden die Proben anschließend fünfmal mit einer 24G-Kanüle aufgezogen. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurden 6 mg Protein in 1,2 ml MBST 1:1 mit 90%igem Saccharose-Gradientenpuffer in einem Ultrazentrifugenröhrchen durchmischt. Die Proben wurden vorsichtig zunächst mit 4 ml 35%igem Saccharose-Gradientenpuffer und schließlich mit 4,5 ml 5%igem Saccharose-Gradientenpuffer überschichtet. Die Gradienten wurden in einem Swing-Out Rotor mit 35000 rpm bei 4 °C für 18 Std. zentrifugiert, sodass sich die Proben über den diskontinuierlichen Dichtegradienten verteilen konnten. Es wurden von oben je 680 µl in insgesamt 16 Fraktionen abgenommen und die Lipid Raft-enthaltenden Fraktionen mittels Flotillin als Markerprotein ermittelt. Diese Fraktionen wurden zusammengeführt und für weitere Ver-

suche verwendet. Als Non-Raft-Fraktionen wurden im Gegensatz hierzu die Cadherin-positiven Fraktionen vereinigt. Die Detektion von Flotillin und Cadherin erfolgte mittels Western Blot-Analyse wie unter Abschnitt 3.2.3.7–3.2.3.7 beschrieben, wobei 10 µl jeder Fraktion pro Tasche auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen wurden. Die Isolation von Lipid Rafts wurde in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt.

3.2.3.12.2.2 Detergenz-freie Isolation von Lipid Rafts

(nach Protokoll Dr. Viola Hauptenthal, Universität des Saarlandes 2014)

Verwendete Puffer:

MBS-Na ₂ CO ₃	Saccharose-Gradientenpuffer
25 mM MES, pH 6,5	90 %, 35 % bzw. 5 %
150 mM NaCl	Saccharose in MBS-Na ₂ CO ₃
250 mM Na ₂ CO ₃	

Die Zellen wurde zunächst wie in Abschnitt 3.2.3.12.2.1 beschrieben aufbereitet, wobei als Homogenisierungspuffer MBS-Na₂CO₃ diente. Anschließend wurden die Proben im Eiswasserbad dreimal für 20 Sek. sonifiziert (Intensität: 60 %; 90 %; 60 %). Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Test bestimmt und auf mindestens 2,5 mg/ml adjustiert. 2 ml der Probe wurden mit 2 ml 90%igem Saccharose-Gradientenpuffer durchmischt und als unterste Schicht in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. In Analogie zu Abschnitt 3.2.3.12.2.1 wurden die Proben anschließend mit 35%igem (4 ml) und 5%igem (3 ml) Saccharose-Gradientenpuffer überschichtet und im Swing-Out Rotor mit 35000 rpm bei 4 °C für 16 Std. zentrifugiert. Zur weiteren Analyse wurden ebenfalls 16 Fraktionen mit jeweils 680 µl von oben abgenommen. Die weitere Aufbereitung und Vereinigung von Fraktionen erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.3.12.2.1 beschrieben. Die Isolation von Lipid Rafts wurde in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt.

3.2.4 Lipidanalytische Arbeiten

3.2.4.1 Massenspektrometrische Analyse von Sulfatiden

(nach Dissertation (STAHLMANN, 2019))

Verwendete Puffer:

Laufmittel
5 mM Ammonium-Acetat in
Methanol/Wasser (97:3, v/v)

Die massenspektrometrische Analyse von Sulfatiden erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe einer in dieser Arbeitsgruppe durch Dr. Christoph Stahlmann etablierten Methode. Sulfatide können im negativen Modus mittels ESI-MS/MS detektiert werden, nach Fragmentierung findet sich dann das gemeinsame Produkt-Ion HSO_4^- bei m/z 97. Die Detektion erfolgte mit einer MRM-Methode.

Zur Probenvorbereitung wurden die verschiedenen Zelllinien kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz zweimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 180 µl ddH₂O wie unter Abschnitt 3.2.3.2.1 beschrieben mechanisch aufgeschlossen. Maushirnhemisphären wurden ebenfalls auf diese Weise homogenisiert, wobei dabei 400 µl ddH₂O verwendet wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde entsprechend Abschnitt 3.2.3.3 ermittelt und diese auf eine Konzentration von 10 mg/ml Gesamtprotein angeglichen. Kreise aus Whatman-Papier mit einem Durchmesser von 6 mm wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-0,45 µm-Filterplatte gelegt und diese auf einer 96-Loch-Platte fixiert. Pro Vertiefung wurden 10 µl der Proben auf die Whatman-Papierkreise pipettiert und um den internen Standard (10 pmol Sulfatid d18:1/12:0 und Sulfatidgemisch aus Schweinehirn) ergänzt. Die Proben wurden unter kontinuierlichem Stickstoffstrom von 1-2 bar für 1 Std. bei RT getrocknet. Nach Zugabe von 300 µl eines Gemisches aus Chloroform/Methanol (95:5, v/v) wurden die Proben für 30 Min. bei RT mit 450 rpm auf einem Plattenschüttler extrahiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Platten bei 500 g über 2 Min., sodass die Proben durch die Filterplatte in die 96-Loch-Platte überführt wurden. Jeder Probe wurden zuletzt 600 µl Laufmittel zugeführt und die Proben für 2 Min. auf einem Plattenschüttler bei 450 rpm durchmischt. Anschließend erfolgte die Messung im Autosampler der Agilent 1200 Serie HPLC bei 10 °C. Es wurden jeweils 20 µl der Probe in ein 4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometer injiziert.

Die Messung erfolgte jeweils als Dreifachmessung zur Reduktion der Standardabweichung. Mit Hilfe der Software Analyst 1.4.2 (Sciex, Darmstadt) erfolgte die Auswertung der Daten, wobei die Intensität der Zählimpulse pro Sekunde (*engl. counts per second, cps*) auf die Intensität des internen Standards normiert wurde. Die Parameter des 4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometers und der Agilent 1200 Serie HPLC zur Messung der Sulfatide können nachfolgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 19: Einstellungen des Massenspektrometers zur Detektion von Sulfatiden.

Parameter	Wert
4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometer	
Messdauer	3 Min.
Scan Type	MRM
Auflösung Q1	Unit
Auflösung Q3	Unit
Step Size	0,1 Da
Curtain Gas (CUR)	10 psi

<i>Temperatur (TEM)</i>	200 °C
<i>Ion Source Gas 1 (GS1)</i>	40 psi
<i>Ion Source Gas 2 (GS2)</i>	50 psi
<i>Interface Heater (ihe)</i>	on
<i>Collisionally activated dissociation gas (CAD)</i>	medium
<i>Ion Spray Voltage (IS)</i>	-4500 V
<i>Entrance Potential (EP)</i>	-10 V
<i>Collision Energy (CE)</i>	-129 eV
<i>Collision Cell Exit Potential (CXP)</i>	-15 V
Agilent 1200 Serie HPLC	
<i>Draw Speed</i>	200 µl/min
<i>Eject Speed</i>	200 µl/min
Waschen der Nadel (Flush Port) mit Methanol ddH ₂ O (9:1, v/v)	10 Sek.
Flussrate 0,0 Min.	30 µl/min
Flussrate 1,3 Min.	30 µl/min
Flussrate 2,4 Min.	200 µl/min
Flussrate 2,8 Min.	200 µl/min
Flussrate 3,0 Min.	30 µl/min

Tabelle 20: Molekülspezifische Parameter für die MRM-Analyse von Sulfatidspezies

Sulfatid	Vorläufer-Ion m/z [M-H]⁻	Produkt-Ion m/z [M-H]⁻	Zeit [ms]	Declustering Potential (DP) [V]
d18:1/12:0 (Standard)	722,5	96,9	100	-200
d18:1/18:0	806,6	96,9	100	-200
d18:1/18:0 hydrox	822,6	96,9	100	-200
d18:1/20:0	834,6	96,9	100	-200
d18:1/20:0 hydrox	850,7	96,9	100	-190
d18:1/22:0	862,8	96,9	100	-205
d18:1/22:0 hydrox	878,8	96,9	100	-200
d18:1/24:0	890,8	96,9	100	-215
d18:1/24:0 hydrox	906,8	96,9	100	-220
d18:1/24.1	888,8	96,9	100	-215
d18:1/24.1 hydrox	904,8	96,9	100	-220

3.2.4.2 Lipidextraktion modifiziert nach Bligh und Dyer

(modifiziert nach (BLIGH, DYER, 1959), Durchführung nach Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Verwendete Puffer:

Lipidextraktions-Gemisch

Chloroform/Methanol

Mischverhältnis 1:2

Die Aufreinigung und Anreicherung von Lipiden erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe einer modifizierten Form der durch Bligh und Dyer 1959 beschriebenen Lipidextraktion. Die Auftrennung beruht dabei auf den lipophilen Eigenschaften der Lipide, die sich durch Phasentrennung mittels Zentrifugation von den hydrophilen Bestandteilen wie Nukleinsäuren, Zucker und Proteinen abscheiden lassen.

Zunächst wurden 100 µl Zellhomogenat, entsprechend 1,5 mg Protein, mit 375 µl Lipidextraktions-Gemisch für 1 Std. auf einem Multi Reax Wheatonschüttler (Firma Heidolph) bei maximaler Geschwindigkeit durchmischt. Anschließend wurden 125 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben für eine weitere Stunde geschüttelt. Nach der Zugabe von 125 µl H₂O wurden die Proben noch einmal für 10 Min. auf dem Schüttler durchmischt, bevor sie schließlich für 5 Min. bei RT mit 3000 rpm zentrifugiert wurden. Die untere, lipophile Chloroform-Phase wird nun durch die Interphase von dem oberen hydrophilen Methanol-H₂O-Gemisch getrennt. Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette durchstoßen und die untere Phase vollständig abgenommen. Um eine Kontamination mit der wässrigen Phase zu vermeiden, wurde die organische Phase unter Stickstoffstrom bei RT eingedampft und anschließend durch die Zugabe von 375 µl Lipidextraktions-Gemisch und 100 µl H₂O die Lipidextraktion wie oben beschrieben noch einmal wiederholt. Die Chloroform-Phase wurde nach der Zentrifugation wieder vorsichtig abgenommen und für weitere Versuche verwendet.

3.2.4.3 Messung der Sufatid-*de novo*-Synthese

(etabliert im Rahmen dieser Arbeit)

Verwendete Puffer:

Szintillationslösung

Die Sulfatid-*de novo*-Synthese wurde indirekt über eine radioaktive Markierung des Reaktionsproduktes, also der Sulfatide, gemessen. Die Zellen wurden hierzu wie in Abschnitt 3.2.1.3.5 beschrieben für

24 Std. mit radioaktivem [³⁵S]-Sulfat behandelt. In diesem Zeitraum wird der Tracer in die Zellhomöostase eingeschlossen und zunächst in PAPS inkooperiert. Dieses dient sowohl für die CST, als auch in der Proteinsynthese, als Koenzym für die Übertragung von Sulfatgruppen, sodass nach der Inkubation sowohl Proteine als auch sulfatierte Lipide radioaktiv markiert vorliegen.

Um diese voneinander zu trennen wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen (siehe hierzu Abschnitt 3.2.3.2.1) und jeweils 100 µl des Homogenats mit einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml für eine Lipidextraktion eingesetzt. Diese erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.4.2 dargestellt nach einer modifizierten Form der Bligh & Dyer-Lipidextraktion (BLIGH, DYER, 1959). Die Reinheit der lipophilen Phase wurde durch eine zweifache Lipidextraktion nochmals erhöht und so eine Kontamination durch das hydrophile, radioaktive Edukt sowie radioaktiv markierte Proteine vermieden.

Die zweite Chloroform-Phase der Lipidextraktion wurde vollständig in ein mit 2,5 ml Szintillationslösung befülltes Röhrchen überführt, die Proben anschließend für 15 Sek. mittels Vortex durchmischt und im Szintillationszähler vermessen. Nach der Aufreinigung sind als Tracer-markierte Bestandteile in der lipophilen Phase der Proben demnach nur noch sulfatierte Lipide zu finden. Diese, bis auf einen sehr geringen zu vernachlässigenden Anteil, als Sulfatide vorliegenden Lipide, wurden während der Inkubationszeit durch die CST synthetisiert. Die aus der lipophilen Phase gemessene Radioaktivität war daher proportional zur Aktivität der Sulfatid-*de novo*-Synthese und konnte als äquivalent für diese angesehen werden. Die Bestimmung der Sulfatid-*de novo*-Synthese wurde teilweise in Kooperation mit Dr. Benjamin Hundsdörfer durchgeführt.

3.2.4.4 Bestimmung des Cholesterin-Gehaltes in Lipid Rafts

(modifiziert nach Herstellerprotokoll, Durchführung nach Dissertation (HUNSDÖRFER, 2014))

Die Bestimmung des Cholesterin-Gehaltes erfolgte in dieser Arbeit nach zuvor durchgeführter Lipid Raft-Präparation unter Verwendung des *Amplex Red Cholesterol Assay Kits (Life Technologies)*. Dieser Versuch nutzt eine gekoppelte Enzymreaktion. Zunächst werden, katalysiert durch die Cholesterin-Esterase, die vorliegenden Cholesterinester in Cholesterin umgewandelt, anschließend setzt die Cholesterin-Oxidase Cholesterin in H₂O₂ und Cholesterin-Keton um. Katalysiert durch die HRP reagieren das entstandene H₂O₂ und Amplex Red zu Resorufin, welches im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 530 ± 10 nm und einer Emission von 590 ± 10 nm gemessen werden kann.

Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll, wobei die Proben 1:1 in 2x Reaktionspuffer gelöst wurden, sodass die Messung in 1x Reaktionspuffer erfolgte. Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle (1x Reaktionspuffer ohne Cholesterin) und eine Positivkontrolle (1x Reaktionspuffer mit 10 µM H₂O₂) hergestellt. 50 µl jeder Probe und 50 µl der Kontrollen wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert und durch Zugabe von 50 µl der nach Herstelleranweisung vorbereiteten Arbeitslösung wurde

die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationsdauer von 60 Min. bei 37 °C unter Ausschluss von Licht erfolgte die Messung im Fluorometer unter o. g. Einstellungen. Das Signal der Negativkontrolle wurde als Hintergrundsignal abgezogen.

3.2.5 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel oder SPSS Statistics 22.0. Bei der überwiegenden Zahl der Ergebnisse handelt es sich um Mittelwertvergleiche von zwei unabhängigen Stichproben, sodass die statistische Signifikanz mit zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests bestimmt wurde. Der Pearson-Korrelationskoeffizient *r* diente zur Berechnung der Signifikanz von Korrelationen.

p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Fehlerbalken entsprechen den mittleren Standardabweichungen. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente durchgeführt, die dargestellten Daten entsprechen dem Mittelwert hieraus.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Gliederung des Ergebnisteils bezieht sich auf die experimentellen Inhalte welche im Rahmen des Hauptprojektes dieser Arbeit erhoben wurden. Ein Teil der hier dargestellten Ergebnisse wurde zu einem Manuskript zusammengefasst, welches zum Zeitpunkt der Abgabe der Arbeit in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift eingereicht wurde und gegenwärtig begutachtet wird. Darüber hinaus wurden im Rahmen der Arbeit auch Daten für Kooperationsprojekte erhoben. Die Inhalte dieser bereits publizierten Projekte werden in Abschnitt 4.7 kurz zusammengefasst.

4.1 Sulfatid-Spiegel in humanem Alzheimer-Hirngewebe

Wie in der Einleitung beschrieben, erbrachten bisherige Studien keine homogene Datenlage bezüglich der Veränderungen des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Es sollte daher untersucht werden, ob es im Verlauf der Erkrankung zu einer Abnahme der Sulfatide im Gehirn kommt. Um diese Frage zu beantworten, wurden 10 *post mortem* Proben von Patienten ohne Alzheimer-Erkrankung mit 20 Proben von Alzheimer-Patienten verglichen. Wie in Tabelle 21 dargestellt zeigten die beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede in Alter, Geschlecht und Verzögerung zwischen Tod und Präparation (engl.: *post mortem delay*, pmd). Die Proben enthielten kortikale Strukturen des Frontallappens, ein Bereich des Gehirns der bei Alzheimer-Patienten häufig betroffen ist. Im Rahmen von vorangehenden Analysen, war gezeigt worden, dass sich das Protein/Nassgewicht-Verhältnis zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (MYLONAS, 2015). Proben mit einem zu geringen Protein/Nassgewicht-Verhältnis wurden, aufgrund des zu hohen Anteils an Weißer Substanz, von der Messung exkludiert. Es ist somit davon auszugehen, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils aus der Grauen- bzw. Weißen Substanz vorlag. Die Sulfatide wurden massenspektrometrisch detektiert, sodass auch eine Analyse der einzelnen Sulfatid-Spezies möglich war.

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Gewebeeigenschaften der Kontroll- und der Alzheimergruppe. Alle Proben wurden dem Kortex des Frontallappens entnommen. Statistische Analyse mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$).

	Kontrolle	Alzheimer	p-Wert
Anzahl			
Gesamt	10	20	
m [%]	4 [40 %]	8 [40 %]	n. s.
w [%]	6 [60 %]	12 [60 %]	n. s.
Mittelwert			
pmd [Std.]	25,5	30,65	n. s.
Alter [Jahre]	78,2	78	n. s.
Braak [I–VI]	2,05	5	<0,001

Wie in Abbildung 4 dargestellt konnte im Hirngewebe des Frontallappens der Alzheimer-Patienten eine signifikante Reduktion des Gesamt-Sulfatid-Spiegels auf 72,7 % ($\pm 9,82$ %, $p = 0,041$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden. Während sich kurzkettige Sulfatide mit 18–20 C-Atomen überwiegend in Neuronen und Astrozyten nachweisen lassen, werden länger-kettige Sulfatide mit 22–24 C-Atomen hauptsächlich in der Myelinscheide angereichert (PERNBER et al., 2002). Um mögliche Unterschiede in diesen beiden Subpopulationen zu erkennen, erfolgte anschließend eine getrennte Analyse dieser beiden Gruppen. Sowohl die länger-kettigen (72,8 %, $\pm 9,71$ %, $p = 0,043$) als auch die kurzkettigen (70,6 %, $\pm 9,29$ %, $p = 0,014$) Sulfatide waren in der Gruppe der Alzheimer-Patienten gleichermaßen verringert, wobei sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten ($p = 0,722$).

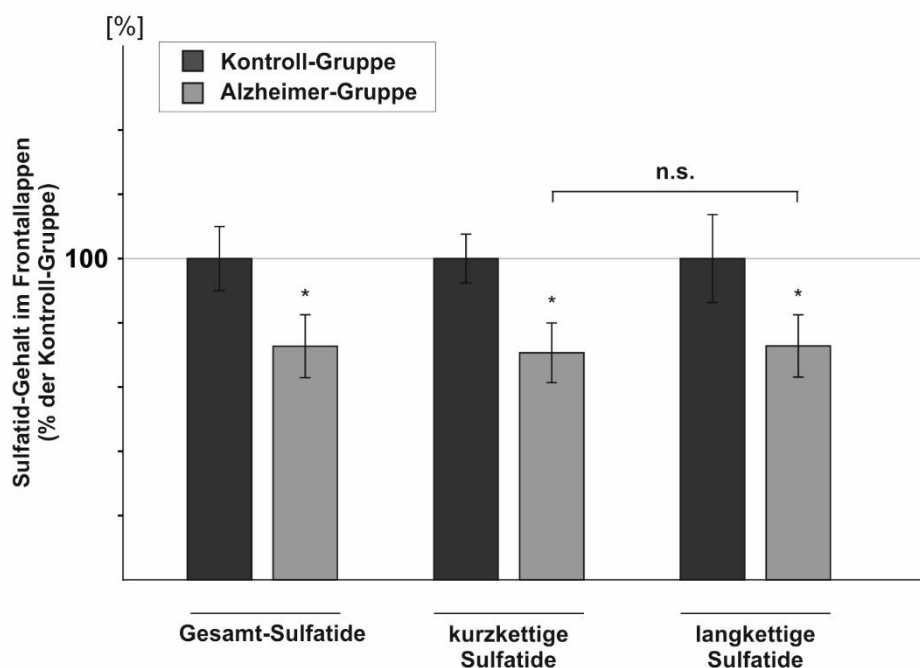


Abbildung 4: Darstellung der prozentualen Veränderung der Sulfatide in humanen Proben aus dem Frontallappen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer Kontroll-Population. (n = 10 Kontroll-Gruppe; n = 20 Alzheimer-Gruppe) Die Detektion der Sulfatide erfolgte mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Kurzkettige Sulfatide wurden definiert mit einer Kettenlänge der Fettsäuren von 18–20 C-Atomen. Langkettige Sulfatide enthielten Fettsäuren mit 22–24 C-Atomen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$).

Bei der neuropathologischen Begutachtung von Hirngewebe von Alzheimer-Patienten spielt die Einteilung nach den Braak-Stadien bis heute eine entscheidende Rolle. Dabei zeigt ein hohes Braak-Stadium eine weiter fortgeschrittene Erkrankung an (ARRIAGADA et al., 1992). Es wurde daher eine Analyse des Sulfatid-Gehaltes auch in Abhängigkeit des Braak-Status durchgeführt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, zeigte sich in der Unterscheidung des Sulfatid-Gehaltes nach den Braak-Stadien nur eine signifikante Reduktion zwischen dem Braak-Stadium I–II und dem Braak-Stadium V–VI (Braak I–II 149,1

$\pm 12,28$ cps, Braak V–VI $100,1 \pm 21,68$ cps, $p = 0,01$). Eine tendenzielle Reduktion konnte auch im Braak-Stadium III–IV nachgewiesen werden, wobei die geringe Anzahl in dieser Gruppe ($n = 4$) keine zu beachten ist ($115,7 \pm 21,68$ cps, I–II/III–IV $p = 0,202$; III–IV/V–VI $p = 0,535$). Mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,97$ stand in unserer Population der Sulfatid-Gehalt in umgekehrt proportionalen Zusammenhang mit dem Braak-Stadium.

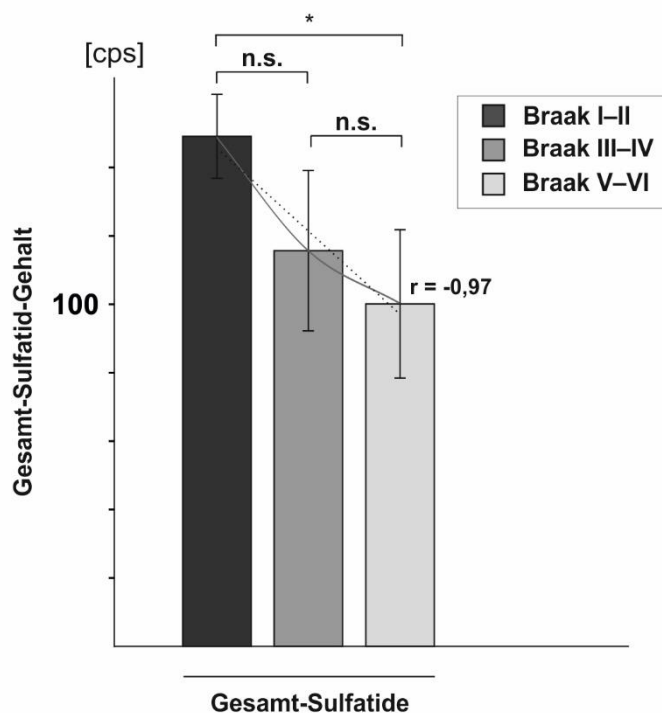


Abbildung 5: Gesamt-Sulfatid-Gehalt in Abhängigkeit des Braak-Stadiums. ($n = 10$ Kontroll-Gruppe; $n = 20$ Alzheimer-Gruppe) Die Detektion der Sulfatide erfolgte mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Dargestellt ist die Summe der Intensität aller Sulfatidspezies in der Massenspektrometrie in cps (*engl. counts per second*) im Verhältnis zu den Braak-Stadien. Der Wert „ r “ gibt dabei den Korrelationskoeffizienten der Mittelwerte der Gruppen an, die gestrichelte Linie bildet die Regressionsgerade. Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, das Signifikanzniveau wurde mittels zweiseitigen, ungepaarten Student’s t -Tests ermittelt (* $p < 0,05$).

Betrachtet man, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, jede einzelne Sulfatidspezies für sich, zeigen sich alle Spezies in den Alzheimer-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell verringert. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnte dabei eine signifikante Reduktion für folgende Spezies nachgewiesen werden: d18:1/18:0 Hydroxy ($0,34 \pm 0,04$ cps vs. $0,22 \pm 0,02$ cps, $p = 0,009$), d18:1/20:0 ($1,32 \pm 0,08$ cps vs. $1,0 \pm 0,03$ cps, $p < 0,001$), d 18:1/20:0 Hydroxy ($0,29 \pm 0,02$ cps vs. $0,20 \pm 0,01$ cps, $p < 0,001$); d18:1/22:0 ($2,09 \pm 0,33$ cps vs. $1,37 \pm 0,15$ cps, $p = 0,03$), d18:1/22:0 Hydroxy ($3,99 \pm 0,45$ cps vs. $2,64 \pm 0,22$ cps, $p = 0,007$) und d18:1/24:0 ($28,98 \pm 3,5$ cps vs. $20,67 \pm 1,96$ cps, $p = 0,04$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der Sulfatide sich nicht auf eine einzelne Spezies zurückführen lässt, sondern eine Verminderung der gesamten Lipidklasse für den Effekt verantwortlich ist.

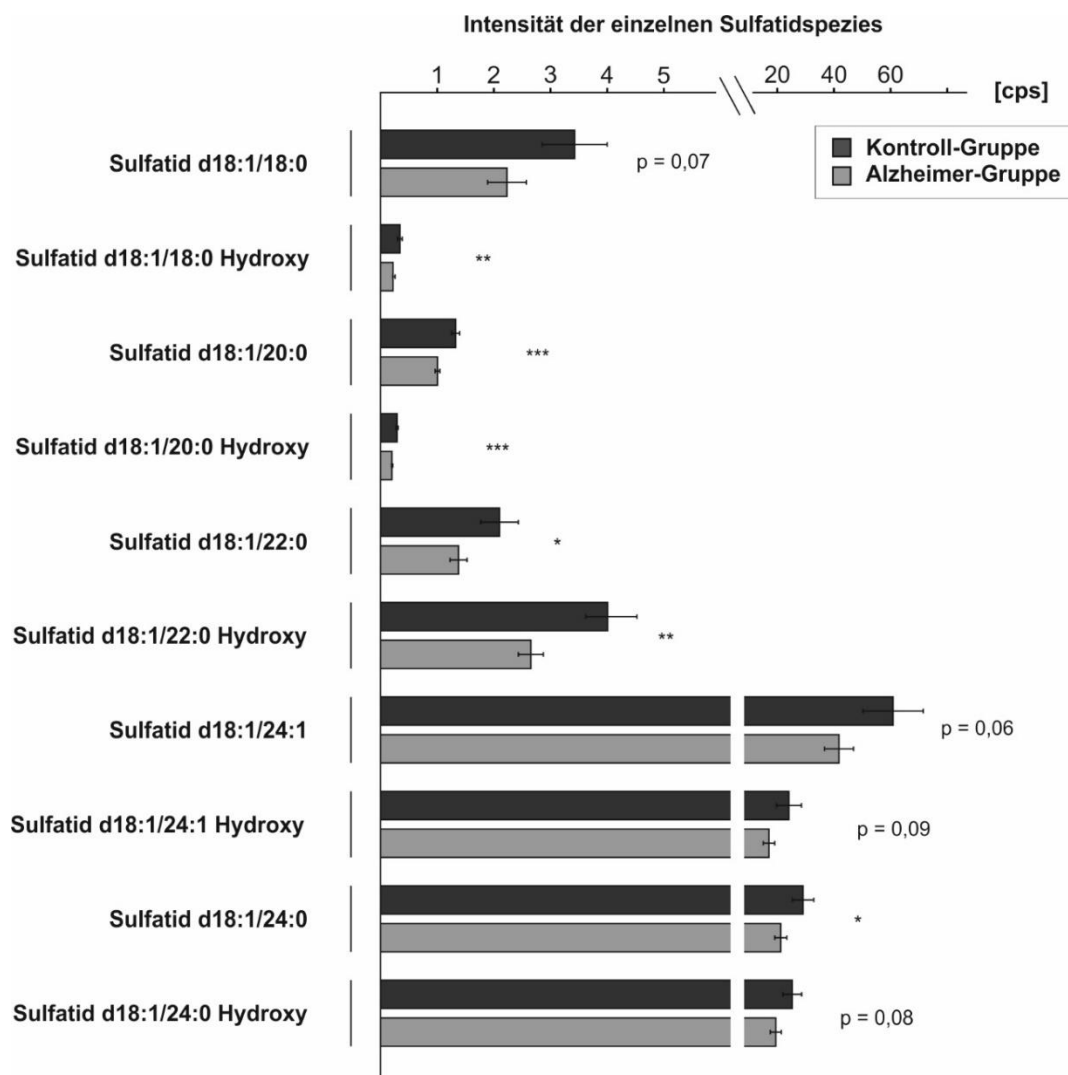


Abbildung 6: Massenspektrometrische Analyse der einzelnen Sulfatidspezies aus humanen Proben des Frontallappens von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer Kontroll-Population. (n = 10 Kontroll-Gruppe; n = 20 Alzheimer-Gruppe) Die Detektion der Sulfatide erfolgte mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Die Abbildung zeigt die Intensitäten der einzelnen Spezies in der Einheit cps, wobei zur besseren Darstellung die x-Achse im niedrigen Bereich eine kleinere Skalierung aufweist. Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, statistische Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2 Sulfatid-Gehalt im zerebralen Gewebe in Abhängigkeit vom Alter

Im Rahmen einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass während des physiologischen Alterungsprozesses eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in der Weißen Substanz auftritt (SVENNERHOLM et al., 1994). Es wurde daher überprüft, ob in der hiesigen Population auch in der Grauen Substanz ähnliche Effekte beobachtet werden können. In Abhängigkeit des Alters zeigte sich keine signifikante Änderung des Gesamt-Sulfatid-Gehaltes in der Grauen Substanz, weder innerhalb der Kontrollgruppe noch innerhalb der Gruppe der Alzheimer-Patienten (Abbildung 7).

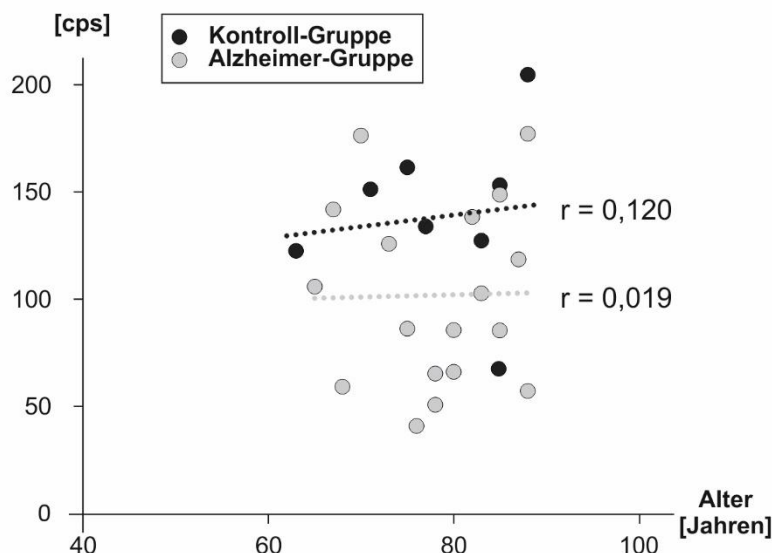


Abbildung 7: Darstellung des Sulfatid-Gehaltes in Abhängigkeit vom Alter der Patienten. Jeder dargestellte Punkt entspricht dem Verhältnis der Gesamt-cps zum Alter einer Probe. Die Trendlinien sind getrennt für die Alzheimer Gruppe und die Kontrolle-Gruppe dargestellt. Mit „r“ wird der Korrelationskoeffizient angegeben.

4.3 Einfluss der APP-Prozessierung auf die Sulfatid-Synthese

In Abschnitt 4.1 konnte nachgewiesen werden, dass es im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung zu einer signifikanten Reduktion der Sulfatide kommt. Für einige Lipide wurde bereits gezeigt, dass der Metabolismus durch die verschiedenen APP-Prozessierungsprodukte direkt beeinflusst werden kann (zusammengefasst in (GRIMM et al., 2017a)). Die folgenden Untersuchungen hatten daher zum Ziel, die Auswirkungen der APP-Prozessierung auf die Sulfatid-Homöostase zu analysieren. Im Rahmen der pathologischen Prozesse bei der Alzheimer-Krankheit könnten diese Mechanismen gestört sein und somit zu der beobachteten Sulfatid-Reduktion im Alzheimer-Gehirn beitragen.

4.3.1 Beeinflussung des Sulfatid-Metabolismus durch die γ -Sekretase

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurden zunächst im Zellkulturversuch embryonale Mausfibroblasten (MEF) betrachtet, die durch eine Defizienz von PS1 und PS2 (MEF PS1/2^{-/-}) keine γ -Sekretase-Aktivität mehr besitzen. Die durch die γ -Sekretase entstehenden proteolytischen Produkte von APP, AICD und A β bzw. p3, können somit nicht mehr gebildet werden. Um Schwankungen der Sulfatide durch eine klonale Heterogenität zu vermeiden, wurden als Kontrolle Presenilin-retransfizierte Zellen (MEF PS1r) verwendet, die eine γ -Sekretase-Aktivität aufweisen, die etwa 50 % unter der Aktivität in Wildtyp-Zellen liegt (DUERING et al., 2005).

Im ersten Schritt wurde mittels Massenspektrometrie der Sulfatid-Gehalt aus Homogenaten dieser Zellen miteinander verglichen. Aufgrund der geringeren Sulfatid-Konzentration in Fibroblasten im Vergleich zu neuronalem Gewebe, wurde hier nur die dominante Sulfatid-Spezies d18:1/24:1 betrachtet. In

den defizienten Zellen zeigte sich im Vergleich zu den retransfizierten Kontrollen eine signifikante Steigerung des Sulfatids d18:1/24:1 auf 242,7 % ($\pm 7,05$ %, $p < 0,001$; Abbildung 8).

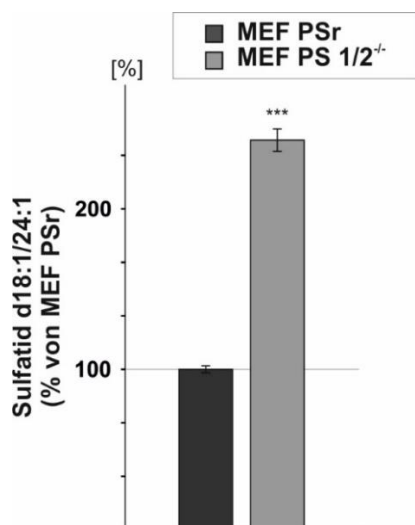


Abbildung 8: Massenspektrometrie der Sulfatid-Hauptspezies d18:1/24:1 in PS 1/2^{-/-} MEF Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe PSr. Die massenspektrometrische Untersuchung wurde durchgeführt in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme von Sulfatid 18:1/24:1 in den Presenilin-defizienten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung, die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (***) $p < 0,001$.

Diese Veränderung könnte sowohl durch eine gesteigerte Synthese, als auch einen reduzierten Abbau der Lipide erklärt werden. Um diese Frage zu beantworten wurde im nächsten Schritt die Sulfatid-Syntheserate in den Zellen bestimmt. Die MEF-Zellen wurden zu diesem Zweck für 24 Std. mit radioaktivem Sulfat inkubiert, welches mit Hilfe des Coenzym PAPS und der CST in die Sulfatide inkorporiert wird. Sulfatide bilden mit Abstand den größten Anteil an sulfatidierten Lipiden, sodass nach sauberer Trennung mittels Lipidextraktion die in der Lipidphase nachgewiesene Radioaktivität direkt proportional zu den synthetisierten Sulfatiden ist. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus konnte nachgewiesen werden, dass in den MEF PS 1/2^{-/-}-Zellen im Vergleich zur Kontrolle 85,1 % ($\pm 4,11$ %, $p < 0,001$) mehr Sulfatide synthetisiert wurden (Abbildung 9).

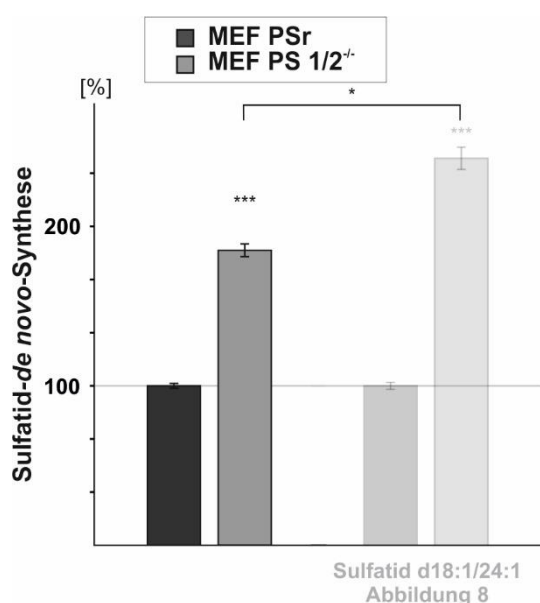


Abbildung 9: Sulfatid-*de novo*-Synthese in Presenilin-defizienten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Bestimmung der Sulfatid-*de novo*-Synthese wurde durchgeführt in Kooperation mit Dr. Benjamin Hundsdörfer. Nach Lipidextraktion zeigte sich eine signifikante Steigerung der Radioaktivität in den PS 1/2^{-/-}-Zellen und somit eine vermehrte Sulfatid-*de novo*-Synthese im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Vergleich war ein signifikant höherer Anstieg des Sulfatid d18:1/24:1 (siehe auch Abbildung 8) messbar. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests bestimmt ($p < 0,001$). Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

Betrachtet man beide Ergebnisse zusammen, lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Steigerung der Synthese und der massenspektrometrisch gemessenen Erhöhung des Sulfatid d18:1/24:1-Spiegels feststellen ($p = 0,033$). Diese Diskrepanz könnte beispielsweise durch eine zusätzliche Reduktion des Abbaus der Sulfatide oder durch eine geringere Spezifität des Synthese-Versuchs erklärt werden.

Eine mögliche Ursache für die gesteigerte Synthese der Sulfatide könnte eine vermehrte Expression der beteiligten Enzyme sein, was die Umwandlung von Ceramid zu Sulfatid verstärken würde. Die Synthese der Sulfatide verläuft in zwei Schritten. Zunächst erfolgt die durch die CGT (kodierendes Gen: *Ugt8a*) katalysierte Bildung von Galactosylceramid. Anschließend werden aus diesem Zwischenprodukt mit Hilfe der CST (kodierendes Gen: *Gal3st1*) schließlich die Sulfatide synthetisiert. Um Expressionsveränderungen zu detektieren, wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR aus den Presenilin-defizienten, und Presenilin-retransfizierten Zellen die mRNA-Spiegel der beiden beteiligten Enzyme bestimmt. Sowohl die *Ugt8a* (1457,0 %, 292,91 %, $p = 0,002$; Abbildung 10a) als auch die *Gal3st1* (240,1 %, $\pm 48,18$ %, $p = 0,016$; Abbildung 10b) Genexpression zeigten sich dabei in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen signifikant gesteigert.

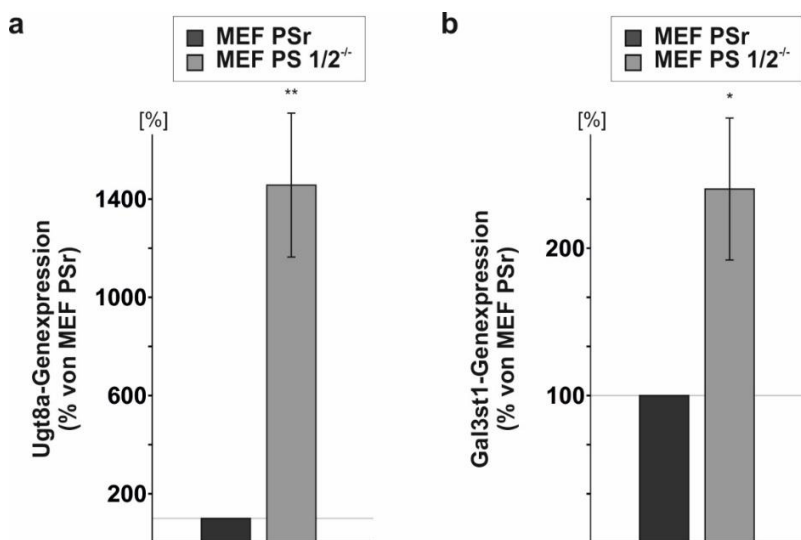


Abbildung 10: Genexpression der *Ugt8a* und *Gal3st1* in MEF PSr im Vergleich zu MEF PS 1/2^{-/-}. Die RT-PCR-Analysen wurden durchgeführt in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen. Dargestellt wird die prozentuale Steigerung der Genexpression der bei der Sulfatid-Synthese beteiligten Enzyme: CGT (*Ugt8a*; Abbildung a) und CST (*Gal3st1*; Abbildung b). Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

In dem zuvor genannten Versuchsaufbau kann nicht sicher beurteilt werden, ob die Effekte auf den Verlust der γ -Sekretase-Aktivität zurückzuführen sind. Auch durch das Fehlen der Proteine Presenilin

1/2 könnten andere, von der Sekretase-Aktivität unabhängige, Funktionen verloren gehen. Um die beobachteten Veränderungen der fehlenden γ -Sekretase-Aktivität zuordnen zu können wurde daher ergänzend die Genexpression der Gal3st1 nach Zugabe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT analysiert. Hierbei wurden SH-SY5Y-Zellen verwendet um Zelltyp-spezifische Effekte in Fibroblasten auszuschließen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte sich nach Inkubation mit DAPT eine signifikante Steigerung der Gal3st1-Genexpression auf 132,1 % ($\pm 4,76$ %; $p = 0,002$).

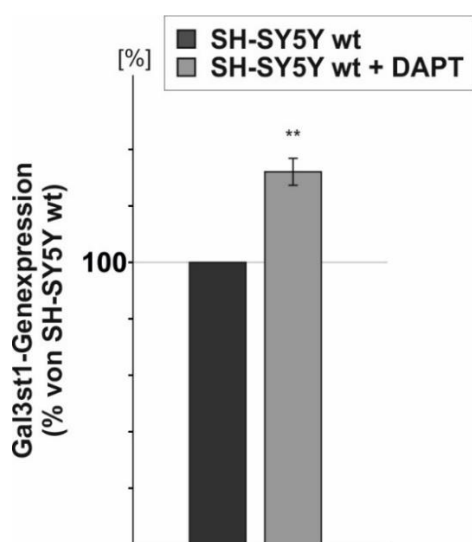


Abbildung 11: Einfluss des γ -Sekretase Inhibitors DAPT auf die Genexpression der Gal3st1. Die RT-PCR-Analysen wurden durchgeführt in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen. Dargestellt wird die Veränderung der Genexpression der Gal3st1 nach Zugabe von DAPT. Die Inkubation erfolgte über 72 Std. mit 2,5 μ M, die Kontrollen wurden mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels behandelt. Die Expression wurde mittels RT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (** $p < 0,01$).

Die im Vergleich zu den Presenilin-defizienten Zellen geringere Effektstärke könnte auf eine nur inkomplette Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität zurückgeführt werden, da auch unter Zugabe des Inhibitors eine Restaktivität erhalten ist. Zudem sind Zelltyp-spezifische Effekte, sowie γ -Sekretase unabhängige Effekte auf die Expression der Gal3st1 denkbar.

Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine fehlende γ -Sekretase-Aktivität zu einer Steigerung der Genexpression der CST und CGT führt. Diese vermehrte Expression führt zu einer verstärkten Synthese der Sulfatide, was sich auch im Sulfatid-Gehalt der Zellen widerspiegelt. Die γ -Sekretase besitzt neben APP noch über 90 weitere Substrate (HAAPASALO, KOVACS, 2011). Für einige ihrer Produkte, wie beispielsweise NICD, wurde eine genregulatorische Wirkung bereits nachgewiesen. Um zu untersuchen ob die beobachteten Veränderungen auf ein anderes Substrat von Presenilin zurückzuführen sind, wurden im Folgenden APP-defiziente Zellen analysiert.

4.3.2 Veränderungen der Sulfatid-Synthese durch APP

Es sollte nun untersucht werden, ob die vorangehenden Ergebnisse sich auf die fehlende APP-Prozessierung zurückführen lassen. Um dies zu analysieren wurden APP/APLP2-defiziente MEF (MEF APP/APLP2^{-/-}) -Zellen mit MEF wt-Zellen verglichen. Im Gegensatz zu neuronalem Gewebe wird in Fibroblasten kein APLP1 exprimiert, sodass den MEF APP/APLP2^{-/-} Zellen alle Mitglieder der APP-Genfamilie fehlen (SLUNT et al., 1994). Ein Nachteil dieses Versuchsaufbaus war das Fehlen einer

retransfizierten Kontrollzelllinie. Dadurch können Schwankungen im Lipidgehalt in Folge der klonalen Heterogenität der Mäuse nicht ausgeschlossen werden.

Wie zuvor in den Presenilin-defizienten Zellen, wurde auch aus den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen zunächst massenspektrometrisch der Sulfatid-Gehalt bestimmt (Abbildung 12a). Im Vergleich zu den MEF wt-Zellen zeigte sich in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen eine signifikante Steigerung der Sulfatid 18:1/24:1 Spezies auf 114,8 % ($\pm 2,05$ %, $p = 0,002$). Die ergänzende Messung der Sulfatid-Synthese konnte in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen ebenfalls eine vermehrte Sulfatid-Produktion nachweisen (196,4 % , $\pm 8,25$ %, $p < 0,001$; Abbildung 12b).

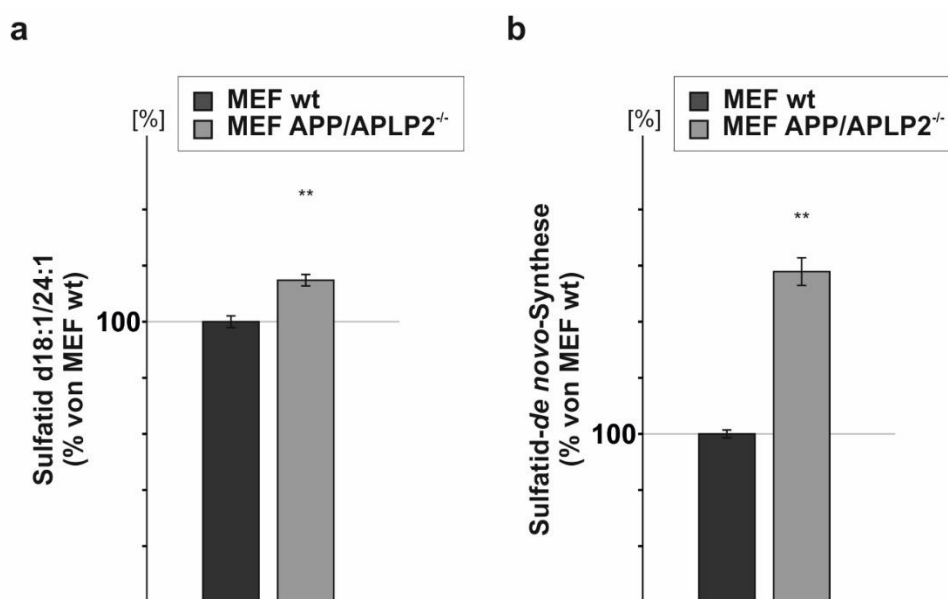


Abbildung 12: Einfluss der APP/APLP2-Defizienz auf den Sulfatid-Gehalt und die Sulfatid-de novo-Synthese. Die massenspektrometrische Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Die Bestimmung der Sulfatid-de novo-Synthese wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsdörfer durchgeführt. Dargestellt wird der prozentuale Anstieg der Sulfatid-Hauptspezies d18:1/24:1 und der Sulfatid-de novo-Synthese in MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen im Verhältnis zu MEF wt-Zellen. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's *t*-Tests bestimmt (** $p < 0,01$). Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

Interessanterweise unterschied sich die Erhöhung der Sulfatid-Synthese nicht signifikant von der in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen beobachteten ($p = 0,208$), sodass angenommen werden konnte, dass APP das für diese Veränderung verantwortliche Substrat der γ -Sekretase darstellt. Die Diskrepanz der nur gering gesteigerten Sulfatid-Spiegel in den APP-defizienten Zellen könnte gegebenenfalls durch die klonale Heterogenität oder Unterschiede in der Sulfatid-Degradation erklärt werden.

Die Bestimmung der mRNA-Spiegel der Ugt8a und Gal3st1 konnte in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen ebenfalls eine signifikante Steigerung der Genexpression beider Enzyme nachweisen (Ugt8a: 651,9 % , $\pm 85,80$ %, $p = 0,003$; Gal3st1: 270,1 % , $\pm 1,65$ %, $p < 0,001$; Abbildung 13). Dabei ergab sich kein

signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression der Gal3st1 in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen und den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen (30,0 %, ± 48,1 %, p = 0,512), während die Expression der Ugt8a in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen deutlicher gesteigert war (805,11 %, p = 0,142). Diese Differenz wäre beispielsweise durch einen zusätzlichen Effekt eines anderen Substrates der γ -Sekretase erklärbar. Die aus der Gal3st1-mRNA gebildete CST katalysiert dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Sulfatid-Synthese, sodass sich die Veränderungen der CGT nur gering auf die Gesamtsyntheseleistung der Zelle auswirken.

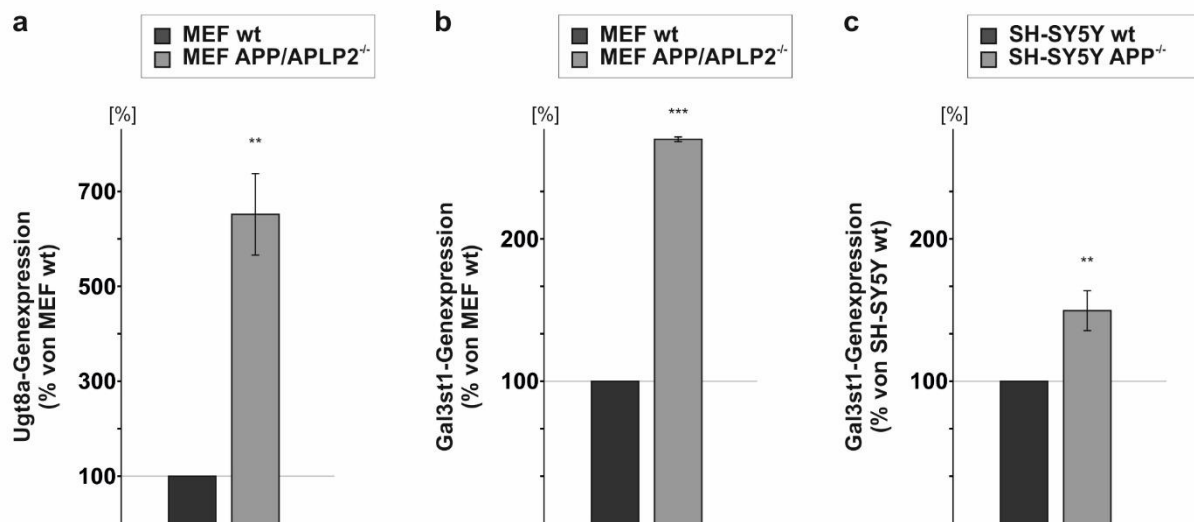


Abbildung 13: Genexpression von Gal3st1 und Ugt8a in MEF wt-Zellen im Vergleich zu APP/APLP2-defizienten Zellen bzw. SH-SY5Y wt-Zellen im Vergleich zu APP-defizienten Zellen. Die RT-PCR Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen durchgeführt. Die Abbildung zeigt die prozentuale Änderung der Expression der CGT (Ugt8a; Abbildung a) und CST (Gal3st1; Abbildung b). Abbildung C zeigt die Änderung der CST-Expression in APP-defizienten-SH-SY5Y Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y wt-Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (** p < 0,01; *** p < 0,001). Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

Diese Ergebnisse aus den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen zeigen, dass die in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen beobachtete Steigerung der Genexpression der an der Sulfatid-Synthese beteiligten Enzyme auf die fehlende Prozessierung von APP zurückzuführen sein könnte. Ergänzend wurde die Gal3st1-Genexpression in SH-SY5Y wt Zellen im Vergleich zur APP defizienten-SH-SY5Y Zellen (SH-SY5Y APP^{-/-}) untersucht. Hier zeigte sich unter APP-Defizienz ebenfalls eine signifikante Steigerung der Gal3st1-Genexpression (149,6%, ± 14%, p = 0,007). Somit konnten die Ergebnisse aus den Fibroblasten in einer weiteren, neuronalen Zelllinie bestätigt werden. Im Folgenden wurden daher die beiden APP-Produkte der γ -Sekretase, A β und AICD, näher betrachtet. Für beide Peptide ist bekannt, dass sie die Lipidhomöostase, beispielsweise von Sphingomyelin oder den Gangliosiden beeinflussen können (GRIMM et al., 2005;

GRIMM et al., 2012). Um die Wirkung von A β auf die Genexpression der Gal3st1 und Ugt8a zu untersuchen, wurden zunächst MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen betrachtet die für 9 Tage mit A β ₄₀ inkubiert wurden. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit A β ₄₀ weder die Ugt8a- (106,2 %, \pm 13,89 %, $p = 0,665$) noch die Gal3st1-Genexpression (97,2 %, \pm 23,48 %, $p = 0,602$) signifikant beeinflusst wurden (Abbildung 14).

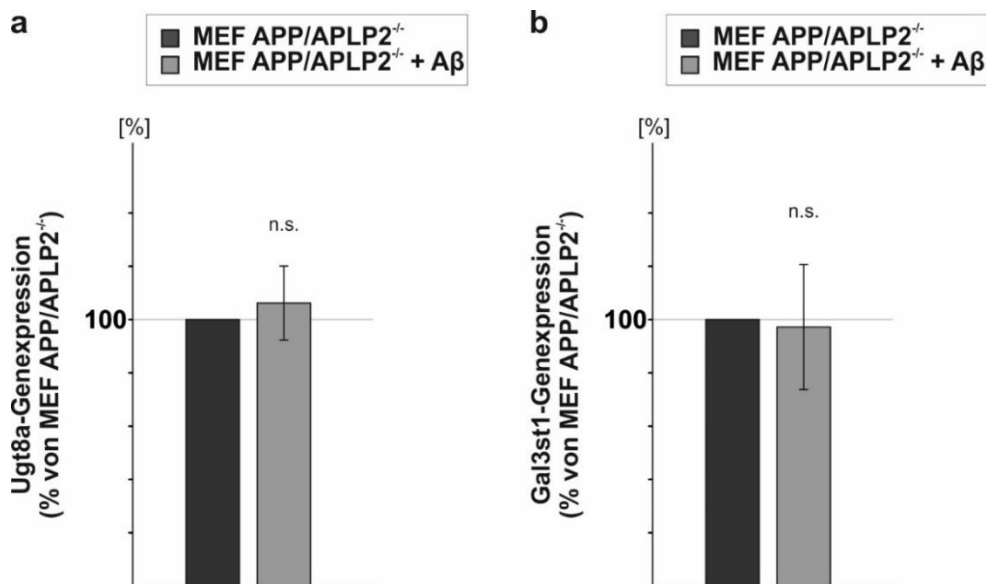


Abbildung 14: Einfluss von A β auf die Genexpression der Ugt8a und Gal3st1 in MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen. Die Analyse der Genexpression erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen. Die Genexpression der genannten Enzyme wurde nach einer neuntägigen Inkubation mit A β ₄₀ untersucht. Die Kontrollzellen wurden mit der gleichen Menge des Lösungsmittels behandelt. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (n. s.: $p > 0,05$).

4.3.3 Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch den APP C-Terminus

Neben A β entsteht bei der proteolytischen Spaltung von APP durch die γ -Sekretase auch das intrazelluläre Fragment AICD. AICD wurde bereits in mehreren Studien als genregulatorisches Peptid diskutiert (GRIMM et al., 2015a; ROBINSON et al., 2014). Das ca. 50 Aminosäuren lange Peptid entsteht aus dem C-terminalen Ende von APP und beinhaltet die sog. YENPTY-Sequenz die als Bindungsstelle für verschiedene Adapterproteine dient. Fehlt dieser Bereich entsteht kein funktionsfähiges AICD. Um zu untersuchen, welche Bedeutung AICD in der Zelle besitzt wurde von Ring et al. eine Mauslinie generiert, die durch eine C-terminale Deletion von 15-Aminosäuren (APP Δ CT15) ein APP-Protein bildet dem diese YENPTY Sequenz fehlt (RING et al., 2007). Im Folgenden wurden daher MEF-Zellen mit diesem verkürzten APP-Peptid analysiert (MEF APP Δ CT15) und mit MEF wt-Zellen verglichen.

Wie in Abbildung 15 dargestellt zeigte sich in der massenspektrometrischen Analyse der 24:1 Sulfatid-Spezies im Vergleich zu den MEF wt-Zellen in den MEF APP Δ CT15-Zellen eine signifikante Steigerung auf 229,1 % (\pm 4,61 %, $p < 0,001$). Interessanterweise war diese Erhöhung der Sulfatide vergleichbar mit der in den MEF PS1/2 $^{-/-}$ -Zellen und unterschied sich von dieser nicht signifikant ($p = 0,500$). Dies unterstreicht die Vermutung, dass der beobachtete Effekt auf die Sulfatid-Synthese in den MEF PS1/2 $^{-/-}$ -Zellen durch AICD vermittelt werden könnte.

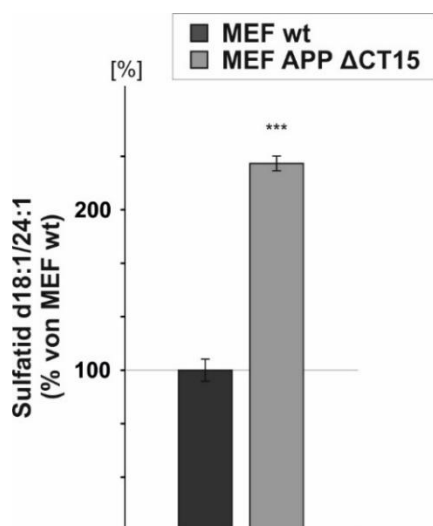


Abbildung 15: Einfluss des C-terminal verkürzten APP auf den Sulfatid d18:1/24:1-Spiegel in MEF-Zellen. Die massenspektrometrische Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Die Bestimmung der Hauptspezies der Sulfatide in MEF Zellen (Sulfatid d18:1/24:1) erfolgte mittels Massenspektrometrie, dargestellt wird die prozentuale Zunahme in MEF APP Δ CT15-Zellen im Verhältnis zu MEF wt-Zellen. Das Signifikanzniveau wurde mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's t -Tests bestimmt (***) $p < 0,001$). Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

Ob diese Veränderung ebenfalls durch eine gesteigerte Expression der beteiligten Enzyme erklärt werden kann wurde mittels qRT-PCR untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant gesteigerte Genexpression der Gal3st1 in den MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle (357,4 %, 122,2 %, $p = 0,049$; Abbildung 16b), während die Expression der Ugt8a nur tendenziell erhöht war (131,6 %, \pm 36,36 %, $p = 0,411$; Abbildung 16a). Die Genexpressionssteigerung der Gal3st1 unterschied sich dabei nicht signifikant von der Steigerung des Sulfatid-Gehaltes ($p = 0,132$).

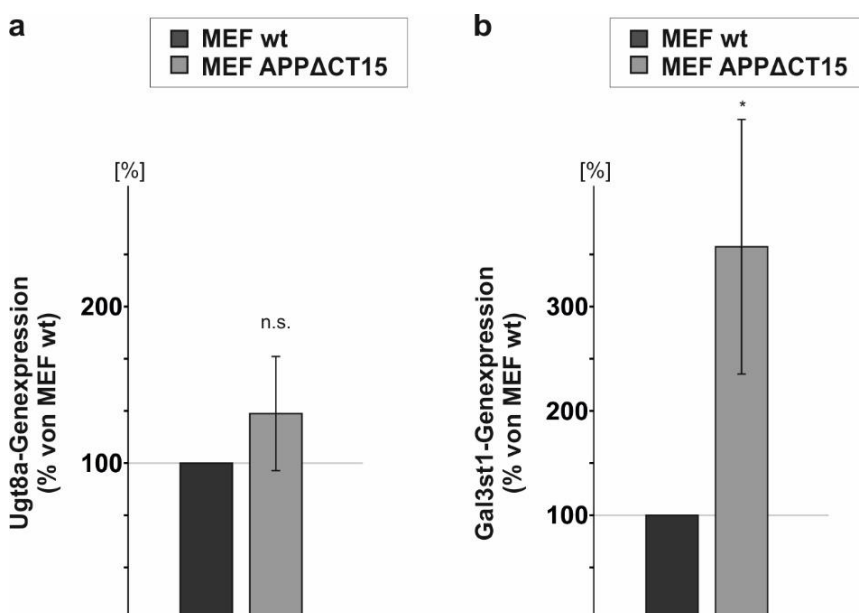


Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Änderung der Ugt8a- und Gal3st1-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen im Vergleich zu MEF wt-Zellen. Die Genexpression wurde in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen analysiert. Mittels RT-PCR wurde nach mRNA-Isolation die Genexpression der beiden an der Sulfatid-Synthese beteiligten Enzyme bestimmt. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (n. s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$). Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

4.3.4 Wirkung von synthetischem AICD auf die Sulfatid-Synthese

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Fehlen von funktionsfähigem AICD zu einer vermehrten Transkription der CST und in geringem Maße auch der CGT führt, wodurch konsekutiv die Sulfatid-Spiegel in der Zelle ansteigen. Umgekehrt sollte also AICD selbst eine Reduktion der Genexpression der CST bewirken. Durch eine Inkubation der MEF APP Δ CT15-Zellen mit 2 μ M AICD über 9 Tage, verglichen mit MEF APP Δ CT15-Zellen ohne Zugabe von AICD, konnte die Expression der CST signifikant auf 66,3 % ($\pm 11,48$ %, $p = 0,015$) verringert werden (Abbildung 17b). Gleichzeitig fand sich auch eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Ugt8a-Genexpression (87,5 %, $\pm 10,74$ %, $p = 0,27$, Abbildung 17a). Durch die Inkubation mit AICD wird, aufgrund der kurzen Halbwertszeit von synthetischem AICD, nur ein partieller Ausgleich der intrazellulären AICD-Spiegel erreicht, wodurch die geringeren Effektstärken bedingt sein könnten. Die Aufnahme von AICD in die Zelle nach o. g. Inkubation konnte bereits in früheren Studien unter Verwendung eines fluoreszierenden AICD-Peptids (FITC-AICD) gezeigt werden (GRIMM et al., 2015a).

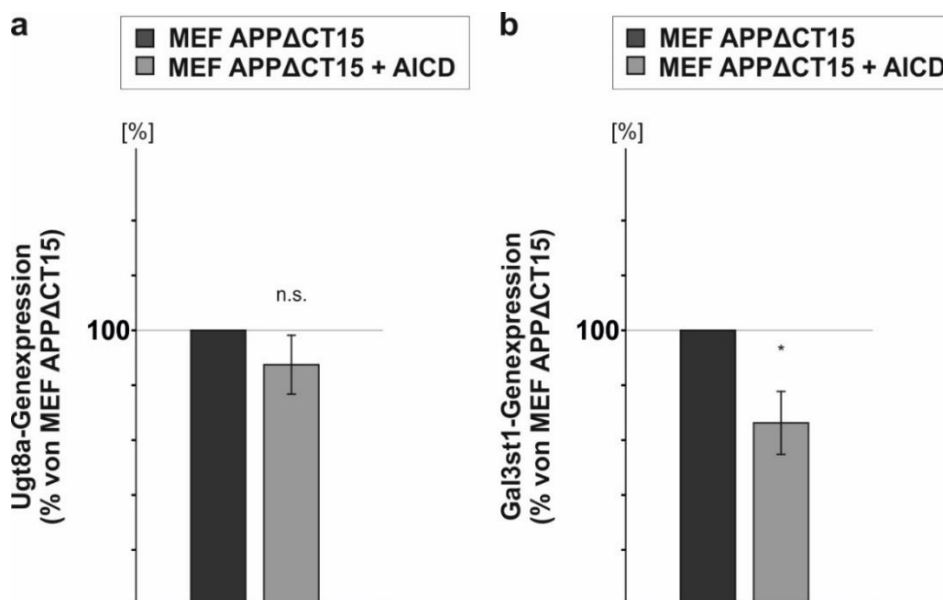


Abbildung 17: Ugt8a- und Gal3st1-Genexpression in MEF APP Δ CT15-Zellen nach Inkubation mit AICD. Die dargestellten RT-PCR Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen durchgeführt. Als Kontrolle dienten MEF APP Δ CT15-Zellen die über den gleichen Zeitraum (9 Tage) mit dem Lösungsmittel inkubiert wurden. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Die statistische Auswertung wurde mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests durchgeführt (n. s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$), die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss eines Proteins auf die Genexpression eines Enzyms genauer zu untersuchen ist ein Promotoraktivitätsversuch. Hierbei erfolgte zunächst die Transfektion eines Plasmids mit dem Promotor der Gal3st1. Unter dessen Kontrolle steht das Gen eines fluoreszierenden Enzyms, in diesem Versuch der Luciferase. Die Intensität der Fluoreszenz ist somit direkt proportional zur Promotoraktivität des untersuchten Gens. In diesem Versuchsaufbau wurde nur die Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der CST analysiert. Die Inkubation mit AICD erfolgte mit einer Lipofektions-basierten Methode unter Verwendung von Saint-PhD. Auch hierfür konnte in einer früheren Studie die suffiziente Aufnahme gezeigt werden (GRIMM et al., 2015a). Wie in Abbildung 18 dargestellt war nach Inkubation mit AICD die Promotoraktivität der Gal3st1 auf 85,35 % ($\pm 2,97$, $p = 0,005$) reduziert.

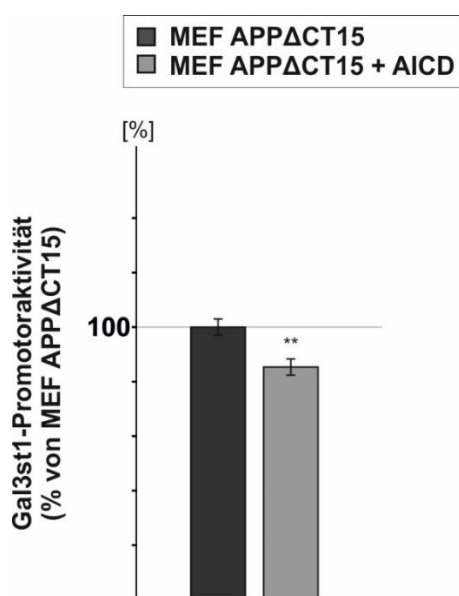


Abbildung 18: Gal3st1-Promotoraktivität nach Inkubation von MEF APPΔCT15-Zellen mit AICD. Der Promotoraktivitätsversuch wurde durchgeführt in Kooperation mit Dr. Janine Mett. Dargestellt wird die Promotoraktivität der Gal3st1 in MEF APPΔCT15-Zellen im Verhältnis zu MEF APPΔCT15-Zellen welche mit AICD inkubiert wurden. Die Promotoraktivität ist dabei direkt proportional zur gemessenen Fluoreszenz des gekoppelten Enzyms (Luciferase). Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests (** $p < 0,01$).

4.3.5 Einfluss von endogenem AICD auf die Sulfatid-Synthese

Im vorherigen Abschnitt wurde untersucht, wie sich die Zugabe von exogenem AICD auf die Sulfatid-Synthese auswirkt. Um die Relevanz dieser Ergebnisse auch für endogenes AICD zu untersuchen wurden im Folgenden Zellen analysiert, welche ein 50 Aminosäure-langes C-terminales Fragment (C50) von APP überexprimieren. Um Zelltyp-spezifische Effekte zu vermeiden wurden sowohl SH-SY5Y wt-Zellen (SH-SY5Y C50), als auch MEF APPΔCT15-Zellen (MEF APPΔCT15 C50), transfiziert. Hierbei ist zu beachten, dass in den SH-SY5Y-Zellen, aufgrund des Wildtyp-Hintergrundes, sowohl endogenes APP als auch das transfizierte C50-Fragment funktionsfähiges AICD bilden können. Im Gegensatz hierzu, liegt in den MEF APPΔCT15 C50-Zellen nur AICD aus dem C50 Fragment vor. Wie in Abbildung 19a gezeigt fand sich in den SH-SY5Y C50-Zellen eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollzelllinie (48,5 %, $\pm 1,8$ %, $p < 0,001$). Mit Hilfe der qRT-PCR konnte außerdem eine verminderte Genexpression der Gal3st1 in den MEF APPΔCT15 C50-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (54,1 %, $\pm 7,3$ %, $p < 0,001$, Abbildung 19b).

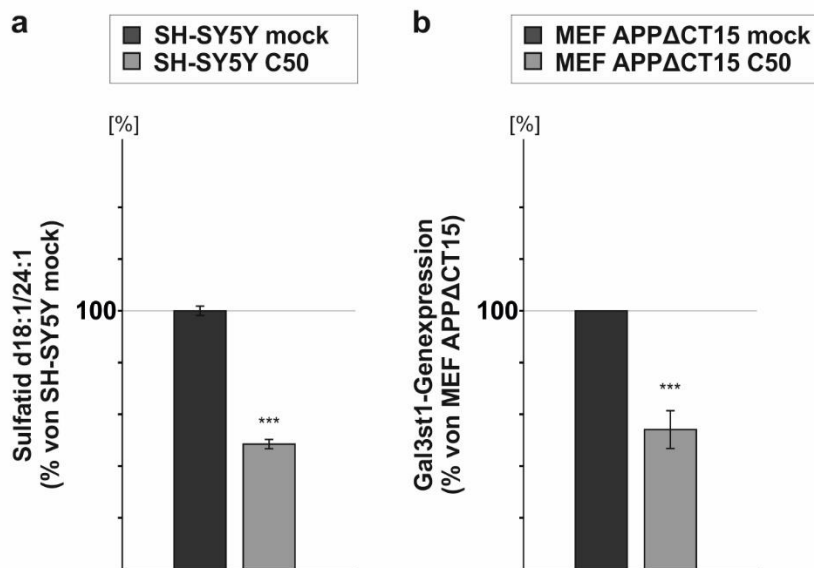


Abbildung 19: Einfluss des APP-C50-Fragments auf die Sulfatid-Synthese. Die Bestimmung des Sulfatid-Gehaltes, sowie die RT-PCR Analyse erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann. Die Bestimmung des Sulfatid-Gehaltes erfolgte mittels Massenspektrometrie. Die jeweiligen Kontrollzellen wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit einem Plasmid ohne enkodierendes Gen transfiziert („mock“-Transfektion). Die Genexpression der Gal3st1 wurde mit Hilfe der qRT-PCR nach mRNA-Isolation analysiert. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde mittels zweiseitigen, unpaarigen Student's *t*-Tests durchgeführt (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl synthetisches AICD als auch endogen produziertes AICD die Genexpression der Gal3st1 beeinflussen und hierdurch zu einer Reduktion der Sulfatid-Synthese und des Sulfatid-Gehaltes der Zellen führen können.

4.3.6 Auswirkung von Fe65 auf die Gal3st1-Genexpression

Wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben wird postuliert, dass AICD gemeinsam mit Fe65 und Tip60 einen Komplex bildet, der dann nach Transport in den Zellkern eine genregulatorische Wirkung besitzen kann (CAO, SÜDHOF, 2001). Ohne seine Bindungspartner scheint AICD nicht transkriptionell aktiv zu sein. Eine Defizienz des Fe65-Gens müsste somit ebenfalls zu einem Verlust des durch AICD-vermittelten Einflusses auf die Genexpression führen. Um diese Fragestellung zu bearbeiten wurden SH-SY5Y-Zellen mit einem Fe65 (Genname: APBB1) -Knock-Down betrachtet. Im Rahmen einer früheren Arbeit konnte für diese Zellen gezeigt werden, dass die Fe65-Expression auf 42 % reduziert ist (GRIMM et al., 2012). In diesen Zellen konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden, wie in den Zellen die kein AICD besaßen. Die beiden Gene Gal3st1 und Ugt8a wurden in den Knock-Down-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant stärker exprimiert (Gal3st1: 378,1 %, \pm 119,22 %, $p = 0,035$; Ugt8a: 222,9 %, \pm 49,03 %, $p = 0,022$, Abbildung 20).

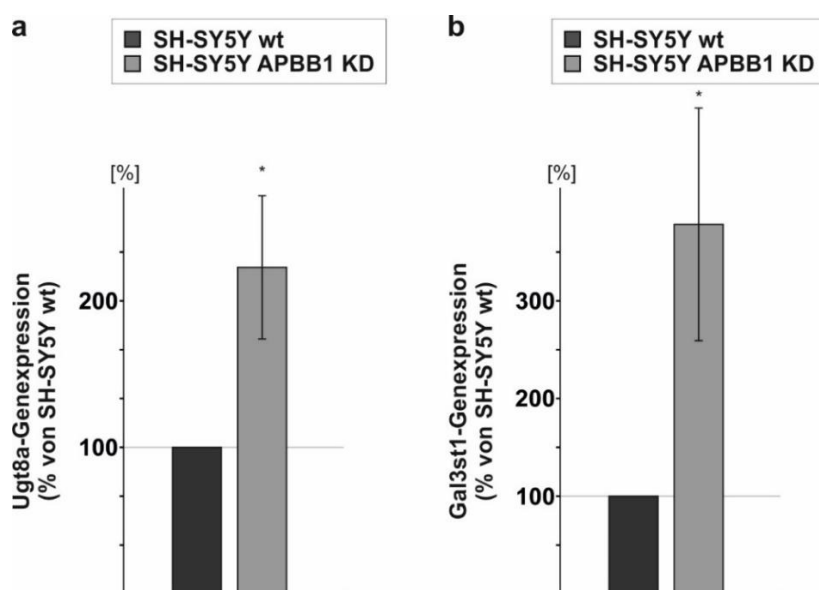


Abbildung 20: Einfluss von Fe65 auf die Sulfatid-Synthese. Die RT-PCR Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann bzw. Dr. Sven Grösgen durchgeführt. Die Gal3st1- und Ugt8a-Genexpression wurden mit Hilfe von mRNA-Isolation und anschließender qRT-PCR analysiert. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die Analyse erfolgte mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode und die anschließende statistische Auswertung unter Verwendung eines zweiseitigen Student's t -Tests (* $p < 0,05$).

4.3.7 Effekt von AICD und APP auf die Sulfatid-Synthese in neuronalem Gewebe

Die bisherigen Untersuchungen konnten nur Aufschluss über den Einfluss von AICD auf die Sulfatid-Synthese in kultivierten Zellen bieten. Dabei wurden vor allem embryonale Fibroblasten verwendet, sodass Rückschlüsse auf die Effekte in neuronalem Gewebe nur bedingt möglich sind. Um die *in vivo* Relevanz der Daten zu überprüfen war es daher nötig auch neuronales Gewebe zu analysieren. Hierzu diente in dieser Arbeit Hirngewebe aus dem Hippocampus von Mäusen. Um zu überprüfen in weit die Sulfatid-Synthese auch in neuronalem Gewebe durch AICD beeinflusst werden könnte wurden APP^{-/-}-Mäuse, sowie APP Δ CT15-Mäuse, mit entsprechenden Wildtyp-Mäusen verglichen. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse wurde zunächst der Gesamt-Sulfatid-Gehalt aus dem Hippocampus-Homogenat bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Sulfatide nur im Hippocampus der APP Δ CT15-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (APP Δ CT15: 115,6 %, \pm 3,32 %, $p = 0,009$, Abbildung 21). In den APP^{-/-}-Mäusen ließ sich hingegen nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung des Sulfatid-Gehaltes nachweisen (APP^{-/-}: 110,6 %, \pm 7,25 %, $p = 0,226$, Abbildung 21). Der Sulfatid-Gehalt im Hippocampus der APP^{-/-}-Mäuse unterschied sich dabei nicht signifikant von dem der APP Δ CT15-Mäuse ($p = 0,53$). Die fehlende Signifikanz der Veränderungen in den APP^{-/-}-Mäusen verglichen zu den Kontroll-Mäusen könnte daher durch eine höhere Varianz in diesen Mäusen bedingt sein. Eine Verstärkung der Testpower mittels Erhöhung der n-Zahl zur Verifizierung war aufgrund des begrenzten *in vivo* Materials nicht möglich.

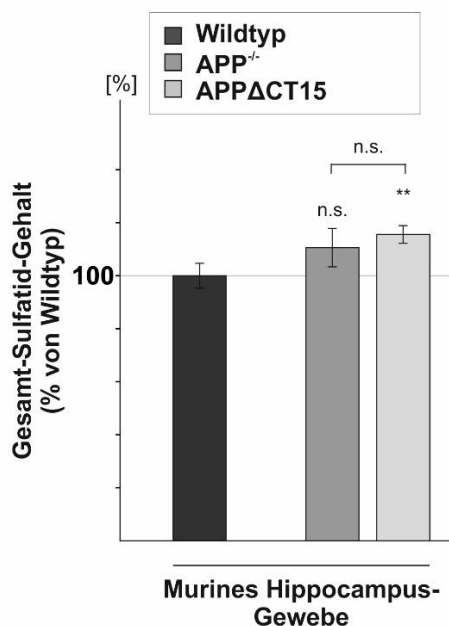


Abbildung 21: Gesamt Sulfatid-Spiegel aus murinem Hippocampus-Gewebe. Die massenspektrometrische Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Verglichen wurden APP^{-/-}- und APP^{ΔCT15}-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen. Der Sulfatid-Gehalt wurde massenspektrometrisch bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. > 0,05, ** p < 0,01). Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

Eine getrennte Analyse der kurzkettigen (18–20C) und langkettigen Sulfatide (22–24C) konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Sulfatid-Spezies nachweisen ($p = 0,756$). Wie in Abschnitt 2.7 beschrieben befinden sich die längerkettigen Sulfatide überwiegend in der Myelinscheide und die kurzkettigen Sulfatide primär in den Neuronen und Astrozyten. Dieses Ergebnis deutet somit daraufhin, dass die Erhöhung des Sulfatid-Spiegels nicht ausschließlich durch eine Beeinflussung der Myelinscheide bedingt ist. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch im neuronalen Gewebe diese Steigerung des Sulfatid-Spiegels auf eine vermehrte Expression der CST und somit eine Zunahme der Sulfatid-Synthese zurück zu führen ist. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus entsprechendem Hippocampus-Gewebe isoliert und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich in Analogie zu den beobachteten Veränderungen in den Fibroblasten auch im Hippocampus der APP^{-/-}-Mäuse (415,5 %, $\pm 115,68$ %, $p = 0,034$) und der APP^{ΔCT15}-Mäuse (235,4 %, $\pm 43,59$ %, $p = 0,021$) eine Steigerung der Gal3st1-Genexpression im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 22). Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den APP^{-/-}-Mäusen und den APP^{ΔCT15}-Mäusen nachweisen ($p = 0,195$).

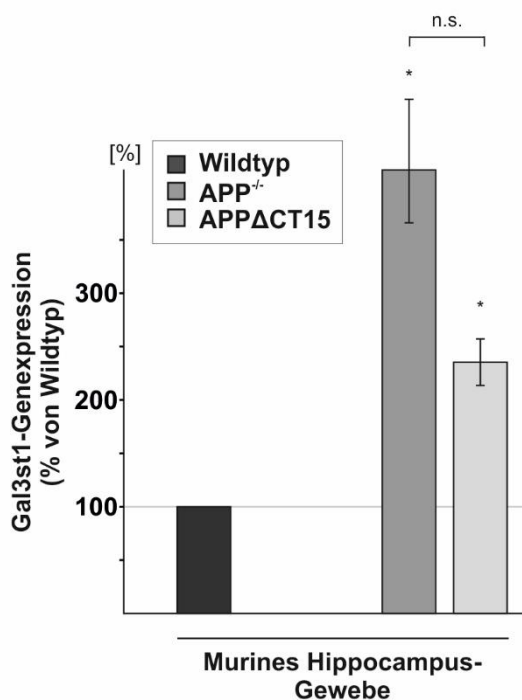


Abbildung 22: Gal3st1-Genexpression in murinem Hippocampus-Gewebe von APP^{-/-}-Mäusen und APPΔCT15-Mäusen. Die dargestellten RT-PCR Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann durchgeführt. Die Abbildung zeigt die prozentuale Steigerung der Gal3st1-Genexpression im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen *t*-Tests (* $p < 0,05$, n. s. $p > 0,05$).

Die verstärkte CST-Expression führt zu einer vermehrten Bildung der CST und somit auch zu einer vermehrten Sulfatid-Synthese. Hierbei ergibt sich eine Diskrepanz zwischen der geringen Effektstärke auf den Sulfatid-Gehalt im Vergleich zu den stärkeren Effekten auf die Expression der CST. Dies deutet daraufhin, dass im murinen Hippocampus-Gewebe Gegenregulationsmechanismen ablaufen, beispielsweise durch einen gleichzeitig gesteigerten Sulfatid-Abbau, die eine zu starke Akkumulation der Sulfatide verhindern.

Im Folgenden sollte auch der Einfluss von APP auf die Gal3st1-Genexpression im humanem Gehirngewebe untersucht werden. Hierzu wurde der APP Gehalt in 18 post-mortem Proben aus humanem Gehirngewebe von Alzheimer Patienten mit der jeweiligen Gal3st1-Genexpression der gleichen Probe korreliert. Es ergab sich eine signifikante, umgekehrt proportionale Korrelation zwischen dem APP-Proteingehalt und der Gal3st1-Genexpression in diesen Proben ($r = -0,48$, $p = 0,04$, Abbildung 22).

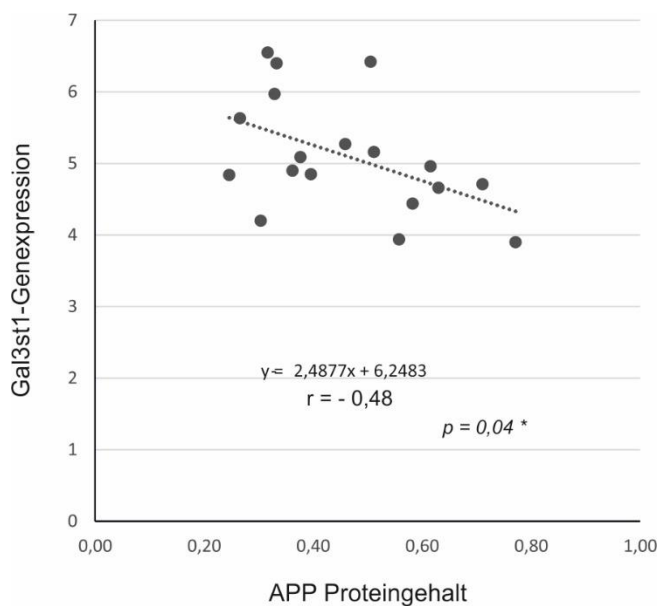


Abbildung 23: Korrelation der Gal3st1-Genexpression mit dem APP-Proteingehalt in humanem post-mortem Gehirngewebe. Die dargestellten Untersuchungen wurden in Kooperation mit Anna Lauer durchgeführt. Der APP-Proteingehalt wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt, die Messung der Gal3st1-Genexpression erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Pearson Korrelation.

Diese Ergebnisse bestätigen die *in vivo* Relevanz der beobachteten Veränderungen. AICD scheint nicht nur im Zellkulturmodell, sondern auch im Hippocampus von Mäusen, über eine Inhibition der Genexpression der CST, die Sulfatid-Synthese zu reduzieren. Im humanem post-mortem Gehirngewebe konnte zudem eine geringere CST-Expression mit einem höherem APP-Gehalt korreliert werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht und dieser ebenfalls auf den höheren AICD-Gehalt zurückzuführen ist.

4.3.8 Sulfatid-Synthese im murinen Alzheimer-Modell

In verschiedenen Zellkulturversuchen und im Hippocampus-Gewebe defizienter Mäuse wurde bisher gezeigt, dass das APP-Prozessierungsprodukt AICD sich direkt auf die Sulfatid-Synthese auswirken kann. Dies legt nahe, dass auch bei der Alzheimer-Erkrankung durch eine veränderte APP-Prozessierung die Sulfatid-Synthese beeinflusst werden könnte.

Als häufig verwendetes murines Modell der Alzheimer-Erkrankung wurde die Genexpression im Gehirn von 5 x FAD-Mäusen untersucht. Diese Mäuse besitzen in der Summe fünf verschiedene Mutationen, welche beim Menschen zu einer familiären Alzheimer-Erkrankung führen. Im Einzelnen sind dies die folgenden drei Mutationen von APP (K670N/M671L, I716V und V717I), sowie zwei Presenilin 1-Mutationen (M146L und L286V) (OAKLEY et al., 2006). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gal3st1-Genexpression im Vergleich zur Wildtyp-Maus (76,5 %, \pm 9,18 %, $p = 0,033$, Abbildung 24). Aufgrund der Mehrfach-Mutationen ist eine Zuordnung dieses Effektes nicht sicher möglich. Einigen Studien zufolge besitzt überwiegend das durch den β -Sekretase-Schnitt gebildete AICD aufgrund seiner Entstehung im endosomalen Kompartiment eine genregulatorische Wirkung (GRIMM et al., 2015a). Somit könnte die hohe β -Sekretase Affinität der APP K670N/M671L („Schwedische Mutation“), zu

einer gesteigerten Bildung von genregulatorisch wirksamem AICD führen, wodurch dann die Gal3st1-Genexpression reduziert werden könnte.

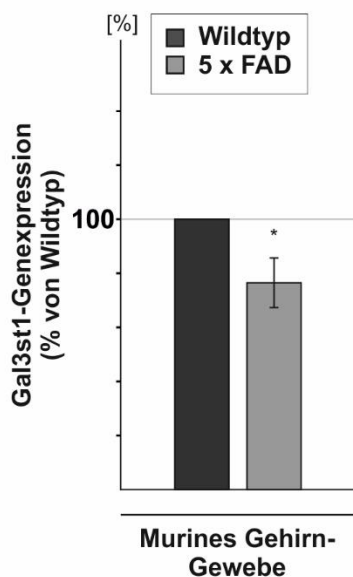


Abbildung 24: Analyse der Gal3st1-Genexpression im murinen Alzheimer-Modell. Die Analyse der Genexpression erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Verglichen wurde das Gehirngewebe von 5 x FAD-Mäusen mit dem Gehirngewebe von Wildtyp-Mäusen. Dargestellt wird die prozentuale Veränderung der mittels qRT-PCR bestimmten Genexpression der Gal3st1 im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$).

4.3.9 Sulfatid-Synthese und Sulfatid-Degradation bei der Alzheimer-Erkrankung

In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass sich im *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten eine signifikante Reduktion der Sulfatide beobachten lässt. Die Ursache hierfür wurde bisher nicht näher untersucht. Die folgenden Versuche zielten deshalb darauf ab zu überprüfen, ob eine verringerte Sulfatid-Synthese hierfür verantwortlich sein könnte. Zu diesem Zwecke wurde die Expression der beiden Enzyme in der Grauen Substanz des Temporal- und Frontallappens von humanem Hirngewebe untersucht. Dabei wurde eine Gruppe von Alzheimer-Erkrankten mit einer Kontrollgruppe von Patienten ohne Alzheimer-Erkrankung verglichen. In beiden Hirnregionen ließ sich eine signifikante Zunahme der Expression der beiden für die Sulfatid-Synthese verantwortlichen Enzyme nachweisen (Temporallappen: Gal3st1 386,3 %, $\pm 113,99$ %, $p = 0,015$; Ugt8a 244,7 %, $\pm 28,79$ %, $p < 0,001$ // Frontallappen: Gal3st1 215,5 %, $\pm 38,52$ %, $p = 0,004$; Ugt8a 223,4 %, $\pm 33,47$ %, $p < 0,001$, Abbildung 25). Zwischen den beiden Hirnregionen konnte kein signifikanter Unterschied der Expression beobachtet werden.

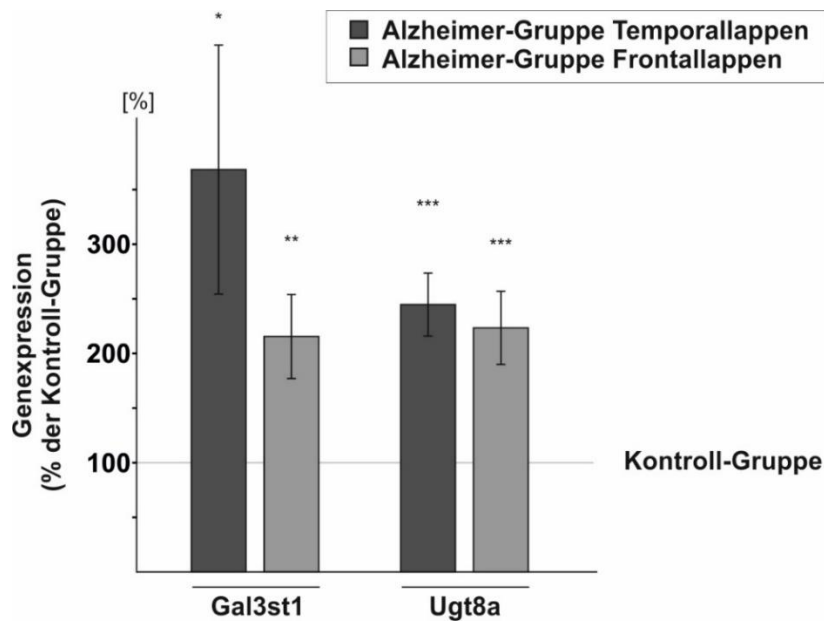


Abbildung 25: Veränderung der Gal3st1- und Ugt8a-Genexpression in *post mortem* Gehirn-Gewebe aus dem Temporal- und Frontallappen von Alzheimer-Patienten. Die Analyse der Genexpression erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen. Als Kontroll-Gruppe diente Gehirn-Gewebe von Patienten ohne Alzheimer-Erkrankung (n = 18). Die Genexpression wurde nach RNA-Isolation mittels qRT-PCR bestimmt, die Auswertung erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, zeigte sich in den beschriebenen Regionen eine Abnahme des Sulfatid-Gehaltes. Die gesteigerte Genexpression, die zu einer vermehrten Sulfatid-Synthese führen würde, scheint dem entgegen zu stehen, sodass diese am ehesten in Folge eines Gegenregulationsmechanismus erklärt werden kann.

Neben der Sulfatid-Synthese spielt für die Sulfatid-Homöostase auch die Sulfatid-Degradation eine entscheidende Rolle. Diese wird durch das lysosomale Enzym Arylsulfatase A (Genname: ARSA) eingeleitet. Eine verstärkte Degradation der Sulfatide könnte somit für den Verlust der zerebralen Sulfatide bei Alzheimer-Patienten mitverantwortlich sein. Um dies zu untersuchen erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Genexpression der ARSA in den genannten Proben aus Temporal- und Frontallappen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer entsprechenden Kontroll-Population. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression der ARSA in den genannten Hirnregionen im Vergleich zu den Kontrollen (Temporallappen: ARSA 189,2 %, $\pm 40,62$ %, $p = 0,035$; Frontallappen: ARSA 173,4 %, $\pm 24,35$ %, $p = 0,005$, Abbildung 26). Somit könnte eine gesteigerte Sulfatid-Degradation im Gehirn von Alzheimer-Patienten zum Verlust der Sulfatide beitragen.

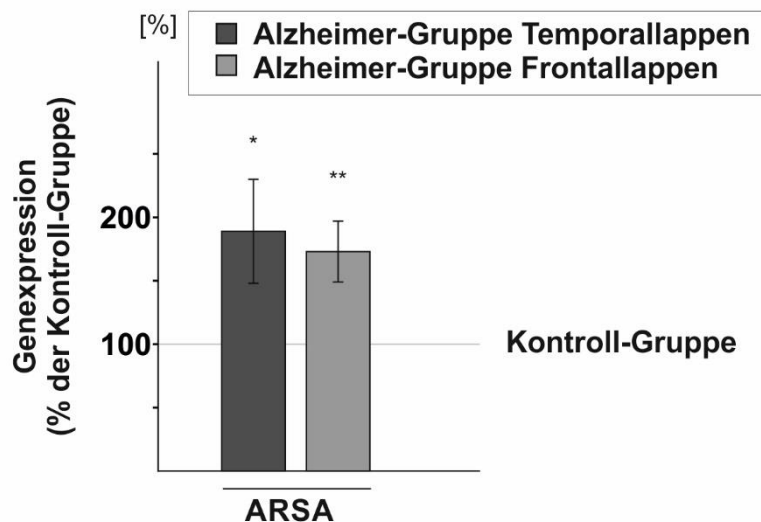


Abbildung 26: Analyse der Genexpression der ARSA bei Alzheimer-Patienten. Die Untersuchung erfolgte mittels RNA-Isolation und qRT-PCR in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen. Dargestellt wird die prozentuale Veränderung der Genexpression der ARSA im Temporal- bzw. Frontallappen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4 Der Einfluss der Sulfatide auf die APP-Prozessierung im Zellkultur-Modell

Im bisherigen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die APP-Prozessierung, durch die Bildung des transkriptionell aktiven AICDs, direkt die Sulfatid-Synthese beeinflussen kann. Umgekehrt könnten aber auch die Sulfatide sich auf die APP-Prozessierung auswirken.

In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass die Lipidzusammensetzung der Membranen in der Regulation der APP-Prozessierung eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Beeinflussung der Prozessierung des amyloiden Vorläuferproteins durch die Lipide kann sich dabei positiv oder negativ auf die Entstehung der verschiedenen A β -Spezies auswirken (GRIMM et al., 2008; GRIMM et al., 2011b).

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung zu einer signifikanten Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in der Grauen Substanz des Frontallappens der Betroffenen kommt. Ob der veränderte Sulfatid-Gehalt durch eine Beeinflussung der APP-Prozessierung Folgen für den Krankheitsverlauf haben könnte sollte daher Ziel der weiteren Untersuchungen sein.

4.4.1 Massenspektrometrische Analyse der Sulfatid-Inkooperation im Zellkultur-Modell

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde zunächst eine humane, immortalisierte Neuroblastoma Zelllinie, die SH-SY5Y Zellen, betrachtet. Um die Auswirkung eines erhöhten Sulfatid-Gehaltes auf die

APP-Prozessierung zu untersuchen wurden diese Zellen für 24 Std. wie in Abschnitt 3.2.1.3.1 beschrieben mit einem aus Schweine-Gehirn gewonnenem Sulfatid-Gemisch inkubiert. Als Kontrolle dienten mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelte Zellen.

Um eine Inkooperation der Sulfatide in die Zellen im Rahmen der Inkubation belegen zu können wurde anschließend eine massenspektrometrische Analyse des Sulfatid-Gehaltes der Zellhomogenate durchgeführt. Nach einer Inkubation über 24 Std. mit 20 μM Sulfatid-Gemisch zeigte sich der Sulfatid-Gehalt in den Homogenaten der inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ca. 25-fach erhöht (25,93-fach, $\pm 1,3$, $p < 0,001$, Abbildung 27).

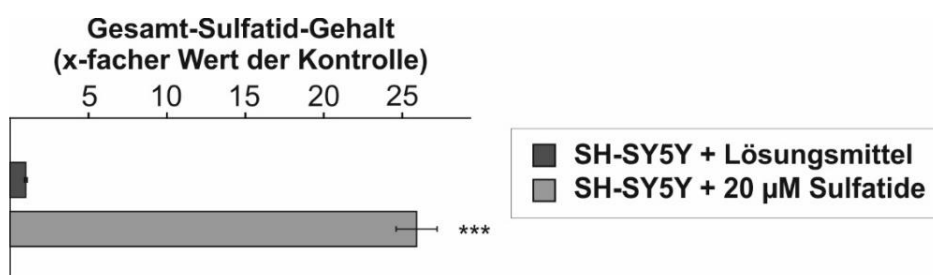


Abbildung 27: Gesamt-Sulfatid-Gehalt nach Inkubation mit 20 μM Sulfatid-Gemisch über 24 Std. auf SH-SY5Y-Zellen. Die massenspektrometrische Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Der Gesamt-Sulfatid-Gehalt beschreibt die Summe aller mittels Massenspektrometrie bestimmten Sulfatid-Spezies. Dargestellt wird die x-fache Steigerung im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's t -Tests bestimmt (***) $p < 0,001$.

4.4.2 Beeinflussung der Zytotoxizität und Sekretionsleistung der Zellen durch Sulfatide

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob in Folge der Sulfatid-Inkubation unspezifische Effekte, durch eine erhöhte Zytotoxizität oder veränderte Sekretionsleistung der Zellen, auftreten. Bei einer Zellviabilität von 98,2 % in den Kontrollzellen, verglichen mit einer Zellviabilität von 97,7 % in den mit 20 μM Sulfatid inkubierten Zellen konnte kein relevanter Einfluss auf die Zytotoxizität durch die verwendeten Sulfatide nachgewiesen werden (Abbildung 28a).

Um auszuschließen, dass Veränderungen der sezernierten APP-Prozessierungsprodukte auf eine unspezifische Beeinflussung der Sekretionsleistung der Zellen zurückzuführen sind, erfolgte ein Kontrollversuch mit Hilfe einer transienten Transfektion der SEAP. Hierbei handelt es sich um eine Fremd-Plasmid-DNS, sodass bei einer gleichmäßigen Transfektion, und Inaktivierung der endogenen SEAP, die im Medium gemessene Aktivität des Enzyms direkt proportional zu der allgemeinen Sekretionsleistung der Zellen ist. Nach Inkubation mit 20 μM Sulfatid-Gemisch zeigte sich im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen keine signifikante Änderung der im Medium gemessenen Aktivität (95,8 %, $\pm 1,71$ %, $p = 0,118$) (Abbildung 28b).

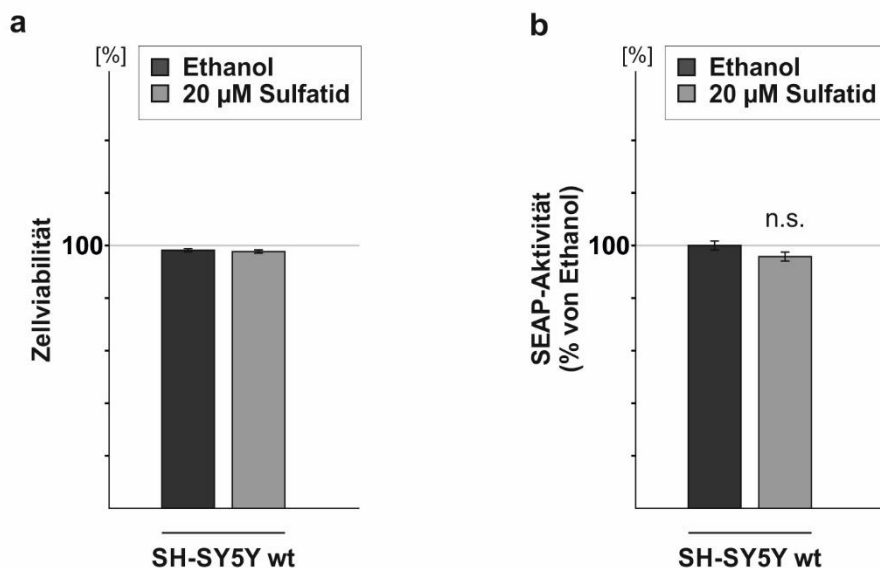


Abbildung 28: Bestimmung der Zellviabilität und SEAP-Sekretion nach Inkubation mit 20 µM Sulfatid-Gemisch. Die Inkubation erfolgte auf SH-SY5Y wt-Zellen über 24 Stunden. Die Kontrollzellen wurden mit der gleichen Menge des Lösungsmittels Ethanol behandelt. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen LDH-Versuchs-Kit. Die Zytotoxizität lag in beiden Fällen unter 3 %. Die SEAP-Transfektion und anschließende Bestimmung der Aktivität erfolgte ebenfalls mittels eines Kits nach Herstelleranweisung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung, die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$).

4.4.3 Veränderung des A β -Gehaltes im Zellkulturmedium nach Zugabe von Sulfatiden

Zur Bestimmung des A β -Gehaltes im Zellkulturmedium erfolgte eine Inkubation mit verschiedenen Sulfatid-Konzentrationen, um einen dosisabhängigen Effekt auf die A β -Spiegel beobachten zu können. Es wurden APP695-überexprimierende Zellen (SH-SY5Y APP) verwendet, um die APP-Prozessierungsprodukte, welche in der Wildtyp-Zelllinie nur in geringer Konzentration vorliegen, leichter detektieren zu können. In der Untersuchung des A β -Gehaltes aus dem Medium der SH-SY5Y APP-Zellen zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 5 µM Sulfatid-Gemisch eine signifikante Reduktion des A β (76,7 %, \pm 4,75 %, $p = 0,002$, Abbildung 29). Durch eine Erhöhung der Sulfatid-Konzentration auf 10 µM (59,7 %, \pm 8,2 %, $p = 0,025$) bzw. 20 µM (38,2 %, \pm 0,69 %, $p < 0,001$) konnte eine weitere Abnahme des sezernierten A β beobachtet werden. Der A β -Gehalt korrelierte dabei signifikant mit der zugegebenen Sulfatid-Menge ($Kor = 0,924$, $p < 0,001$), sodass eine dosisabhängige Wirkung des Sulfatid-Gehaltes auf die A β -Spiegel im Medium nachgewiesen werden konnte.

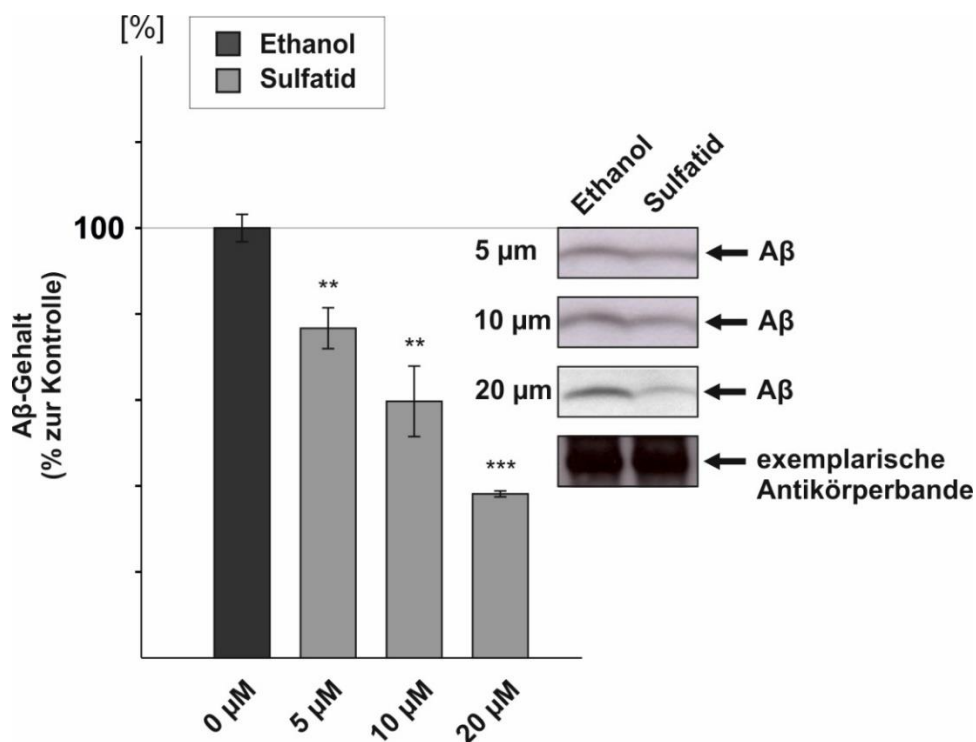


Abbildung 29: Aβ-Gehalt im Medium von SH-SY5Y APP-Zellen nach Inkubation mit Sulfatid-Gemisch. Der Aβ-Gehalt wurde mit Hilfe einer Immunpräzipitation unter Verwendung des W02-Antikörpers und anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Es erfolgten mindestens drei unabhängige Versuche. Die Antikörperbanden dienen als Kontrolle einer gleichmäßigen Probenverteilung. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests. Signifikanzniveau gegenüber der Kontrolle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Repräsentativer Ausschnitt des mit ECL-Methode entwickelten Films.

Neben dem Gesamt-Aβ-Gehalt spielt aufgrund der höheren Aggregationstendenz das vermehrte Auftreten der Aβ₄₂-Spezies in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle. Aβ₄₂ bildet nur etwa ein Zehntel des Gesamt-Aβ, sodass es auf den Gesamt-Aβ-Spiegel nur einen geringen Einfluss nimmt. Um dennoch die Veränderungen der Aβ₄₂-Spezies analysieren zu können wurden spezifische Aβ-Antikörper verwendet, die eine getrennte Detektion der Aβ₄₂-Spezies und der häufigsten Aβ-Form, Aβ₄₀, ermöglichten. Es zeigte sich nach einer Inkubation mit 20 μM Sulfatid-Gemisch sowohl für die Aβ₄₀-Spezies (42,4 %, ± 1,95 %, $p < 0,001$), als auch für die Aβ₄₂-Spezies (38,5 %, ± 3,35 %, $p < 0,001$) eine signifikante Reduktion (Abbildung 30). Die Abnahme der Aβ₄₂-Peptide war dabei etwas stärker, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Reduktion der Aβ₄₀-Peptide ($p = 0,369$).

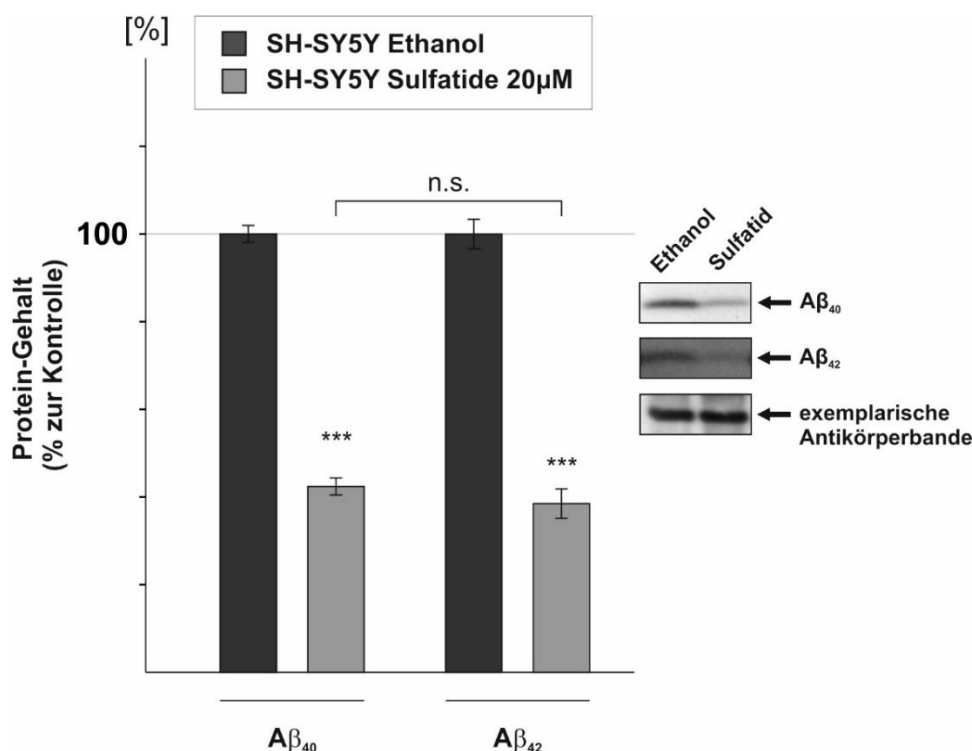


Abbildung 30: Prozentuale Reduktion des Aβ₄₀ und Aβ₄₂ nach Inkubation mit Sulfatiden. Die Bestimmung des Aβ₄₀- und Aβ₄₂-Gehaltes erfolgte in Kooperation mit Dr. Janine Mett. Der Gehalt von Aβ₄₀ und Aβ₄₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Inkubation erfolgte für 24 Std. Es erfolgten mindestens drei unabhängige Versuche. Im Bild rechts wird ein repräsentativer Ausschnitt des mit ECL-Methode entwickelten Films dargestellt. Die Antikörperbanden dienen als Kontrolle einer gleichmäßigen Probenverteilung. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (***) $p < 0,001$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch einen erhöhten Sulfatid-Gehalt in der Zellkultur eine signifikante, dosisabhängige Reduktion des Aβ-Gehaltes sowohl des Aβ₄₀ als auch des Aβ₄₂ im Medium erreicht werden kann. Aufgrund der größten Effektstärke, bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität, wurden die folgenden Versuche mit einer Sulfatid-Konzentration von 20 μM im Medium durchgeführt. In Folge der hohen Korrelation zwischen dem Aβ- und Sulfatid-Gehalt ist zu erwarten, dass vergleichbare Effekte auch bei geringeren Konzentrationen für die beobachteten Aβ-Veränderungen verantwortlich sind.

4.4.4 Einfluss der Sulfatide auf die Degradation von Aβ

Neben einer reduzierten Aβ-Synthese könnte eine gesteigerte Degradation von Aβ für die Reduktion der Aβ-Spiegel im Medium der Zellen verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen wurden N2a-Zellen mit synthetischen Aβ-Peptiden inkubiert und nach 6 Std. die noch vorhandene Aβ-Menge bestimmt. Diese ist entsprechend umgekehrt proportional zur Gesamtdegradation von Aβ in den Zellen. Nach Inkubation mit dem Sulfatid-Gemisch zeigte sich keine signifikante Veränderung der Aβ-Degradation in den Zellen (101,2 %, ± 2,44 %, $p = 0,740$, Abbildung 31a). Zusätzlich wurde, um Zelltyp-spezifische Effekte auszuschließen, die Aktivität von NEP, einem der wichtigsten Aβ-degradierenden Enzyme, aus SH-SY5Y-

Zellen nach Inkubation mit Sulfatiden gemessen. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der NEP-Aktivität nach Inkubation mit Sulfatiden (97,5 %, \pm 1,49 %, $p = 0,267$, Abbildung 31b).

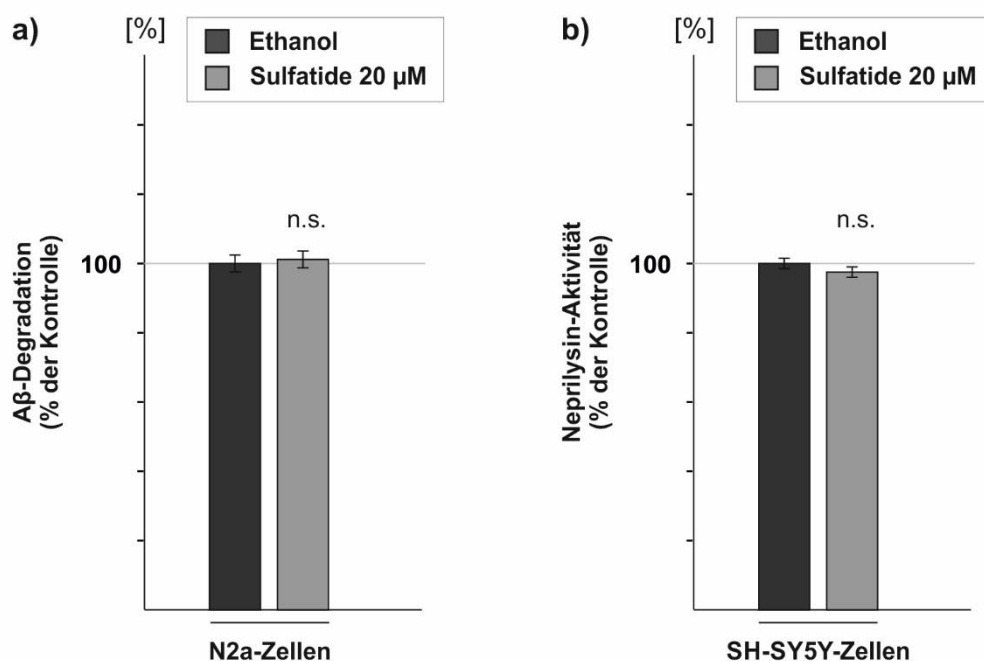


Abbildung 31: Aβ-Degradation nach Inkubation mit Sulfatiden 20 µM. Die Bestimmung der Aβ-Degradation und NEP-Aktivität erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Janine Mett. Abbildung a) zeigt die Aβ-Gesamtdegradation auf N2a Zellen. Diese murine Neuroblastom-Zelllinie produziert kein humanes Aβ, sodass die im Medium mit Hilfe des W02-Antikörpers detektierte Aβ-Menge dem nicht-degradierten, synthetischem Aβ entspricht. Die verbliebene Aβ-Menge, welche mittels Western Blot unter Verwendung des W02-Antikörpers detektiert wurde, war somit umgekehrt proportional zur Aβ-Degradation. Abbildung b) zeigt die Aktivität von NEP in SH-SY5Y-Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$).

Dieses Ergebnis zeigt, dass unter den hier verwendeten Bedingungen Sulfatide die Aβ-Degradation nicht relevant beeinflussen. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob eine verringerte Synthese von Aβ für den reduzierten Aβ-Gehalt im Medium verantwortlich ist.

4.4.5 Einfluss der Sulfatide auf die Prozessierungsprodukte sAPPα und sAPPβ

Wie in der Einleitung unter Abschnitt 2.3 beschrieben erfolgt die Aβ-Synthese im Rahmen der APP-Proteolyse nur auf dem Weg der amyloidogenen Prozessierung. Durch den Nachweis der beiden sekretorischen APP-Produkte, sAPPα und sAPPβ, sollte untersucht werden, in wie weit das Gleichgewicht zwischen dem ersten Schritt der amyloidogenen- und nicht-amyloidogenen Prozessierung verschoben sein könnte. Abbildung 32 zeigt, dass nach der Inkubation mit Sulfatiden keine Veränderung der sAPPα-Spiegel im Medium beobachtet wurde, während sich der sAPPβ-Gehalt im Medium signifikant um ca. 30 % verringerte (sAPPα: 102,9 %, \pm 3,03 %, $p = 0,507$; sAPPβ: 71,0 %, \pm 3,58 %, $p < 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es infolge der Sulfatid-Inkubation, bei konstanter nicht-amyloidogener Prozessierung, zu einer Reduktion der amyloidogenen Prozessierung von APP kommt.

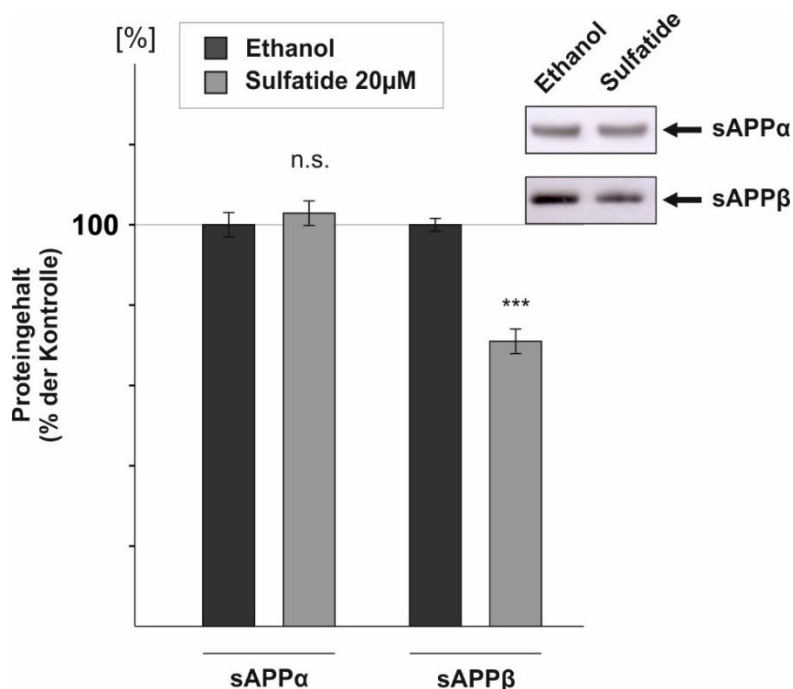


Abbildung 32: sAPPα- und sAPPβ-Proteinkonzentration nach Inkubation mit Sulfatiden. Dargestellt ist der Gehalt der sekretorischen APP-Prozessierungsprodukte sAPPα und sAPPβ im Medium von SH-SY5Y Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Sulfatiden bzw. Lösungsmittel-Kontrolle. Die Konzentration wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt, die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Im Bild rechts wird ein repräsentativer Ausschnitt des mit ECL-Methode entwickelten Films dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.4.6 Einfluss der Sulfatide auf die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP

In der vorangegangenen Untersuchung zeigte sich keine Veränderung des sAPPα nach Inkubation mit Sulfatiden. Dies deutet daraufhin, dass die α-Sekretase-Aktivität nicht durch Sulfatide beeinflusst wird. Um diese Frage zu beantworten erfolgte daher zunächst eine *in vitro* Inkubation mit Sulfatiden auf PNFs. Hier zeigte sich nach Zugabe von Sulfatiden eine geringe, jedoch nicht signifikante Reduktion der Aktivität der α-Sekretase (90,74 %, ± 5,31 %, $p = 0,153$, Abbildung 33a). Dieser Versuchsaufbau untersucht jedoch nur die direkte Beeinflussung der Enzymaktivität. Um mögliche Veränderungen der Enzymaktivität durch Expressions- oder Proteinstabilitäts-Effekte zu analysieren, wurden zusätzlich die Proteinlevel von ADAM 10 und ADAM 17 bestimmt. Diese beiden Enzyme sind überwiegend für die α-Sekretase-Aktivität verantwortlich. Sowohl die ADAM 10-Proteinlevel (98,06 %, ± 3,04 %, $p = 0,622$), als auch die ADAM 17-Proteinlevel (97,06 %, ± 7,57 %, $p = 0,790$), zeigten sich nach Inkubation von Sulfatiden in der Zellkultur nicht verändert (Abbildung 33b).

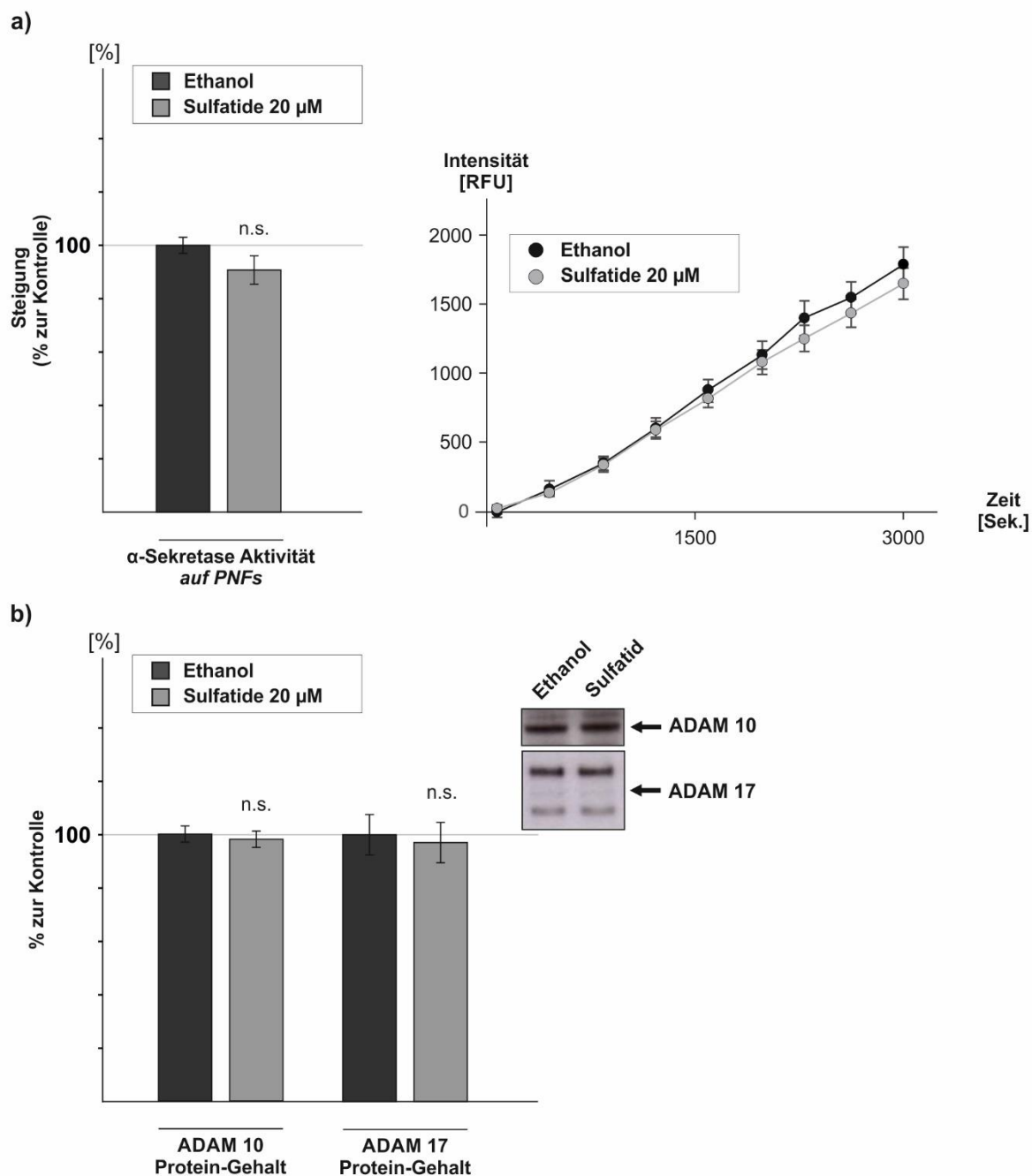


Abbildung 33: Einfluss von Sulfatiden auf die α -Sekretase-Aktivität und Proteinlevel der α -Sekretase. Abbildung a) zeigt die Beeinflussung der α -Sekretase-Aktivität nach *in vitro* Inkubation von Sulfatiden auf PNFs, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Sulfatiden-behandelten PNFs und den Kontrollen ergab. Die dargestellte Kinetik entspricht dem Mittelwert, die Fehlerbalken der mittleren Standardabweichung der einzelnen Messpunkte. Abbildung b) stellt den Proteingehalt von ADAM 10 und ADAM 17 nach Inkubation von Sulfatiden in der Zellkultur über 24 Std. dar. Die Untersuchung erfolgte mittels Western Blot Analyse, β -Aktin diente als Ladekontrolle und zeigte keine signifikanten Schwankungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$).

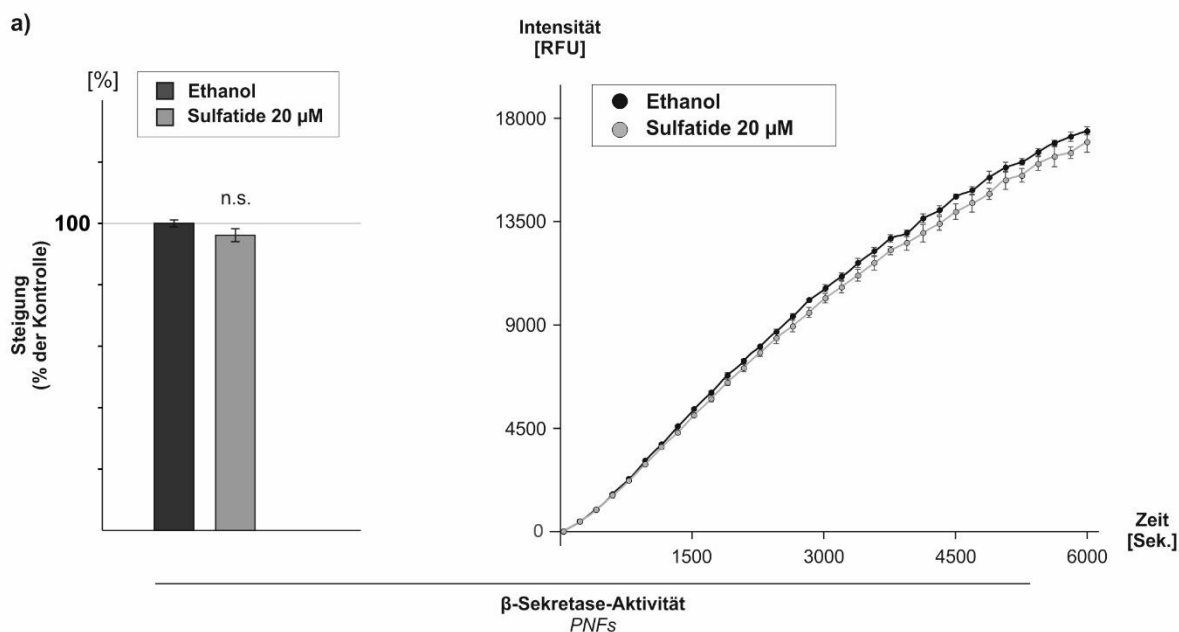
Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die beobachtete A β -Reduktion nicht Folge einer verstärkten nicht-amyloidogenen Prozessierung ist. Die weiteren Untersuchungen hatten daher zum Ziel die amyloidogene Prozessierung genauer zu analysieren. Hierbei wurde aufgrund der Reduktion von sAPP β zunächst das Augenmerk auf die β -Sekretase gelegt.

4.4.7 Einfluss der Sulfatide auf die amyloidogene Prozessierung

4.4.7.1 Veränderung der β -Sekretase durch Sulfatide

4.4.7.1.1 Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität durch Sulfatide

In den folgenden Versuchen wurde mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Enzymassays die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y wt-Zellen bestimmt. Dabei könnten Sulfatide sowohl direkten Einfluss auf das Enzym besitzen, oder aber sich durch Veränderungen der Transkription, der Proteininstabilität oder der zellulären Lokalisation auf die Aktivität auswirken. Um diese beiden Möglichkeiten getrennt voneinander zu betrachten wurden die Sulfatide zunächst auf PNFs inkubiert, sodass nur die direkte Beeinflussung der Enzymaktivität gemessen werden konnte, bevor anschließend die Messung in lebenden Zellen erfolgte. Während sich nach Inkubation auf den PNFs nur eine leichte, nicht signifikante Reduktion der β -Sekretase-Aktivität nachweisen ließ (96,2 %, \pm 2,09 %, $p = 0,170$, Abbildung 34a), war in den lebenden Zellen die Aktivität nach der Inkubation mit Sulfatiden um 34 % verringert (66,3 %, \pm 7,7 %, $p < 0,001$, Abbildung 34b).



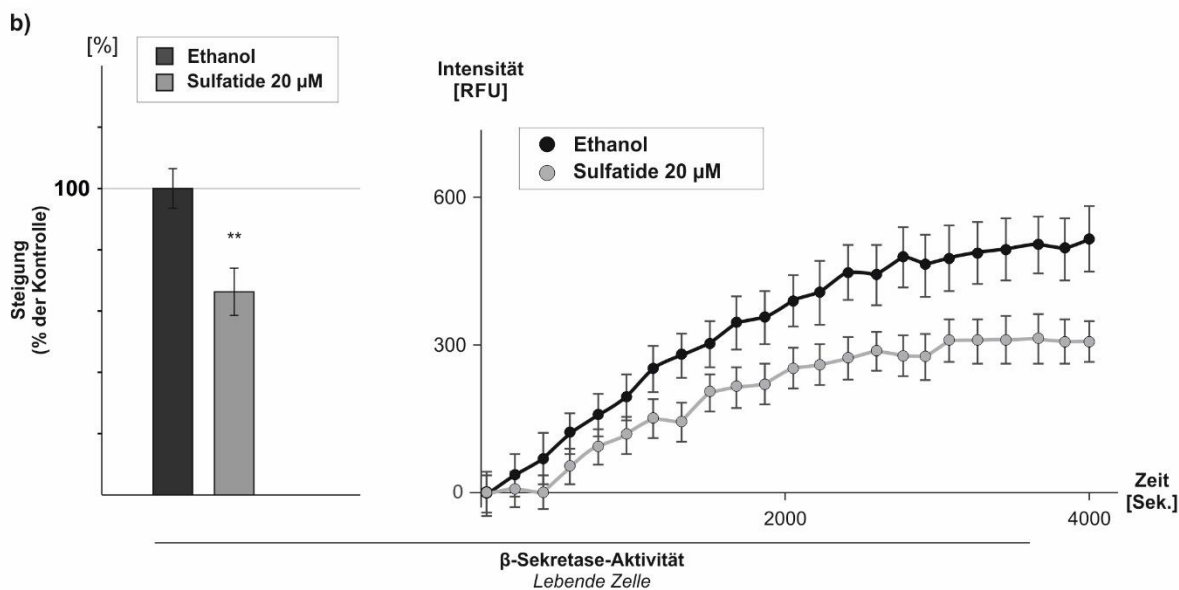


Abbildung 34: β-Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Sulfatiden auf PNFs bzw. in lebenden Zellen. Abbildung a) stellt die Veränderung der Enzymkinetik der β-Sekretase nach Zugabe von Sulfatiden auf PNFs im Vergleich zur Kontrolle dar. Abbildung b) zeigt die Enzymaktivität der β-Sekretase nach Inkubation von lebenden Zellen mit Sulfatiden. Links dargestellt ist jeweils die Steigung in Prozent der Kontrolle, rechts wird der Mittelwert der unterschiedlichen Enzymkinetiken dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung bzw. der mittleren Standardabweichung der einzelnen Messpunkte. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$, ** $p < 0,01$).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die β-Sekretase-Aktivität nicht direkt durch die Sulfatide beeinflusst wird. Stattdessen kann vermutet werden, dass eine Beeinflussung des Stoffwechsels des Enzyms oder seiner intrazellulären Verteilung ursächlich für die beobachteten Effekte ist.

4.4.7.1.2 Einfluss der Sulfatide auf den Metabolismus der β-Sekretase

Die voranstehenden Untersuchungen zeigten, dass Sulfatide die β-Sekretase-Aktivität nicht durch eine direkte Interaktion beeinflussen. Veränderungen des Metabolismus der β-Sekretase BACE1 könnten jedoch für die beobachteten Effekte in lebenden Zellen verantwortlich sein. Dies sollte in den folgenden Versuchen analysiert werden.

Wie in Abbildung 35 dargestellt zeigte sich der Proteingehalt von BACE1 nach Inkubation mit Sulfatiden auf 79,2 % ($\pm 2,81$ %, $p < 0,001$) verringert. Mittels qRT-PCR wurde im nächsten Schritt überprüft, ob eine Reduktion der Genexpression von BACE1 ursächlich hierfür sein könnte. Es zeigte sich eine nicht signifikante, 22%ige Steigerung der Expression von BACE1 nach Inkubation mit Sulfatiden (122,6 %, $\pm 16,74$ %, $p = 0,194$, Abbildung 35). In Zusammenhang mit dem gleichzeitig reduzierten BACE1-Proteinlevel deutet dies am ehesten auf einen Gegenregulationsmechanismus hin.

Neben einer verringerten Synthese des Enzyms könnte auch eine vermehrte Proteindegradation den BACE1-Gehalt in der Zelle vermindern. Um dies zu untersuchen wurden die Zellen für 24 Std. mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Dies bewirkt, dass ausschließlich bereits vor der Inkubation mit Sulfatiden synthetisiertes BACE1 in der anschließenden Messung des Proteingehaltes detektiert wird. Interessanterweise konnte trotz der Translationsinhibition eine Reduktion des BACE1-Proteingehaltes auf 76,8 % ($\pm 1,59$ %, $p < 0,001$, Abbildung 35) beobachtet werden. Diese Verminderung unterschied sich nicht signifikant von der ohne CHX gemessenen Abnahme von BACE1 ($p = 0,788$), sodass der Effekt auf die BACE1-Proteinspiegel am ehesten durch eine verstärkte Degradation des Enzyms verursacht wird. Die Degradation von BACE1 erfolgt überwiegend im lysosomalen Kompartiment (KOH et al., 2005). Durch eine Inhibition der Lysosomen müsste daher die verstärkte Degradation von BACE1 verhindert werden und die BACE1-Proteinlevel dürften nach Inkubation mit Sulfatiden nicht mehr verändert sein. Tatsächlich ließ sich nach Zugabe des Lysosomeninhibitors Chlo-roquin keine signifikante Reduktion von BACE1 in Folge der Sulfatid-Inkubation mehr nachweisen (95,2 % , $\pm 1,8$ % , $p = 0,095$, Abbildung 35).

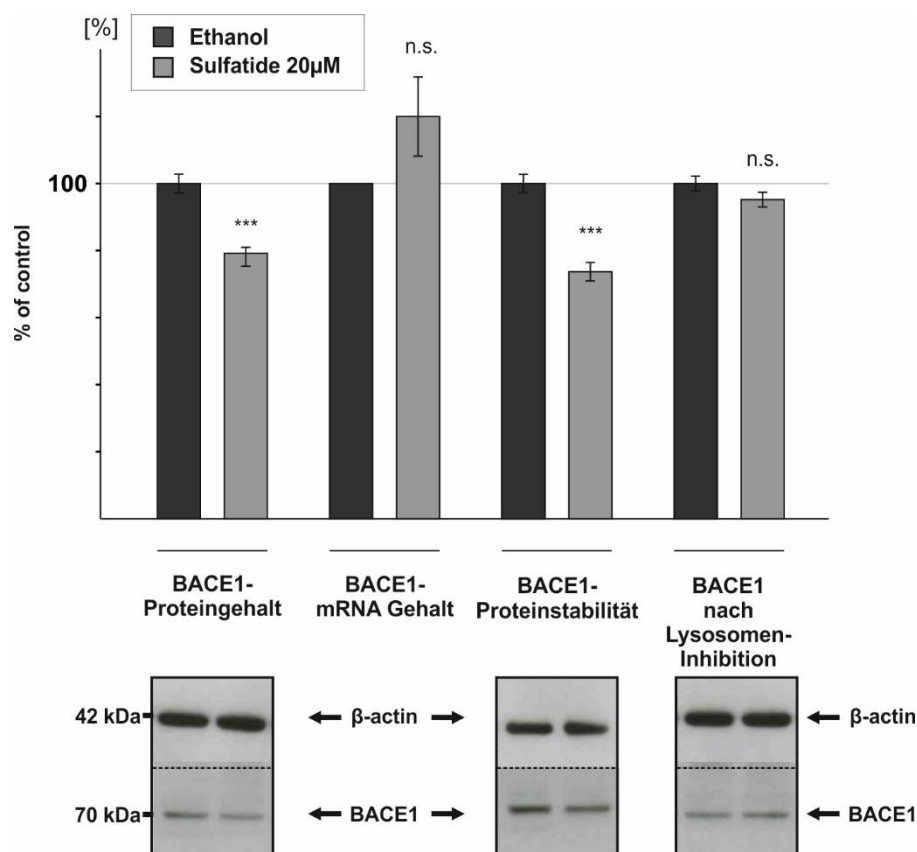


Abbildung 35: Veränderung des BACE1-Proteingehaltes nach Inkubation mit Sulfatiden in Folge einer vermehrten lysosomalen Proteindegradation. Die Untersuchung des BACE1-Proteingehaltes nach Inhibition der Lysosomen erfolgte in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal, die Bestimmung der Genexpression von BACE1 erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen. Die Analyse des BACE1-Proteingehaltes erfolgte mittels Western Blot nach Inkubation mit 20 µM Sulfatiden bzw. dem Lösungsmittel Ethanol. β-Aktin diente als Ladekontrolle und zeigte keine signifikanten Schwankungen. Die Messung der Genexpression wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Zur Beurteilung der Proteinstabilität wurden die Zellen mit dem Translationsinhibitor CHX für 24 Std. behandelt und anschließend ebenfalls

der Proteingehalt mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Die Inhibition der Lysosomen erfolgte ebenfalls über 24 Std. unter Verwendung von Chloroquin. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests bestimmt (***p* < 0,001, n. s. *p* > 0,05).

4.4.7.1.3 Einfluss der Sulfatide auf die subzelluläre Lokalisation von BACE1

Im vorangehenden Abschnitt konnte nachgewiesen werden, dass durch die Inkubation mit Sulfatiden die β -Sekretase-Aktivität signifikant reduziert werden kann. Hierfür verantwortlich zeigte sich u. a. eine vermehrte lysosomale BACE1-Degradation, die zu einer Abnahme des Gesamtproteingehaltes des Enzyms in der Zelle führte. Die beobachteten Effekte auf die Aktivität des Enzyms waren dabei tendenziell stärker als die gemessene Änderung des Proteingehaltes von BACE1 (66,3 % vs. 78,2 %, *p* = 0,071), sodass von einem zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität ausgegangen werden musste. Die Aktivität der β -Sekretase hängt stark von ihrer subzellulären Lokalisation ab, wobei sie, aufgrund des sauren Milieus, ihre größte Aktivität im frühen-endosomalen Kompartiment besitzt. Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher die Aktivität des Enzyms in diesem Kompartiment der Zelle zu analysieren. Mit Hilfe von Dichtegradienten erfolgte zunächst die Isolation der Endosomen. Die anschließende Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität ergab eine signifikante Reduktion auf 60,1 % (\pm 6,56 %, *p* = 0,014, Abbildung 36) nach der Inkubation mit Sulfatiden. Die Messung des Proteingehaltes von BACE1 innerhalb der Endosomen ergab eine vergleichbare Verringerung auf 55,0 % (\pm 4,92 %, *p* = 0,003, Abbildung 36). Proteingehalt und Aktivität unterschieden sich dabei nicht signifikant (*p* = 0,814). Neben der Verteilung von BACE1 spielt auch die Kolo-kalisation mit dem Substrat APP innerhalb der Endosomen für die Entstehung von A β eine wichtige Rolle. Die Bestimmung des APP-Gehaltes im endosomalen Kompartiment zeigte nach Inkubation mit Sulfatiden keine signifikante Veränderung (95 %, \pm 4,47 %, *p* = 0,47, Abbildung 36).

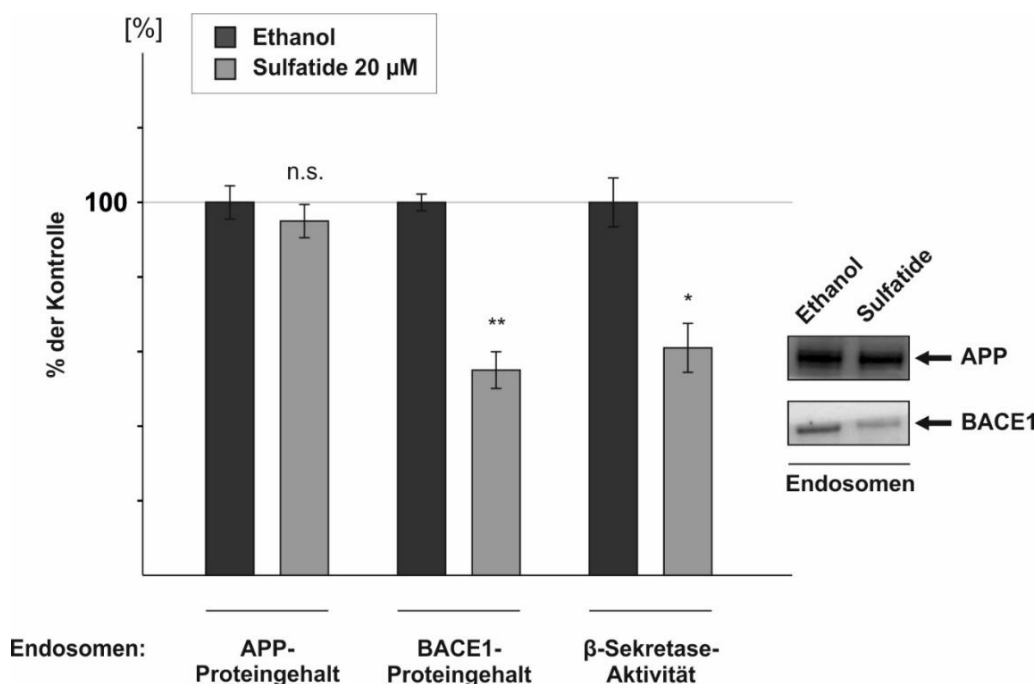


Abbildung 36: Reduzierte β -Sekretase-Aktivität und BACE1-Proteingehalt im endosomalen Kompartiment. Die gezeigten Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Tatjana Rothhaar durchgeführt. Nach Präparation der Endosomen und Bestimmung der EEA1-positiven Fraktionen erfolgte die Aktivitätsmessung aus den vereinigten Fraktionen mittels fluoreszenzbasiertem Enzymassay. Der Proteingehalt von APP bzw. BACE1 wurde mittels Western Blot analysiert. Dargestellt werden repräsentative Ausschnitte nach Entwicklung mittels ECL-Methode. Im Balkendiagramm werden die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle angegeben, die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Statistische Analyse mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (n. s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Vergleicht man den BACE1-Proteingehalt im endosomalen Kompartiment mit dem BACE1-Proteingehalt im Lysat der Zellen zeigt sich eine signifikant stärkere Reduktion von BACE1 in den Endosomen (55,04 % vs. 78,16 %, $p = 0.004$), was darauf hindeutet, dass eine zusätzliche Verschiebung von BACE1 innerhalb der Zelle stattfinden könnte. Um dies weiter zu untersuchen erfolgte die Bestimmung des an der Zelloberfläche lokalisierten BACE1. Nach Biotinylierung der Proteine an der Zelloberfläche und anschließender Präzipitation zeigte sich eine Reduktion von BACE1 an der Plasmamembran (85,54 %, ± 3.31 %, Abbildung 37). Diese fiel jedoch geringer aus als die Reduktion im Lysat und unterschied sich signifikant von dem endosomal lokalisierten BACE1 ($p = 0.006$).

Neben einer vermehrten Degradation von BACE1 scheint somit auch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von BACE1 eine wichtige Rolle für deren Aktivitätsabnahme in Folge der Sulfatid-Inkubation zu spielen. Dabei entsteht eine Verschiebung von BACE1 aus dem endosomalen Kompartiment hinaus in Richtung der Plasmamembran, wo die β -Sekretase aufgrund des höheren pH-Wertes eine geringere Aktivität aufweist.

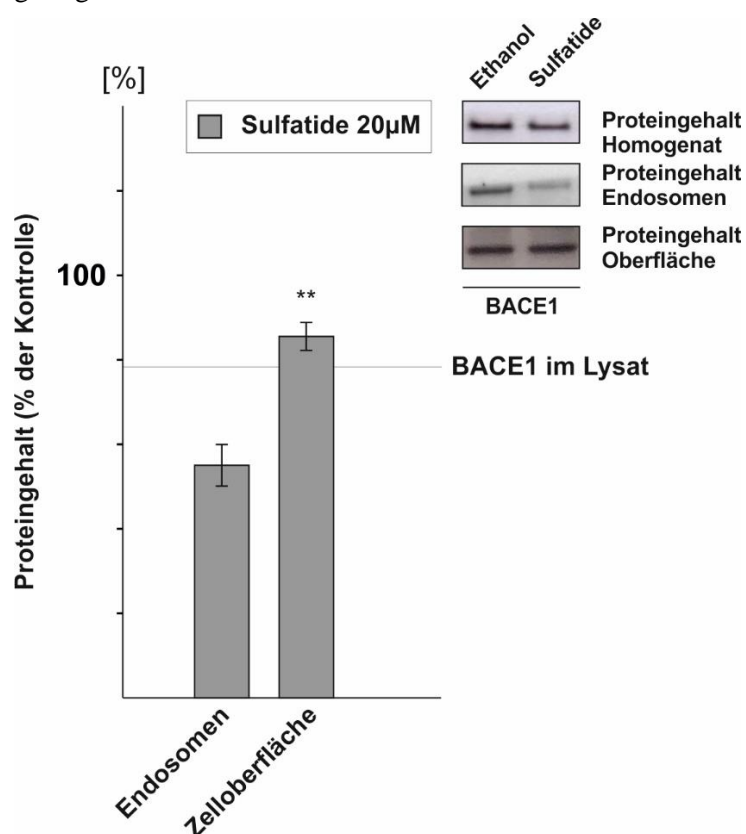


Abbildung 37: Verschiebung von BACE1 aus dem endosomalen Kompartiment in Richtung der Plasmamembran nach Inkubation mit Sulfatiden. Nach Biotinylierung und anschließender Präzipitation der Zelloberflächenproteine erfolgte die Bestimmung von BACE1 mittels Western Blot Methode. Dargestellt wird die prozentuale Veränderung im Vergleich zur Kontrolle, wobei die horizontale Linie dem BACE1-Gehalt im Lysat entspricht. Rechts dargestellt werden repräsentative Ausschnitte der mittels ECL-Methode entwickelten Filme. Die Darstellung von BACE1 aus Homogenat und Endosomen wurde zum besseren Verständnis aus den vorherigen Abbildungen übernommen. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten, zweiseitigen Student's *t*-Tests (** $p < 0,01$).

4.4.7.2 Veränderung der γ -Sekretase durch Sulfatide

In Abschnitt 4.4.3 wurde gezeigt, dass die Inkubation mit 20 μ M Sulfatid zu einer über 60%igen Reduktion der A β -Spiegel im Medium führte. Die bisherigen Ergebnisse konnten nachweisen, dass die amyloidogene Prozessierung über die β -Sekretase um ca. 40 % verringert wird. Diese Diskrepanz weist darauf hin, dass ein weiterer Mechanismus, beispielsweise über die Beeinflussung der γ -Sekretase, eine Rolle für die A β -Reduktion spielen könnte.

Nach Inkubation mit Sulfatiden konnte, trotz der reduzierten β -Sekretase-Aktivität, eine signifikante Zunahme von β -CTF beobachtet werden (132,7 %, \pm 6,79 %, $p < 0,001$, Abbildung 38). β -CTF ist nicht nur Produkt der β -Sekretase, sondern auch Edukt der γ -Sekretase, sodass eine verringerte γ -Sekretase-Aktivität zu einer Akkumulation von β -CTF in der Zelle führt. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Steigerung des β -CTF auf eine veränderte γ -Sekretase-Aktivität zurückgeführt werden kann, wurden die Zellen zusätzlich mit γ -Sekretase-Inhibitor inkubiert. Hier zeigte sich, passend zu der zuvor beschriebenen Abnahme der β -Sekretase-Aktivität, eine Reduktion des β -CTF auf 89,8 % (\pm 1,59 %, $p = 0,004$, Abbildung 38). Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise darauf, dass eine geänderte γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Sulfatiden zu den verringerten A β -Spiegeln in der Zelle beitragen könnte.

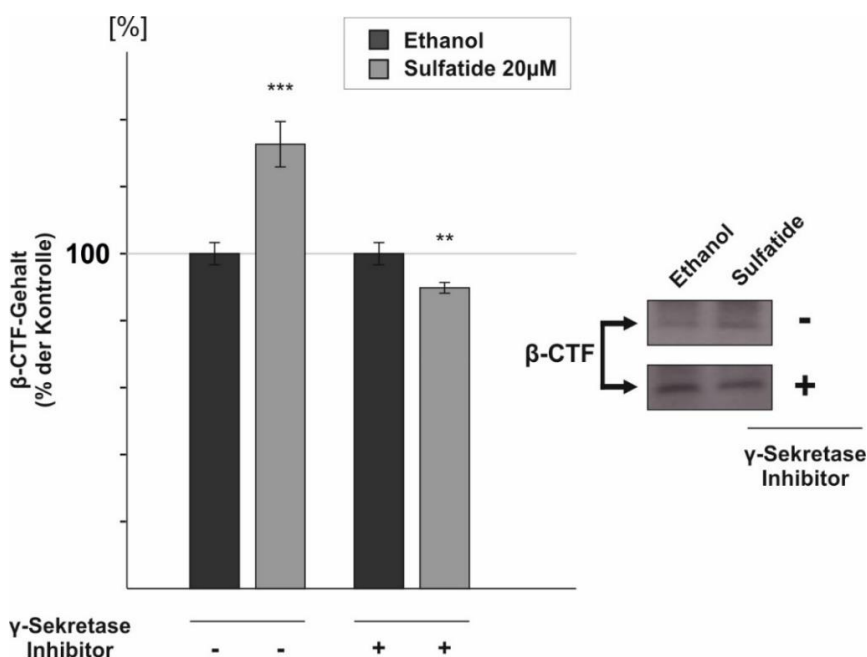
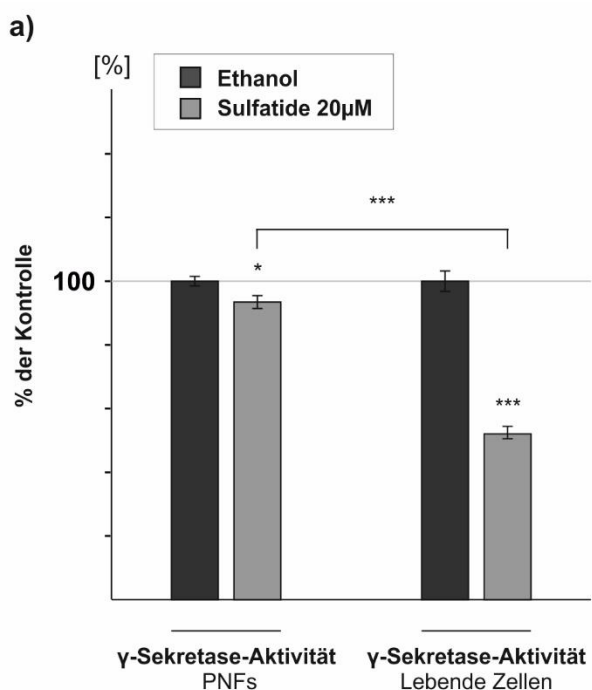


Abbildung 38: Veränderung des β -CTF-Proteingehaltes durch Inkubation mit Sulfatiden. Dargestellt ist die prozentuale Änderung des β -CTF-Spiegels im Zelllysate von SH-SY5Y APP-Zellen nach Zugabe von Sulfatiden im Vergleich zur Kontrolle. Um die Auswirkungen der γ -Sekretase auf den β -CTF-Gehalt zu beurteilen wurden die Zellen einmal mit und einmal ohne Zugabe des γ -Sekretase-Inhibitors X untersucht. Die Analyse des β -CTF erfolgte mittels Western Blot, rechts dargestellt sind repräsentative Ausschnitte nach Entwicklung mittels ECL-Methode. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$). Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

4.4.7.2.1 Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität durch Sulfatide

Ähnlich der erfolgten Untersuchungen zur β -Sekretase-Aktivität sollte auch für die γ -Sekretase mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Versuchs die Aktivität dieses Enzyms gemessen werden. Dabei wurde wieder zwischen direkten und indirekten Effekten auf die Aktivität unterschieden, sodass zunächst eine Inkubation von Sulfatiden auf PNFs erfolgte. Wie Abbildung 39 zeigt, kam es nach Inkubation der PNFs zu einer geringen, aber signifikanten, Abnahme der γ -Sekretase Aktivität (93,4 %, $\pm 2,05$ %, $p = 0,022$). Dieser Effekt konnte auch nach Inkubation von lebenden Zellen mit Sulfatiden nachgewiesen werden, war dort jedoch deutlich stärker ausgeprägt (53,9 %, $\pm 3,24$ %, $p < 0,001$, Abbildung 39). Die Reduktion der Aktivität in lebenden Zellen unterschied sich dabei signifikant von der beobachteten Aktivitätsminderung nach *in vitro* Inkubation auf PNFs ($p < 0,001$). Diese Resultate weisen darauf hin, dass sowohl eine direkte, als auch indirekte Beeinflussung der γ -Sekretase durch die Sulfatide vorliegt.



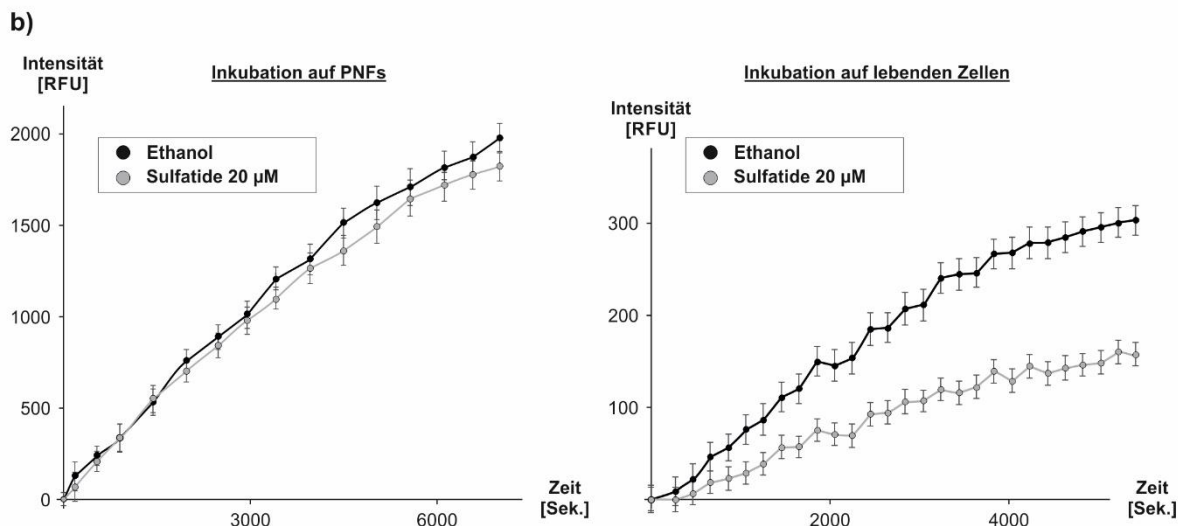


Abbildung 39: Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität durch Inkubation mit Sulfatiden. Abbildung a) zeigt die prozentuale Veränderung der Aktivität nach Sulfatid-Inkubation im Verhältnis zu den mit Ethanol inkubierten PNFs. Die Inkubation erfolgte für die Versuche für 15 Min. bei 37 °C. Für die Aktivitätsmessung in lebenden Zellen wurde die Inkubation für 24 Std. vor der im Anschluss begonnenen fluorometrischen Messung durchgeführt. Abbildung b) zeigt den Mittelwert der Enzymkinetiken für den jeweiligen Versuchsaufbau. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung bzw. der mittleren Standardabweichung der einzelnen Messpunkte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.4.7.2.2 Einfluss von Sulfatiden auf den Proteingehalt von Nicastrin und Presenilin 1

Die vorangehenden Ergebnisse legen nahe, dass Sulfatide neben ihrer direkten Wirkung, die γ -Sekretase beispielsweise über eine Veränderung des Proteingehaltes der Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes beeinflussen könnten. Nicastrin ist ein essentieller Bestandteil der γ -Sekretase und kann im Gegensatz zu Presenilin oder den Aph-Proteinen nicht durch ein anderes Protein der gleichen Familie ersetzt werden. Presenilin 1 oder Presenilin 2 bilden die katalytische Einheit des Enzymkomplexes, sodass ihnen ebenso eine wichtige Bedeutung zukommt. Wie in Abbildung 40 dargestellt zeigte sich jedoch nach Inkubation mit Sulfatiden keine Veränderung des Proteingehaltes von Presenilin 1 (105,12 %, $\pm 4,83$ %, $p = 0,48$) oder Nicastrin (100,9 %, $\pm 5,77$ %, $p = 0,919$). Zu den anderen Bestandteilen des γ -Sekretase-Komplexes kann keine sichere Aussage getroffen werden.

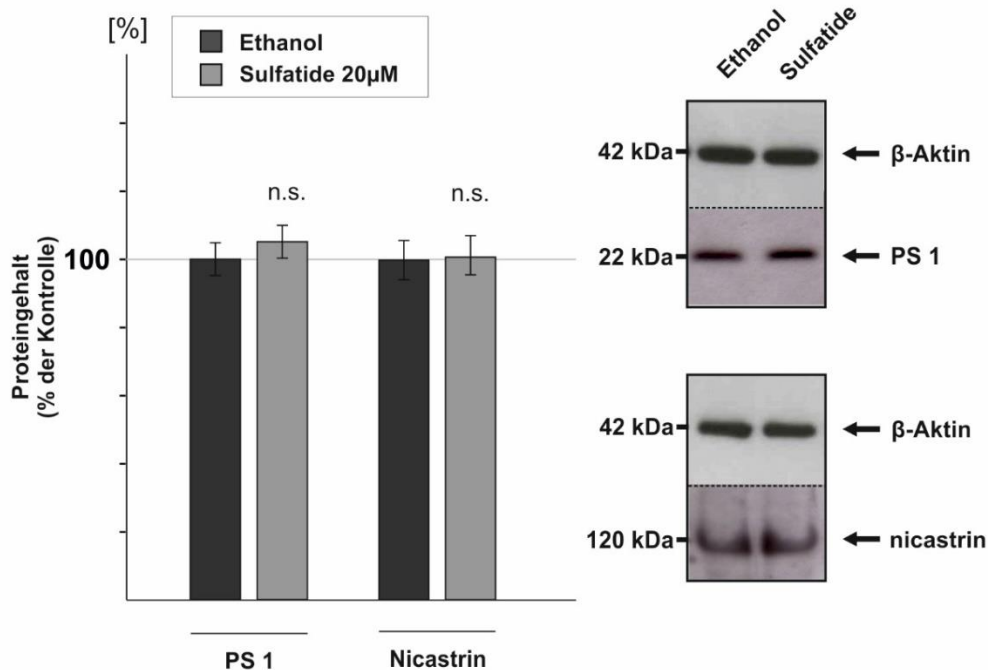


Abbildung 40: Auswirkung der Sulfatid-Inkubation auf den Proteingehalt der Komponenten der γ -Sekretase. Die Bestimmung des Nicastrin Proteingehaltes erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Janine Mett. Mittels Wester Blot-Analyse erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Nicastrin und Presenilin 1. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Rechts dargestellt sind repräsentative Ausschnitte nach Entwicklung mittels ECL-Methode. Signifikanzen wurden mit Hilfe eines zweiseitigen Student's *t*-Tests berechnet (n. s. $p > 0,05$). Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

4.4.7.2.3 Veränderung der Lipid Raft-Mikrodomänen durch Inkubation mit Sulfatiden

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der direkten Beeinflussung der γ -Sekretase durch Inkubation mit Sulfatiden auf PNFs und der deutlich stärkeren Auswirkung auf die Enzymaktivität nach Inkubation von lebenden Zellen. Veränderungen des Proteingehaltes der Komponenten der γ -Sekretase schienen dabei nicht ursächlich für diesen Effekt zu sein. Neben den oben genannten Veränderungen im Proteingehalt spielt bei der γ -Sekretase aufgrund ihrer vielen verschiedenen Substrate die intrazelluläre Verteilung eine wichtige Rolle für ihre Aktivität. In mehreren Studien wurde diskutiert, dass die Prozessierung von β -CTF und die Entstehung von A β insbesondere in den Lipid Raft-Domänen der Membranen stattfindet, während α -CTF vorzugsweise in den Non-Raft-Domänen geschnitten wird (HUR et al., 2008). Interessanterweise scheinen Sulfatide, sowie andere Sphingolipide und Cholesterin, sich insbesondere in den Lipid Raft Domänen anzureichern (MOYANO et al., 2014).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Verteilung der γ -Sekretase in den Lipid Raft-Domänen durch die Inkubation mit Sulfatiden beeinflusst werden könnte. Mit Hilfe eines Saccharose-Dichtegradienten wurden die Lipid Raft-Domänen von den Non-Raft-Domänen getrennt. Die Lipid Raft-Fractionen wurden mit Hilfe der Western Blot-Analyse des Markerproteins Flotillin detektiert und von den Cadherin-

positiven Non-Raft-Fractionen unterschieden. Anschließend wurden die jeweiligen Fractionen zusammengeführt, um den Gesamtgehalt verschiedener Lipide, Proteine und die γ -Sekretase-Aktivität in den Lipid Raft-Domänen und Non-Raft-Domänen miteinander vergleichen zu können.

Wie in Abbildung 41 dargestellt zeigte sich eine geringe, nicht signifikante Abnahme der Non-Raft-Fractionen (94,2 %, \pm 2,84 %, $p = 0,166$), während gleichzeitig die Lipid Raft-Fractionen durch die Sulfatid-Inkubation um 10 % gesteigert waren (110,2 %, \pm 0,90 %, $p = 0,001$). Das Verhältnis der Raft-/Non-Raft-Fractionen war somit durch die Inkubation mit Sulfatiden auf 1,17 (Kontrolle = 1, $p = 0,006$) zu Gunsten der Raft-Fractionen signifikant verschoben.

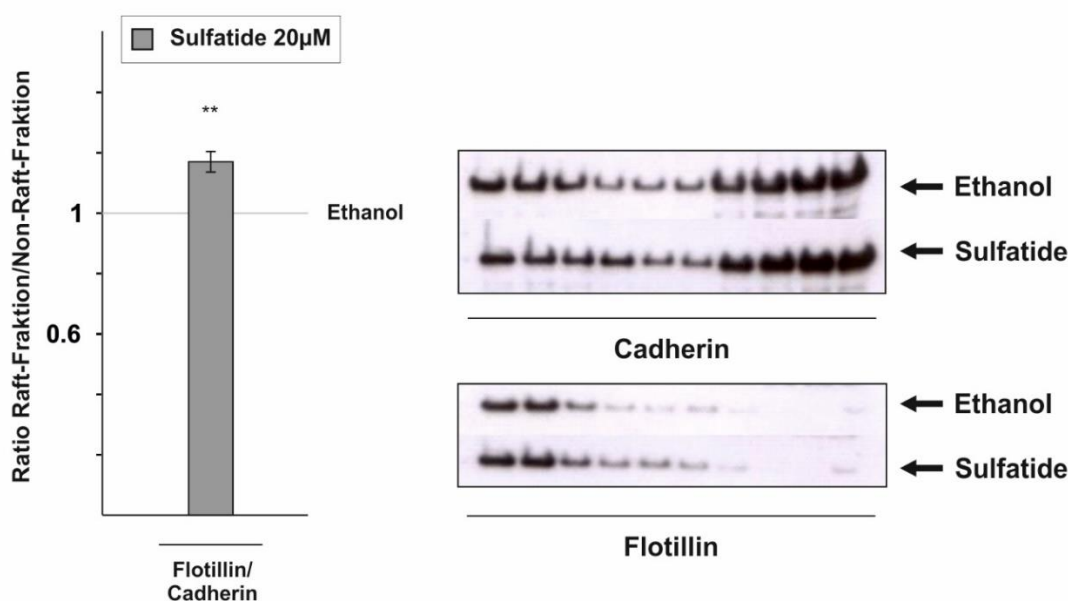


Abbildung 41: Einfluss von Sulfatiden auf die Raft-Fractionen. Die Lipid Raft-Präparation, sowie anschließende Analyse des Proteingehaltes wurde in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Western Blots der Saccharose-Dichtegradienten. Nach Vereinigung der Cadherin- bzw. Flotillin-positiven Fractionen wurde das Raft/Non-Raft-Verhältnis der Kontrollen auf 1,0 gesetzt und im Verhältnis hierzu das Raft/Non-Raft-Verhältnis der inkubierten Zellen betrachtet. Der Fehlerbalken repräsentiert die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's t -Tests berechnet (** $p < 0,01$).

Diese Veränderung ließ sich auf eine 3,3-fach stärkere Akkumulation der Sulfatide in den Lipid Raft-Fractionen im Vergleich zu den Non-Raft-Fractionen zurückführen (Abbildung 42, Non-Raft-Fractionen: 432,2 %, \pm 7,81 %, $p < 0,001$; Raft-Fractionen: 1423,6 %, \pm 6,35 %, $p < 0,001$). Neben Sphingolipiden stellt Cholesterin das wichtigste Lipid in den Raft-Fractionen der Zelle dar. Es wurde daher zusätzlich die Verteilung von Cholesterin analysiert, da durch eine Verschiebung von Cholesterin ebenfalls die γ -Sekretase beeinflusst werden könnte. Es zeigte sich in der Folge der Sulfatid-Inkubation jedoch keine signifikante Veränderung des Cholesteringehaltes in den Non-Raft- bzw. Raft-Fractionen (Non-

Raft-Fractionen: 92,7 %, \pm 1,8 %, $p = 0,127$; Raft-Fractionen: 100,9 %, \pm 0,1 %, $p = 0,76$, Abbildung 42), wobei das Verhältnis der Raft-/Non-Raft Fraktion auf 1,08 nicht signifikant verschoben wurde.

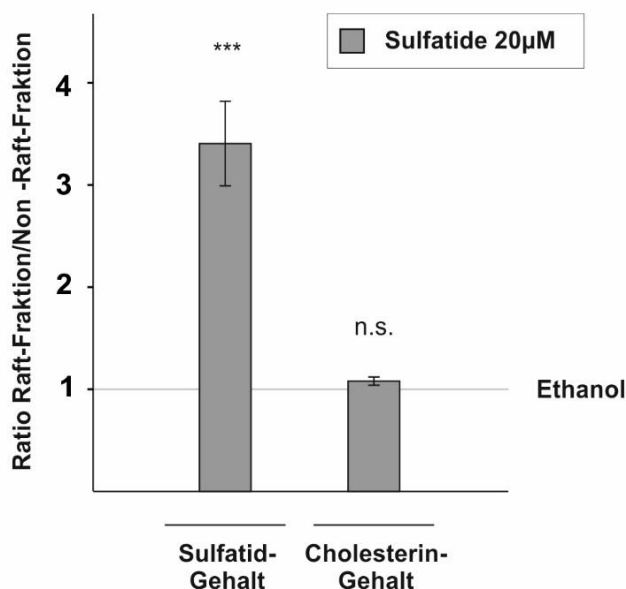


Abbildung 42: Einfluss der Inkubation von Sulfatiden auf das Raft/Non-Raft-Verhältnis von Sulfatiden und Cholesterin. Die Lipid Raft-Präparation und Bestimmung des Cholesteringehaltes wurden in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt, die massenspektrometrische Analyse des Sulfatid-Gehaltes erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann. In den vereinigten Raft- bzw. Non-Raft-Fractionen wurde der Sulfatid-Gehalt (Summe aller Sulfatide) mittels Massenspektrometrie ermittelt. Der Cholesteringehalt wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Versuchskits bestimmt. Die Raft-/Non-Raft Verhältnisse der Kontrollen wurden mit 1,0 gleichgesetzt. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests berechnet (n. s. $p > 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.4.7.2.4 Beeinflussung der APP-Prozessierung innerhalb der Lipid Raft-Mikrodomänen

Um den Einfluss der Sulfatide auf die amyloidogene Prozessierung innerhalb der Lipid Raft-Domänen zu analysieren wurden anschließend die Proteinspiegel von APP, PS1 und Nicastrin sowohl in den Raft- als auch in den Non-Raft-Fractionen untersucht. Interessanterweise zeigte sich, dass die Inkubation mit Sulfatiden zu einer Umverteilung der beiden γ -Sekretase-Komponenten Nicastrin und Presenilin aus den Raft-Fractionen (Nicastrin: 86,8 %, \pm 2,4 %, $p = 0,003$; PS1: 86,0 %, \pm 3,8 %, $p = 0,026$) in die Non-Raft-Fractionen (Nicastrin: 107,4 % \pm 7,9 %, $p = 0,544$; PS1: 126,7 %, \pm 2,89 %, $p = 0,003$) führte. Das Verhältnis der Raft-/Non-Raft Fractionen war dabei im Vergleich zu den mit Ethanol inkubierten Zellen signifikant zugunsten der Non-Rafts verschoben (Nicastrin-Ratio: $0,81 \pm 0,03$, $p = 0,01$; PS1-Ratio: $0,68 \pm 0,03$, $p < 0,001$; Abbildung 43). Zusätzlich konnte eine leichte, nicht signifikante Umverteilung auch von APP aus den Raft-Fractionen in die Non-Raft-Fractionen detektiert werden (Non-Raft-Fractionen: 110,9 %, \pm 7,3 %, $p = 0,350$; Raft-Fractionen: 98,3 %, \pm 1,9 %, $p = 0,556$; APP Ratio: $0,89 \pm 0,06$, $p = 0,171$, Abbildung 43). Abschließend erfolgte die Messung der γ -Sekretase-Aktivität sowohl aus den Raft- als auch aus den Non-Raft-Fractionen. Hier konnte eine deutliche Reduktion

der Aktivität in den Raft-Fractionen (63,6 %, \pm 1,1 %, $p < 0,001$) nachgewiesen werden, während die γ -Sekretase-Aktivität in den Non-Raft-Fractionen sich nicht signifikant veränderte (98,8 %, \pm 0,7 %, $p = 0,643$). Auch hier zeigte sich eine signifikante Verschiebung des Raft-/Non-Raft-Verhältnisses in den Sulfatid-inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ($0,64 \pm 0,01$, $p < 0,001$, Abbildung 43).

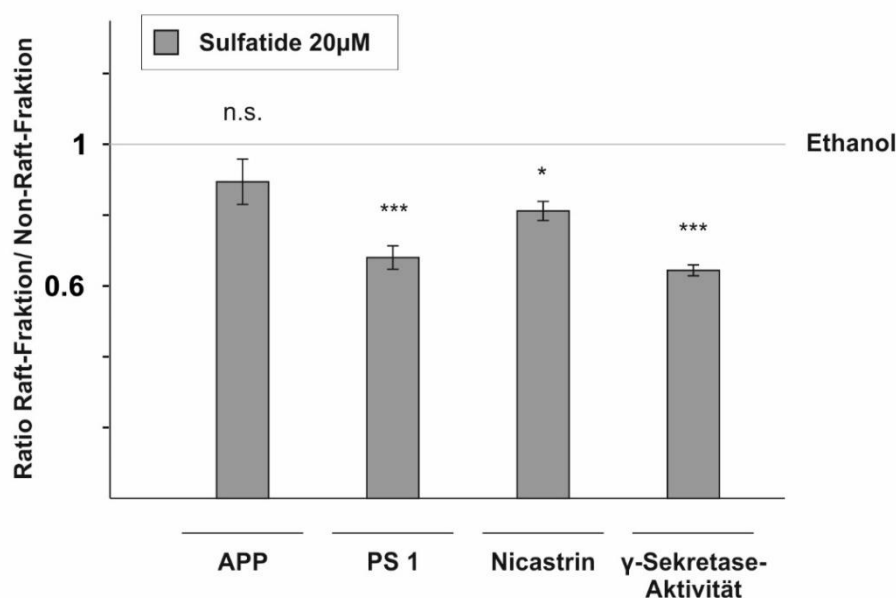


Abbildung 43: Amyloidogene Prozessierung in Raft- und Non-Raft-Fractionen nach Inkubation mit Sulfatiden. Die Lipid Raft-Präparation, sowie anschließende Analyse des Proteingehaltes und der γ -Sekretase-Aktivität wurden in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt. Dargestellt wird das Verhältnis von APP, PS1 und Nicastrin zwischen den Raft- und Non-Raft-Fractionen normiert auf das Gesamtprotein der jeweiligen gepoolten Fractionen. Das Raft-/Non-Raft-Verhältnis der Kontrollen wurde dabei mit 1,0 gleichgesetzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Western Blot-Analyse aus den gepoolten Fractionen. Die γ -Sekretase-Aktivität wurde mittels eines fluoreszenz-basierten Enzymassay gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Statistische Auswertung unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend konnten diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation mit Sulfatiden zu einer indirekten Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität durch Verschiebung der Raft-/Non-Raft-Verteilung des Enzymkomplex zu Gunsten der Non-Rafts führt. Zudem konnte beobachtet werden, dass durch den erhöhten Sulfatid-Gehalt insbesondere die innerhalb der Lipid Rafts lokalisierte γ -Sekretase-Aktivität vermindert wird. Beide Faktoren zusammen tragen somit zu einer verminderten A β -Synthese bei.

4.4.8 Effekt von Galactosylceramid auf die APP-Prozessierung

Die vorangehenden Ergebnisse beschreiben die durch Inkubation mit Sulfatiden erreichte Reduktion der A β -Synthese in Folge einer reduzierten β - und γ -Sekretase-Aktivität sowie die zugrundeliegenden Mechanismen. Bisher liegen keine Daten bezüglich der Auswirkungen von GalCer, dem Vorläuferlipid der Sulfatide, auf die A β -Synthese vor. Es sollte daher im Weiteren untersucht werden, ob die beobachteten

Effekte für die Gruppe der Sulfatide spezifisch sind, oder ob sich das Vorläuferlipid GalCer in ähnlichem Maße auf die APP-Prozessierung auswirkt. Hierzu wurden SH-SY5Y APP-Zellen und SH-SY5Y wt-Zellen äquimolar zu den Sulfatid-Inkubationen mit 20 μ M GalCer inkubiert. Nach Inkubation von SH-SY5Y APP-Zellen zeigte sich eine geringe, nicht signifikante Reduktion des A β -Gehaltes im Medium (93,9 %, \pm 2,14 %, $p = 0,08$, Abbildung 44). Die Messung der β - und γ -Sekretase-Aktivität in lebenden Zellen nach GalCer-Inkubation auf SH-SY5Y wt-Zellen erfolgte in Analogie zu dem Versuchsaufbau mit Sulfatiden. Wie in Abbildung 44 dargestellt zeigte sich eine signifikante Reduktion, sowohl der β -Sekretase- (83,2 %, \pm 3,3 %, $p < 0,001$) als auch der γ -Sekretase-Aktivität (89,9 %, \pm 3,5 %, $p < 0,001$) nach Zugabe von GalCer im Vergleich zur Kontrolle. Die Reduktion war im Vergleich zu den mit Sulfatiden inkubierten Zellen jedoch signifikant geringer (β -Sekretase: 66,3 % vs. 83,2 %, $p = 0,003$; γ -Sekretase: 53,9 % vs. 89,9 %, $p < 0,001$). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die beobachteten Effekte spezifisch für die Lipidklasse der Sulfatide sind.

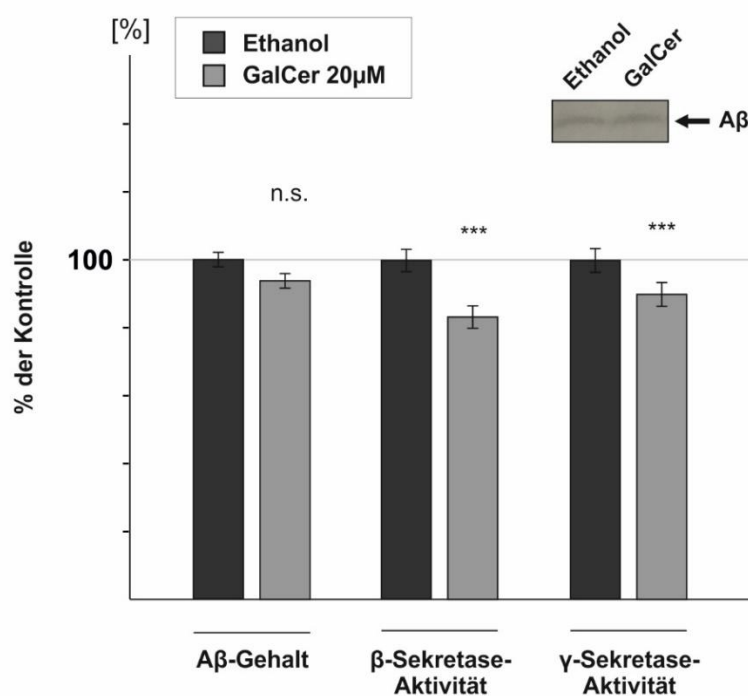


Abbildung 44: Auswirkung der Inkubation mit GalCer auf den A β -Gehalt im Medium und die Aktivität der β - und γ -Sekretase in lebenden Zellen. Nach Inkubation von SH-SY5Y APP-Zellen für 24 Std. mit 20 μ M GalCer erfolgte die Bestimmung des A β -Gehaltes im Medium mittels Western Blot-Analyse nach Immunpräzipitation mit Hilfe des W02-Antikörpers. Die Sekretase-Aktivitäten wurden in lebenden SH-SY5Y wt-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 20 μ M GalCer gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von ungepaarten, zweiseitigen Student's t -Tests (n. s. $p > 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.4.9 Veränderung der Sekretase-Aktivität durch Beeinflussung der endogenen Sulfatide in SH-SY5Y-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass durch die exogene Zufuhr von Sulfatiden im Zellkulturversuch der Sulfatid-Gehalt in der Zelle signifikant gesteigert werden kann und hierdurch bedingt eine Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität erreicht wird. Diese Resultate lassen jedoch keine Rückschlüsse zu, in welchem Maße sich eine Steigerung des endogenen Sulfatid-Gehaltes auf die Aktivität der beiden Sekretasen auswirken könnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden im Rahmen dieser Arbeit SH-SY5Y wt-Zellen stabil mit shRNA der Arylsulfatase A (Genname: ARSA) transfiziert. Nach Selektion der stabil transfizierten Zellen zeigte sich für den verwendeten Klon eine signifikante Reduktion der ARSA-Genexpression auf 23 % (Abbildung 45, 22,7 %, \pm 1,5 %, $p < 0,001$). Infolge dessen geht man davon aus, dass es zur Akkumulation von Sulfatiden in den Zellen kommt. Wie in Abbildung 46 dargestellt ließ sich eine signifikante Reduktion der β -Sekretase-Aktivität in diesen Zellen im Vergleich zu den mit einem mock-Plasmid transfizierten Kontrollen nachweisen (80,5 %, \pm 6,3 %, $p = 0,006$). Gleichzeitig konnte auch eine signifikant geringere γ -Sekretase-Aktivität gemessen werden (70,26 %, \pm 3,5 %, $p < 0,001$, Abbildung 46). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Steigerung der endogenen Sulfatide ähnliche Effekte auf die Sekretasen erreicht werden können wie durch die exogene Zufuhr der Lipide.

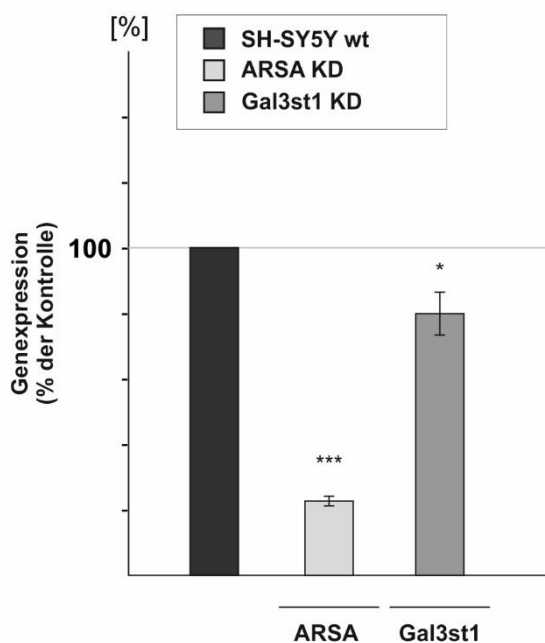


Abbildung 45: Überprüfung der Effizienz der ARSA-KD (stabil) bzw. der Gal3st1-KD (transient) der verwendeten Zelllinien. Die gezeigten RT-PCR Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Stahlmann durchgeführt. Die transiente Transfektion der Gal3st1-siRNA erfolgte in Kooperation mit Dr. Janine Mett. In Folge der Transfektion (stabil oder transient) kommt es zu einer Blockade der Transkription des Ziel-Gens. Nach Isolation der mRNA wurde daher mit Hilfe einer qRT-PCR des entsprechenden Gens die Effizienz der Transfektion untersucht. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen Student's *t*-Tests.

Im Falle der Alzheimer-Erkrankung findet sich wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben eine signifikante Minderung des Sulfatid-Gehaltes in den *post mortem* Hirnproben. Im Umkehrschluss der vorangehenden Untersuchungen könnte dies bedeuten, dass eine gesteigerte Aktivität der β - und γ -Sekretase zu einer vermehrten A β -Synthese führt und somit die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung begünstigt. Um diese Frage zu beantworten wurde im Zellkulturversuch durch Transfektion von siRNA

der CST (Genname: Gal3st1) ein transients Knock-Down dieses Enzyms erzeugt, woraus eine reduzierte Sulfatid-Synthese resultierte. Dabei wurde mittels qRT-PCR eine Defizienz um 20 % detektiert (79,9 %, \pm 6,5 %, $p = 0,015$, Abbildung 45) welche in etwa der 28%igen Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von Alzheimer-Patienten entspricht. Interessanterweise fand sich in Folge dieser Minderung des Sulfatid-Gehaltes eine signifikante Steigerung, sowohl der β - als auch der γ -Sekretase-Aktivität, im Vergleich zu den Kontrollzellen (β -Sekretase: 107,18 %, \pm 1,5 %, $p = 0,003$; γ -Sekretase: 128,05 %, \pm 3,3 %, $p = 0,02$, Abbildung 46). Die geringe Effektstärke im Vergleich zu den ARSA-defizienten Zellen lässt sich am ehesten auf die geringere Knock-Down-Effizienz zurückführen (siehe Abbildung 45: 77 % für ARSA im Vergleich zu 20 % für Gal3st1). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass eine Steigerung des Sulfatid-Gehaltes im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten als möglicher therapeutischer Ansatz von Nutzen sein könnte.

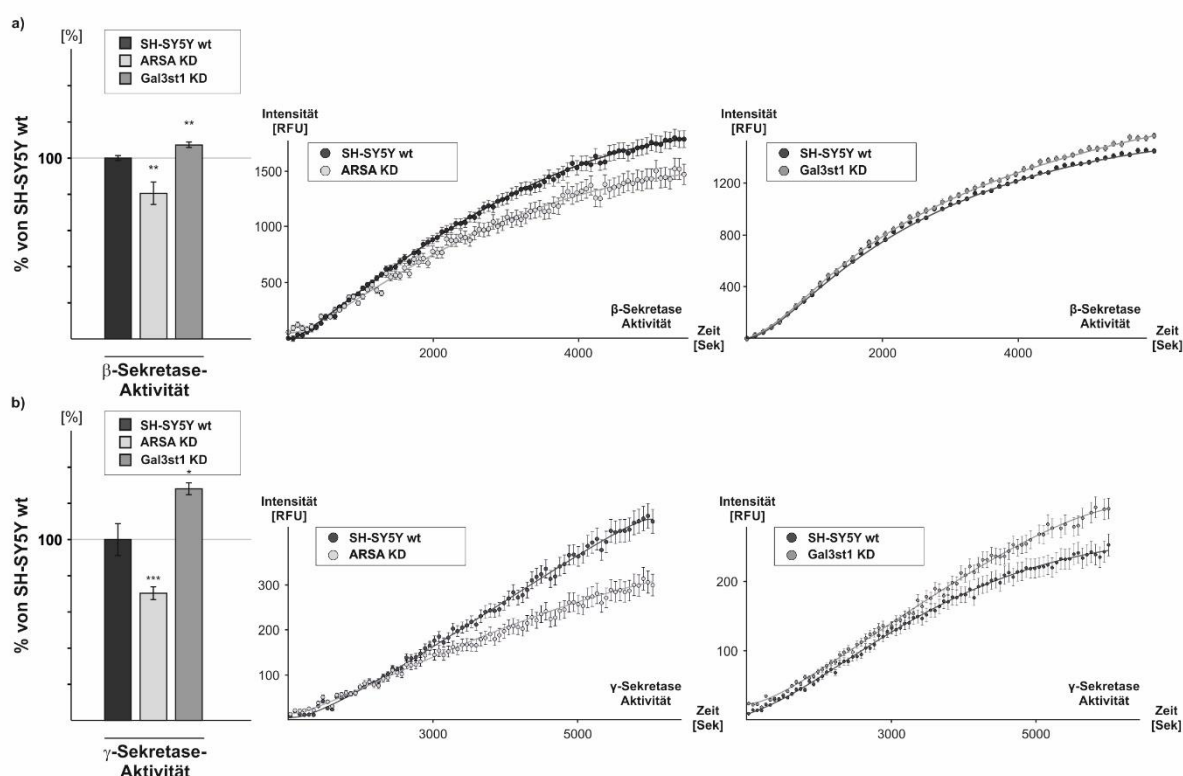


Abbildung 46: Einfluss des ARSA- bzw. Gal3st1-KD auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase. Die Bestimmung der Enzym-Aktivitäten wurde in Kooperation mit Dr. Viola Hauptenthal durchgeführt. Dargestellt wird die Auswirkung der jeweiligen Defizienz auf die Aktivität der Sekretasen in lebenden Zellen. Die Messung der Sekretase-Aktivität erfolgte frühestens 24 Std. nach der transienten Transfektion. Die Kontrollzelllinien wurden entsprechend mit einem mock-Plasmid ohne genregulatorische Wirkung transfiziert, sodass die Aktivitätsänderung der Sekretasen nicht durch die Transfektion selbst erklärt werden kann. Abbildung a zeigt die prozentuale Veränderung der β -Sekretase-Aktivität sowie die exemplarischen Kinetiken. Abbildung b zeigt die Kinetiken der γ -Sekretase-Aktivität und entsprechende prozentuale Änderung der Steigung im Vergleich zur mit mock-Plasmid transfizierten Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's t -Tests (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

4.5 Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide *in vivo*

4.5.1 Einfluss der Sulfatide auf die γ -Sekretase-Aktivität in humanem *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben konnte im Zellkulturversuch gezeigt werden, dass durch eine Reduktion des Sulfatid-Gehaltes die Aktivität der β - und γ -Sekretase ansteigt. Dies könnte entsprechend auch auf das Gehirn von Alzheimer-Patienten übertragen werden. Im Gegensatz zur β -Sekretase konnte für die γ -Sekretase in den bisherigen Untersuchungen beobachtet werden, dass eine direkte Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Sulfatide eine Rolle spielt. Um zu überprüfen, ob durch die Steigerung des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität möglich wäre, wurden daher Homogenate von *post mortem* Gehirngewebe von vier Patienten *ex vivo* mit Sulfatiden inkubiert. Wie Abbildung 47 darstellt, konnte in allen vier Proben eine Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität erreicht werden, gemittelt ergab sich dabei eine signifikante Abnahme von ca. 13 % durch die Sulfatid-Inkubation (87,2 %, \pm 2,75 %, $p = 0,003$).

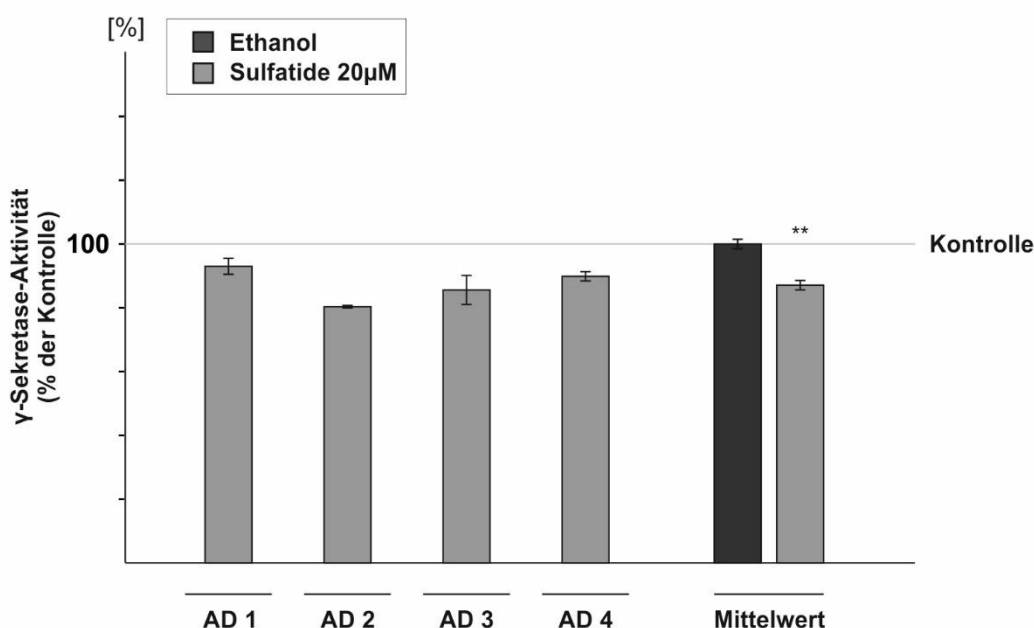


Abbildung 47: γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit 20 μ M Sulfatiden auf PNFs von *post mortem* Alzheimer-Gehirngewebe. Die Bestimmung der Sekretase-Aktivität erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Tatjana Rothhaar. Nach Inkubation mit Sulfatiden für 15 Min. bei 37 °C auf PNFs von vier unterschiedlichen Alzheimer-Hirnproben (Abk. AD) erfolgte anschließend die Membranpräparation sowie fluorometrische Messung der γ -Sekretase-Aktivität. Die Proben wurden als technisches Triplet gemessen und der Mittelwert der einzelnen Proben zur Ermittlung der mittleren Effektstärke und für die statistische Auswertung verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung der technischen Triplets bzw. der Mittelwerte der jeweiligen Proben. Statistische Auswertung mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (** $p < 0,01$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der *ex vivo* Situation eine Verringerung der Aktivität erzielt werden kann. Betrachtet man die vorangegangenen Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass der weit größere

Effekt der Sulfatide auf die γ -Sekretase nicht auf einer direkten Inhibition beruht, sondern das lebende System bedarf, scheint *in vivo* eine noch stärkere Reduktion der γ -Sekretase Aktivität möglich zu sein.

4.5.2 Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide *in vivo* im Mausmodell

Die bisherigen Ergebnisse erbrachten Hinweise, wie sich Sulfatide in der Zellkultur oder *post mortem* auf die amyloidogene APP-Prozessierung auswirken können. Ob veränderte Sulfatid-Spiegel auch *in vivo* im Gehirn eine Rolle in der Regulation der Sekretasen spielen könnten, sollte daher Ziel der weiteren Untersuchungen sein. Zu diesem Zweck wurden defiziente Mäuse betrachtet, denen das Enzym ASA (ARSA^{-/-}) fehlt, wodurch sie keine Sulfatide mehr abbauen können. Hierdurch akkumulieren Sulfatide u. a. in Neuronen und Oligodendrozyten (MOLANDER-MELIN et al., 2004). Eine Analyse des Sulfatid-Gehaltes aus dem Gehirn dieser Mäuse konnte im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen (ARSA^{+/-}), die dem Wildtyp-Phänotyp entsprechen, eine zweifach höhere Konzentration der Sulfatide nachweisen (208,2 %, \pm 5,97 %, $p < 0,001$, Abbildung 48). Die heterozygoten Mäuse dienten aufgrund des unauffälligen Phänotyps ohne relevante Anreicherung von Sulfatiden für die weiteren Versuche als Kontrolle.

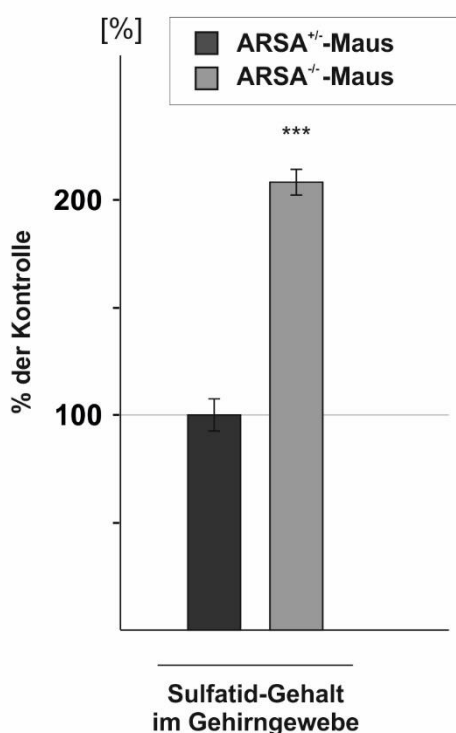


Abbildung 48: Sulfatid-Gehalt im Gehirngewebe von ARSA^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den heterozygoten ARSA^{+/-}-Mäusen. (ARSA^{+/-}-Mäuse n = 3, ARSA^{-/-}-Mäuse n = 5) Die massenspektrometrische Messung wurde durchgeführt in Kooperation mit Dr. Christoph Stahlmann. Dargestellt wird, nach massenspektrometrischer Analyse, der Gesamt-Sulfatid-Gehalt (Summe aller Sulfatid-Spezies) im Gehirngewebe von ARSA-defizienten Mäusen in Prozent der heterozygoten Kontrollen. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (***) $p < 0,001$).

Das Ziel der weiteren Versuche war zu untersuchen, ob sich die im Zellkulturmodell gemessenen Veränderungen der Sekretase-Aktivität auch im Hirngewebe von Mäusen nachweisen lassen. Die Messung der β -Sekretase-Aktivität zeigte eine signifikante Reduktion um ca. 15 % in den ARSA^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (85,5 %, \pm 1,13 %, $p = 0,032$, Abbildung 49). In den vorherigen Zellkultur-Versuchen konnte dieser Effekt der Sulfatide u. a. durch eine vermehrte Degradation von BACE1 erklärt

werden. Auch im Gehirngewebe der ARSA^{-/-}-Mäuse ließ sich ein signifikant geringerer BACE1-Proteingehalt im Vergleich zu den Kontrollen beobachten (56,0 %, ± 4,40 %, p = 0,002, Abbildung 49). Neben der Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität konnte im Zellkulturmodell auch eine reduzierte γ -Sekretase-Aktivität durch einen erhöhten Sulfatid-Gehalt gemessen werden. Die Untersuchung der γ -Sekretase-Aktivität in den ARSA^{-/-}-Mäusen bestätigte auch hier die Ergebnisse der Zellkultur. Wie in Abbildung 49 dargestellt zeigte sich die γ -Sekretase-Aktivität in den ARSA^{-/-}-Mäusen um ca. 49 % signifikant reduziert (51,2 %, ± 6,83 %, p = 0,004).

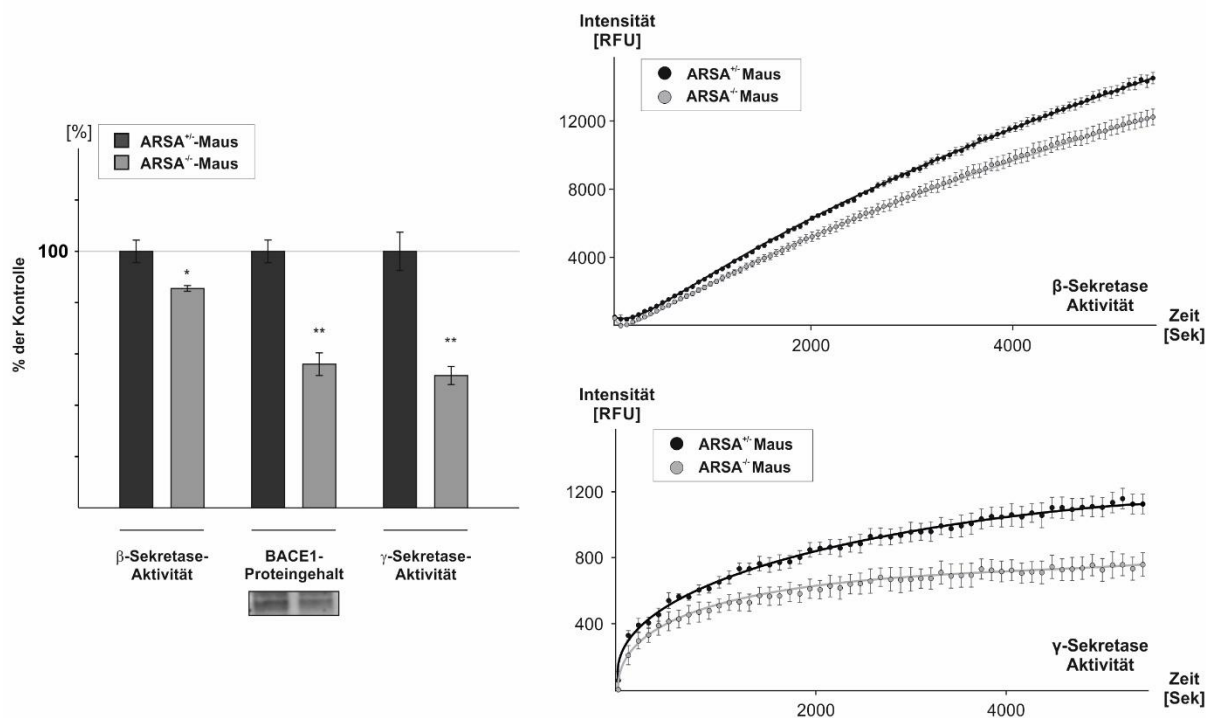


Abbildung 49: Einfluss des ARSA-Knock-out auf die APP-Prozessierung im Maushirn-Homogenat. (ARSA^{+/+}-Mäuse n = 3, ARSA^{-/-}-Mäuse n = 5) Untersucht wurde mittels fluoreszenzbasierten Enzymassays die β - und γ -Sekretase-Aktivität nach Membranpräparation aus Hirngewebe von ARSA^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ARSA^{+/+}-Mäusen. In der Abbildung rechts finden sich exemplarische Kinetiken für die β - bzw. γ -Sekretase-Aktivität. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Änderung der Enzymaktivität. Der BACE1-Proteingehalt wurde aus Homogenaten desselben Hirngewebes analysiert. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung, die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-Tests (**p < 0,01; * p < 0,05).

Diese Ergebnisse unterstützen die *in vivo* Relevanz der zuvor beschriebenen Beobachtungen aus den Zellkulturversuchen. Ein erhöhter Gehalt an Sulfatiden im Gehirn von Mäusen scheint, über die Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität, zu einer reduzierten amyloidogenen Prozessierung zu führen. Eine Messung des A β -Gehaltes im Homogenat des Gehirngewebes der Mäuse wurde mittels ELISA-Kit durchgeführt, der A β -Gehalt war jedoch zu gering und die gemessenen Werte in Höhe des Hintergrundsignals, sodass diese Daten nicht ausgewertet werden konnten. Um die Auswirkungen der genannten Veränderungen der Sekretase-Aktivitäten auf den A β -Gehalt, die kognitiven Funktionen und die A β -

Plaques zu untersuchen müsste daher ein ARSA-Knock-out in einem transgenen Alzheimer Mausmodell durchgeführt werden. Dieser lag im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vor.

4.6 Einfluss der Sulfatide auf die A β -Aggregation

Neben der Degradation und der Synthese von A β spielt insbesondere die A β -Aggregation in der Alzheimer-Pathologie eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu monomeren A β -Peptiden besitzen die aggregierten Formen von A β , insbesondere die Oligomere, eine deutlich höhere Zytotoxizität und werden daher heute für den neuronalen Zellverlust im Gehirn der Alzheimer-Patienten mitverantwortlich gemacht (CLEARY et al., 2005). Veränderungen der lokalen Umgebung von A β konnten bereits in mehreren Studien zu einer veränderten Aggregation der Peptide beitragen (HOSSAIN et al., 2009). In den folgenden Versuchen sollte daher überprüft werden, ob Sulfatide sich positiv oder negativ auf die Aggregation von A β auswirken könnten. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Lipiden die A β -Aggregation unabhängig von der Lipidklasse beeinflusst, sodass Ethanol als Lösungsmittel-Kontrolle für diesen Versuchsaufbau nicht geeignet ist. Als häufig vorkommende Lipidklasse und Vorläufer der Sulfatide dienten daher Ceramide in äquimolarer Menge für die folgenden Versuche als Kontrolle.

4.6.1 Rasterkraft-Mikroskopie von A β_{42} -Aggregaten nach Sulfatid-Anreicherung

Es erfolgte die Aufreinigung von synthetischem A β_{42} mit Hilfe von HFIP und mehreren Filtersystemen, sodass bei Versuchsbeginn nur A β_{42} in monomerer Form vorlag. Nach Zugabe von Ceramiden bzw. Sulfatiden zu einer vordefinierten A β_{42} -Menge wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Std. mit Hilfe der Rasterkraft-Mikroskopie die A β -Aggregate bildlich dargestellt. Ein exemplarischer Bildausschnitt wird in Abbildung 50 dargestellt. Die Daten konnten quantifiziert werden unter Verwendung des Programms Image Gauge. Nach Zugabe von Sulfatiden zeigte sich im Vergleich zu einer Ceramid-Zugabe eine signifikant geringere Aggregation von A β (55,7 %, \pm 1,8 %, $p < 0,001$, Abbildung 50).

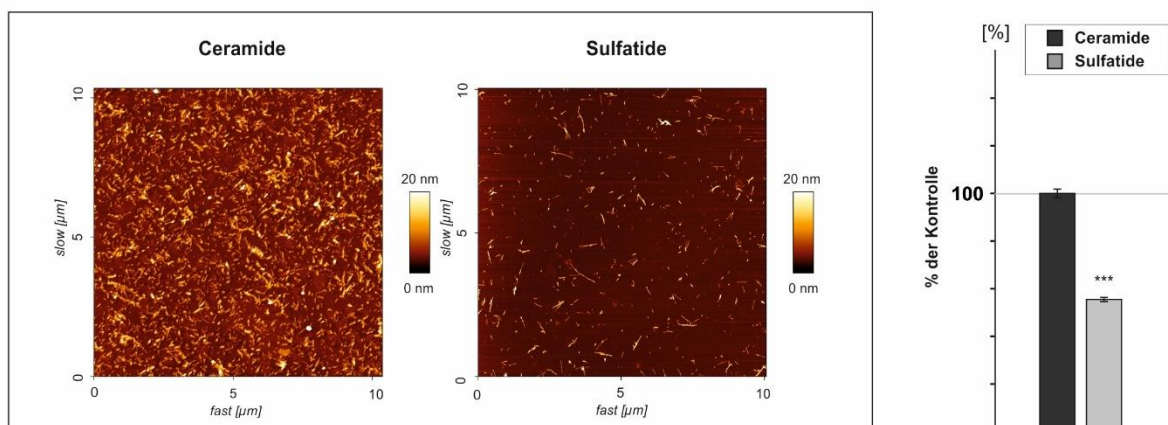


Abbildung 50: Rasterkraft-Mikroskopie von A β ₄₂-Fibrillen. Die Inkubation und Rasterkraft-Mikroskopie wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsdoerfer. Der Versuchsaufbau wurde zur Vermeidung von Zufallsschwankungen mehrfach wiederholt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme der in Anwesenheit von 10 μ M Ceramiden (links) bzw. 10 μ M Sulfatiden (rechts) gebildeten A β ₄₂-Aggregate nach einer Inkubationszeit von 24 Std. Rechts wird die prozentuale Änderung der hellen Bildpunkte als Quantifizierung der A β ₄₂-Fibrillen dargestellt.

4.6.2 Quantifizierung der A β ₄₂-Aggregation unter dem Einfluss von Sulfatiden

Um diese Veränderung quantifizieren zu können wurde ein Aggregationsversuch durchgeführt, bei dem die Entstehung der β -Faltblattstruktur durch die Konformationsänderung von A β mittels Thioflavin T fluorometrisch gemessen wurde. Sowohl das Maximum der Kurve, als auch die Steigung waren nach Sulfatid-Zugabe im Vergleich zu den Proben mit Ceramid signifikant reduziert (Maximum: 78,9 %, \pm 5,02 %, $p = 0,01$; Steigung: 69,4 %, \pm 6,4 %, $p = 0,01$, Verzögerungszeit: 167,5 %, \pm 6,6 %, $p < 0,001$ Abbildung 51b). Die Kinetik des Aggregationsverlaufs nach Zugabe der Lipide wird in Abbildung 51a dargestellt. Unter *in vitro* Bedingungen scheinen Sulfatide somit die Aggregation von A β zu verlangsamen und gleichzeitig die Zahl der langen Fibrillen zu reduzieren.

In Zusammenhang mit der A β -Aggregation ist die Entstehung der A β -Oligomere von besonderer Bedeutung. Ihnen konnte im Rahmen mehrerer Studien die höchste Neurotoxizität aller A β -Aggregationsformen zugeschrieben werden (CLEARY et al., 2005). Mit dem für A β -Oligomere spezifischen Antikörper A11 wurde untersucht, ob die Entstehung der toxischen A β -Oligomere ebenfalls durch Sulfatide gehemmt werden kann. Tatsächlich zeigte sich, dass nach *in vitro* Inkubation von synthetischem A β ₄₂ mit Sulfatiden, im Vergleich zur äquimolaren Menge von Ceramiden, signifikant weniger toxische A β -Oligomere vorlagen (84,0 %, \pm 3,95 %, $p = 0,006$, Abbildung 51c).

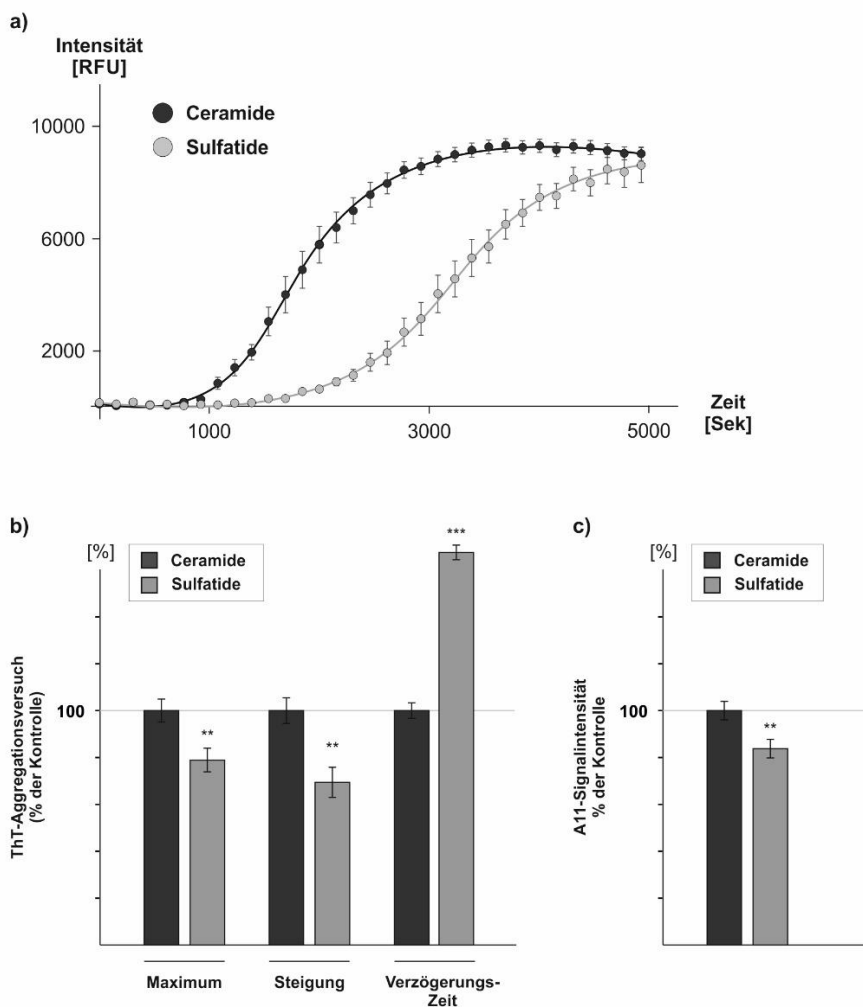


Abbildung 51: Aggregation von synthetischem A β ₄₂ unter Einfluss von Sulfatiden bzw. Ceramiden. Der ThT-Aggregationsversuch und die Dot-Blot-Analysen wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Hundsödörfer und Herr Lukas Schwarz. Die Inkubation erfolgte mit 10 μ M Ceramiden bzw. Sulfatiden über 24 Std. Die ThT-Analyse erfolgte während der Inkubationszeit, die Dot-Blot-Analyse erfolgte nach Abschluss der Inkubation. a) zeigt die Kinetik des ThT-Aggregationsversuchs, die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung der einzelnen Datenpunkte. b) stellt die prozentuale Veränderung der Mittelwerte des Maximums, der Steigung bzw. der Verzögerungszeit des ThT-Aggregationsversuchs unter Inkubation mit Sulfatiden bzw. Ceramiden dar. c) zeigt die prozentuale Reduktion der toxischen A β -Oligomere nach Inkubation mit Sulfatiden. Nachgewiesen wurden die Oligomere mit Hilfe der Dot-Blot-Methode unter Verwendung des spezifischen Antikörpers A11. Die Fehlerbalken von Abbildung b) und c) entsprechen der mittleren Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Student's *t*-Tests (** $p < 0,01$).

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich Sulfatide *in vitro* im Vergleich zu ihrem Vorläufer Ceramid durch eine Verlangsamung der Aggregation und Reduktion der Fibrillen positiv auf die A β -Aggregation auswirken. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass auch die toxischen A β -Oligomere durch Sulfatide reduziert werden können.

4.7 Zusammenfassung von Kooperationsprojekten mit Beteiligung im Rahmen der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen von Kooperationen erfolgte in den ersten Jahren der Einarbeitung auch die Mitarbeit an anderen Projekten welche bereits publiziert werden konnten. Eine kurze Zusammenfassung dieser Publikationen, sowie der Beitrag des Verfassers dieser Arbeit zu den jeweiligen Projekten und die Bedeutung der Daten im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

4.7.1 Effekt verschiedener Phospholipide auf die α -Sekretase-Aktivität des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweges der Alzheimer-Erkrankung

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *International Journal of Molecular Science*

Grimm M.O.W.*, Hauptenthal V.J.*, Rothhaar T.L., Zimmer V.C., Grösgen S., Hundsdörfer B., Lehmann J., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 14(3): 5879-5898. * equally contributed (GRIMM et al., 2013a)

Neben der amyloidogenen Prozessierung besitzt die nicht-amyloidogene Prozessierung für die Alzheimer-Erkrankung eine besondere Bedeutung. Durch den Schnitt der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne von APP wird die Entstehung von A β verhindert. Eine gesteigerte nicht-amyloidogene Prozessierung kann somit zu einer Reduktion von A β beitragen. Aufgrund des Schnittes der γ -Sekretase innerhalb der Transmembranregion von APP, wurde in früheren Studien insbesondere der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf dieses Enzym untersucht (HOLMES et al., 2012). Ziel des Projektes war es daher die Veränderung der α -Sekretase-Aktivität unter dem Einfluss verschiedener Phospholipide systematisch zu untersuchen. Es wurden Phospholipide mit unterschiedlichen Kettenlängen, variabler Kopfgruppe und veränderter Anzahl und Position der Doppelbindungen analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit bestand die Mitbeteiligung in der Mitarbeit in der Zellkultur und der statistischen Auswertung der Daten mittels SPSS.

Es konnte nachgewiesen werden, dass kurzkettige Phospholipide (Phosphatidylcholin (PC) 10:0 und PC 12:0) im Vergleich zu PC 18:0 die α -Sekretase-Aktivität auf 120–140 % steigern können. Phospholipide mit einer Kettenlänge von > 18:0 zeigten weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die α -Sekretase-Aktivität. Die Veränderung der Kopfgruppe erbrachte keine konsistenten Ergebnisse. Während Phosphatidylserin (PS) 12:0 in lebenden Zellen eine Reduktion der α -Sekretase-Aktivität bewirkte, zeigte sich bei Inkubation auf Membranen eine Steigerung der α -Sekretase-Aktivität für PS 14:0. Ebenfalls signifikante Veränderungen ergaben sich für die Inkubation mit Phospholipiden mit einer unterschiedlichen Zahl von Doppelbindungen, welche sich insbesondere auf die Membranfluidität auswirken

(ESCRIBÁ et al., 2008). Ab vier Doppelbindungen konnte dabei eine Steigerung der α -Sekretase-Aktivität auf 120–150 % im Vergleich zu PC 18:0 nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit Daten einer früheren Studie, die zeigte, dass eine erhöhte Konzentration ungesättigter Fettsäuren die Produktion von sAPP α steigern kann (YANG et al., 2011). Die Position der Doppelbindungen bewirkte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität des Enzyms.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich nicht nur die γ -Sekretase-Aktivität durch die Zusammensetzung der Lipidkomposition der Membranen beeinflussen lässt, sondern auch die α -Sekretase-Aktivität hierdurch direkt beeinflusst werden kann. Im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten ließen sich in früheren Studien Veränderungen der Phospholipide nachweisen (NITSCH et al., 1992). Dies unterstreicht die Theorie, dass Lipide im Krankheitsprozess der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle spielen könnten, was im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden sollte.

4.7.2 Sind Phytosterine das bessere Cholesterin bei der Alzheimer-Erkrankung? Eine mechanistische Studie.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *Journal of Neuroscience*.

Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, Mett, J., Weingartner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lutjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33, 16072-16087. (BURG et al., 2013)

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil in den zerebralen Membranen. Dort reichert es sich insbesondere in den Lipid Raft-Domänen an (SIMONS, IKONEN, 1997), welche mit der amyloidogenen Prozessierung in Verbindung gebracht werden (EHEHALT et al., 2003). Phytosterine bilden das natürlich vorkommende Cholesterin-Äquivalent in Pflanzen und können die Blut-Hirn-Schranke passieren und so in zerebrale Membranen integriert werden (VANMIERLO et al., 2012). In Pflanzen konnte gezeigt werden, dass Phytosterine sich ebenfalls in Lipid Raft-Domänen anreichern, sodass ein Einfluss auf die amyloidogene Prozessierung möglich erscheint (MONGRAND et al., 2010). Ziel dieses Projektes war es daher die Veränderung der amyloidogenen Prozessierung durch unterschiedliche Phytosterine im Vergleich zu Cholesterin zu untersuchen. Im Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Untersuchung des Einflusses von Stigmasterin auf die Sekretionsleistung der Zelle mit Hilfe des SEAP-Versuchs, sowie in der Mithilfe bei der Zellkultur.

Es wurden hierzu Zellkulturversuche mit verschiedenen häufig vorkommenden Phytosterinen (β -Sitos-
terin, Stigmasterin, Brassicasterin, and Campesterin) durchgeführt und deren Effekt auf die amyloidogene Prozessierung im Vergleich zu Cholesterin oder einer Lösungsmittelkontrolle analysiert. Es zeigte sich eine gesteigerte Aktivität der β - und γ -Sekretase im Zellkulturversuch unter erhöhtem Cholesterin-

gehalt. Die unterschiedlichen Phytosterine, bewirkten im Vergleich zu Cholesterin eine geringere Steigerung der Sekretase-Aktivitäten. Eine protektive Wirkung durch eine Reduktion der β -Sekretase-Aktivität konnte nur für Stigmasterin nachgewiesen werden. Diese ließ sich insbesondere durch eine Umverteilung von BACE1 von den Endosomen an die Zelloberfläche erklären, wobei die β -Sekretase dort eine geringere Aktivität aufweist. Gleichzeitig ließ sich für Stigmasterin auch eine Anreicherung in den Lipid Raft-Domänen beobachten, die zu einer Reduktion des Cholesterins und Verminderung der γ -Sekretase-Aktivität in diesen Regionen beitrug. Die unterschiedlichen Komponenten der γ -Sekretase zeigten sich außerdem unter dem Einfluss von Stigmasterin in ihrer Genexpression reduziert. Diese Ergebnisse ließen sich auch *in vivo* bestätigen. Eine Stigmasterin-reiche Fütterung von Mäusen bewirkte eine Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität sowohl im Gehirngewebe als auch in den Blutzellen, welche in einem reduzierten A β -Gehalt resultierte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich auch die amyloidogene Prozessierung durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran beeinflussen lässt. Dabei scheinen insbesondere die Lipid Raft-Domänen eine wichtige Rolle zu spielen. Sulfatide reichern sich als Sphingolipide ebenfalls in den Lipid Raft-Domänen der Zellen an, sodass bei der Untersuchung des Einflusses der Sulfatide auf die amyloidogene Prozessierung im Rahmen dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Lipid Raft-Domänen gelegt wurde.

4.7.3 Der Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und die A β -Degradation bei der Alzheimer-Erkrankung.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert in *Neurodegenerative diseases*.

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

Vitamin D₃ zählt zu den Secosteroiden und kann mit der Nahrung aufgenommen werden oder im Körper unter dem Einfluss von UV-Strahlen aus Cholesterinderivaten synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Vitamin D-Rezeptor, der die physiologische Funktion des fettlöslichen Vitamins vermittelt, auch im zerebralen Gewebe exprimiert wird (CUI et al., 2013). Im Rahmen weiterer Studien ließ sich auch ein Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Alzheimer-Erkrankung nachweisen, wobei eine Verschlechterung der kognitiven Funktionen mit einem geringeren Vitamin D-Spiegel assoziiert werden konnte (LLEWELLYN et al., 2011). Vitamin D besitzt dabei u. a. antioxidative und antiinflammatorische Effekte und könnte sich so protektiv auf den Krankheitsverlauf auswirken (ANNWEILER, BEAUCHET, 2011). Ziel dieses Projektes war es im Zellkultur- und Mausmodell auch den Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und die A β -Degradation zu untersuchen. Im

Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Mithilfe bei der Zellkultur und der Messung der Sekretase-Aktivitäten.

In Vitamin D-defizienten Mäusen, die eine ca. 25%ige Reduktion des Vitamin D in Folge einer speziellen Fütterung aufwiesen, zeigte sich trotz der nur milden Defizienz ein um etwa 10 % gesteigerter A β ₄₀ und A β ₄₂-Gehalt. Im Gegensatz hierzu ließ sich im Zellkulturversuch auf N2A-Zellen durch eine Langzeitinkubation mit dem aktiven Metaboliten von Vitamin D über vier Wochen eine ca. 13%ige Reduktion des A β -Gehaltes nachweisen. Die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus ergab, dass es in den Vitamin D-defizienten Mäusen zu einer Steigerung der β -Sekretase-Aktivität in Folge eines erhöhten BACE1-Proteingehaltes kam. Gleichzeitig ließ sich eine signifikante Reduktion der A β -Degradation durch eine gesteigerte NEP-Expression und NEP-Aktivität nachweisen. Nach oben genannter Langzeitinkubation und Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes im Zellkulturversuch konnte umgekehrt eine gesteigerte A β -Degradation als Folge einer gesteigerten NEP-Aktivität, eines erhöhten IDE-Proteingehaltes und einer verstärkten Expression anderer A β -degradierender Enzyme gemessen werden. Abbildung 52 fasst die beschriebenen Ergebnisse schematisch zusammen.

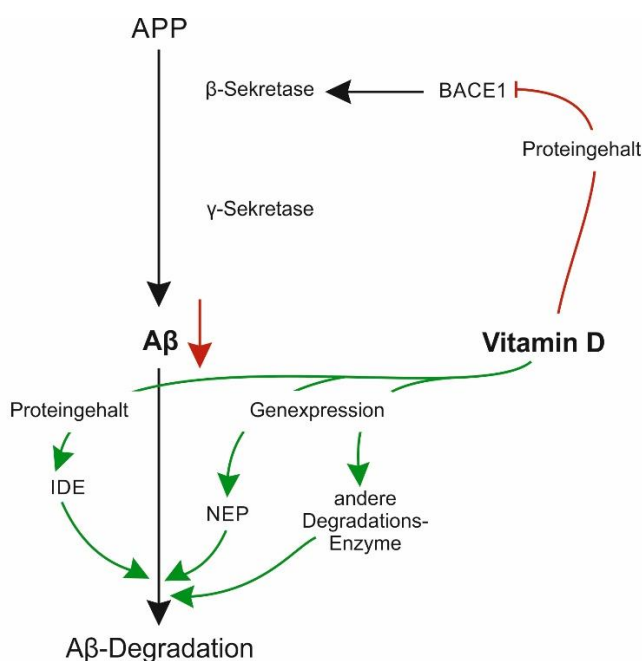


Abbildung 52: Schematische Zusammenfassung des Effekts von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation. Abbildung modifiziert nach (GRIMM et al., 2014b). Vitamin D reduziert die β -Sekretase-Aktivität durch eine Verringerung des BACE1-Proteingehaltes, was zu einer Reduktion des A β -Gehaltes in Folge einer verminderten Synthese beiträgt. Gleichzeitig erhöht Vitamin D über verschiedene Mechanismen die A β -Degradation (Erhöhung des Proteingehaltes von IDE, verstärkte Genexpression von NEP und anderen A β -degradierenden Enzymen) was zu einer weiteren Reduktion des A β -Gehaltes führt.

Diese Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass eine Vitamin D-Defizienz sich negativ auf die pathophysiologischen Prozesse der Alzheimer-Erkrankung auswirken könnte. Umgekehrt konnte im Zellkulturversuch gezeigt werden, dass eine Steigerung des Vitamin D-Gehaltes und hierdurch bedingte verstärkte A β -Degradation möglicherweise protektiv für die Erkrankung ist. Für die vorliegende Arbeit waren diese Ergebnisse von Bedeutung, da im Rahmen einer früheren Studie gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes im Gehirngewebe von Mäusen auch eine Steigerung des

Sulfatid-Gehaltes bewirkt (POPESCU et al., 2018). Es könnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen den hier beobachteten Effekten von Vitamin D und dem Einfluss von Sulfatiden auf die amyloidogene Prozessierung bestehen. Hierauf soll im Rahmen der Diskussion noch näher eingegangen werden.

4.7.4 Vitamin E: Fluch oder Segen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung? Eine systematische Analyse des Einflusses von α -, γ - und δ -Tocopherol auf die A β -Synthese und die A β -Degradation.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *Journal of Nutrition, Health and Aging*.

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

Der Überbegriff Vitamin E beinhaltet drei verschiedene Subklassen: Tocopherole, Tocotrienole und Tocomonoenole. Diese unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Zahl ungesättigter Fettsäuren. Innerhalb einer Subklasse bestehen außerdem in Folge der Methylierung des Chromanrings die verschiedenen Formen α -, β -, γ - und δ -Tocopherol. α -Tocopherol wurde lange Zeit als wichtigster Vertreter unter den Vitamin E-Typen betrachtet und ist das am häufigsten verwendete Vitamin E in Nahrungsergänzungsmitteln (BANKS et al., 2010). Die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) durch einen erhöhten A β -Gehalt bewirkt bei der Alzheimer-Erkrankung eine vermehrte Lipid-Peroxidation welche schädlich für die Zellen ist (BUTTERFIELD et al., 1994). Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung wurde daher Vitamin E aufgrund seiner antioxidativen Wirkung ein protektiver Effekt zugeschrieben (KONTUSH, SCHEKATOLINA, 2004). Andererseits interagiert Vitamin E aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften mit den Membranen, sodass auch eine direkte Beeinflussung der A β -Synthese und Degradation möglich wäre. Ziel dieses Projektes war es daher die Effekte der unterschiedlichen Tocopherole α , γ und δ auf die Sekretasen und A β -Degradation zu untersuchen. Im Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Mithilfe in der Zellkultur und der Messung der Sekretase-Aktivitäten.

Im Rahmen der Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass durch Inkubation der verschiedenen Tocopherole der A β -Gehalt im Medium der Zellen gesteigert wird. Zwischen den einzelnen Tocopherole ließen sich dabei keine Unterschiede darstellen. Als Ursache hierfür konnte eine gesteigerte γ -Sekretase-Aktivität in lebenden Zellen beobachtet werden welche sich auf einen erhöhten PS1-Proteingehalt und

verstärkte Expression der Komponenten der γ -Sekretase zurückführen ließ. Dieser Effekt war am stärksten ausgeprägt bei δ -Tocopherol. Ebenfalls konnte eine gesteigerte β -Sekretase-Aktivität in lebenden Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Tocopherolen nachgewiesen werden. δ -Tocopherol führte dabei zu einer Steigerung des endosomalen BACE1 wodurch die Aktivität des Enzyms gesteigert wird. Zuletzt konnte auch eine Reduktion der A β -Degradation infolge der Tocopherol-Inkubationen beobachtet werden. Diese war am ehesten durch eine verstärkte Aktivität von IDE bedingt. Die Ergebnisse des Projektes sind in Abbildung 53 zusammenfassend dargestellt.

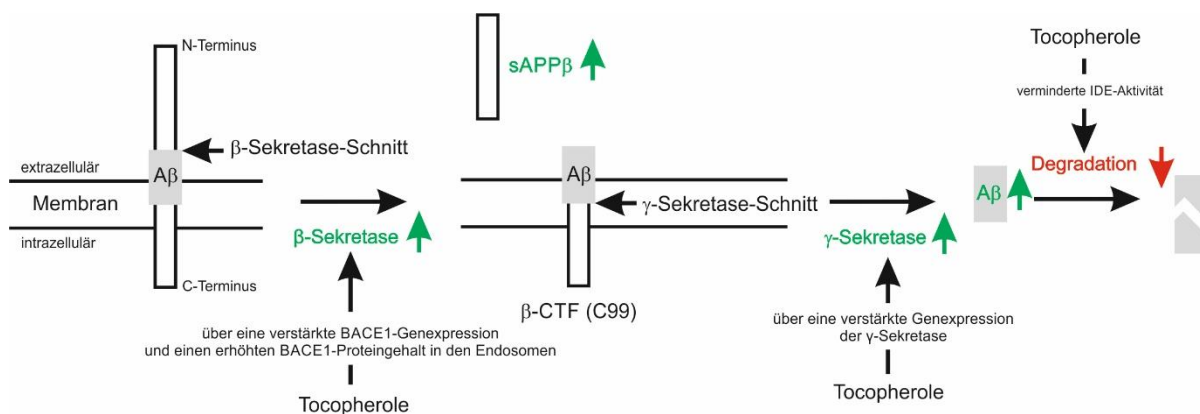


Abbildung 53: Zusammenfassende Darstellung der Effekte der Tocopherole auf die amyloidogene Prozessierung und die A β -Degradation. (Abbildung übersetzt nach (GRIMM et al., 2015b)) Tocopherole wirken über verschiedene Mechanismen auf den A β -Gehalt der Zellen. Einerseits steigern Tocopherole die Genexpression und verstärken die endosomalen Lokalisation von BACE1 woraus eine verstärkte β -Sekretase-Aktivität resultiert. Gleichzeitig wird durch eine vermehrte Genexpression auch die Aktivität der γ -Sekretase gesteigert und somit insgesamt die A β -Synthese verstärkt. Andererseits bewirken die Tocopherole auch eine reduzierte A β -Degradation über einen IDE-vermittelten Mechanismus.

Tocopherole scheinen somit durch eine Verstärkung der A β -Synthese und Reduktion der A β -Degradation zu einer Erhöhung des A β -Gehaltes zu führen, was negative Konsequenzen für den Krankheitsverlauf haben könnte. Gleichzeitig ließ sich in früheren Studien der antioxidative Effekt der Tocopherole auch im Mausmodell nachweisen. Während Vitamin E als Antioxidanz protektiv für die Alzheimer-Erkrankung ist steht dem die Erhöhung des A β -Gehaltes entgegen. In weiteren Studien könnten andere Antioxidantien untersucht werden, um die antioxidative Wirkung ohne eine Erhöhung des A β -Gehaltes nutzen zu können. Für die vorliegende Arbeit waren diese Ergebnisse wichtig, da nachgewiesen werden konnte, dass durch die Interaktion eines lipophilen Vitamins neben den Sekretase-Aktivitäten auch die A β -Degradation beeinflusst werden kann. Somit lässt sich schließen, dass die Lipidkomposition auch bei der A β -Degradation eine Rolle spielt weswegen dies im Falle von Sulfatiden auch untersucht wurde.

4.7.5 Die aus der amyloidogenen, β - und γ -Sekretase-abhängigen Prozessierung von APP entstehende APP-intrazelluläre Domäne reguliert die Neprilysin-Expression.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *Frontiers in Aging Neuroscience*.

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

Die genregulatorische Wirkung von AICD wird vielfach diskutiert (siehe hierzu auch Abschnitt 5.6.1). Neprilysin zählt gemeinsam mit IDE zu den wichtigsten A β -degradierenden Enzymen, weswegen es eine besondere Relevanz für den zerebralen A β -Gehalt bei der Alzheimer-Erkrankung besitzt. Der Einfluss von AICD auf die Genexpression von Neprilysin wurde daher in einer Vielzahl von Studien untersucht. Während einige Autoren nachweisen konnten, dass AICD zu einer Steigerung der NEP-Expression führt konnte dies in anderen Studien nicht bestätigt werden (BELYAEV et al., 2009; GRIMM et al., 2013b; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005). Ziel dieses Projektes war es daher mit Hilfe verschiedener Methoden, pharmakologischen sowie genetischen Ansätzen, den Einfluss von AICD auf die Neprilysin-Genexpression genauer zu untersuchen und den zugrundeliegenden Regulationsmechanismus aufzuklären. Im Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Zellkultur sowie Inkubationen mit Inhibitoren (u. a. Endozytoseinhibitor).

In Presenilin 1/2-defizienten sowie APP/APLP2-defizienten MEF-Zellen konnte eine signifikante Reduktion der NEP-Genexpression, des Proteingehaltes und der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dies ließ sich auch nach Inkubation mit einem γ -Sekretase-Inhibitor bestätigen. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit AICD eine Steigerung der NEP-Genexpression und Aktivität bewirkt. Auch mittels genetischer Überexpression des C50-Fragments ließ sich dieser Effekt vom AICD objektivieren. Interessanterweise konnte mit verschiedenen Inhibitoren und defizienten Zelllinien gezeigt werden, dass die Genexpressionssteigerung durch AICD nur im Zusammenhang mit der β -Sekretase beobachtet werden kann, sich aber nicht durch die α -Sekretase beeinflussen lässt. Die AICD-vermittelte Steigerung der Genexpression von Neprilysin ließ sich auch im Mausmodell bestätigen.

Die Ergebnisse der Studie konnten somit die Beteiligung von AICD bei der Transkription von NEP *in vitro* und *in vivo* bestätigen. Mit Hilfe verschiedener Methoden und unterschiedlicher Modelle ließ sich nachweisen, dass überwiegend das aus der amyloidogenen Prozessierung stammende AICD eine transkriptionelle Aktivität zu besitzen scheint. Für die vorliegende Arbeit waren diese Ergebnisse wichtig, da am Beispiel von NEP der Einfluss von AICD auf die Genexpression von verschiedenen Enzymen nochmals bestätigt werden konnte. Bei der Untersuchung des Einflusses der APP-Prozessierung auf die Sulfatid-Synthese war dies von besonderer Bedeutung für die weiteren Versuche.

4.7.6 Die Presenilin-abhängige APP-Prozessierung reguliert die Glucosylceramid-Synthase und ist im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung verändert.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *Cellular Physiology and Biochemistry*.

Grimm, M.O.*, Hundsdorfer, B.*, Grosgen, S., Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Stahlmann, C.P., Hauptenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Lehmann, J., Patzold, A., Zinser, E.G., Tanila, H., Shen, J., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 34, 92-110. (GRIMM et al., 2014a)

Ganglioside sind glykosylierte Sphingolipide deren Biosynthese durch die Bindung von Glukose an Ceramide initiiert wird. Dieser erste, geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gangliosid-Synthese wird durch die GCS katalysiert, die somit für die Entstehung aller Ganglioside essentiell ist. Ganglioside besitzen vor allem im neuronalen Gewebe eine relevante Funktion in der Differenzierung und Proliferation von Zellen (DEGROOTE et al., 2004). In einigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Alzheimer-Erkrankung und dem zerebralen Gangliosid-Gehalt nachgewiesen werden (CHAN et al., 2012; CUTLER et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich das Gangliosid GM1 über verschiedene Mechanismen negativ auf die APP-Prozessierung, A β -Synthese und A β -Aggregation auswirkt (YANAGISAWA et al., 1995; ZHA et al., 2004). Ziel dieses Projektes war es daher zu untersuchen inwiefern die APP-Prozessierung auch die Gangliosid-*de novo*-Synthese beeinflussen könnte. Im Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Durchführung den Western Blot-Analysen von A β , sAPP α und sAPP β nach Langzeit-Inkubation mit Glucosylceramid (GlucCer) und DL-PDMP.

In Presenilin- bzw. APP/APLP2-defizienten-MEF-Zellen zeigte sich ein erhöhter Gangliosid-Gehalt, wobei insbesondere auch der GlucCer-Gehalt als Vorläuferlipid gesteigert war. Dies konnte zurückgeführt werden auf eine verstärkte Genexpression, einen erhöhten Proteingehalt und eine gesteigerte Aktivität der GCS. Diese Ergebnisse ließen sich auch im Gehirngewebe von APP- bzw. PS1/2-defizienten Mäusen bestätigen. Aufgrund der diskutierten Funktion von AICD bei der Transkription verschiedener Enzyme wurde vermutet, dass AICD möglicherweise eine Reduktion der GCS-Genexpression bewirken könnte. Während sich die GCS-Aktivität nach Inkubation mit AICD reduziert zeigte ließ sich jedoch kein Effekt auf die Genexpression der GCS beobachten. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass die GCS-Genexpression im Gehirngewebe verschiedener Alzheimer-Mausmodelle gesteigert ist. Im zerebralen Gewebe von Alzheimer-Patienten zeigte sich eine Erhöhung des Gangliosid-Gehaltes, welche teilweise ebenfalls auf eine gesteigerte GCS-Genexpression zurückgeführt werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der APP-Prozessierung und der Genexpression der GCS besteht. Möglicherweise besitzt AICD in diesem Zusammenhang eine wichtige Funktion, wobei in weiteren Studien die genaue Wirkung von AICD auf die GCS untersucht werden müsste. Die im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung beobachtete Steigerung des zerebralen Gangliosid-Gehaltes könnte sich darüber hinaus auf die A β -Synthese auswirken, wobei eine Inhibition der GCS in der Zellkultur zu einer Reduktion von A β führte (TAMBOLI et al., 2005). Diese Ergebnisse bestätigen den engen Zusammenhang zwischen den Sphingolipiden und der Alzheimer-Erkrankung weswegen sie eine besondere Bedeutung auch für diese Arbeit besitzen. Ceramide bilden darüberhinaus den Vorläufer der Sulfatide, sodass eine gesteigerte Expression der GCS zu einer Reduktion des Eduktes der Sulfatid-Synthese führt und somit die Sulfatid-Homöostase indirekt beeinflusst.

4.7.7 Steigerung der PGC1 α -Genexpression über einen mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten Stoffwechselweg: Presenilin 1/APP/AICD.

Die nachfolgenden Daten wurden publiziert im *Aging Cell*.

Robinson, A., Grosgen, S., Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Hauptenthal, V.J., Hundsdorfer, B., Stahlmann, C.P., Slobodskoy, Y., Muller, U.C., Hartmann, T., Stein, R., and Grimm, M.O. (2014). Upregulation of PGC-1 α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13, 263-272. (ROBINSON et al., 2014)

PGC1 α dient als Co-Aktivator bei der Transkription und steigert über verschiedene Wege die Genexpression unterschiedlicher Bestandteile des mitochondrialen Energiemetabolismus (RODGERS et al., 2008). Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle im Energiehaushalt der Zelle. Bei der Alzheimer-Erkrankung konnte eine mitochondriale Dysfunktion und reduzierte Expression verschiedener am Energiemetabolismus beteiligter Proteine bereits mehrfach nachgewiesen werden (RIEMER, KINS, 2013). Auch im Mausmodell ließ sich diese Dysregulation feststellen (YAO et al., 2009). Über die Ursache der gestörten mitochondrialen Funktion im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung ist bisher wenig bekannt, sodass es Ziel dieses Projektes sein sollte zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der APP-Prozessierung und der Mitochondrien-Funktion besteht. Im Rahmen dieses Projektes bestand die Beteiligung in der Bestimmung des ATP-Gehaltes in unterschiedlichen Zelllinien sowie der Mithilfe bei Western Blot-Analysen.

Zunächst wurde der Energiehaushalt in Presenilin 1/2-defizienten-Zellen untersucht. Hier zeigte sich, als Zeichen einer gestörten mitochondrialen Funktion, eine Reduktion des ATP-Gehaltes und des Sauerstoff-Verbrauchs bei gleichzeitiger Erhöhung der Membranpotentiale. Die weitere Analyse des Proteoms konnte eine Reduktion des Proteingehaltes von 12 unterschiedlichen mitochondrialen Proteinen nachweisen. Diese ließ sich mittels qRT-PCR auf eine reduzierte Genexpression zurückführen. Unter diesen Proteinen zeigten sich u. a. alle Untereinheiten der ATP-Synthase reduziert, sodass ein gemeinsamer Mechanismus diskutiert wurde. Die Expression der Proteine der Atmungskette wird reguliert

über den Superaktivator PGC1 α der mit den unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren interagiert. Tatsächlich zeigte sich in den Presenilin1/2-defizienten-Zellen eine Reduktion der PGC1 α -Genexpression und des PGC1 α -Proteingehaltes. Der Effekt auf die Genexpression von PGC1 α ließ sich schließlich auch in APP/APLP2-defizienten-Zellen und APP Δ CT15-Zellen nachweisen, sodass Presenilin über das Prozessierungsprodukt AICD auf die Expression von PGC1 α Einfluss zu nehmen scheint. Tatsächlich konnte in Folge einer Inkubation mit AICD die PGC1 α -Genexpression und Promotoraktivität gesteigert werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch im murinen Hirngewebe von APP-defizienten- bzw. APP Δ CT15-Mäusen bestätigen.

Zusammenfassend konnte eine Regulation der mitochondrialen Funktion über die Presenilin-abhängige Synthese von AICD nachgewiesen werden. Hierbei bewirkt die Steigerung der PGC1 α -Genexpression die Stimulation einer Vielzahl von Proteinen des mitochondrialen Stoffwechsels. Eine mögliche Beeinträchtigung dieses Mechanismus, beispielsweise durch eine Presenilin-FAD-Mutation könnte somit zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit konnte im Rahmen einer früheren Studie gezeigt werden, dass sich in PGC1 α -Knock-out-Mäusen eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes beobachten lässt (KIEBISH et al., 2012). Dies legt eine direkte Verbindung zwischen Sulfatiden, AICD und der mitochondrialen Funktion nahe.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es die wechselseitige Beeinflussung des Sulfatid-Metabolismus und der APP-Prozessierung in Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung zu untersuchen. Hierbei sollte geprüft werden in wie weit der Sulfatid-Gehalt im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten verändert ist und ob eine Beeinflussung des Sulfatid-Metabolismus durch die APP-Prozessierung vorliegt. Umgekehrt sollten auch die Auswirkungen eines veränderten Sulfatid-Gehaltes auf die APP-Prozessierung analysiert werden. Somit sollte untersucht werden, ob ein veränderter Sulfatid-Gehalt im Laufe der Alzheimer-Erkrankung die pathophysiologischen Prozesse beeinflusst oder umgekehrt Folge der Erkrankung ist, wobei auch eine wechselseitige Beeinflussung möglich wäre.

5.1 Sulfatid-Gehalt im Gehirn während des physiologischen Alterungsprozesses

Der Untersuchung der Lipid-Komposition im Gehirn von Alzheimer-Patienten und deren Bedeutung für die pathophysiologischen Prozesse kam in den letzten Jahren vermehrte Bedeutung zu (zusammengefasst in: (GRIMM et al., 2017b; WONG et al., 2017)). Die Trockenmasse des menschlichen Gehirns besteht zu 60 % aus Lipiden. In einigen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass sich während des physiologischen Alterungsprozesses die Lipidzusammensetzung im Gehirn verändert. Dabei konnten Svennerholm et. al. eine signifikante Reduktion des kortikalen Cholesteringehaltes mit zunehmendem Alter nachweisen. Innerhalb der Weißen Substanz zeigte sich zudem eine Reduktion des Sulfatid-Gehaltes während des Alterungsprozesses (SVENNERHOLM et al., 1994).

Die Analyse des Sulfatid-Gehaltes aus der hier verwendeten Grauen Substanz in Korrelation zum Alter der Patienten konnte in unserer Kohorte keine signifikante Veränderung nachweisen (Abbildung 7). Ob in der Weißen Substanz ein altersabhängiger Verlust der Sulfatide nachweisbar gewesen wäre, konnte bei fehlendem Material nicht weiter untersucht werden. In der von Svennerholm et al. publizierten Studie wurde eine signifikante Sulfatid-Reduktion nur zwischen der Gruppe der unter 40-Jährigen und der Gruppe der über 80-jährigen nachgewiesen (SVENNERHOLM et al., 1994). Die hier vorliegende Kohorte beinhaltet jedoch nur Patienten zwischen 63 und 88 Jahren, sodass sich möglicherweise aufgrund des geringeren Altersunterschiedes keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen. Im Gegensatz zur Studie von Svennerholm wurden in dieser Arbeit keine Altersgruppen miteinander verglichen, sondern es erfolgte eine Korrelations-Analyse. Auch hierdurch könnten die unterschiedlichen Ergebnisse begründet sein. Einer der wichtigsten Risikofaktoren bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung ist das Alter, sodass man vermuten könnte, dass neben anderen Faktoren auch die Veränderung der Lipidzusammensetzung des Gehirns im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses eine Rolle für die Erkrankung spielt. Treten dann die erkrankungsspezifischen pathologischen Prozesse hinzu, könnten die physiologischen Kompensationsmechanismen nicht mehr ausreichen und so die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung begünstigen. Für die Untersuchungen aus humanem Hirngewebe im Rahmen dieser

Arbeit war es aus diesem Grund wichtig, dass sich keine signifikanten Unterschiede im Alter der beiden Patientengruppen ergaben, um hierdurch bedingte Nebeneffekte auszuschließen.

5.2 Zerebraler Sulfatid-Gehalt bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen

Im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems konnten bereits Veränderung des Lipidgehaltes bestimmter Lipidklassen im Gehirn nachgewiesen werden. Hierzu zählen insbesondere die genetisch bedingten neurodegenerativen Erkrankungen bei denen es durch Enzymdefekte des Lipidstoffwechsels zu einer Akkumulation von verschiedenen Lipiden kommt. Zu diesen sog. Lysosomalen-Speichererkrankungen gehört auch die Metachromatische Leukodystrophie (MLD). In Folge eines Defektes des für den Sulfatid-Katabolismus verantwortlichen Enzyms Arylsulfatase A, kommt es zu einer Akkumulation von Sulfatiden in den lysosomalen Kompartimenten von Oligodendrozyten, Schwannzellen, Astrozyten und auch Neuronen. Die Anreicherung der Sulfatide führt zu einer Demyelinisierung und stimuliert die Bildung von inflammatorischen Zytokinen (zusammengefasst in (VAN RAPPARD et al., 2015)). Es werden in Abhängigkeit der Schwere des Gendefektes drei Formen der Erkrankung unterschieden, welche sich in unterschiedlichen Lebensphasen präsentieren. Bei der infantilen Variante führt eine homozygot vorliegende Mutation im ARSA Gen zum vollständigen Verlust des funktionsfähigen Enzyms. Bereits im Alter von weniger als 2,5 Jahren treten schwere Ataxien, zentrale Paresen sowie epileptische Anfälle auf. Die Erkrankung verläuft innerhalb von wenigen Jahren tödlich. Die juvenile Variante kann zwischen dem 2. Lebensjahr und dem 16. Lebensjahr auftreten. Meist besteht ein heterozygoter Gendefekt wodurch eine unzureichende Menge an funktionsfähiger Arylsulfatase A gebildet wird. Die Erkrankung verläuft langsamer als bei der infantilen Form der Erkrankung. Leitsymptom ist ebenfalls eine Ataxie und spastische Parese, epileptische Anfälle können vorkommen. Bei der adulten Form der MLD treten erste Symptome erst nach dem 16. Lebensjahr auf. Die Akkumulation der Sulfatide erfolgt deutlich langsamer, da die vorliegenden Gendefekte lediglich eine reduzierte Enzymaktivität zur Folge haben. Erste Symptome sind häufig Verhaltensauffälligkeiten und kognitive Defizite, die Erkrankung verläuft meist erst nach mehreren Jahrzehnten tödlich (zusammengefasst in (VAN RAPPARD et al., 2015)). Insbesondere die adulte Variante der MLD zeigt, dass ein funktionsfähiger Sulfatid-Metabolismus für die kognitiven Funktionen im menschlichen Gehirn notwendig ist. Während die frühe Akkumulation von Sulfatiden in der Entwicklung insbesondere zu motorischen Defiziten führt, scheinen im Erwachsenenalter Sulfatide eher für höhere zerebrale Funktionen wie Emotionen und Kognition von Bedeutung zu sein. Für die pathophysiologischen Prozesse bei der Alzheimer-Erkrankung lässt sich somit schließen, dass ein veränderter Sulfatid-Metabolismus sich auch auf die kognitiven Funktionen auswirken könnte. Ähnlich wie bei der Alzheimer-Erkrankung ließen sich auch bei Patienten mit MLD erhöhte Spiegel für Tau und phosphoryliertes Tau im Liquor nachweisen, während A β in unveränderter Konzentration vorlag (TARASIUK et al., 2012). Dies unterstreicht die Zusammenhänge zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und dem Sulfatid-Metabolismus.

Neben den genetisch bedingten neurodegenerativen Erkrankungen sind in den letzten Jahren auch für sporadisch auftretende neurodegenerative Erkrankungen Veränderungen des Lipidgehaltes im Gehirngewebe nachgewiesen worden. Veränderungen der Lipidzusammensetzung des Gehirns wurden im Zusammenhang der Multiplen Sklerose sowie der Parkinson-Erkrankung (FABELO et al., 2011; HALLETT et al., 2018) und nicht zuletzt im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung beschrieben. Fabelo et al. konnten zeigen, dass bei Parkinson Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe im Krankheitsverlauf eine altersunabhängige Reduktion des Sulfatid-Gehaltes auftritt (FABELO et al., 2011). Dies ist auch im Hinblick auf die Alzheimer-Erkrankung von Interesse, da im Verlauf der Parkinson-Erkrankung ebenfalls eine dementielle Entwicklung auftreten kann. Hierbei konnte an *post mortem* Proben von Parkinson Patienten mit Demenz gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Ablagerung von A β im Striatum dieser Patienten kommt (KALAITZAKIS et al., 2008). Bisher existieren jedoch keine Daten dazu, ob die Reduktion des Sulfatid-Gehaltes bei Parkinson-Patienten mit Demenz höher ist als bei Patienten ohne Demenz.

Ebenfalls von Interesse könnte die Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes bei Patienten mit affektiven Störungen sein. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung des Ceramid-Gehaltes im Hippocampus, depressive Verhaltensmuster bei Mäusen ausgelöst werden können (GULBINS et al., 2013). Ceramide bilden dabei die Vorläufer der Sulfatide, sodass auch eine verstärkte Sulfatid-Degradation zu einem Anstieg des Ceramid-Gehaltes führen könnte. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte für Sphingomyelin bereits gezeigt werden, wobei eine Verschiebung des Gleichgewichts von Ceramiden hin zu Sphingomyelin protektiv bei Depressionen zu sein scheint (GULBINS et al., 2018). Auch einige der heute verwendeten Antidepressiva, wie beispielsweise Amitriptylin oder Fluoxetin, greifen an diesem Mechanismus an und reduzieren, durch die Inhibition der azidischen Sphingomyelinase, die Konzentration von Ceramiden bei gleichzeitiger Steigerung des Sphingomyelin-Gehaltes (GULBINS et al., 2013). Depressionen zählen zu den häufigen Frühsymptomen der Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung (BENNETT, THOMAS, 2014; MARSH, 2013), sodass hier möglicherweise ebenfalls eine Veränderung des Sphingolipid-Stoffwechsels zu Grunde liegen könnte.

Diese Beispiele zeigen, dass der Sphingolipid-Metabolismus und der Sulfatid-Gehalt des Gehirns nicht nur für die physiologischen Prozesse wichtig sind, sondern auch maßgeblich an der Pathophysiologie von unterschiedlichen Erkrankungen beteiligt sein können.

5.3 Sulfatid-Gehalt im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich in den vergangenen Jahren mit der Veränderung der Lipid Komposition im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung. Ursächlich für dieses Interesse waren, neben der membrangebundenen APP-Prozessierung, u. a. die frühen GWAS-Studien (engl. „*Genome wide association Study*“) in denen der ApoE ϵ 4-Status als wichtigster genetischer Risikofaktor für die Entstehung

der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden konnte (CORDER et al., 1993). Die physiologische Funktion von ApoE im menschlichen Gehirn ist dabei der Transport von Lipiden, u. a. auch von Sulfatiden, weswegen ein Zusammenhang zwischen Lipiden und der Alzheimer-Erkrankung naheliegend ist (HAN et al., 2003a). Bereits 2002 konnte in einer Studie von Han et al. gezeigt werden, dass eine starke Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von Alzheimer-Patienten vorliegt (HAN et al., 2002). Diese Veränderungen ließen sich, trotz des höheren Sulfatid-Gehaltes in der Weißen Substanz, deutlicher in der Grauen Substanz nachweisen und traten bereits in den Frühstadien der Alzheimer-Erkrankung auf. Aufgrund der geringen Fallzahl folgten weitere Studien um die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse in verschiedenen Kohorten zu überprüfen. Interessanterweise ließen sich jedoch keine konsistenten Daten bezüglich des Sulfatid-Gehaltes im Alzheimer-Gehirngewebe nachweisen. Während in zwei folgenden Studien keine signifikante Veränderung des Sulfatid-Gehaltes (CHAN et al., 2012; CUTLER et al., 2004) gemessen wurde, zeigte sich in zwei weiteren Studien ebenfalls eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in der Grauen Substanz (CHENG et al., 2013; GÓNZALEZ DE SAN ROMÁN et al., 2017). Bandaru et al. konnten hingegen nur eine signifikante Reduktion in der Weißen Substanz, nicht aber in der Grauen Substanz nachweisen (BANDARU et al., 2009). Auf die methodischen Unterschiede der Studien und hierdurch bedingte Abweichungen der Ergebnisse soll im Verlauf der Arbeit noch näher eingegangen werden. Tabelle 22 fasst die Ergebnisse der einzelnen Studien nochmals tabellarisch zusammen.

Tabelle 22: Literatur-Zusammenfassung: Sulfatid-Gehalt im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten. Zusammenfassung der bisherigen Literatur über die Veränderungen des zerebralen Sulfatid-Gehaltes im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung.

Publikation	Methodik	Effekte	Ergebnisse
	<i>Probenzahl</i>	<i>Trennung graue/weiße Substanz</i>	
(HAN et al., 2002)	ESI/MS <i>CDR 0 (n=5) CDR 0,5 (n=3) CDR 1 (n=4) CDR 2 (n=6) CDR 3 (n=4)</i>	Ja	↓↓
			<ul style="list-style-type: none"> • 91% Gesamt-Sulfatid Reduktion in Grauer Substanz im Temporallappen • 51% Gesamt-Sulfatid Reduktion in Weißer Substanz im Temporallappen
(CUTLER et al., 2004)	ESI/MS <i>Kontr. (n=2), Mild (n=5), Moderat (n=8), Schwer (n=12)</i>	Nein	→
			<ul style="list-style-type: none"> • Keine signifikante Veränderung des Sulfatid-Gehaltes in isolierten Membranen

Publikation	Methodik	Effekte	Ergebnisse
	<i>Probenzahl</i>	<i>Trennung graue/weiße Substanz</i>	
(BANDARU et al., 2009)	ESI/MS <i>Kontr. (n=26), AD (n=30)</i>	Nein	→ ↓
			<ul style="list-style-type: none"> Keine signifikante Veränderung des Sulfatid-Gehaltes in der Grauen Substanz 78%ige Reduktion in der Weißen Substanz
(CHAN et al., 2012)	ESI/MS <i>Kontr. (n=10), AD (n=10)</i>	Nein	(↓)
			<ul style="list-style-type: none"> Tendenzielle, nicht signifikante Reduktion der Gesamt-Sulfatide
(CHENG et al., 2013)	MALDI-TOF/MS <i>Kontr. (n=6), pre-clin. AD (n=8)</i>	Ja	↓
			<ul style="list-style-type: none"> 35 % Reduktion der Gesamt-Sulfatide 24:0 Sulfatid 40 % Reduktion
(GÓNZALEZ DE SAN ROMÁN et al., 2017)	MALDI-IMS <i>Kontr (n=5), Braak I-II (n=5), Braak III-IV (n=5), Braak V-VI (n=5)</i>	Ja	↓↓
			<ul style="list-style-type: none"> 50 % Reduktion der Gesamt-Sulfatide in der Grauen Substanz des Frontallappens Nicht signifikante Reduktion in der Weißen Substanz
Daten dieser Arbeit	Kontr. (n=10), AD (n=20)	Ja	↓
			<ul style="list-style-type: none"> 28 % Reduktion der Gesamt-Sulfatide in der Grauen Substanz des Frontallappens

Aufgrund der Diskrepanz der Studienlage, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Sulfatid-Gehalt im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer alters- und geschlechtskorrelierten Kontrollgruppe in einer größeren Kohorte nochmals untersucht werden. Es zeigte sich in der verwendeten Kohorte in der Grauen Substanz des Frontallappens von Alzheimer-Patienten eine signifikante Reduktion des Gesamt-Sulfatid-Gehaltes um ca. 28 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4). Im Weiteren sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Sulfatid-Reduktion nur aus einem Verlust der langkettigen Fettsäuren resultiert. Diese machen, aufgrund ihrer Anreicherung in der Myelinscheide, den weitaus größten Anteil der zerebralen Sulfatide aus. Unter der Annahme, dass die massenspektrometrisch erfasste Intensität der einzelnen Spezies direkt mit dem tatsächlichen Spiegel korreliert, liegen in unserer Population 96,5 % der Sulfatide in Form von langkettigen Spezies (C 22-24) vor. Dies gilt jedoch nur, wenn die Substanz-spezifische Beeinflussung von Matrix-Effekten, Ionisierbarkeit oder der Coulomb-Explosion sich zwischen den unterschiedlichen Spezies nicht unterscheiden. Es wäre somit denkbar, dass die Verminderung der Sulfatide nur Folge eines Verlustes langkettiger Fettsäuren ist. In

der differenzierten Analyse ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Sulfatid-Spezies, sondern eine Reduktion aller Sulfatid-Spezies nachweisen (Abbildung 6). Somit wurde vermutet, dass die Verminderung der Sulfatide auf einer Reduktion der gesamten Lipidklasse beruht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichbare Effektstärke wie in der Studie von Cheng. et al. beobachtet (CHENG et al., 2013). Dabei wurde im Vergleich zu den bisherigen Studien, eine größere Probenzahl analysiert (n = 10 Kontrollen, n = 20 Alzheimer-Proben). Lediglich Bandaru et. al. verwendeten im Rahmen ihrer Studie eine noch größere Probenzahl. Insbesondere bei der Studie von Cutler et al. (CUTLER et al., 2004) fällt die geringe Zahl an Kontrollproben (n = 2) auf, wodurch sich möglicherweise bei einer vergleichsweise großen interindividuellen Varianz des kortikalen Sulfatid-Gehaltes das negative Ergebnis dieser Studie erklären lässt. Zudem erfolgte hier, die Analyse im Gegensatz zu den anderen Studien nicht aus Homogenaten, sondern aus isolierten Membranen. Weitere Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien könnten Diskrepanzen in der *post mortem* Zeit, der Blutkontamination und den unterschiedlichen Homogenisierungsverfahren sein.

Betrachtet man sich die Studien genauer die keine signifikanten Veränderungen der Sulfatide zeigten, fällt auf, dass Chan et al. ebenfalls eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante, Reduktion der Sulfatide beobachten konnten (CHAN et al., 2012). Methodische Unterschiede der Studie ergeben sich, ebenso wie für die Studien von Bandaru et al. (BANDARU et al., 2009) und Cutler et. al. (CUTLER et al., 2004) insbesondere durch die rein makroskopische Trennung der Weißen- und Grauen Substanz. Die exakte Trennung der Grauen- und Weißen Substanz ist bei der Analyse von Sulfatiden jedoch von besonderer Bedeutung, da der Sulfatid-Gehalt in der Weißen Substanz ca. 2,5-mal höher ist als in der Grauen Substanz (HAN et al., 2002). Eine ungenaue Trennung des Gewebes führt somit zu einer höheren Varianz, zum anderen könnten sich unterschiedlich große Anteile Weißer Substanz zwischen den Kohorten auch positiv oder negativ auf die beobachteten Effekte auswirken.

Für die Proben dieser Arbeit wurde die Reinheit der Grauen Substanz durch eine Analyse des Protein/Nassgewicht-Verhältnisses i. R. einer vorangehenden Arbeit überprüft. Während man für die Weiße Substanz ein Verhältnis von 11 mg Protein/g Nassgewicht annimmt, besteht in der Grauen Substanz mit etwa 71 mg Protein/g Nassgewicht ein deutlich höherer Protein-Gehalt (MYLONAS, 2015). Proben mit einem Verhältnis von weniger als 55,8 mg Protein/g Nassgewicht (einfache Standardabweichung) wurden unter der Annahme eines zu hohen Anteils Weißer Substanz für die Messungen nicht verwendet (MYLONAS, 2015). Das Protein/Nassgewicht-Verhältnis zwischen den beiden hier verwendeten Kohorten zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die verwendete Methode kann eine geringe Verunreinigung durch Weiße Substanz nicht gänzlich ausschließen, hat jedoch den Vorteil, dass hierbei kein zusätzliches *in vivo* Material verbraucht wird, da eine Bestimmung des Proteingehaltes generell vor jeder massenspektrometrischen Analyse erfolgte.

In den Studien von Han et al., sowie Cheng et al. erfolgte die Unterscheidung der Gewebearten anhand des Lipidprofils, wobei ein PE 18:1-18:1 zu 18:0-22:6 Verhältnis von weniger als 0,12 für die Definition der Grauen Substanz verwendet wurde (CHENG et al., 2013; HAN et al., 2002). Ebenso konnten San Roman et al. mit der Methode der MALDI-Imaging-Massenspektrometrie (IMS) eine gezielte, räumliche Analyse der Sulfatide aus dem kortikalen Gewebe durchführen, wobei aufgrund der Methode eine Verunreinigung durch Weiße Substanz sicher ausgeschlossen werden kann. Auch hier ließ sich eine signifikante, ca. 50%ige Reduktion der kortikalen Sulfatide nachweisen. Diese Daten zeigen, dass eine signifikante Veränderung der Sulfatide in der Grauen Substanz vermutlich nur beobachtet werden kann, wenn eine strikte Trennung zwischen der Weißen- und Grauen Substanz im Vorfeld erfolgt. Bei einer Effektstärke von ca. 30 % würden beispielsweise 20 % mehr Weiße Substanz bei den Alzheimer Proben im Vergleich zu den Kontrollen die Effekte bereits ausgleichen.

Neben der Analyse der Gesamt-Sulfatide erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auch eine getrennte Auswertung der kurzkettigen (18–20 C-Atome) und langkettigen (22–24 C-Atome) Sulfatide. Es zeigte sich dabei für beide Kettenlängen eine Reduktion der Sulfatide, wobei sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ergaben (Abbildung 4). Während sich die langkettigen Sulfatide überwiegend in den Oligodentroyten anreichern, finden sich die kurzkettigen Sulfatide vor allem innerhalb der Membran von Neuronen (PERNBER et al., 2002). Somit weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass die Reduktion der Sulfatide sowohl in Oligodentroyten als auch Neuronen und Astrozyten stattfinden könnte. Um die Veränderungen der Sulfatide Zelltyp-spezifisch zu analysieren wären jedoch andere Methoden besser geeignet. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ließe sich beispielsweise durch eine Antikörper-basierte Markierung von Sulfatiden eine eindeutige räumliche Zuordnung zu verschiedenen Zelltypen erreichen. Die Immunfluoreszenz-basierte Markierung von Lipiden ist im Vergleich zur Massenspektrometrie jedoch weniger spezifisch, sodass hier die Massenspektrometrie überlegen ist.

Das Braak-Stadium gilt als eine der wichtigsten neuropathologischen Kategorisierungen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathologie, wobei ein höheres Braak-Stadium mit einer weiter fortgeschrittenen Erkrankung und Zunahme der Tau-Pathologie korreliert (BRAAK, BRAAK, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der analysierten Kohorte der Sulfatid-Gehalt negativ mit dem Braak-Stadium korreliert. Ein signifikanter Unterschied ließ sich dabei zwischen Braak-Stadium I–II und V–VI nachweisen. Auch in einer früheren Studie konnte bereits eine negative Korrelation des Sulfatid-Gehaltes mit dem Braak-Stadium gezeigt werden (CHENG et al., 2013). Im Rahmen dieser früheren Studie beschreiben die Autoren, dass die Reduktion der Sulfatide bereits in präklinischen Phasen der Alzheimer-Erkrankung nachweisbar ist. Diesbezüglich kann im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Aussage getroffen werden, da nur Patientenproben von bereits klinisch Erkrankten verwendet wurden und keine spezifischen Informationen über die kognitiven Leistungen der Kontrollgruppe existieren.

tieren. Im Hinblick auf künftige Studien sollten daher auch die Kriterien des „Mild Cognitive Impairment“ in der Kontrollgruppe überprüft werden. Ließe sich bestätigen, dass die Sulfatid-Reduktion bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auftritt, könnte vermutet werden, dass diese nicht nur Folge der pathophysiologischen Prozesse ist, sondern auch daran mitbeteiligt sein könnte.

Zusammenfassend konnte, unter Verwendung stringenter Kriterien zur Trennung der Grauen Substanz, die in der Literatur beschriebene Reduktion der Sulfatide im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung bestätigt werden. Dies unterstreicht die mögliche Rolle der Sulfatide im Zusammenhang mit der Erkrankung. Die Ursache des Verlusts der Sulfatide konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, wobei ein ApoE vermittelter Mechanismus diskutiert wird. Ziel dieser Arbeit war es daher im Weiteren einen Zusammenhang zwischen der Alzheimer-Erkrankung und dem Sulfatid-Metabolismus herzustellen und zu untersuchen ob der Verlust der Sulfatide Ursache oder Konsequenz der Erkrankung ist.

5.4 ApoE und Sulfatide im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung

Wie im vorangehenden Abschnitt geschildert kann im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung eine Reduktion der kortikalen Sulfatide beobachtet werden. ApoE bildet den wichtigsten genetischen Risikofaktor für die Entstehung der sporadischen Alzheimer-Erkrankung und scheint früheren Studien zufolge auch eine Rolle bei der Regulation des zerebralen Sulfatid-Gehaltes zu besitzen. In ApoE^{-/-}-Mäusen ließ sich eine signifikante Steigerung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes im Vergleich zur ApoE-Wildtyp-Maus nachweisen (HAN et al., 2003a). Es wäre somit denkbar, dass die Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung in Zusammenhang mit dem ApoE-Status steht.

Beim Menschen existieren drei verschiedene Isoformen des Apolipoprotein E: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Im Vergleich zum homozygoten $\epsilon 3$ -Genotyp erhöht sich, durch das Verschieben des Alters bei Symptombeginn, das Alzheimer Risiko durch das heterozygote Vorliegen des $\epsilon 4$ -Genotyps um das 2–3-fache, während homozygote Träger der $\epsilon 4$ Variante ein 14-fach erhöhtes Alzheimer Risiko besitzen. Das homozygote Vorliegen des $\epsilon 2$ -Genotyps wirkt sich im Gegensatz hierzu protektiv aus und senkt das Risiko im Vergleich zum homozygoten $\epsilon 3$ -Genotyp um etwa die Hälfte (FARRER et al., 1997).

Han et al. konnten zeigen, dass im Mausmodell im kortikalen Gewebe eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in Abhängigkeit des ApoE-Genotyps auftritt. Dabei führten sowohl der humane ApoE $\epsilon 3$ -Genotyp als auch der humane ApoE $\epsilon 4$ -Genotyp im Vergleich zur Wildtyp-Maus zu einem verminderten Sulfatid-Gehalt. Die Gesamt-Sulfatide zeigten sich dabei beim $\epsilon 4$ -Genotyp am stärksten reduziert (HAN et al., 2003a). Die Autoren konnten weiterhin nachweisen, dass im Liquor von kognitiv nicht beeinträchtigten Patienten der Sulfatid-Gehalt abhängig vom ApoE-Genotyp ist. Das homozygote

oder heterozygote Vorliegen des $\epsilon 4$ -Genotyps führte dabei zu einem erhöhten Sulfatid-Gehalt im Liquor, sodass gefolgert wurde, dass der zerebrale Sulfatid-Gehalt möglicherweise durch einen vermehrten Abtransport der Sulfatide sinkt (HAN et al., 2003a).

Neben seiner Rolle beim Transport von Lipiden wird ApoE auch eine Funktion im Metabolismus von A β zugeschrieben, wobei in Abhängigkeit des ApoE-Genotyps eine stärkere Akkumulation ($\epsilon 4 > \epsilon 3 > \epsilon 2$) von neuritischen Plaques beobachtet wurde (HOLTZMAN et al., 2000). Im Zusammenhang mit dem Sulfatid-Metabolismus konnten Han et al. im Zellkulturmodell zeigen, dass die ApoE-abhängige Aufnahme von A β in die Zelle durch Sulfatide signifikant verstärkt wird. Gleichzeitig ließen sich in Abhängigkeit des ApoE-Genotyps verschieden starke Effekte der Sulfatide auf die A β -Aufnahme verzeichnen. Die Zugabe von Sulfatiden hatte dabei den größten Effekt bei Vorliegen des $\epsilon 4$ -Genotyps (ZENG, HAN, 2008). Diese Daten zeigen, dass ein enger Zusammenhang zwischen Sulfatiden und dem ApoE Status besteht. Der reduzierte Sulfatid-Gehalt bei Alzheimer-Patienten könnte somit Folge eines vermehrten Lipoprotein-vermittelten Abtransportes zur Beseitigung von A β sein.

Ein weiteres mit ApoE und dem Lipidtransport assoziiertes Protein bildet LRP1. Ein Polymorphismus von LRP1 konnte dabei als geringer Risikofaktor für die Entstehung der sporadischen Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden (LAMBERT et al., 1998). LRP1 scheint dabei maßgeblich für den Transport von A β über die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich zu sein, wobei eine stärkere Bindung, und somit Beseitigung von A β_{40} im Vergleich zu länger-kettigen A β -Peptiden vorliegt (DEANE et al., 2004). Ein Knock-Out des neuronalen LRP1 führt dabei zu einem altersabhängigen Verlust von Synapsen und einer zunehmenden Neurodegeneration. In diesen Mäusen ließ sich außerdem eine signifikante Reduktion des zerebralen Sulfatid-Gehaltes beobachten (LIU et al., 2010). Es wurde bisher nicht untersucht, ob der Verlust der Sulfatide für die beobachtete Neurodegeneration mitverantwortlich ist oder nur Folge des LRP1-Verlustes ist. In einer neueren Studie ließ sich zudem eine Verminderung der LRP1-Genexpression durch A β_{42} nachweisen (BARUCKER et al., 2014). Somit könnte der erhöhte A β_{42} -Gehalt im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung eine verminderte LRP1-Genexpression bedingen. Entsprechend des LRP1-Knock-Out-Modells könnte dies ein möglicher Mechanismus der Reduktion des zerebralen Sulfatid-Gehaltes während der Alzheimer-Erkrankung sein.

Aufgrund dieser Daten sollte bei der Untersuchung des Sulfatid-Gehaltes in *post mortem* Gehirngewebe auch der ApoE-Status mitbetrachtet werden. Entsprechend des von Han et al. postulierten Modells könnten hier Unterschiede zwischen den verschiedenen Subgruppen vorliegen wobei der $\epsilon 4$ -Genotyp mit einer stärkeren Sulfatid-Depletion assoziiert sein könnte. Im Gegensatz hierzu konnten Bandaru et al. jedoch eine Steigerung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes bei Alzheimer-Patienten mit ApoE $\epsilon 4$ -Genotyp im Vergleich zum $\epsilon 3$ -Genotyp feststellen (BANDARU et al., 2009). Für die in der hiesigen Arbeit verwendeten Proben war der ApoE-Status nicht bekannt, sodass diesbezüglich keine Subgruppenanalyse

möglich war. Durch die Unterteilung in 6 verschiedene Subgruppen würde die Anzahl der Proben pro Gruppe zu klein um eine statistische Signifikanz zu erreichen, sodass diese Analyse nicht erfolgt ist. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen wären erforderlich um die Auswirkung des ApoE-Status auf den Sulfatid-Gehalt im menschlichen Gehirn unter physiologischen Bedingungen, sowie unter pathophysiologischen Umständen bei der Alzheimer-Erkrankung zu untersuchen.

5.5 Sulfatid-Synthese und -Degradation im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung

Für die in Abschnitt 5.3 beschriebene Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung können mehrere Ursachen diskutiert werden. Die bereits beschriebenen Zusammenhänge zu ApoE und LRP1, wirken sich entsprechend des vorangehenden Abschnittes überwiegend auf den Transport der Sulfatide aus. Eine Verminderung des Sulfatid-Gehaltes könnte jedoch auch in Folge einer reduzierten Sulfatid-Synthese oder eines vermehrten Abbaus des Lipids auftreten.

Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein zu analysieren, ob sich die reduzierten Sulfatid-Spiegel im *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten durch eine reduzierte Sulfatid-Synthese erklären lassen. Es erfolgten daher Expressionsanalysen der für die Sulfatid-Synthese verantwortlichen Enzyme CGT und CST (siehe hierzu auch Abbildung 2). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression beider Enzyme, wobei für die CST eine bis zu 3-mal höhere, für die CGT eine bis zu 2-mal höhere Expression im *post mortem* Gehirngewebe der Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden konnte (Abbildung 25). Interessanterweise konnten Katsel et al. im Rahmen einer Analyse des Sphingolipid-Stoffwechselwegs mittels MicroArray-Versuch ebenfalls eine gesteigerte Genexpression der CGT im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten nachweisen (KATSEL et al., 2007). Im Falle der Alzheimer-Erkrankung scheint eine verminderte Expression der Enzyme CGT und CST somit nicht ursächlich für die niedrigeren Sulfatid-Spiegel zu sein. Es muss jedoch beachtet werden, dass mittels mRNA-Isolation und qRT-PCR Analysen bzw. MicroArray-Versuch lediglich Veränderungen der Expression der beteiligten Enzyme gemessen werden können. Es ist keine Aussage zur Enzymaktivität oder zum Proteingehalt dieser Enzyme möglich, sodass trotz der vermehrten Genexpression eine reduzierte Sulfatid-Synthese vorliegen könnte. Wichtig ist außerdem zu beachten, dass nur die mRNA-Spiegel zum Zeitpunkt des Sterbens betrachtet werden können, eine reduzierte Genexpression zu Beginn der Erkrankung kann im Rahmen einer solchen Analyse ebenfalls nicht erfasst werden. Aufgrund der in der gleichen Kohorte nachgewiesenen Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in der untersuchten Hirnregion (siehe Abschnitt 5.3) könnte die gesteigerte Genexpression jedoch auch Ausdruck von Gegenregulationsmechanismen sein.

Bisher ist wenig bekannt über die Regulationsmechanismen der Sulfatid-Synthese im neuronalen Gewebe. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass Vitamin K eine regulatorische Wirkung auf die Sulfatid-Synthese im Mausmodell besitzt. Hierbei führte eine Vitamin K-reiche Diät zu einem

Anstieg der CST-Aktivität und hierdurch bedingtem Anstieg der Sulfatide im Gehirngewebe (SUNDARAM et al., 1996). Umgekehrt kam es durch Therapie mit dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin zu einer Reduktion des zerebralen Sulfatid-Gehaltes (SUNDARAM, LEV, 1988). Einer neueren Studie zu Folge konnte auch durch eine vermehrte Vitamin D-Substitution der Sulfatid-Gehalt im Gehirn von Mäusen gesteigert werden (POPESCU et al., 2018). Diese Erkenntnisse sind auch für die Alzheimer-Erkrankung von Relevanz, da in epidemiologischen Studien gezeigt wurde, dass im Vergleich zu gesunden alterskorrelierten Kontrollen die Vitamin K-Aufnahme und die Vitamin D-Spiegel bei Alzheimer-Patienten deutlich reduziert sind (PRESSE et al., 2008; SHEN, JI, 2015). Somit könnte unter Umständen eine Reduktion der Sulfatid-Synthese im Rahmen des Vitaminmangels eine Rolle in der Entstehung der Sulfatid-Depletion bei der Alzheimer-Erkrankung spielen. Eine Vitamin K-reduzierte Diät führte darüber hinaus im Tierversuch in Ratten zu einer Verschlechterung der räumlichen Orientierung und des Lernvermögens (CARRIÉ et al., 2011). Es wurde bisher nicht untersucht, ob der beobachtete kognitive Abbau u. a. auf der Reduktion des Sulfatid-Gehaltes basiert und ob durch Substitution von Sulfatiden diesem entgegengewirkt werden könnte. Während aus einer Vielzahl von Studien bekannt ist, dass der Vitamin D-Spiegel bei Alzheimer-Patienten reduziert ist, ließ sich bisher nicht eindeutig nachweisen, ob dies Teil der pathophysiologischen Prozesse ist oder nur Folge der veränderten Lebensumstände. Durch den Zusammenhang zum Sulfatid-Metabolismus könnte hier ein weiterer für die Erkrankung relevanter Aspekt vorliegen.

Neben der genannten Regulation der Sulfatid-Synthese durch die beiden fettlöslichen Vitamine D und K könnte auch der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α) in der Regulation der Sulfatid-Synthese eine wichtige Rolle besitzen. PPAR α beeinflusst als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wobei gezeigt werden konnte, dass er durch seine Expression im Hippocampus einen relevanten Einfluss auf die kognitiven Funktionen besitzt (ROY et al., 2013). Gleichzeitig konnte im Rahmen einer anderen Studie beobachtet werden, dass die PPAR α -Spiegel bei Alzheimer-Patienten signifikant reduziert sind (DE LA MONTE, WANDS, 2006). Interessanterweise führte eine gesteigerte Aktivierung von PPAR α im Zellkulturmodell von Fibroblasten zu einer vermehrten Synthese von Sulfatiden durch Stimulation der CST-Expression (YANG et al., 2016). Umgekehrt könnten somit die im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung reduzierten PPAR α -Spiegel zu einer Depletion der Sulfatide beitragen.

Neben dem Risikofaktor ApoE ϵ 4 können insbesondere Umweltfaktoren und der Lebensstil das Alzheimer Risiko relevant erhöhen. In einer Metaanalyse von 2010 konnten Cataldo et al. zeigen, dass durch Zigarettenrauch das Alzheimer Risiko signifikant gesteigert wird (CATALDO et al., 2010). Um der Ursache hierfür nachzugehen erfolgten Studien an Mäusen welche mehrere Wochen unter dem Einfluss von Zigarettenrauch angereicherter Luft lebten. Eine Analyse der Lipide nach dieser Episode zeigte, dass es u. a. zu einer Reduktion der Sulfatide in der Weißen Substanz der Rauch-exponierten Mäuse

kam (NUNEZ et al., 2016). Die Ursache dieser durch Rauchen ausgelösten Verminderung der Sulfatid-Spiegel wurde bisher nicht weiter untersucht.

Wie oben beschrieben, gibt es unterschiedliche Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beeinflussen. Bei genauerer Analyse zeigt sich, dass mehrere dieser Faktoren ebenfalls den zerebralen Sulfatid-Gehalt beeinflussen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die beschriebenen Faktoren auch über den Sulfatid-Gehalt die Alzheimer-Pathogenese modulieren könnten. Um diese Hypothese abschließend zu beantworten bedarf es jedoch weiterer Studien.

Es existieren bisher keine Untersuchungen ob Veränderungen der Sulfatid-Degradation im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle spielen könnten. Mit diesem Ziel wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Genexpression der ASA untersucht. Die ASA ist als lysosomales Enzym Teil des endo-lysosomalen Systems und deren Enzymaktivität somit abhängig von einer unbeeinträchtigten Funktion der Lysosomen. Im Rahmen zahlreicher Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass es während der Alzheimer-Erkrankung zu einer Störung des endo-lysosomalen Systems kommt, die sich u. a. in einer verstärkten Endozytose, Vergrößerung der Endosomen und funktionellen Beeinträchtigung der Lysosomen widerspiegelt (zusammengefasst in (NIXON, 2017; WHYTE et al., 2017)). Die Analyse der Genexpression der ASA im humanem *post mortem* Hirngewebe der Alzheimer-Patienten erbrachte eine signifikante, ca. 1,7-fache, Steigerung der Expression des Enzyms im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 26). Dies zeigt, dass möglicherweise eine vermehrte Sulfatid-Degradation für die Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Alzheimer-Gehirn verantwortlich sein könnte. Auffällig ist hierbei die gleichzeitig gesteigerte Genexpression der für die Sulfatid-Synthese verantwortlichen Gene, was auf eine potentielle Fehlregulation hindeutet.

Eine Beeinflussung der Sulfatid-Degradation im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung könnte unter Umständen auch durch das mitochondriale Enzym PGC1 α mitbedingt sein. In PGC1 α -Knock-Out-Mäusen ließ sich eine signifikante Reduktion des Sulfatid-Gehaltes nachweisen, wobei die Synthese der Sulfatide nicht beeinflusst wurde. Von den Autoren wurde daher eine vermehrte Degradation als Ursache hierfür diskutiert (KIEBISH et al., 2012). Interessanterweise konnte auch im *post mortem* Hirngewebe von Alzheimer-Patienten eine mitochondriale Dysfunktion durch eine Beeinträchtigung des PGC1 α -Sirt3-Pfades nachgewiesen werden (YIN et al., 2019). Im Zellkulturmodell wurde zudem eine reduzierte PGC1 α -Genexpression im Zusammenhang mit verschiedenen für die familiäre Alzheimer-Erkrankung relevanten Mutation von Presenilin beobachtet (ROBINSON et al., 2014). Im Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass ApoE ϵ 4-Mäuse, im Vergleich zu ApoE ϵ 3-Mäusen, eine deutlich stärkere Reduktion der PGC1 α -Spiegel zeigen, was die vermehrte Reduktion der Sulfatide in ApoE ϵ 4-Mäusen

erklären könnte (YIN et al., 2019). Bei einer Steigerung der ASA-Expression auf das 2-fache und gleichzeitiger Steigerung der CST- und CGT-Expression auf das ca. 2–3-fache, kann dieser Effekt jedoch nicht alleine für die beobachtete Reduktion der Sulfatide verantwortlich sein. Weitere Studien sollten diesbezüglich auch die Enzymaktivitäten der CST, CGT und ASA näher untersuchen, um zu überprüfen, ob sich die gesteigerte Expression auch in einer vermehrten Enzymaktivität widerspiegelt. Darüber hinaus ließ sich in einer neueren Studie im Mausmodell nachweisen, dass der Sulfatid-Gehalt im Gehirn durch eine gesteigerte Degradation der Sulfatide in Folge einer PUFA-arme Diät abnimmt (WANG et al., 2020). Der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren scheint im Rahmen der Alzheimer Erkrankung ebenfalls reduziert zu sein, was somit ebenfalls zu einer Reduktion der Sulfatide beitragen könnte (SÖDERBERG et al., 1991).

Zusammenfassend kann man somit vermuten, dass der reduzierte Sulfatid-Gehalt im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung aus einer multifaktoriellen Ursache entstehen könnte. Dabei scheinen sich multiple Veränderungen im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung negativ auf den Sulfatid-Gehalt auszuwirken und durch sich aufsummierende Effekten die zerebalen Sulfatide zu reduzieren. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass u. a. eine verstärkte Sulfatid-Degradation durch eine Expressionssteigerung der ASA zu der Reduktion der Sulfatide im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten beitragen könnte. Der zugrundeliegende Mechanismus bleibt aktuell noch unklar und sollte in weiteren Studien näher untersucht werden. Gleichzeitig muss aufgrund der engen Assoziation mit dem ApoE-Status und LRP1 ein vermehrter Sulfatid-Transport in die Peripherie als Ursache der Sulfatid-Vermin- derung vermutet werden. Inwiefern auch eine veränderte Sulfatid-Synthese eine Rolle spielt sollte durch weitergehende Untersuchungen der Enzymaktivitäten überprüft werden. Die verschiedenen Mechanismen, die zu einer Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung beitragen könnten, sind in Abbildung 54 schematisch dargestellt.

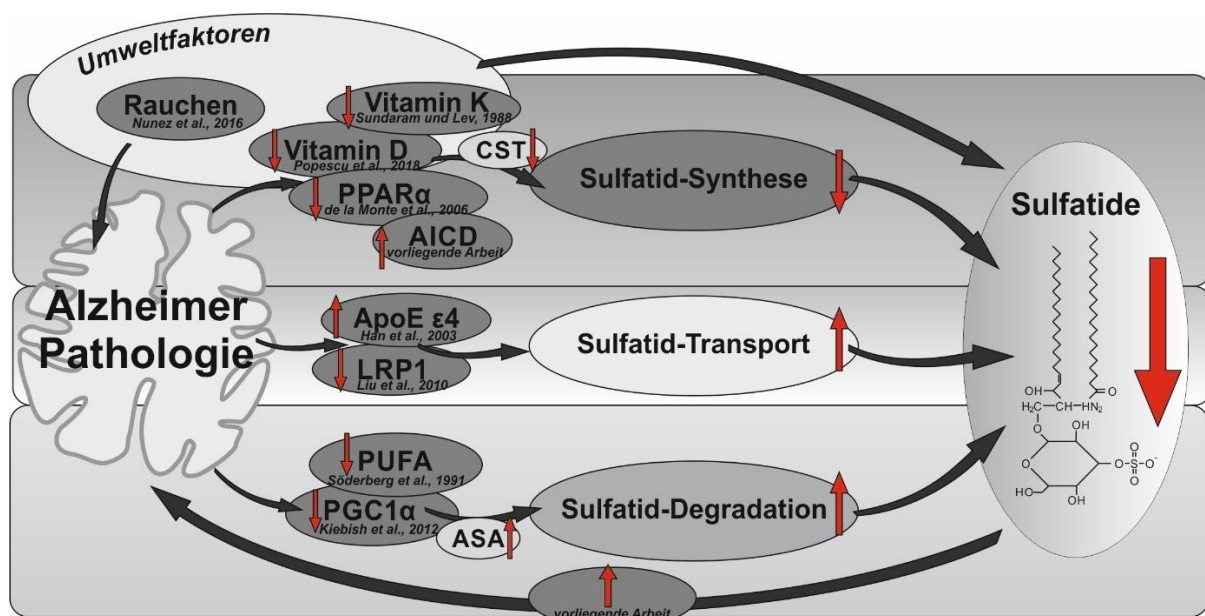


Abbildung 54: Multifaktorielle Ursache des reduzierten Sulfatid-Gehaltes bei der Alzheimer-Erkrankung. Abbildung 54 fasst die möglichen Mechanismen die zur Reduktion des Sulfatid-Gehaltes im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung beitragen könnten zusammen. Hierbei kann unterschieden werden zwischen den Mechanismen, die sich auf die Sulfatid-Synthese, den Sulfatid-Transport oder die Sulfatid-Degradation auswirken. Die Sulfatid-Synthese könnte reduziert sein in Folge von Umweltfaktoren wie einem Vitamin K und Vitamin D Mangel, aber auch durch eine Reduktion von PPAR α . Wie im Verlauf der Arbeit noch diskutiert wird könnte auch ein erhöhter AICD-Gehalt zu einer Reduktion des Sulfatid-Gehaltes beitragen. Der Sulfatid-Transport aus dem zerebralen Gewebe in die Peripherie könnte gesteigert sein durch eine Reduktion von LRP1 oder aber ein vermehrtes Vorkommen des ApoE ϵ 4-Genotyps. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass eine vermehrte Sulfatid-Degradation über die ASA stattfinden könnte, wobei diese u. a. aus einer Reduktion von PGC1 α und der PUFA resultieren könnte. Nicht zuletzt könnten auch Risikofaktoren wie Rauchen den Sulfatid-Gehalt verringern. Der reduzierte Sulfatid-Gehalt selbst wiederum könnte die pathologischen Prozesse der Alzheimer-Erkrankung zusätzlich verstärken (siehe hierzu Abschnitt 5.7.3).

5.6 Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch die γ -Sekretase und APP-Proteinfamilie

Wie im vorangehenden Kapitel diskutiert wurde, ist bisher wenig über die Regulationsmechanismen der Sulfatid-Synthese im Gehirngewebe bekannt. In früheren Studien zeigte sich, dass APP und seine Prozessierungsprodukte, sowohl durch genregulatorische Effekte als auch durch Aktivitätsänderungen, Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels beeinflussen (GRIMM et al., 2005; GRIMM et al., 2011a; GRIMM et al., 2014a). Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die APP-Prozessierung auch bei der Regulation der Sulfatid-Synthese beteiligt sein könnte.

Für die Sulfatid-Synthese aus Ceramiden werden, wie in der Einleitung beschrieben, die beiden Enzyme CGT und CST benötigt. Die CGT katalysiert dabei die Bildung von Galactosylceramid aus Ceramid, die CST die Bildung von Sulfatiden aus Galactosylceramid. Letzteres bildet dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese, weswegen wie oben beschrieben Veränderungen der Sulfatid-Synthese häufig auf einer Regulation dieses Enzyms beruhen (SUNDARAM et al., 1996).

Um die Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch die APP-Prozessierung zu untersuchen wurden zunächst der Sulfatid-Gehalt, die Sulfatid-Synthese, sowie die Genexpression der beiden Enzyme CGT und CST in embryonalen Mausfibroblasten untersucht. Hierbei wurden Fibroblasten mit einer Defizienz von Presenilin 1 und 2 (MEF PS1/2^{-/-}), sowie Mausfibroblasten mit einer Defizienz der APP-Proteinfamilie (MEF APP/APLP2^{-/-}) im Vergleich zu den korrespondierenden MEF wt-Zellen analysiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erbrachten in beiden defizienten Zelllinien eine signifikante Steigerung des Sulfatid-Gehaltes, der Sulfatid-Synthese und der Genexpression der CGT und CST (Abbildung 8–Abbildung 13). Während den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen die katalytische Einheit der γ -Sekretase fehlt, besteht aufgrund der fehlenden Expression von APLP1 in Fibroblasten in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen eine vollständige Defizienz der APP-Proteinfamilie (HEBER et al., 2000). Beiden Zelllinien gemeinsam ist somit die fehlende Bildung der durch die γ -Sekretase entstehenden Prozessierungsprodukte von APP: AICD, p3 sowie die verschiedenen A β -Spezies. Somit konnte

vermutet werden, dass eines dieser Peptide für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, was im Verlauf der Arbeit weiter analysiert werden sollte.

Im Unterschied zu den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen können in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen durch die Defizienz der γ -Sekretase auch die anderen Substrate des Multienzymkomplexes nicht mehr prozessiert werden. Auf der anderen Seite fehlen den Zellen mit einer Defizienz der gesamten APP-Proteinfamilie nicht nur die bereits genannten Prozessierungsprodukte der γ -Sekretase, sondern auch APP selbst sowie die Prozessierungsprodukte sAPP α , sAPP β , α -CTF und β -CTF. Diese Unterschiede muss man beachten, wenn man sich mit der Auswirkung der jeweiligen Defizienz auf die Sulfatid-Synthese im Folgenden beschäftigt. Des Weiteren handelt es sich bei der korrespondierenden Kontrollzelllinie der MEF PS1/2^{-/-} um Presenilin-retransfizierte-Zellen, während die Kontrollzelllinie der MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen eine MEF wt-Zelllinie darstellen. Hierdurch besteht für die Kontrollzellen der MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen eine klonale Heterogenität, die bei der Beurteilung der Effektstärken ebenfalls eine Rolle spielt. Die Unterschiede der verschiedenen defizienten Zelllinien werden in Abbildung 55 nochmal schematisch dargestellt. Die Effektstärken auf den Sulfatid-Gehalt, die Sulfatid-Synthese und die Genexpression unterschieden sich aufgrund dieser Unterschiede teilweise signifikant voneinander worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

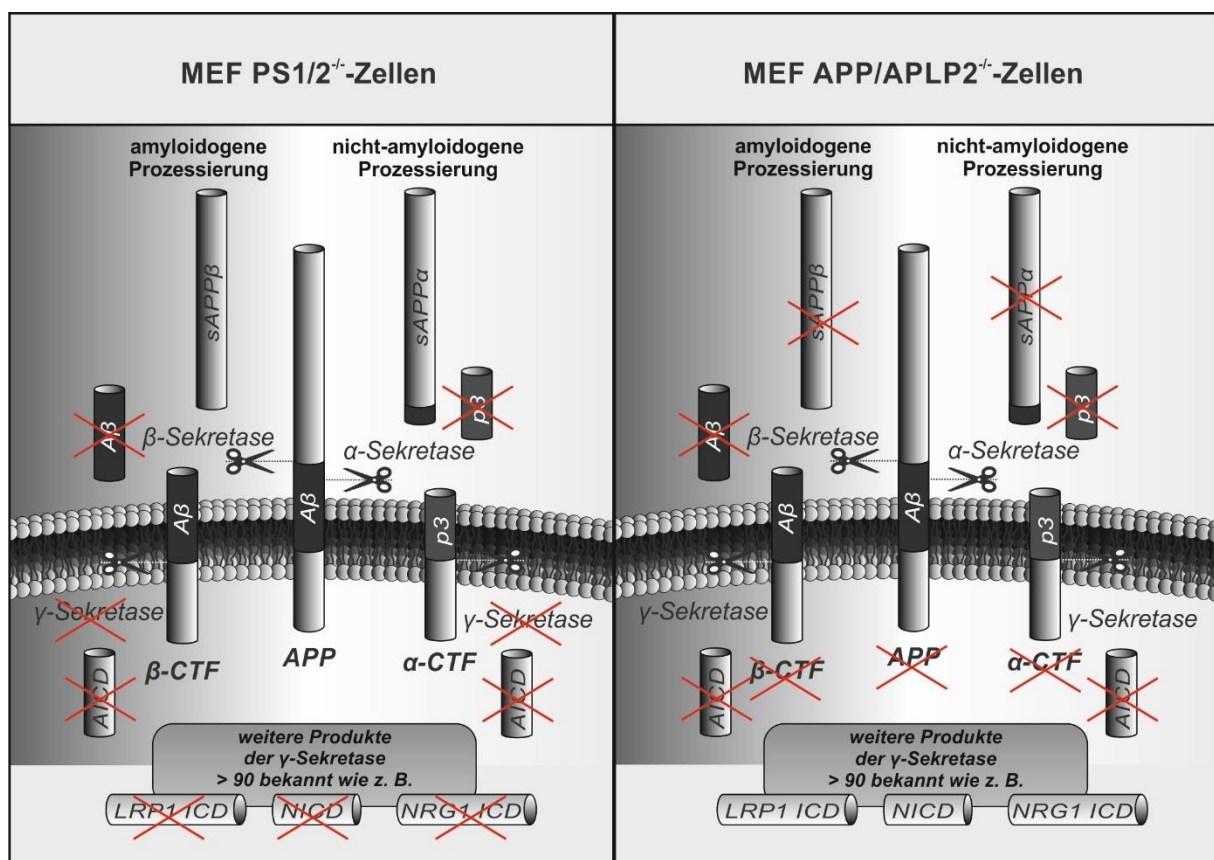


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Unterschiede der verwendeten MEF-Zelllinien. Dargestellt werden die Unterschiede zwischen den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen und den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen. Den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen fehlen neben APP auch alle seine Prozessierungsprodukte. Die Funktion der γ -Sekretase ist jedoch nicht beeinträchtigt, sodass deren weitere Produkte unverändert gebildet werden. In den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen fehlen im Gegensatz hierzu alle Produkte der γ -Sekretase. APP und die durch die α - bzw. β -Sekretase gebildeten Prozessierungsprodukte von APP sind nicht verändert. Beiden Zelllinien gemeinsam ist somit das Fehlen der durch die γ -Sekretase geschnittenen Produkte von APP: A β , p3 und AICD.

Während in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen der Sulfatid-Gehalt signifikant höher war als die Steigerung der Sulfatid-Synthese (Abbildung 8 und Abbildung 9), war in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen die Sulfatid-Synthese signifikant mehr gesteigert als der Sulfatid-Gehalt (Abbildung 12). Für die MEF PS1/2^{-/-}-Zellen könnte dies bedeuten, dass durch ein anderes Substrat der γ -Sekretase (z. B.: Notch) die Sulfatid-Degradation reduziert wird und somit der Sulfatid-Gehalt weiter steigt. Ein weiterer Grund könnte die, im Vergleich zur massenspektrometrischen Analyse, geringere Spezifität des Sulfatid-Synthese Versuchs sein, wodurch die Effektstärken abgeschwächt werden könnten. Zur Überprüfung der Spezifität des Sulfatid-Synthese-Versuchs wäre eine Analyse aus CST-defizienten-Zellen notwendig welche im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Auf die Herstellung einer solchen Zelllinie wurde verzichtet, da die Verifizierung der Ergebnisse mit Hilfe unterschiedlicher Methoden gelang. Des Weiteren könnten sich Veränderungen der vorangehenden Schritte der Sphingolipid-Synthese auf den massenspektrometrisch gemessenen Sulfatid-Gehalt auswirken. Im Sulfatid-Synthese-Versuch wird im Gegensatz hierzu durch die Inkoooperation von [35S]-Sulfat nur die *de novo* Synthese der Sulfatide im letzten Schritt analysiert. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass sich in MEF PS1/2^{-/-}-Zellen eine signifikante Steigerung der Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase (SPT) nachweisen lässt, wodurch die Sphingolipid-Synthese generell verstärkt wird (GRIMM et al., 2011a). Dies könnte zusätzlich zu den höheren Effektstärken bei der massenspektrometrischen Messung des Sulfatid-Gehaltes beitragen.

Es zeigten sich auch signifikante Unterschiede zwischen der Steigerung der Genexpression im Verhältnis zur etwas geringeren Steigerung der Sulfatid-Synthese (Abbildung 10). Vergleichbare Differenzen in den Effektstärken fanden sich auch in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen (Abbildung 13). Diese Unterschiede ließen sich beispielsweise durch zusätzliche, von der Genexpression unabhängige, Effekte auf die beteiligten Enzyme erklären. Hierzu zählen zum Beispiel die Beeinflussung der Proteinstabilität, aber auch eine direkte Hemmung der Enzymaktivität. Die in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen beobachteten Veränderungen der reduzierten CST-Genexpression konnten in einer weiteren Zelllinie, der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, unter Verwendung des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 11). Die hier etwas geringe Effektstärke könnte sowohl durch Zelltyp-spezifische Effekte aber auch durch die unvollständige Inhibition der γ -Sekretase erklärt werden. Im Rahmen einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass in Folge der Inkubation eine Restaktivität der γ -Sekretase von ca. 50 % erhalten bleibt (GRIMM et al., 2015a).

In den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen zeigte sich nur ein geringer Anstieg im Sulfatid-Gehalt bei gleichzeitig dennoch deutlich gesteigerter Sulfatid-Synthese (Abbildung 12). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der gesteigerten Sulfatid-Synthese eine vermehrte Sulfatid-Degradation entgegensteht. Dieser Effekt war spezifisch für die MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen und ließ sich nicht in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen beobachten. Somit ist anzunehmen, dass APP oder ein γ -Sekretase unabhängiges Prozessierungsprodukt hierfür verantwortlich ist. sAPP α könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Ihm werden eine Vielzahl positiver Effekte im Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathologie, aber auch unter physiologischen Bedingungen, zugeschrieben. Hierzu zählen beispielsweise die Neuroprotektion (RYAN et al., 2013) und die Verbesserung der Gedächtnisfunktion (MEZIANE et al., 1998). Eine verminderte Degradation der Sulfatide könnte beispielsweise durch eine Reduktion des Ceramid-Gehaltes dessen neurotoxische Wirkung reduzieren. Diesbezüglich könnte untersucht werden, ob die Substitution von sAPP α in MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen zu einer Steigerung des Sulfatid-Gehaltes führt.

In den vorangehenden Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Steigerung der Sulfatid-Synthese in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen und den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen. Ebenso war die verstärkte Genexpression des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Sulfatid-Synthese, der CST, nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Zelllinien. Dies legt nahe, dass für die Veränderungen der Genexpression der CST ein APP-Prozessierungsprodukt der γ -Sekretase verantwortlich ist. Sowohl für A β als auch für AICD sind dabei Interaktionen mit dem Sphingolipidstoffwechsel beschrieben worden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von A β mit einem Enzym des Gangliosid-Stoffwechsels, der GD3S, zu einer Reduktion der Enzymaktivität führt. Dies resultiert in einer verminderten Bildung von GD3 (GRIMM et al., 2012). Zudem wurde in einer früheren Studie nachgewiesen, dass es durch A β ₄₂ zu einer Steigerung der neutralen Sphingomyelinase (nSMase)-Aktivität kommt, wodurch die Ceramid-Spiegel steigen und der Sphingomyelin-Gehalt sinkt (GRIMM et al., 2005). Für A β ₄₀ wurde außerdem eine Inhibition der Cholesterin-*de-novo*-Synthese durch eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase nachgewiesen (GRIMM et al., 2005). Neben der direkten Interaktion von A β mit unterschiedlichen Enzymen wurde auch eine genregulatorische Funktion diskutiert (BARUCKER et al., 2014). Um eine mögliche Interaktion von A β zu untersuchen wurde daher die CST- und CGT Genexpression nach Inkubation von MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen mit A β ₄₀ analysiert, wobei sich hier keine Effekte auf die Genexpression zeigten (Abbildung 14). Aufgrund des Versuchsaufbaus ist es nicht möglich eine Beeinflussung der CST durch A β im Allgemeinen auszuschließen. Neben dem hier eingesetzten A β ₄₀ werden durch die γ -Sekretase weitere A β -Peptide unterschiedlicher Länge produziert, wobei diesen verschiedene Eigenschaften zugeschrieben werden. Barucker et al. konnten beispielsweise zeigen, dass eine Reduktion der Transkription von LRP1 nur durch A β ₄₂ bewirkt wird, nicht aber durch kürzere A β -Peptide (BARUCKER et al., 2014). Auch am Beispiel der nSMase kann bestätigt werden, dass die

verschiedenen A β Moleküle unterschiedliche Funktionen besitzen, wobei die nSMase nur durch A β ₄₂, nicht aber durch A β ₄₀ beeinflusst wird (GRIMM et al., 2005). Dies zeigt, dass eine Beeinflussung der Sulfatid-Synthese durch andere A β -Peptide trotz der hier erhobenen Ergebnisse möglich wäre. Des Weiteren wurden nur Expressionseffekte auf die CGT bzw. CST untersucht werden, sodass keine Aussage zu einer möglichen direkten Beeinflussung der Enzymaktivität getroffen werden kann.

Anhand der bisherigen Untersuchungen konnte für A β kein Effekt auf die Genexpression der CGT bzw. CST nachgewiesen werden, sodass im Weiteren die Auswirkung von AICD auf die Genexpression dieser Enzyme untersucht wurde.

5.6.1 Genregulatorische Wirkung von AICD

Neben A β bzw. p3 entsteht aus APP als weiteres Prozessierungsprodukt der γ -Sekretase die zytosolisch vorliegende intrazelluläre Domäne von APP, kurz: AICD. In den letzten Jahren wurde vermehrt diskutiert, dass dieses Peptid an der transkriptionellen Regulation einiger Gene beteiligt sein könnte. Hierzu zählen die APP-Prozessierung und A β -Degradation betreffende Gene wie APP, BACE1, IDE und NEP (GRIMM et al., 2015a; LAUER et al., 2020; VON ROTZ et al., 2004), aber auch hiervon unabhängige Gene wie z. B. p53, FOXO3a und PGC1 α (JIANG et al., 2020; LI et al., 2015; ROBINSON et al., 2014). Auch im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus wurden zunehmend durch AICD regulierte Gene detektiert. Hierzu zählen die SPT, die GCS, die GD3S und LRP1 (GRIMM et al., 2011a; GRIMM et al., 2014a; GRIMM et al., 2012; LIU et al., 2007).

Hinweise auf eine mögliche genregulatorische Funktion von AICD ergaben sich durch dessen Homologie zu dem Peptid NICD. Dieses Peptid entsteht, wie auch AICD, durch die sequentielle, intramembranöse Proteolyse eines Typ-I-Transmembranproteins. Dieser als Notch bezeichnete Rezeptor wird nach Aktivierung durch seine Liganden (z. B. Delta) zunächst durch eine Metalloprotease der ADAM-Proteinfamilie geschnitten (MUMM et al., 2000). Das hierbei in der Membran verbleibende Fragment NEXT (engl. *notch extracellular truncation*) wird anschließend, in Analogie zu α CTF bzw. β CTF, innerhalb der Transmembrandomäne durch die γ -Sekretase an der S3 Position proteolytisch gespalten (SASTRE et al., 2001). Die NICD wird infolge dieses Vorgangs in das Zytosol freigesetzt und kann von dort durch Interaktion mit Importin α in den Nukleus translozieren (HUENNIGER et al., 2010). Durch Kontakt mit DNS-Bindeproteinen (CSL) interagiert NICD dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und kann so regulatorisch auf die Transkription einer Vielzahl von Genen einwirken (HUENNIGER et al., 2010).

Aufgrund der Ähnlichkeit zur APP-Prozessierung wurde auch für AICD eine genregulatorische Funktion vermutet und in Folge dessen vermehrt untersucht. Es konnte bereits 2001 nachgewiesen werden, dass ein transkriptionell aktiver Komplex durch die Bindung von AICD an das Adapterprotein Fe65 und

die Histon-Acetyltransferase Tip60 gebildet wird (CAO, SÜDHOF, 2001). Die Entstehung dieses sog. AFT-Komplexes ist dabei stark abhängig von dem Vorliegen weiterer, konkurrierender Adapterproteine von AICD. Dabei existieren Proteine, die die Degradation von AICD beschleunigen, wie beispielsweise MINT1/X11 α oder Nedd8 (VON ROTZ et al., 2004), aber auch Proteine, die die genregulatorische Wirkung von AICD verstärken, hierzu zählen z. B. 14-3-3 γ Protein-Dimere (SUMIOKA et al., 2005). Neben den bereits beschriebenen AFT-Komplexen kann alternativ zu der Bindung von AICD an Fe65 auch eine Bindung an JIP1 erfolgen. Die hierdurch entstehenden AJT-Komplexe konnten ebenfalls im Nukleus nachgewiesen werden, sodass auch eine Fe65 unabhängige transkriptionelle Funktion von AICD möglich ist (SCHEINFELD et al., 2003). Die Regulation der Transkription durch die AFT- bzw. AJT-Komplexe erfolgt vermutlich über eine Histon-Acetylierung. Diese beeinflusst durch eine Änderung der Histon-DNS-Interaktion das Binden von Transkriptionsfaktoren. Im Rahmen einiger Studien konnte jedoch auch ein transkriptioneller Effekt von AICD in Promotoraktivitätsversuchen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass neben der Histon-Acetylierung auch andere Mechanismen eine Rolle spielen (GRIMM et al., 2015a).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass aus der nicht-amyloidogenen Prozessierung stammendes AICD keine wesentliche genregulatorische Aktivität besitzt (BELYAEV et al., 2010; GOODGER et al., 2009). Aufgrund der Instabilität von AICD und seiner raschen Degradation im Zytosol durch z. B. IDE, wurde daher diskutiert, dass transkriptionell-aktives AICD nur durch die amyloidogene Prozessierung entstehen kann. Der Schnitt der α -Sekretase erfolgt überwiegend im Bereich der Plasmamembran, sodass das AICD aus der nicht-amyloidogenen Prozessierung hauptsächlich dort gebildet wird. Die amyloidogene Prozessierung hingegen findet vorwiegend im endosomalen Kompartiment statt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde durch Belyaev et. al. ein Modell zur Regulation der NEP-Expression postuliert. Demzufolge spielt bei der Entstehung von AICD aus der amyloidogenen Prozessierung die kurze Halbwertszeit des Peptides, aufgrund der räumlichen Nähe der Endosomen zum Nukleus, eine untergeordnete Rolle. Hierdurch bedingt kann amyloidogenes AICD durch Bindung an Fe65 in den Zellkern translozieren, während an der Plasmamembran entstehendes nicht-amyloidogenes AICD degradiert wird (BELYAEV et al., 2010). Dieses Modell konnte im Rahmen einer Studie unserer Arbeitsgruppe ebenfalls am Beispiel von NEP bestätigt werden (GRIMM et al., 2015a). Abbildung 56 veranschaulicht das beschriebene Modell nochmal schematisch.

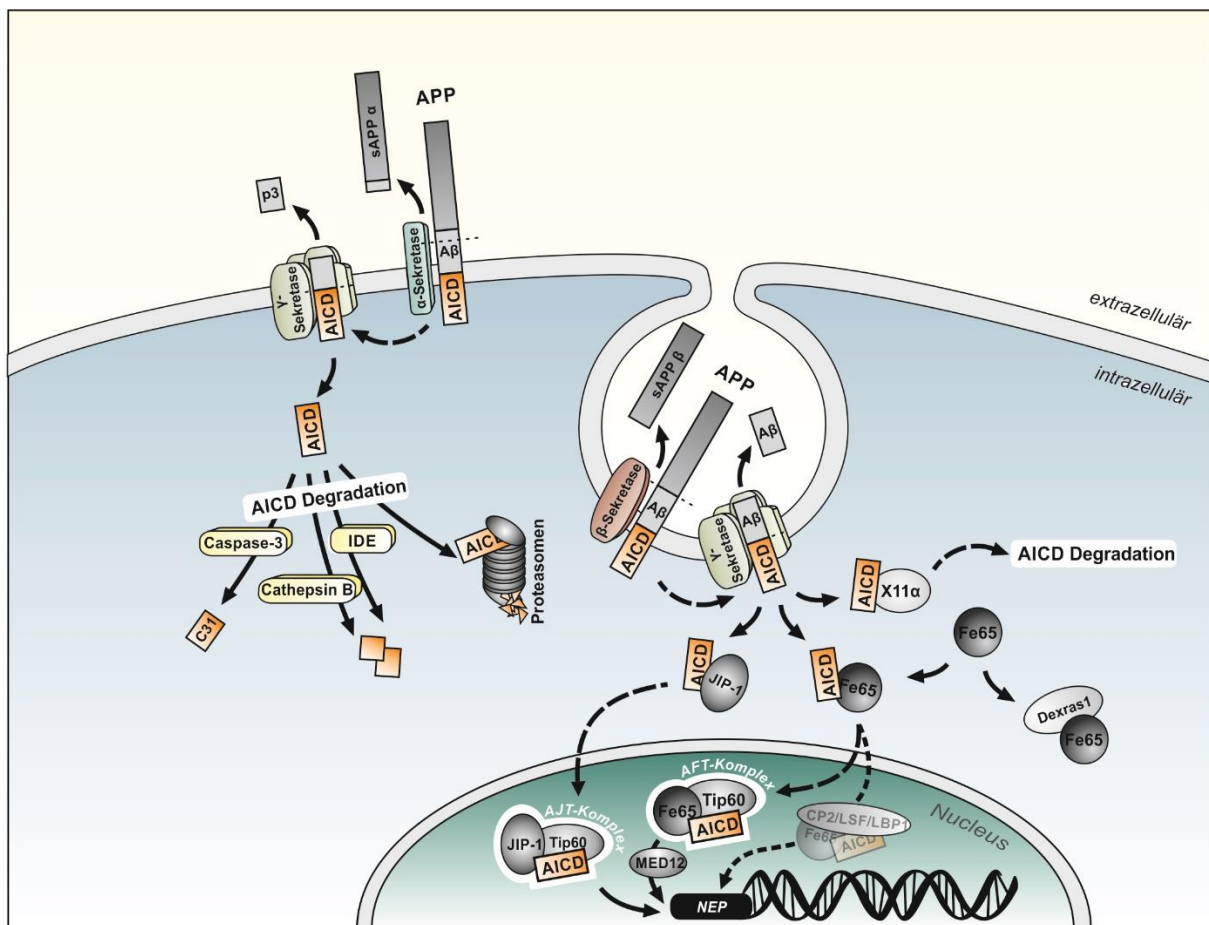


Abbildung 56: Modell zur genregulatorischen Wirkung von AICD am Beispiel von NEP. Die Abbildung wurde modifiziert und übersetzt aus (GRIMM et al., 2013b). Schematische Darstellung des hier postulierten Modells zur genregulatorischen Wirkung von AICD. AICD, welches bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung gebildet wird, wird aufgrund seiner Entstehung an der Plasmamembran und räumlichen Distanz zum Nucleus durch verschiedene Enzyme und Proteasomen degradiert. Im Gegensatz hierzu kann AICD aus der amyloiden Prozessierung, aufgrund seiner Entstehung im endosomalen Kompartiment, nach Bindung an JIP-1 oder Fe65 in den Nucleus translozieren und dort seine genregulatorische Wirkung entfalten.

Neben diesem Modell zur Wirkung von AICD auf die Transkription werden auch alternative Vorgänge diskutiert. Eines der wichtigsten konkurrierenden Modelle beruht auf der Vermutung, dass Fe65 durch Bindung an den C-Terminus von APP aktiviert wird und nach dem γ -Sekretase-Schnitt gemeinsam mit AICD freigesetzt wird. Auf dem Weg zum Nucleus wird dabei AICD degradiert, während Fe65 durch Bindung an Tip60 die genregulatorischen Prozesse aktiviert (CAO, SÜDHOF, 2004). In diesem Modell wäre das Vorliegen von AICD im Nucleus nicht zwangsläufig für die genregulatorische Wirkung von APP notwendig, sodass die Herkunft aus der amyloiden bzw. nicht-amyloiden Prozessierung keine Rolle spielen würde. Dabei wären auch beide Modelle denkbar, die nebeneinander als parallele Regulationswege existieren könnten.

Trotz der vorangehend betrachteten Studien wird die genregulatorische Wirkung von AICD bis heute kontrovers diskutiert. Dies liegt u. a. daran, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit von wenigen Minuten der Nachweis von AICD im Nukleus und dessen Interaktion mit genregulatorischen Faktoren nur schwer gelingt (CUPERS et al., 2001). Andererseits ließ sich die Regulation einiger zunächst ermittelter Ziel-Gene nicht immer reproduzieren, sodass Zweifel an diesen Regulationsmechanismen entstanden (Zusammengefasst am Beispiel von NEP in (GRIMM et al., 2013b). Als möglicher Grund hierfür könnten einerseits Zelltyp-spezifische Effekte aber auch methodische Unterschiede genannt werden. Dabei ist auffällig, dass insbesondere in Folge von Veränderungen des aus der nicht-amyloidogenen Prozessierung entstehenden AICDs keine transkriptionellen Effekte beobachtet wurden (WALDRON et al., 2008), was das oben genannte Modell von Belvaey et al. bekräftigt. In diesem Zusammenhang ist es zudem wichtig darauf hinzuweisen, dass, durch unterschiedliche Positionen der Prozessierung, AICD-Peptide mit unterschiedlicher Länge entstehen. Neben AICD 57 und AICD 59 entsteht so auch AICD 50. Dieses durch den sog. ϵ -Schnitt von APP gebildete verkürzte Peptid hat eine große Homologie zum S3 Schnitt von Notch, weswegen ihm in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit zukam (PINNIX et al., 2013; YU et al., 2001). Es wäre möglich, dass, ähnlich wie für A β gezeigt, auch den AICD-Peptiden mit variierender Länge unterschiedliche Funktionen zukommen.

Diese Erkenntnisse zeigen, dass die bis heute kritisch diskutierte genregulatorische Wirkung von AICD von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in verschiedenen Modellen, sowohl mittels Zellkulturversuchen als auch im *in vivo* Modell die mögliche transkriptionelle Regulation der Enzyme der Sulfatid-Synthese durch AICD untersucht. Dabei wurden nicht nur genetisch bedingte Veränderungen des AICD-Gehaltes durch Knock-Out oder überexprimierende Zellen untersucht, sondern auch der Einfluss von einer Inkubation mit synthetischem AICD auf die Genregulation analysiert. Durch die Verwendung verschiedener Methoden sollte die Möglichkeit eines falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisses reduziert werden und somit die Eigenschaft von AICD als genregulatorisches Peptid anhand eines weiteren Gens betätigt werden.

5.6.2 Einfluss von AICD auf die Sulfatid-Synthese

Nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit wurde vermutet, dass eine genregulatorische Wirkung von AICD auf die Enzyme der Sulfatid-Synthese CGT und CST vorliegt. Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst MEF-Zellen mit einem C-terminal um 15 Aminosäuren verkürzten APP betrachtet. Diesen MEF APP Δ CT15-Zellen fehlt die sog. YENPTY-Sequenz die für die Interaktion von AICD mit seinen Adapterproteinen essentiell ist, sodass kein funktionsfähiges AICD entstehen kann.

Wie in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt, zeigte sich eine signifikante Steigerung des Sulfatid-Gehaltes auf das ca. 2-fache der Kontrolle sowie eine 5-fach höhere CST-Genexpression in diesen Zellen. Zwischen der Effektstärke auf den Sulfatid-Gehalt und die Genexpression der CST ließ sich kein

signifikanter Unterschied nachweisen. Der zuvor in den MEF APP/APLP2^{-/-}-Zellen beobachtete Anstieg der CGT-Genexpression ließ sich in den MEF APPACT15-Zellen nicht nachweisen, hier zeigte sich nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der CGT-Genexpression. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Sulfatid-Synthese wird durch die CST katalysiert, womit diesem Enzym bei der Regulation des Sulfatid-Metabolismus die größere Bedeutung zukommt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die genregulatorische Wirkung von AICD überwiegend die CST betrifft, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch die Beeinflussung der CGT eine untergeordnete Relevanz besitzt. Interessanterweise zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Effektstärken des Sulfatid-Gehaltes der MEF APPACT15-Zellen und der MEF PS1/2^{-/-}-Zellen, sodass vermutet werden kann, dass der Effekt in den MEF PS1/2^{-/-}-Zellen ebenfalls durch AICD vermittelt wird.

Um diese Ergebnisse weiter zu unterstützen wurde zusätzlich der Einfluss auf die Genexpression der CGT und CST nach Inkubation mit synthetischem AICD untersucht. In früheren Studien konnte für dieses ca. 20 Aminosäure-lange Peptid bereits eine genregulatorische Wirkung auf andere Zielgene nachgewiesen werden. Mit Hilfe von FITC-markiertem AICD konnte außerdem eine suffiziente Aufnahme in die Zelle und Kolo-kalisation im Nukleus fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden (GRIMM et al., 2015a; ROBINSON et al., 2014). Um unspezifische, durch die Inkubation mit einem kurzen Peptid bedingte, Effekte auszuschließen wäre ein vergleichbares Peptid mit unspezifischer Aminosäure-Sequenz als Kontrolle sinnvoll. Für die hiesigen Untersuchungen wurde jedoch eine Lösungsmittelkontrolle gewählt, da nach Inkubation mit A β ₄₀, einem anderen Peptid ähnlicher Länge, kein Effekt auf die Genexpression der Enzyme beobachtet wurde.

In Folge der AICD-Inkubation auf MEF APPACT15-Zellen kam es zu einer signifikanten Reduktion der CST-Genexpression, wobei sich für die CGT ebenfalls eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Genexpression zeigte (Abbildung 17). Um die Hemmung der CST-Transkription durch AICD mit Hilfe einer anderen Methode zu bestätigen erfolgte zusätzlich ein Promotoraktivitätsversuch in welchem ebenfalls eine signifikante Reduktion der CST-Promotoraktivität durch AICD beobachtet werden konnte (Abbildung 18). Die Unterschiede in der Effektstärke beruhen dabei am ehesten auf den verwendeten Methoden der AICD-Inkubation. Nach der Lipofektions-basierten Methode, welche zur Untersuchung der Promotoraktivität verwendet wurde, konnte im Rahmen von früheren Studien eine fünffach geringere Aufnahme von AICD in die Zelle im Vergleich zu der langfristigen Inkubation beobachtet werden (GRIMM et al., 2015a). Des Weiteren können Effekte auf die Transkription die durch die Histone-Acetylierung bedingt sind im Promotoraktivitätsversuch nicht erfasst werden, wobei gezeigt werden konnte, dass der AFT-Komplex u. a. über diesen Mechanismus in die Genregulation eingreift. Dies zeigt mögliche Schwächen dieses Versuchsaufbaus, weswegen mit Hilfe weiterer Methoden die bisherigen Ergebnisse validiert wurden.

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt erwähnt, gewinnt AICD 50 in den letzten Jahren zunehmende Relevanz. AICD 50 entsteht durch den ϵ -Schnitt der γ -Sekretase und bildet eines der häufigsten physiologisch vorkommenden AICD-Peptide (PINNIX et al., 2013). Durch eine Überexpression in zwei verschiedenen Zelllinien, den MEF APP Δ CT15-Zellen und den SH-SY5Y wt-Zellen, sollte daher die Rolle des physiologisch vorkommenden AICD 50 auf die CST analysiert werden. Es zeigte sich in den MEF APP Δ CT15-Zellen eine signifikante Reduktion der Genexpression der CST, sowie auch des Gesamt-Sulfatid-Gehaltes (Abbildung 19). Auch in der C50 überexprimierenden Neuroblastom-Zelllinie konnte eine signifikante Verminderung des Sulfatid-Gehaltes gemessen werden. Dies bestätigt die genregulatorische Wirkung von AICD sowohl in Fibroblasten als auch in Neuroblastomzellen, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um Zelltyp-übergreifende-Effekte handeln könnte.

Wie oben beschrieben wird diskutiert, dass zur Vermittlung der genregulatorischen Eigenschaften von AICD die Bildung des AFT-Komplexes benötigt wird. Ein Knock-Down des Adapterproteins Fe65 (Genname APBB1) sollte sich somit auf gleiche Art wie der Verlust von AICD auf die CST-Genexpression auswirken. Tatsächlich zeigte sich in SH-SY5Y APBB1 KD-Zellen (Reduktion der Fe65-Genexpression um 58 %) eine signifikante Steigerung der CST- und CGT-Genexpression auf das ca. 2–3fache der Kontrollzellen (Abbildung 20). Die hier nachgewiesene Steigerung der CGT-Expression könnte dafürsprechen, dass neben AICD auch andere Fe65-Adapterpeptide die CGT-Genexpression zusätzlich beeinflussen.

Die Ergebnisse aus dem Zellkulturmodell konnten auch *in vivo* im Mausmodell verifiziert werden. Sowohl im Hippocampus von APP^{-/-}-Mäusen als auch in APP Δ CT15-Mäusen konnte eine signifikante Steigerung der CST-Genexpression auf das 2–3fache nachgewiesen werden (Abbildung 22). Interessanterweise zeigte sich der Sulfatid-Gehalt in der gleichen Region bei den APP^{-/-}-Mäusen nicht signifikant erhöht. Bei den APP Δ CT15-Mäusen konnte eine signifikante Steigerung des Sulfatid-Gehaltes im Hippocampus nachgewiesen werden. Mit einer Effektstärke von ca. 15 % ist diese Steigerung des Sulfatid-Gehaltes jedoch signifikant geringer im Vergleich zur Steigerung der Genexpression der CST (Abbildung 21). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es im Gehirn zu Regulationsmechanismen kommt, um einer zu starken Anreicherung von Sulfatiden entgegenzuwirken. Hierbei könnte beispielsweise eine vermehrte Degradation eine wichtige Rolle spielen, was jedoch bisher nicht untersucht wurde. Interessanterweise ließ sich nicht nur im Mausmodell die *in vivo* Relevanz bestätigen. Eine Messung der CST-Genexpression in *post mortem* Hirngewebe von Alzheimer-Patienten erbrachte eine signifikante, negative Korrelation der CST-Genexpression mit dem APP-Proteingehalt (Abbildung 23). Ähnliche Korrelationen konnten auch für andere AICD regulierte Gene beobachtet werden (LAUER et al., 2020). Dies besätigt, dass möglicherweise auch im humanem Hirngewebe AICD die CST-Genexpression hemmen könnte, was eine mögliche Erklärung für den Verlust der Sulfatide im Verlauf der Alzheimer Erkrankung sein könnte.

Ergänzend zu den vorangehenden Untersuchungen sollte auch der Effekt von AICD im Zusammenhang mit der familiären Alzheimer-Erkrankung analysiert werden. Insbesondere für die APP^{swe} Mutation konnte eine größere Affinität zur β -Sekretase nachgewiesen werden (CITRON et al., 1992). Entsprechend dem Modell von Belvaev et. al sollte dies zur vermehrten Bildung von transkriptionell aktivem AICD führen (BELYAEV et al., 2010). Tatsächlich konnte in einem 5xFAD-Mausmodell (REINHARDT et al., 2014), welches u. a. die APP^{swe} Mutation trägt, eine ca. 25%ige Reduktion der CST-Genexpression im Vergleich zur Wildtyp-Maus gemessen werden (Abbildung 24). Es bleibt jedoch unklar, wie sich die anderen Mutationen auf die CST-Genexpression auswirken. Bei diesen überwiegend Presenilin betreffenden Mutationen handelt es sich um „loss of function“-Mutationen, die zu einer geringeren γ -Sekretase-Aktivität bei gleichzeitiger Erhöhung des A β_{42} beitragen. Inwiefern sich dies auf die Entstehung von transkriptionell aktivem AICD auswirkt, wurde bisher nur wenig untersucht. Es ist jedoch zu vermuten, dass eine reduzierte AICD-Synthese vorliegt, was wiederum in einer gesteigerten CST-Genexpression resultieren müsste. Im Zellkulturmodell ließ sich am Beispiel der Genregulation von PGC1 α tatsächlich ein geringerer Effekt von AICD bei Vorliegen der unterschiedlichen Presenilin-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen (ROBINSON et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich an Hand der Ergebnisse dieser Arbeit die genregulatorische Wirkung von AICD am Beispiel der CST bestätigen. Es konnte mit Hilfe verschiedener methodischer Ansätze gezeigt werden, dass AICD, wahrscheinlich vermittelt über das Adapterprotein Fe65, die CST-Genexpression reduziert. Dieser Regulationsmechanismus scheint sowohl in Mausfibroblasten als auch in Neuroblastomzellen sowie im murinen und humanem Gehirngewebe eine Rolle zu spielen. Aufgrund der Reproduzierbarkeit in verschiedenen Gewebearten kann vermutet werden, dass unter physiologischen Bedingungen auch im menschlichen Gehirn dieser Regulationsmechanismus eine Rolle spielen könnte. Dies müsste jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit gibt es Hinweise aus dem murinen Alzheimermodell der 5x FAD-Maus, dass das aus der amyloidogenen Prozessierung entstandene AICD für die regulatorische Wirkung auf die CST-Genexpression verantwortlich ist. Um diese These weiter zu bekräftigen, müssten jedoch mit Hilfe von β -Sekretase-Inhibitoren oder genetischem Knock-Out weitere Untersuchungen erfolgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen Einfluss von AICD auf die Sulfatid-Synthese durch eine Reduktion der Genexpression der CST zeigen. Eine ebenso große Bedeutung für den Sulfatid-Gehalt in der Zelle spielt jedoch der Katabolismus der Sulfatide welcher über das Enzym Arylsulfatase A katalysiert wird. Bisher existieren hierzu keine Studien, sodass zur Beurteilung des Einflusses von APP auf den Sulfatid-Metabolismus im Gesamten, auch Untersuchungen der Sulfatid-Degradation durchgeführt werden sollten.

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit, wurde die genregulatorische Wirkung von AICD auf die Sulfatid-Synthese erstmalig untersucht. Interessanterweise zeigten sich jedoch bereits in anderen Unter-

suchungen Zusammenhänge zwischen AICD und dem Sphingolipid-Stoffwechsel. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass AICD die Genexpression der SPT, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Sphingolipid-*de novo*-Synthese katalysiert, signifikant reduziert (GRIMM et al., 2011a). Dies könnte zusätzlich zu dem bereits genannten Effekt auf die CST durch eine reduzierte Substratmenge zu einer Reduktion der Sulfatide beitragen. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass sich die γ -Sekretase, durch ihr Substrat APP, auch auf den Gangliosid-Metabolismus auswirkt. AICD führt dabei, durch eine Verminderung der GCS-Aktivität zu einer Reduktion der Gangliosid-Synthese (GRIMM et al., 2014a). In Folge der verminderten GCS-Aktivität tritt eine Akkumulation von Ceramiden ein, welche durch die Reduktion der Sulfatid-Synthese nochmals verstärkt wird. Dieser Akkumulation von Ceramiden wirkt jedoch die reduzierte SPT-Genexpression entgegen, sodass insgesamt der Ceramid-Gehalt im Gleichgewicht gehalten wird. Ceramide bilden auch den Ausgangspunkt weiterer Lipidstoffwechselwege (z. B. Signalmoleküle wie Sphingosin-1-Phosphat), sodass AICD hierüber eine bedeutende Rolle in der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse zukommt. Ferner konnte in einer weiteren Studie eine Verminderung der GD3S-Genexpression durch AICD nachgewiesen werden. Dieses Enzym katalysiert bei der Gangliosid-Synthese den Umbau von GM3 in GD3, sodass bei einer verminderten Expression die aus GM3 synthetisierten Ganglioside der a-Serie überwiegen (GRIMM et al., 2012).

Neben der direkten Beeinflussung des Sphingolipid-Metabolismus wird AICD auch eine Wirkung auf die Genregulation von LRP1 zugeschrieben (LIU et al., 2007). LRP1 bildet dabei einen wichtigen Interaktionspartner für ApoE. Es konnte gezeigt werden, dass AICD die Genexpression von LRP1 vermindert, gleichzeitig kommt es durch einen Verlust von LRP1 zu einer Erhöhung von ApoE im Gehirn transgener Mäuse (LIU et al., 2007). Interessanterweise ließ sich in einer anderen Studie beobachten, dass der LRP1-Knock-out zu einer Reduktion der zerebralen Sulfatide führt, was wiederum durch den erhöhten ApoE-Gehalt und einen vermehrten Abtransport in die Peripherie bedingt sein könnte (LIU et al., 2010). Dies zeigt, dass AICD den zerebralen Sulfatid-Gehalt nicht nur durch eine direkte Beeinflussung der CST inhibiert, sondern den Sulfatid-Spiegel zusätzlich durch die Reduktion der LRP1-Genexpression vermindern könnte.

Diese Erkenntnisse aus früheren Studien zeigen, dass eine enge Verknüpfung des Sphingolipid-Metabolismus mit AICD und, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, auch anderen APP-Prozessierungsprodukten besteht. Die unterschiedlichen Effekte von AICD und A β führen einerseits zu einer Reduktion der *de novo*-Synthese von Ceramiden, andererseits jedoch zu einer reduzierten Synthese von komplexeren Sphingolipiden, was in der Summe betrachtet unter physiologischen Bedingungen den Ceramid-Gehalt in der Zelle wieder im Gleichgewicht hält. In Abbildung 57 werden diese Zusammenhänge nochmal schematisch verdeutlicht.

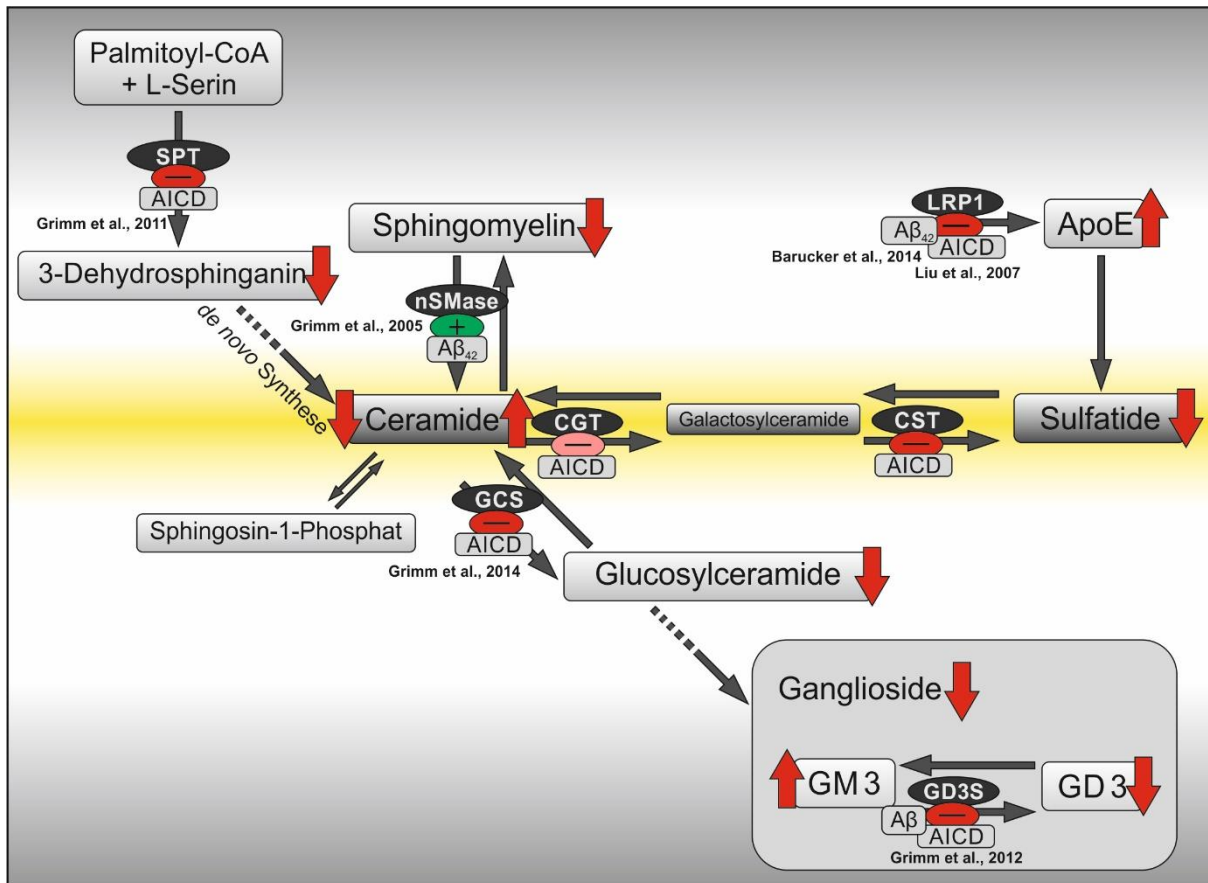


Abbildung 57: Schematische Darstellung des Einflusses von AICD und Aβ auf den Sphingolipidstoffwechsel. Die Abbildung fasst die bisher bekannten Auswirkungen der APP-Prozessierungsprodukte auf den Metabolismus der Sphingolipide schematisch zusammen. Gelb unterlegt sind die im Rahmen dieser Arbeit hinzugewonnenen Erkenntnisse einer reduzierten Sulfatid-Synthese durch den Einfluss von AICD auf die CST-Genexpression und in geringerem Maße auch die CGT-Expression. Aus früheren Studien ist bekannt, dass AICD darüber hinaus die Expression der SPT, der GCS, der GD3S und von LRP1 reduziert. Darüber hinaus wirkt Aβ stimulierend auf die nSMase und hemmend auf die GD3S und LRP1. Der reduzierten Umwandlung von Ceramiden in GlucCer und GalCer sowie der vermehrten Bildung von Ceramiden aus Sphingomyelin, steht eine verminderte *de novo*-Synthese von Ceramiden entgegen. Die APP-Prozessierungsprodukte halten somit, durch ihre unterschiedlichen Effekte, den Ceramid-Level im Gleichgewicht.

5.7 Beeinflussung der APP Prozessierung durch Sulfatide

5.7.1 Dosis-abhängige Reduktion des Aβ-Gehaltes durch Sulfatide im Zellkulturmodell

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im kortikalen Gewebe des Frontallappens von Alzheimer-Patienten, im Vergleich zu den nicht an Alzheimer erkrankten Kontrollen, zu einer signifikanten Reduktion des Sulfatid-Gehaltes kommt. Gleichzeitig ließ sich im Zellkultur- und Mausmodell eine Inhibition der Sulfatid-Synthese durch AICD nachweisen. Die bisherigen Ergebnisse konnten demnach eine enge Assoziation der Sulfatide mit der APP-Prozessierung und der Alzheimer-Pathologie nachweisen. Das Ziel der weiteren Versuche war es zu untersuchen, ob umgekehrt auch Sulfatide die

APP-Prozessierung beeinflussen und sich hieraus Konsequenzen für die pathophysiologischen Prozesse bei der Alzheimer-Erkrankung ergeben.

Zu diesem Zweck erfolgten Inkubationen von Neuroblastom Zellen mit einem aus Schweine-Gehirn extrahierten Sulfatid-Gemisch. Dieses Gemisch wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zum zerebralen Sulfatid-Muster beim Menschen verwendet. Des Weiteren konnten so spezifische Effekte durch das Überangebot einzelner Fettsäuren vermieden werden. Die Inkubation erfolgte, aufgrund von früheren Studien an anderen Zelllinien, in einer zu diesen Studien vergleichbaren Konzentration von 20 μM (BRUUN et al., 2007; ROESKE-NIELSEN et al., 2004; ZENG, HAN, 2008). Die suffiziente Aufnahme der über 24 Std. inkubierten Sulfatide konnte mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden, wobei sich im Vergleich zu den Kontrollen eine 25-fache Steigerung der Sulfatide zeigte (Abbildung 27). Die Inkubation der Sulfatide erfolgte auf Wildtyp- bzw. APP-überexprimierenden-Zellen, die auch endogen produzierte Sulfatide besitzen, sodass die Sulfatid-Konzentration nach der Inkubation über dem physiologischen Maß lag. Für einige Sphingolipide, insbesondere Ceramide, konnte eine Beeinflussung der Zellviabilität in früheren Studien nachgewiesen werden (CZUBOWICZ, STROSZNAJDER, 2014). Aus diesem Grund waren Kontrollversuche notwendig die eine generelle Beeinflussung der Zellintegrität durch die erhöhte Sulfatid-Konzentration ausschließen konnten. Weder die Zytotoxizität, noch die sekretorische Funktion der Zellen wurden durch die Sulfatid-Inkubation signifikant beeinflusst (Abbildung 28), sodass unter Verwendung dieser Inkubationsbedingungen die Untersuchung der APP-Prozessierung in mehreren Schritten erfolgen konnte.

Die Analyse des $\text{A}\beta$ -Gehaltes im Medium der inkubierten Zellen zeigte eine signifikante Reduktion von $\text{A}\beta$ nach Zugabe von Sulfatiden in verschiedenen Konzentrationen, wobei der $\text{A}\beta$ -Gehalt nach Inkubation mit 20 μM Sulfatiden um ca. 60 % am stärksten reduziert war (Abbildung 29). Dabei ergab sich eine negative Korrelation zwischen dem $\text{A}\beta$ -Gehalt im Medium und der bei der Inkubation verwendeten Sulfatid-Menge. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,92 zeigte sich diese hochsignifikant, sodass eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung im Zellkulturmodell angenommen werden kann. Bei der Alzheimer-Erkrankung spielt insbesondere die Entstehung von $\text{A}\beta_{42}$ eine besondere Rolle, da diesem aufgrund seiner stärkeren Aggregationstendenz eine größere Neurotoxizität zugeschrieben wird (siehe hierzu auch Abschnitt 2.4). Die getrennte Untersuchung von $\text{A}\beta_{40}$ und $\text{A}\beta_{42}$ zeigte eine signifikante Reduktion beider $\text{A}\beta$ -Spezies ($\text{A}\beta_{40}$: 58%ige Reduktion, $\text{A}\beta_{42}$: 62%ige Reduktion). Zwischen diesen beiden Peptiden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 30). Vergleicht man die Effektstärken mit den in der Literatur beschriebenen Effekten durch andere Lipide, finden sich bei einer Inkubation mit 10 μM Sulfatiden vergleichbare Effekte wie nach Inkubation mit 10 μM Stigmasterin bzw. 100 μM Docosahexaensäure (BURG et al., 2013; GRIMM et al., 2011b). Die Effektstärken nach Inkubation mit 20 μM Sulfatiden sind vergleichbar mit den durch medikamentöse Reduktion von Cholesterin

erreichbaren Effekten (FASSBENDER et al., 2001). Nach Statintherapie, und hierdurch bedingter Reduktion des Cholesteringehaltes, konnte im APP-transgenen-Mausmodell auch eine Verringerung der Senilen Plaques und Verbesserung der kognitiven Funktionen nachgewiesen werden (KURATA et al., 2011). Aufgrund der vergleichbaren Effektstärken im Zellkulturmodell könnte daher diskutiert werden, dass eine Erhöhung der Sulfatid-Spiegel sich auch *in vivo* auf die Alzheimer-Pathologie auswirken könnte.

Interessanterweise konnte eine Reduktion des A β -Gehaltes durch Inkubation mit Sulfatiden auch im Rahmen einer früheren Studie beobachtet werden. Han et al. zeigten ebenfalls eine signifikante, dosisabhängige Minderung des A β -Gehaltes im Medium von H4-Zellen in Folge einer Inkubation mit Sulfatiden (ZENG, HAN, 2008). Die Inkubation erfolgte in dieser Studie ebenfalls über 24 Std., wobei bei einer Konzentration von 30 μ M Sulfatiden eine relative Reduktion von A β_{40} um ca. 30 % und von A β_{42} um ca. 60 % gemessen wurde (ZENG, HAN, 2008). Während die Reduktion von A β_{42} in der vorliegenden Arbeit in ähnlicher Effektstärke beobachtet werden konnte war die Verminderung von A β_{40} hier deutlich stärker ausgeprägt. Diese Differenz lässt sich am ehesten durch die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen erklären, wobei in der Studie von Han et al. zur Verbesserung der Sulfatid-Aufnahme zusätzlich Methyl- β -Cyclodextrin (50 μ M) im Medium enthalten war (ZENG, HAN, 2008). Methyl- β -Cyclodextrin ist eine Chemikalie die häufig verwendet wird, um den Cholesteringehalt in Membranen zu reduzieren, wobei vor allem die Eigenschaften der Lipid Rafts signifikant beeinflusst werden (MAHAMMAD, PARMRYD, 2015). Diese Mikrodomänen sind insbesondere für die amyloidogene Prozessierung von APP relevant (siehe hierzu auch Abschnitt 5.7.3.3), sodass die gleichzeitige Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin die APP-Prozessierung unabhängig von den zugegeben Sulfatiden beeinflussen könnte. Einen weiteren Aspekt bildet die Beeinflussung der Endozytose durch Methyl- β -Cyclodextrin. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Clathrin-unabhängige Endozytose als auch die Clathrin-medierte Endozytose durch Methyl- β -Cyclodextrin beeinflusst werden können (VERCAUTEREN et al., 2010). Auch die Eigenschaften von Lysosomen verändern sich im Zellkulturmodell durch die Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin (JADOT et al., 2001). Ähnlich wie die Lipid Raft-Domänen ist das Endo-Lysosomale-System im Zusammenhang mit der APP-Prozessierung ebenfalls überwiegend für die amyloidogene Prozessierung von Bedeutung. Die geringere Effektstärke in der Studie von Han et al. könnte, neben Zelltyp-spezifischen Unterschieden, somit auch Folge der simultanen Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin sein. Insbesondere Effekte der Sulfatide auf die Lipid Raft-Domänen oder das Endo-Lysosomale-System könnten hierdurch nicht mehr vollständig erfasst werden.

Die mechanistischen Ursachen der durch den erhöhten Sulfatid-Gehalt bedingten A β -Reduktion sollten im weiteren Verlauf erarbeitet werden. Hierzu wurden sowohl die Effekte auf die APP-Prozessierung als auch auf die A β -Degradation genauer analysiert.

5.7.2 A β -Degradation nach Inkubation mit Sulfatiden

Neben der A β -Synthese im Rahmen der APP-Prozessierung spielt auch die A β -Degradation für den A β -Gehalt im Zellkulturmedium, aber auch *in vivo* im Gehirn, eine wichtige Rolle. Die A β -Degradation wird dabei über eine Vielzahl von verschiedenen Metalloprotease katalysiert. Für die folgenden Enzyme konnte dabei eine *in vivo* Relevanz im Gehirn mit Hilfe von Versuchen am Mausmodell bestätigt werden: ECE (engl. *endothelin converting enzyme*) 1 und 2, IDE, MMP (engl. *matrix metalloproteinase*) 2 und 9 sowie NEP (ECKMAN et al., 2003; IWATA et al., 2004; MILLER et al., 2003; YIN et al., 2006). Mit Hilfe von verschiedenen Knock-out-Mauslinien konnte gezeigt werden, dass durch eine NEP-Defizienz eine Verdopplung, durch eine IDE-Defizienz eine 50%ige Steigerung des zerebralen A β -Gehaltes bewirkt wird (IWATA et al., 2004; MILLER et al., 2003). Diesen beiden Enzymen wird daher die größte Bedeutung *in vivo* zugesprochen. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der A β -Degradation durch Lipide möglich ist. Für die beiden mehrfach-ungesättigten Fettsäuren Docosahexaensäure und Eicosahexaensäure konnte beispielsweise eine signifikante Steigerung der A β -Degradation in Folge einer gesteigerten IDE-Aktivität nachgewiesen werden (GRIMM et al., 2016). Umgekehrt führte ein Mangel des Secosteroids Vitamin D im Mausmodell zu einer reduzierten NEP-Expression und A β -Degradation (GRIMM et al., 2014b). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die A β -Degradation durch die Inkubation mit Sulfatiden verstärkt wird, was den reduzierten A β -Gehalt erklären könnte. Aufgrund der Vielzahl der A β -degradierenden-Enzyme wurde zur Beurteilung der A β -Degradation ein Versuchsaufbau gewählt mit welchem die Gesamtdegradation durch Zugabe von synthetischem A β im Zellkulturmodell gemessen wurde. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der A β Degradation durch die Inkubation mit Sulfatiden im Zellkulturversuch mit N2a Zellen (Abbildung 31a). Um eine Beeinflussung durch endogen produziertes A β zu vermeiden erfolgte die Sulfatid-Inkubation und Messung der A β -Gesamtdegradation aus der murinen Neuroblastom Zelllinie N2a. Diese Zelllinie produziert kein humanes A β , sodass durch anschließende Western Blot-Analyse mit dem für humanes A β -spezifischen Antikörper W02, nur das synthetische A β gemessen wurde. Um den Einfluss der Sulfatide auf die A β -Degradation in SH-SY5Y Zellen zu untersuchen erfolgte zusätzlich die Messung der Aktivität von NEP nach Inkubation mit Sulfatiden. Auch hier zeigte sich die Aktivität unverändert (Abbildung 31b). Es ist jedoch zu beachten, dass die A β -Gesamtdegradation nicht auf SH-SY5Y Zellen gemessen wurde, weswegen beispielsweise Effekte auf IDE oder andere A β -degradierende-Enzyme in SH-SY5Y-Zellen anhand dieser Ergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden können.

5.7.3 Einfluss der Sulfatide auf die APP-Prozessierung

Die A β -Synthese erfolgt wie in Kapitel 2.3 beschrieben über die amyloidogene APP-Prozessierung, während über den alternativen Weg der nicht-amyloidogenen Prozessierung die Entstehung von A β verhindert wird. Somit ist die A β -Entstehung abhängig vom Gleichgewicht der amyloidogenen zur nicht-

amyloidogenen Prozessierung. Um dieses Gleichgewicht zu untersuchen wurden die beim Schnitt der α - bzw. β -Sekretase entstehenden sekretorischen Prozessierungsprodukte sAPP α und sAPP β weiter untersucht. Es zeigte sich nach Inkubation mit Sulfatiden eine signifikante Reduktion des sAPP β -Spiegels um 30 %, während sich keine Änderung des sAPP α -Spiegels nachweisen ließ (Abbildung 32). Diese Veränderung spricht für eine reduzierte amyloidogene Prozessierung durch die β -Sekretase. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte auch die Untersuchung des nach dem β -Sekretase-Schnitt in der Zellmembran verbleibenden APP-Fragmentes β -CTF, welches dort der γ -Sekretase als Edukt dient. Um mögliche Effekte der γ -Sekretase auf den β -CTF-Gehalt zu reduzieren wurden die Zellen zusätzlich mit dem γ -Sekretase-Inhibitor-X behandelt. Es zeigte sich auch für β -CTF nach Inhibition der γ -Sekretase eine signifikante Reduktion in Folge der Sulfatid-Inkubation (Abbildung 38). Die geringere Effektstärke von ca. 10 % im Vergleich zu 30 % für sAPP β könnte durch die nur inkomplette Inhibition der γ -Sekretase (ca. 50 % Restaktivität) bedingt sein, was aufgrund der nachgewiesenen reduzierten γ -Sekretase-Aktivität (siehe hierzu Abschnitt 5.7.3.2) zu einer Steigerung des β -CTF-Gehaltes führt.

Durch eine Steigerung der nicht-amyloidogenen Prozessierung könnte APP als Substrat für β -Sekretase nur noch in geringerer Menge zur Verfügung stehen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die α -Sekretase Aktivität durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung beeinflusst werden kann. Hierbei konnte beispielsweise für kurzkettige oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine Steigerung der α -Sekretase Aktivität gemessen werden (GRIMM et al., 2013a). Um den Einfluss der Sulfatide auf die nicht-amyloidogene Prozessierung genauer zu untersuchen, erfolgte die Analyse der α -Sekretase-Aktivität nach *in vitro* Inkubation mit Sulfatiden. Es ließ sich keine signifikante Beeinflussung der α -Sekretase-Aktivität unter den untersuchten Bedingungen nachweisen (Abbildung 33). Auch die Proteinlevel der beiden überwiegend für die α -Sekretase-Aktivität verantwortlichen Enzyme ADAM 10 und ADAM 17 zeigten sich nach Inkubation mit Sulfatiden unverändert (Abbildung 33). Bei gleichzeitig fehlender Veränderung des sAPP α ließ sich unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen somit kein Einfluss auf die α -Sekretase durch den erhöhten Sulfatid-Gehalt messen.

Für eine Vielzahl weiterer Lipide, insbesondere auch der Sphingolipidklasse, konnte in früheren Studien die Beeinflussung der amyloidogenen bzw. nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP nachgewiesen werden (BURG et al., 2013; GRIMM et al., 2008; GRIMM et al., 2011b; LU et al., 2019; PUGLIELLI et al., 2003). Für Ceramide ließ sich beispielsweise eine gesteigerte amyloidogene Prozessierung nachweisen (PUGLIELLI et al., 2003), während durch Sphingomyelin eine Reduktion der amyloidogenen Prozessierung zu verzeichnen war (LU et al., 2019). Die beobachtete Reduktion der amyloidogenen Prozessierung durch Sulfatide ließ vermuten, dass sowohl Sphingomyelin als auch Sulfatide als Gegenspieler zu Ceramiden wirken könnten. Diese Theorie sollte mit Hilfe der folgenden Versuche weiter mechanistisch untersucht werden.

5.7.3.1 Sulfatide reduzieren die β -Sekretase-Aktivität über zwei unabhängige Mechanismen

Die β -Sekretase-Aktivität ist abhängig von dem Enzym BACE1 welches die proteolytische Spaltung von APP katalysiert. Die Aspartatprotease BACE1 gehört zur Pepsinproteinfamilie und besitzt neben APP noch viele weitere Substrate. Hierzu zählen die für die Myelinisierung von Nerven wichtigen Proteine Neuregulin 1 und 3 (Nrg1 und Nrg3), sowie auch der spannungsabhängige Natriumkanal $\beta 2$ (Nav $\beta 2$), welcher vor allem für die erhöhte Anfallsneigung bei BACE1-KO Mäusen verantwortlich zu sein scheint (zusammengefasst in (KOELSCH, 2017)). Sulfatide stellen eines der wichtigsten Lipide in der Myelinscheide dar, sodass ein Zusammenhang zwischen Neuregulin und Sulfatiden denkbar wäre. Die Regulation von BACE1 durch Sulfatide könnte sich somit indirekt auf das aktive Neuregulin auswirken, womit Sulfatide die Myelinisierung beeinflussen könnten. Hierzu existieren zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit jedoch keine genaueren Studien. Eine Schlüsselfunktion könnte hierbei AICD besitzen welches, neben des im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen negativen Effektes auf die Sulfatid-Synthese, auch die BACE1-Genexpression reguliert.

Die bisherigen Ergebnisse legten eine Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität durch Sulfatide nahe. Hierbei wäre sowohl ein direkter Effekt auf die Aktivität des membranständigen Enzyms denkbar, als auch eine indirekte Auswirkung der Sulfatide auf die Transkription, die Proteinstabilität oder die subzelluläre Lokalisation der β -Sekretase. Es wurde daher zunächst die β -Sekretase-Aktivität nach *in vitro* Inkubation von Sulfatiden auf postnukleären Fraktionen analysiert, wobei sich hierbei nur Effekte durch eine direkte Beeinflussung des Enzyms messen lassen. Es ließ sich nach *in vitro* Inkubation kein direkter Effekt nachweisen (Abbildung 34). Nach Inkubation von lebenden Zellen mit Sulfatiden zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der β -Sekretase-Aktivität um 34 % (Abbildung 34) was für einen indirekten Effekt auf die β -Sekretase spricht. Dies soll im Verlauf der Arbeit noch näher untersucht werden.

Aufgrund der genannten Vielzahl von Substraten der β -Sekretase sollte nachgewiesen werden, dass die reduzierte β -Sekretase-Aktivität tatsächlich eine verminderte amyloidogene APP-Prozessierung zur Folge hat. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben zeigte sich sAPP β in Folge der Sulfatid Inkubation ebenfalls um ca. 30 % reduziert (Abbildung 32). Die Effektstärken auf die β -Sekretase-Aktivität und sAPP β unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander, sodass die Wirkung auf das Substrat APP bestätigt werden konnte. Anhand dieser Ergebnisse ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob auch die Proteolyse der anderen Substrate von BACE1 durch Sulfatide reduziert wird. Eine möglichst geringe Beeinflussung der anderen Substrate wäre für eine potentielle therapeutische Anwendung vorteilhaft. Um dies weiter zu analysieren könnten die proteolytischen Produkte der anderen Substrate in künftigen Studien untersucht werden. Im Folgenden sollte jedoch zunächst der zugrundeliegende Mechanismus für die reduzierte β -Sekretase-Aktivität erarbeitet werden.

Um die indirekte Beeinflussung der β -Sekretase zu analysieren wurde zunächst der BACE1-Proteingehalt nach Inkubation mit Sulfatiden untersucht. Hier konnte eine signifikante Reduktion um ca. 22 % gemessen werden (Abbildung 35). Die Überprüfung des BACE1-mRNA-Gehalts zeigte eine nicht signifikante Steigerung der Expression von BACE1, was möglicherweise auf eine Gegenregulation hindeutet. Eine veränderte Genexpression war somit nicht ursächlich für den beobachteten Effekt auf den Proteingehalt. Durch Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid für 24 Std. konnten die beobachteten Effekte auf den BACE1-Proteingehalt nicht nivelliert werden (Abbildung 35). Der BACE1-Proteingehalt in der Zelle ändert sich nach Inhibition der Translation nur noch infolge der Degradation des Enzyms. Bei einer Halbwertszeit des Proteins von 16 Std. kann so der Effekt der Sulfatide auf die Proteindegradation gemessen werden (PUGLIELLI et al., 2003). Oben genanntes Ergebnis führt somit zu der Annahme, dass ein erhöhter Sulfatid-Gehalt zu einer Steigerung der BACE1-Degradation führt. Die Proteinstabilität von BACE1 wird überwiegend reguliert durch eine GGA3-abhängige-Sortierung des Proteins in das lysosomale Kompartiment in welchem dann die Degradation von BACE1 stattfindet (KOH et al., 2005). Sulfatide werden ebenfalls innerhalb der Lysosomen abgebaut, weswegen bei einem Sulfatid-Überschuss eine Anreicherung des Lipids in diesem Kompartiment stattfindet (WITTKKE et al., 2004). Es sollte daher untersucht werden ob die Inkubation mit Sulfatiden die lysosomale BACE1-Degradation beeinflusst. Nach Inkubation mit dem Lysosomeninhibitor Chloroquin ließ sich schließlich kein signifikanter Unterschied mehr im BACE1-Proteingehalt zwischen den mit Sulfatiden behandelten Zellen und den Kontrollzellen nachweisen (Abbildung 35). Sulfatide scheinen somit die lysosomale Degradation von BACE1 zu steigern wodurch die amyloidogene Prozessierung reduziert wird.

In diesem Zusammenhang ist eine aktuelle Studie von Fan et al. erwähnenswert (FAN et al., 2019). Hier konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors durch ein Vitamin D Analogon, Paricalcitol, im Mausmodell zu einer Steigerung der lysosomalen BACE1-Degradation führt. In einer weiteren Studie ließ sich auch nach einer Inkubation mit Vitamin D bzw. Paricalcitol in der Zellkultur eine Reduktion der β -Sekretase-Aktivität und des BACE1-Proteingehaltes nachweisen (GRIMM et al., 2017c). Gleichzeitig beschrieben Popescu et al. während der Remyelinisierung im Mausgehirn eine signifikante Steigerung des Sulfatid-Gehaltes in Folge einer Vitamin D-Substitution (POPESCU et al., 2018). Möglicherweise könnte demnach die Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes durch die Vitamin D-Zufuhr für die gesteigerte BACE1-Degradation verantwortlich sein. Es ist jedoch bisher nicht untersucht, ob unter physiologischen Bedingungen eine Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors bzw. eine Vitamin D-Substitution in der Zellkultur oder im Mausgehirn ebenfalls zu einer Steigerung des Sulfatid-Gehaltes führt.

Puglielli et al. konnten interessanterweise für Ceramide gegenläufige Effekte auf BACE1 beobachten. Eine Inkubation mit 10 μ M Ceramiden führte zu einer signifikanten Zunahme der Proteinstabilität von BACE1. Nach 16 Std. Inkubation ließ sich eine ca. 30%ige Reduktion des BACE1-Proteingehaltes in

den Kontrollzellen nachweisen, während nach Inkubation mit Ceramiden noch keine relevante Reduktion des Proteingehaltes zu verzeichnen war (PUGLIELLI et al., 2003). Ceramide bilden zusammen mit GalCer den direkten Vorläufer der Sulfatide, sodass eine Verschiebung des Gleichgewichtes von Ceramiden hin zu den Sulfatiden zu einer noch deutlicheren Reduktion der β -Sekretase-Aktivität führen könnte. Ceramide sind außerdem bekannt eine Beteiligung an der durch A β -medierten Neurotoxizität zu haben und könnten hierdurch die Alzheimer-Pathologie zusätzlich negativ beeinflussen. Interessanterweise ließen sich im Alzheimer-Gehirn auch erhöhte Ceramid-Spiegel nachweisen (HE et al., 2010). Die gleichzeitige Reduktion des Sulfatid-Gehaltes könnte somit eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Ceramide bedeuten, was sich negativ auf die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung auswirken könnte.

Während sich die β -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Sulfatiden um ca. 34 % reduziert zeigte, ließ sich für den BACE1-Proteingehalt nur eine 22%ige Verminderung nachweisen. Diese Differenz der Effektstärke zeigte sich nicht signifikant ($p = 0,061$), sie ließ jedoch darauf schließen, dass neben der verstärkten Degradation von BACE1 andere Effekte die Aktivität der β -Sekretase zusätzlich beeinflussen könnten. Ursächlich könnte beispielsweise eine Veränderung der intrazellulären Verteilung von BACE1 sein. BACE1 besitzt aufgrund seines PH-Optimums im sauren Bereich seine höchste Aktivität im Bereich der Endosomen (VASSAR et al., 1999), während das an der Plasmamembran lokalisierte BACE1 nur eine geringe enzymatische Aktivität besitzt. Es sollte daher untersucht werden, ob die intrazelluläre Verteilung von BACE1 durch Sulfatide beeinflusst werden könnte. Nach einer Endosomenpräparation und anschließenden Messung des BACE1-Proteingehaltes und der Enzymaktivität innerhalb der Endosomen, zeigte sich für die β -Sekretase-Aktivität eine 40%ige und für den Proteingehalt eine 45%ige Reduktion (Abbildung 36). Zwischen diesen beiden Ergebnissen ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p = 0,814$). Dies spricht dafür, dass Sulfatide zusätzlich zu einer verstärkten Degradation von BACE1 auch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation des Proteins bewirken. BACE1 unterliegt einem Recyclingmechanismus, wobei ein ständiger Austausch zwischen dem an der Plasmamembran befindlichen BACE1 und dem in den Endosomen bzw. dem Golgi-Apparat lokalisierten BACE1 stattfindet (TOH et al., 2018). Dieses Gleichgewicht sollte ebenfalls nach Sulfatid-Inkubation untersucht werden. Im Vergleich zum BACE1-Gesamtproteingehalt in der Zelle ließ sich eine leichte nicht signifikante Steigerung des mittels Biotinylierung erfassten BACE1 an der Zelloberfläche nachweisen (78 % vs. 85,5 %). Gleichzeitig zeigte sich eine signifikant stärkere Reduktion innerhalb der Endosomen (55 %, Abbildung 37). APP lag innerhalb der Endosomen nach Sulfatid-Inkubation in gleicher Menge zur Kontrolle vor, was gegen eine generelle Beeinflussung der Endozytose durch die Sulfatide spricht (Abbildung 36).

Im Rahmen früherer Studien konnte auch für andere Lipide eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von BACE1 durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung gezeigt werden. Eine Inkubation mit Stigmasterin führte beispielsweise zu einer Reduktion der Internalisierung von BACE1 und somit Erhöhung des BACE1-Gehaltes an der Plasmamembran (BURG et al., 2013). Weitere Studien könnten untersuchen welche Rolle Lipide generell bei der Endozytose von BACE1 besitzen um hieraus neue therapeutische Möglichkeiten zur Reduktion der A β -Synthese zu entwickeln.

Wie im Kapitel 5.7.1 beschrieben konnten Han et al. in H4 Zellen nach Inkubation mit Sulfatiden ebenfalls eine Reduktion von A β nachweisen. Im Gegensatz zu den hier beobachteten Ergebnissen konnten Han et al. jedoch keine Veränderung der β -Sekretase-Aktivität beobachten (ZENG, HAN, 2008). Als mögliche Ursache könnte die oben bereits erwähnte Inkubation unter Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin eine Rolle spielen. Hierdurch bedingt kommt es, unabhängig von den zugegebenen Sulfatiden, zu einer Beeinflussung der Endosomen und Lysosomen (JADOT et al., 2001; VERCAUTEREN et al., 2010). Dies könnte den durch die Sulfatide bedingten Effekten, sowohl auf die lysosomale Degradation von BACE1 als auch auf dessen Internalisierung, entgegenwirken und somit die diskrepanten Ergebnisse erklären. Eine andere Möglichkeit, die die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen könnten, wären Zelltyp-spezifische Effekte. Während SH-SY5Y-Zellen eine humane Neuroblastom-Zelllinie darstellen handelt es sich bei H4-Zellen um Glioblastomzellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Sulfatid-Gehalt durch zwei synergistische Mechanismen die β -Sekretase-Aktivität reduziert. Zum einen führt eine Inkubation mit Sulfatiden zu einer vermehrten lysosomalen Degradation von BACE1. Zum anderen bewirkt der erhöhte Sulfatid-Gehalt eine reduzierte Internalisierung von BACE1 und somit Verschiebung von BACE1 aus den Endosomen an die Zelloberfläche. Hieraus resultiert dann, aufgrund der geringeren Enzymaktivität an der Plasmamembran, eine weitere Reduktion der β -Sekretase-Aktivität. Die mechanistischen Zusammenhänge werden in Abbildung 58 nochmals schematisch zusammengefasst.

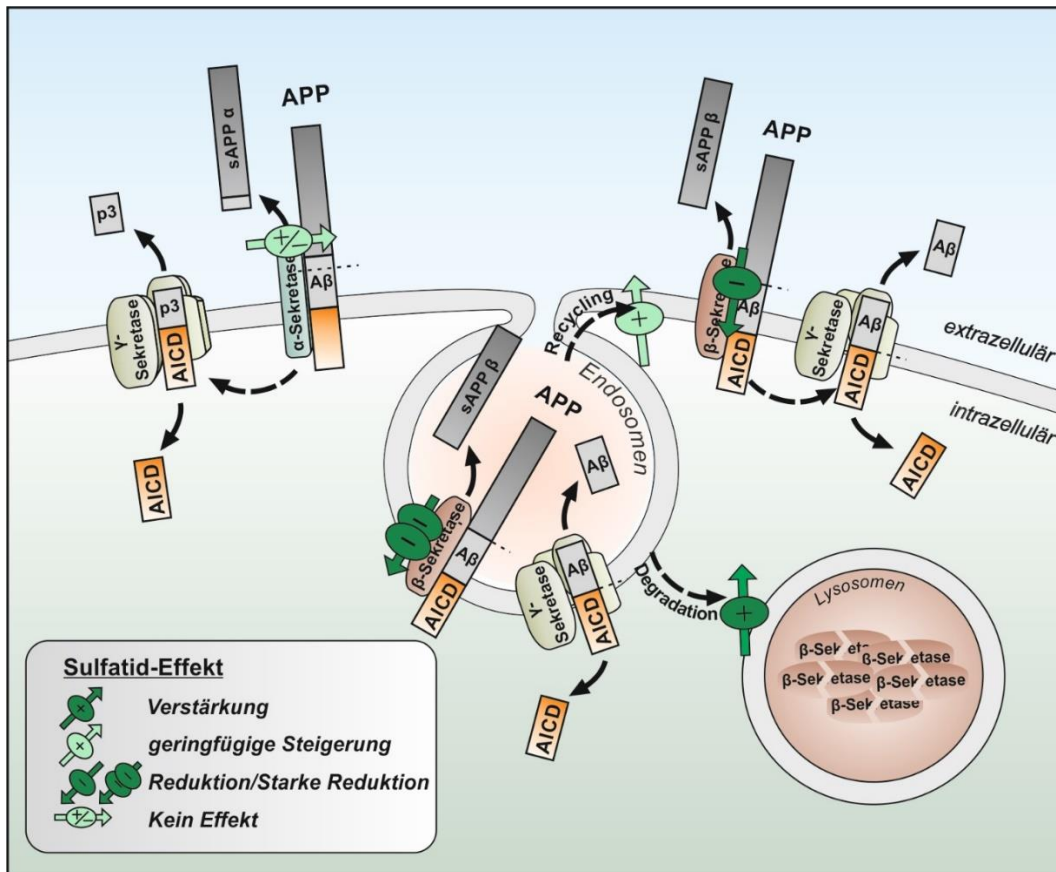


Abbildung 58: Mechanismus der Inhibition der β -Sekretase durch Sulfatide. Schematische Darstellung des Einflusses der Sulfatide auf den Metabolismus und die intrazelluläre Lokalisation der β -Sekretase. Sulfatide führen durch eine verstärkte lysosomale Degradation von BACE1 zu einem reduzierten BACE1-Proteingehalt in der Zelle und konsekutiv verminderter β -Sekretase-Aktivität. Auf der anderen Seite wird die intrazelluläre Verteilung der β -Sekretase beeinflusst, wodurch insbesondere die endosomal vorliegende β -Sekretase noch weiter reduziert wird. Gleichzeitig gelangt mehr β -Sekretase an die Plasmamembran, dort ist ihre Aktivität aufgrund des höheren pH-Wertes jedoch geringer. Die α -Sekretase wurde durch Sulfatide im hier verwendeten Versuchsaufbau nicht beeinflusst.

5.7.3.2 Sulfatide hemmen die γ -Sekretase Aktivität

Wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben führte die Inkubation mit 20 μM Sulfatiden zu einer signifikanten Reduktion des $\text{A}\beta$ -Gehaltes um 62 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Gleichzeitig ließ sich eine signifikante Verminderung der β -Sekretase-Aktivität um 34 % nachweisen. Der $\text{A}\beta$ -Gehalt war demnach signifikant stärker reduziert als die β -Sekretase-Aktivität ($p = 0,009$). Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben konnte keine Veränderung der $\text{A}\beta$ -Degradation oder der nicht-amyloidogenen Prozessierung beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch eine Beeinflussung des zweiten Schritts der amyloidogenen Prozessierung durch Sulfatide vorliegen könnte. Hinweisend hierauf zeigte sich nach Inkubation mit 20 μM Sulfatiden eine signifikante Steigerung des β -CTF-Gehaltes um ca. 32 % (Abbildung 38). Dieses APP-Fragment ist zum einen abhängig von seiner Entstehung in Folge des Schnitts der β -Sekretase, zum anderen dient es der γ -Sekretase als Edukt. Eine reduzierte γ -Sekretase-Aktivität führt demnach zu einer Akkumulation von β -CTF. Wurde mit Hilfe eines

Inhibitors die Enzymaktivität der γ -Sekretase gehemmt, zeigte sich eine Reduktion des β -CTFs, was die Vermutung bestätigt, dass der durch Sulfatide erhöhte β -CTF-Gehalt auf eine verminderte γ -Sekretase-Aktivität zurückzuführen ist.

Die γ -Sekretase besteht aus einem membrangebundenen Multienzymkomplex, wobei PS 1 oder PS 2 das aktive Zentrum dieses Komplexes bilden. Weiterhin gehören zum Komplex der γ -Sekretase der essentielle Bestandteil Nicastrin sowie die beiden Proteine Anterior pharynx-defective 1 (Aph1a oder Aph1b) und Presenilin enhancer 2 (DE STROOPER, 2003). Eine besondere Eigenschaft der γ -Sekretase ist die sog. regulierte-intramembranöse Proteolyse. Dieser als RIP (engl. regulated intramembrane proteolysis) bezeichnete Vorgang beschreibt, dass der Schnitt des Substrats innerhalb der Mitte der Membran im hydrophoben Milieu erfolgt, ein Vorgang der nur für wenige Enzyme bisher bekannt ist (MCCARTHY et al., 2009). Für die katalytische Aktivität von PS 1 sind dabei zwei sich gegenüberstehende Aspartat-Reste verantwortlich, welche ebenfalls innerhalb der Transmembrandomäne von Presenilin lokalisiert sind (WOLFE et al., 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde vermehrt daran geforscht, ob die Lipidkomposition der Membran die γ -Sekretase Aktivität beeinflussen kann. Dabei ließ sich in verschiedenen Untersuchungen sowohl eine Beeinflussung der Aktivität der γ -Sekretase durch die Kettenlänge der Fettsäuren, die cis/trans-Position der Doppelbindungen, die Zahl der Doppelbindungen und die Kopfgruppe des Lipides nachweisen (AYCIRIEX et al., 2016; HOLMES et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob in Folge der Sulfatid-Inkubation die γ -Sekretase-Aktivität ebenfalls verändert wird. Hierzu erfolgte zunächst die *in vitro* Inkubation um direkte Effekte auf die γ -Sekretase-Aktivität zu untersuchen. Nach Inkubation von 20 μ M Sulfatiden auf PNFs zeigte sich eine signifikante Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität um ca. 7 % im Vergleich zu den mit Lösungsmittel inkubierten Kontrollen (siehe auch Abbildung 39).

Interessanterweise konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass durch Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Kopfgruppe und Aminosäuren des γ -Sekretase-Komplexes gebildet werden, wodurch die Aktivität der γ -Sekretase reduziert wurde (AGUAYO-ORTIZ et al., 2018). Dies konnte insbesondere für Phosphatidylinositol (PI) bereits in mehreren Studien gezeigt werden (HOLMES et al., 2012; OSAWA et al., 2008). Hierbei führte eine Erhöhung von PI-Diphosphat zu einer reduzierten Interaktion der γ -Sekretase mit ihrem Substrat β -CTF und hierdurch bedingten Aktivitätsminderung (OSAWA et al., 2008). Betrachtet man sich die Strukturformel der Sulfatide im Vergleich zur Strukturformel von Phosphatidylinositol-Phosphat, besteht eine deutliche Homologie der Kopfgruppe, wobei insbesondere die negative Ladung an einem Zuckermolekül und der Abstand der Ladung zur Membran von Relevanz sein könnten. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 59 die Strukturformeln im direkten Vergleich nebeneinander.

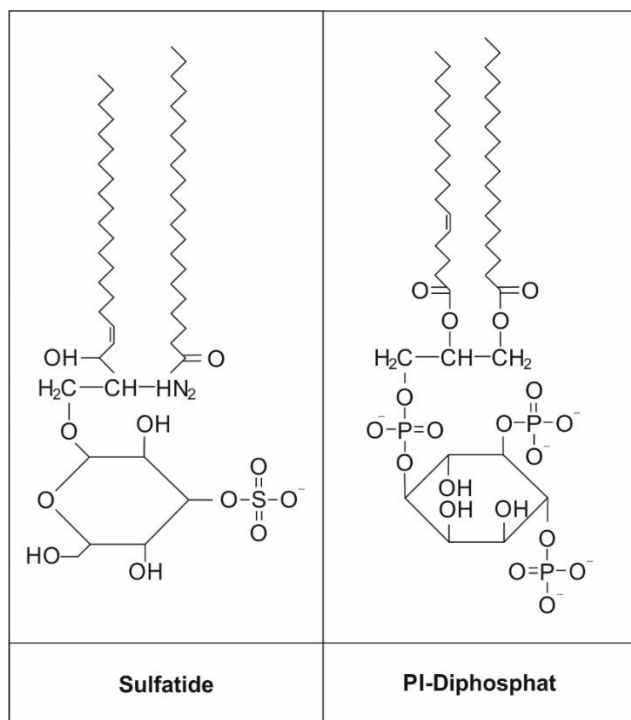


Abbildung 59: Gegenüberstellung der Strukturformeln von Sulfatiden im Vergleich zu PI-Diphosphat. Dargestellt sind die Strukturformeln der beiden Moleküle, wobei die Fettsäurereste willkürlich gewählt wurden und sich in ihrer Länge und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden können. Auffällig sind die strukturellen Homologien im Bereich der Kopfgruppe, wobei die negative Ladung bei PI-Diphosphat durch die Phosphatreste gebildet wird, während bei den Sulfatiden der Sulfatrest als negative Ladung dient. Ebenfalls analog ist das Vorhandensein der Zuckermoleküle, wodurch der hydrophobe und hydrophile Anteil des Moleküls einen vergleichbaren Abstand zueinander besitzen.

Diese Ähnlichkeit lässt sich auch im Zusammenhang mit Lipidinteraktionen anderer Proteine nachweisen. Chao et al. beschrieben beispielsweise eine selektive Lipidbindung von Phosphatidylinositol und Sulfatiden an das Protein Gasdermin-B was im Zusammenhang mit der Differenzierung von epithelialen Zellen eine Rolle spielt (CHAO et al., 2017). Die oben beschriebenen Untersuchungen für Phosphatidylinositol zum Nachweis einer direkten Beeinflussung der γ -Sekretase erfolgten unter Verwendung von aufgereinigter γ -Sekretase und mindestens 10 % Phosphatidylinositol im Lipidgemisch (HOLMES et al., 2012). Untersuchungen an aufgereinigter γ -Sekretase und deren Aktivitätsbestimmung in einem Sulfatid-angereicherten Lipidmilieu liegen zum Zeitpunkt des Verfassens der Arbeit nicht vor. In dieser Arbeit konnte jedoch auch nach Zugabe von Sulfatiden *in vitro* zu PNFs eine Verringerung der γ -Sekretase-Aktivität gezeigt werden. Die geringe Effektstärke von ca. 7 % (Abbildung 39) könnte auf die, im Vergleich zur Studie von Holmes et al., kleinere Menge der zugegebenen Sulfatide zurückzuführen sein, wodurch eine geringere Interaktion des Lipids mit der γ -Sekretase möglich ist. Ebenfalls könnte die unterschiedliche Aufreinigung die Effektstärke beeinflussen. Durch das Vorliegen weiterer Proteine könnte bei Inkubation auf PNFs eine kompetitive Bindung der Sulfatide an andere Proteine auftreten wodurch die Interaktion mit der γ -Sekretase zusätzlich verringert werden würde. Aufgrund der oben beschriebenen Ähnlichkeit zu Phosphatidylinositol wären weitere Untersuchungen an aufgereinigter γ -Sekretase in Zukunft sinnvoll um den Mechanismus einer direkten Beeinflussung der γ -Sekretase durch Sulfatide genauer zu untersuchen.

Neben der bereits erwähnten Analyse der γ -Sekretase nach *in vitro* Inkubation mit Sulfatiden erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auch die Messung der γ -Sekretase-Aktivität in metabolisch aktiven, lebenden Zellen. Hierbei ließ sich eine Aktivitätsreduktion in Folge der Sulfatidinkubation von 46 % beobachten

(Abbildung 39). Somit besteht eine stärkere Hemmung der γ -Sekretase bei erhaltener Zellintegrität, was vermuten lässt, dass neben der direkten Beeinflussung der γ -Sekretase ein zusätzlicher indirekter Effekt durch Sulfatide verursacht wird. Die Untersuchung der Proteinkonzentrationen von Nicastrin und PS 1 im Zelllysate konnte keinen signifikanten Unterschied nach Inkubation mit Sulfatiden nachweisen, sodass eine Auswirkung der Sulfatide auf den Proteingehalt der Komponenten der γ -Sekretase unwahrscheinlich erscheint. Dennoch könnte prinzipiell eine Reduktion der anderen Komponenten der γ -Sekretase vorliegen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Neben einer geänderten Proteinkonzentration der γ -Sekretase Komponenten, könnte auch die subzelluläre Lokalisation der γ -Sekretase eine Rolle für deren Aktivität spielen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Verteilung der γ -Sekretase in sog. Lipid Raft-Domänen von Bedeutung. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die γ -Sekretase innerhalb der Lipid Rafts ihre höchste Aktivität für die amyloidogene Prozessierung besitzt (HUR et al., 2008; URANO et al., 2005). Sulfatide reichern sich, wie auch andere Sphingolipide und Cholesterin, in den Lipid Rafts an (MOYANO et al., 2014), sodass im Folgenden untersucht werden sollte, ob eine Veränderung der Lipid Raft-Mikrodomänen nach Inkubation mit Sulfatiden vorliegt und ob hierdurch bedingt die γ -Sekretase-Aktivität beeinflusst wird.

5.7.3.3 Sulfatide beeinflussen die amyloidogene Prozessierung innerhalb der Lipid Rafts

In der Literatur wurde bereits in früheren Studien eine Anreicherung von Sulfatiden in den Lipid Raft-Mikrodomänen im Gehirn nachgewiesen (MOYANO et al., 2014). Im verwendeten Zellkulturmodell der SH-SY5Y-Zellen sollte daher untersucht werden, ob die Inkubation mit Sulfatiden unter den hier verwendeten Bedingungen ebenfalls zu einer stärkeren Anreicherung des Lipids in den Lipid Raft-Domänen führt. Nach Inkubation mit Sulfatiden ließ sich eine ca. dreimal stärkere Akkumulation der Sulfatide in den Raft-Domänen im Vergleich zu den Non-Raft-Domänen nachweisen (Abbildung 42). Interessanterweise führte dies nicht zu einer Verdrängung von Cholesterin, dessen Gehalt in den Raft- bzw. Non-Raft Fraktionen durch die Sulfatid-Inkubation nicht verändert wurde (Abbildung 42). Die Analyse der Proteinmarker Cadherin für die Non-Raft Fraktionen und Flotillin für die Raft-Fraktionen zeigte stattdessen eine signifikante Zunahme der Raft-Fraktionen, sodass eine Vergrößerung der Lipid Raft-Domänen in Folge der Sulfatid-Inkubation anzunehmen ist (Abbildung 41).

Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung wurden bereits in mehreren Studien Veränderungen der Lipid Raft-Mikrodomänen nachgewiesen. Martin et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Fettsäurezusammensetzung in den Lipid Rafts von kortikalem Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten sich signifikant vom Kontrollgewebe unterscheidet (MARTÍN et al., 2010). Diese Veränderungen ließen sich in einer Folgestudie bereits in den frühesten Stadien der Erkrankung nachweisen (FABELLO et al., 2014). In dieser Studie bestanden keine Unterschiede im Sulfatid-Gehalt der Lipid Rafts aus kortikalen *post mortem* Proben von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Weitere Studien an größeren

Kohorten fehlen diesbezüglich. In verschiedenen Studien ließ sich nachweisen, dass es in Folge der veränderten Lipidzusammensetzung im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung zu einer verstärkten APP/BACE1-Interaktion innerhalb der Lipid Rafts kommt, wodurch die amyloidogene Prozessierung deutlich verstärkt wird (DÍAZ et al., 2015; FABELLO et al., 2014). Somit könnten die Lipid Raft-Mikrodomänen in der Entstehung und dem Voranschreiten der Erkrankung durch eine Stimulation der Amyloid-Kaskade eine besondere Bedeutung besitzen. Die Relevanz der Lipid Rafts bei pathophysiologischen Prozessen konnte auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die ebenfalls mit einer dementiellen Entwicklung assoziiert sind, wie Morbus Parkinson und Lewy Body Demenz, bestätigt werden (FABELLO et al., 2011; MARIN et al., 2017). In diesem Zusammenhang konnte bei Patienten mit einem idiopathischen Morbus Parkinson eine signifikante, ca. 30%ige Reduktion des Sulfatid-Gehaltes in den Lipid Rafts des kortikalen Gewebes des Frontallappens nachgewiesen werden (FABELLO et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit war es im Weiteren zu untersuchen, ob durch die Anreicherung der Sulfatide im Bereich der Lipid Rafts die amyloidogene APP-Prozessierung beeinflusst werden kann. Die Untersuchung der zwei Komponenten der γ -Sekretase, Nicastrin und Presenilin, zeigte in Folge der Inkubation mit Sulfatiden eine Verschiebung sowohl von Presenilin als auch Nicastrin aus den Raft-Fraktionen in die Non-Raft Fraktionen (Abbildung 43). Für APP selbst konnte eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante, Umverteilung in die Non-Raft Fraktionen beobachtet werden. Die getrennte Untersuchung der γ -Sekretase-Aktivität zeigte schließlich, dass die Inkubation mit Sulfatiden zu einer selektiven Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität innerhalb der Raft-Domänen um ca. 40 % führt, während sich die γ -Sekretase-Aktivität in den Non-Raft-Fraktionen nicht signifikant veränderte (Abbildung 43).

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben ist im Rahmen früherer Studien im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung die Aktivität der γ -Sekretase sowohl innerhalb der Lipid Rafts als auch in den Non-Raft-Domänen untersucht worden. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Aktivität der γ -Sekretase innerhalb der Lipid Rafts im Vergleich zu den Non-Raft-Fraktionen (HUR et al., 2008; URANO et al., 2005)). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die starken Effekte der Sulfatid-Inkubation auf die γ -Sekretase-Aktivität von lebenden Zellen im Vergleich zur *in vitro* Inkubation von Sulfatiden sein. Der ca. 3,3-fach höhere Sulfatid-Gehalt in den Raft-Domänen könnte wie in Abschnitt 5.7.3.2 beschrieben zu einer stärkeren direkten Hemmung der γ -Sekretase beitragen und somit die Gesamtaktivität der γ -Sekretase in den Zellen senken. Von einigen Autoren wurde zudem ein Modell postuliert, in welchem die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP überwiegend in den Non-Raft-Domänen erfolgt, während die amyloidogene Prozessierung zu einem großen Teil in den Lipid Raft-Domänen lokalisiert ist (HICKS et al., 2012; VETRIVEL, THINAKARAN, 2010). Diese Vermutung wird unterstützt durch die S-Palmitoylierung von BACE1 (HATTORI et al., 2006) und der γ -Sekretase (CHENG et al., 2009), wodurch eine Lokalisation in den Rafts begünstigt wird. Gleichzeitig ließ sich eine Interaktion zwischen

BACE1 und APP innerhalb der Lipid Rafts nachweisen (FABELO et al., 2014), sowie eine Bindung von BACE1 an die Raft-Proteine Caveolin und Flottilin (HATTORI et al., 2006). Somit könnte die Beeinflussung der γ -Sekretase innerhalb der Raft-Mikrodomänen zu einer weiteren, selektiven Reduktion der amyloidogenen Prozessierung beitragen ohne die nicht-amyloidogene Prozessierung zu beeinträchtigen. Durch die Beeinflussung der γ -Sekretase nur innerhalb der Lipid Rafts bleibt zudem eine ausreichende Aktivität der außerhalb der Rafts lokalisierten γ -Sekretase bestehen, sodass die Prozessierung anderer γ -Sekretase Substrate zum Erhalt von physiologischen Prozessen weniger beeinflusst wird. Dies ist ein positiver Aspekt für einen möglichen therapeutischen Nutzen einer Erhöhung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes während der Alzheimer-Erkrankung.

5.7.3.4 Spezifität und Reproduzierbarkeit der Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Sulfatide

5.7.3.4.1 Die Reduktion der A β -Synthese ist spezifisch für Sulfatide

Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob die beobachteten Effekte auf die amyloidogene Prozessierung und die A β -Synthese spezifisch für Sulfatide sind oder auch durch strukturähnliche Lipide ausgelöst werden können. Den direkten Vorläufer der Sulfatide bilden dabei Galactosylceramide (GalCer). Diese Lipidklasse besteht aus einem Ceramidgerüst mit einem zusätzlichen Galactose-Rest, die negativ geladene Sulfatgruppe fehlt diesen Lipiden.

Für die den GalCer strukturverwandten Lipide GlucCer konnte in einer vorherigen Studie dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Steigerung der A β -Synthese besteht (HUNSDÖRFER, 2014). Somit wäre auch eine Beeinflussung der A β -Synthese durch GalCer denkbar. Nach Inkubation mit GalCer, in äquimolarer Menge von 20 μ M und gleichem Zeitintervall wie für die Sulfatid-Inkubation, ließ sich keine Veränderung des A β -Gehaltes im Medium nachweisen (Abbildung 44). Interessanterweise fand sich nach 24-stündiger Inkubation jedoch eine signifikante Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität um ca. 17 % bzw. 10 % (Abbildung 44). Im Vergleich zur Inkubation mit Sulfatiden war diese Aktivitätsreduktion der beiden Sekretasen jedoch signifikant geringer (siehe hierzu Abschnitt 4.4.8). Aus GalCer werden durch die CST Sulfatide gebildet, sodass im Verlauf der 24-stündigen Inkubation auch der Sulfatid-Gehalt der Zellen zunimmt. Hiermit ließen sich sowohl die leichte Reduktion der Sekretase-Aktivität als auch der fehlende Effekt auf den A β -Gehalt erklären. Während der A β -Gehalt im Medium durch die A β -Synthese der letzten 16 Std. vor Inkubationsende bestimmt wird, beschreibt die Enzymaktivitätsmessung nur die Aktivität der β - und γ -Sekretase zum Ende der Inkubationszeit nach 24 Stunden. Somit könnte die reduzierte Sekretase-Aktivität Folge des steigenden Sulfatid-Gehaltes sein, während sich dieser auf den A β -Gehalt erst nach einer noch längeren Inkubationszeit auswirken würde. Zur Überprüfung dieser Annahme wäre ein transienter Knock-Down der CST während der GalCer-Inkubation notwendig, um so die *de novo* Synthese von Sulfatiden zu verhindern. Hierdurch müssten dann die Effekte auf die Sekretasen aufgehoben werden. Ebenso könnte der Sulfatid-Gehalt der

Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten der GalCer-Inkubation bestimmt werden, was einen indirekten Hinweis geben würde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten Effekte auf die amyloidogene Prozessierung von APP spezifisch für die Lipidklasse der Sulfatide und nicht für deren Vorläufer sind. GalCer konnte unter den genannten Bedingungen, trotz der bestehenden Strukturhomologie, keine vergleichbare Beeinflussung der A β -Synthese bewirken. Dies legt nahe, dass die negativ geladene Sulfatgruppe für die beobachteten Effekte von besonderer Relevanz zu sein scheint. Die bereits in Abschnitt 5.7.3.2 beschriebene Annahme einer direkten Interaktion der negativ geladenen Kopfgruppe der Sulfatide mit der γ -Sekretase wird durch diese Ergebnisse zusätzlich gestützt.

5.7.3.4.2 Endogene Sulfatide beeinflussen die amyloidogene APP-Prozessierung

Um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und die Relevanz für die Alzheimer-Erkrankung weiter zu untersuchen erfolgten zusätzlich zu den Sulfatid-Inkubationen Zellkultur-Versuche mit verschiedenen Knock-Down-Zelllinien. Dieser Versuch bietet im Vergleich zur Inkubation den Vorteil, dass die Sulfatid-Verteilung der physiologischen Verteilung in der Zelle entspricht, während sich die Sulfatide nach Inkubation zunächst überwiegend an der Plasmamembran anreichern. Mit Hilfe einer Defizienz des Sulfatid-degradierenden Enzyms ASA (Genname: ARSA) wurde der endogene Sulfatid-Gehalt innerhalb der Zellen erhöht. Hieraus resultierte, ebenso wie für die Sulfatid-Inkubation gezeigt, eine signifikante Reduktion der β -Sekretase-Aktivität um ca. 19 % bzw. der γ -Sekretase-Aktivität um ca. 32 % (Abbildung 46). Beachtet man frühere Studien an ARSA-Knock-out-Zelllinien zeigt sich hier ein signifikanter Anstieg der Sulfatide auf das ca. 4–5-fache (SARAVANAN et al., 2007). Dies bedeutet für die hier verwendeten defizienten Zellen mit einer Restexpression von 23 %, wird im Vergleich zu den durchgeführten Sulfatid-Inkubationen eine deutlich geringere Anreicherung der Sulfatide vorliegen. Hierdurch lassen sich die geringeren Effektstärken im Vergleich zu den Sulfatid-Inkubationen erklären. Dieses Ergebnis zeigt jedoch auch, dass eine geringe Steigerung des Sulfatid-Gehaltes bereits eine signifikante Reduktion der β - bzw. γ -Sekretase-Aktivität bewirkt. Somit kann angenommen werden, dass kein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen dem Sulfatid-Gehalt und der Sekretase Aktivität besteht. Eine 25-fache Steigerung des Sulfatid-Gehaltes mit Hilfe der Inkubation führte zu einer 34%igen Reduktion der β -Sekretase-Aktivität bzw. 46%igen Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität, während die Steigerung des Sulfatid-Gehaltes um das 4–5-fache eine Verminderung der β -/ γ -Sekretase-Aktivität um ca. 19 % bzw. 32 % bewirkte. Dies könnte für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Bedeutung sein, da hierdurch ausreichende Effektstärken bei besserem Nebenwirkungsprofil möglich wären. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Effektstärken könnte sich auch aus der Verteilung der Sulfatide innerhalb der Zellen ergeben, wobei sich nach Inkubation die Sulfatide zunächst in der Plasmamembran anreichern, während die Akkumulation bei einer reduzierten ASA-Aktivität überwiegend in den Lysosomen

stattfinden wird (WITTKE et al., 2004). Die im Verhältnis zur Steigerung des Sulfatid-Gehaltes geringere Effektstärke nach Inkubation mit Sulfatiden könnte auch Folge einer verstärkten Degradation der Sulfatide sein. Der hieraus resultierende Anstieg des Ceramid-Gehaltes der Zelle, könnte wie in Abschnitt 5.7.3.1 beschrieben, zu einem gegenläufigen Effekt auf die β -Sekretase führen. In einer neueren Studie ließ sich auch eine Steigerung der γ -Sekretase-Aktivität und $A\beta_{42}$ -Bildung durch Ceramid-Analoga nachweisen (TAKASUGI et al., 2015). In den ARSA-defizienten Zellen können, aufgrund der fehlenden Sulfatid-Degradation, keine Ceramide akkumulieren, sodass ausschließlich der Sulfatid-Effekt gemessen wird.

Im Gehirn der Alzheimer-Patienten ließ sich wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben eine ca. 27%ige Reduktion des Sulfatid-Gehaltes beobachten. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass eine Steigerung des Sulfatid-Gehaltes über das physiologische Maß, eine Reduktion der β - und γ -Sekretase-Aktivität bewirken kann. Umgekehrt sollte auch untersucht werden, ob ein reduzierter Sulfatid-Gehalt zu einer gesteigerten Aktivität der Sekretasen führt. Es erfolgte zu diesem Zweck mittels siRNS ein transients Knock-Down des für die Sulfatid-Synthese verantwortlichen Enzyms CST (Genname: Gal3st1), wobei hierbei eine Restexpression von ca. 80 % erhalten blieb, um eine ähnlich geringe Sulfatid-Reduktion wie im Alzheimer Gehirn zu simulieren. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der β -Sekretase-Aktivität um ca. 7,5 % in den Gal3st1-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 46). Auch für die γ -Sekretase ließ sich in Folge des reduzierten Sulfatid-Gehaltes eine Steigerung der Aktivität um 24 % nachweisen (Abbildung 46).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein reduzierter Sulfatid-Gehalt im Zellkulturmodell eine Steigerung der amyloidogenen Prozessierung bedingt. Somit könnte der reduzierte Sulfatid-Gehalt im Gehirn von Alzheimer-Patienten ebenfalls eine vermehrte Synthese von $A\beta$ bedingen und hierüber die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung verstärken. Interessanterweise konnte im Gehirn von Alzheimer-Patienten ebenfalls eine signifikante Steigerung der β -Sekretase-Aktivität nachgewiesen werden (LI et al., 2004). Die Reduktion der Sulfatide im Gehirn der Alzheimer-Patienten könnte somit die vermehrte β -Sekretase-Aktivität mitbedingen. Auf der anderen Seite konnte im Zellkulturmodell eine Hemmung der Sulfatid-Degradation, bei nur mäßiger Beeinflussung des Sulfatid-Gehaltes, zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität der β - und γ -Sekretase und somit der amyloidogenen Prozessierung beitragen.

5.7.3.5 Sulfatide reduzieren die amyloidogene Prozessierung *in vivo*

Nachdem an Hand von Zellkulturversuchen in SH-SY5Y-Zellen eine Reduktion der amyloidogenen Prozessierung in Folge eines erhöhten Sulfatid-Gehaltes nachgewiesen werden konnte, sollte die *in vivo* Relevanz dieser Ergebnisse untersucht werden. Während eine Reduktion des $A\beta$ -Gehaltes durch eine Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes in einer anderen Zelllinie in einer früheren Studie gezeigt werden

konnte (siehe hierzu auch Abschnitt 5.7.1) existieren bisher keine Daten dazu, inwiefern diese Prozesse auch im Gehirn eine Rolle spielen könnten.

In SH-SY5Y-Zellen wurde gezeigt, dass durch eine *in vitro* Zugabe von Sulfatiden auf PNFs eine direkte Hemmung der γ -Sekretase erreicht werden kann. Um zu untersuchen, ob ähnliche Effekt auch im humanen Gehirngewebe nachgewiesen werden können wurden PNF's aus Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten hergestellt und diese anschließend ebenfalls *in vitro* mit Sulfatiden behandelt. Es zeigte sich in Folge dessen eine Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität in allen vier Proben, wobei die Aktivität im Mittel um 13 % signifikant reduziert war (Abbildung 47). Dies legt nahe, dass die beschriebenen Mechanismen nicht nur im Zellkulturmodell, sondern auch im Gehirngewebe eine Rolle spielen. Für andere Lipide, wie beispielsweise Plasmalogene, wurden in früheren Studien bereits ähnliche Effekte beobachtet (ROTHHAAR et al., 2012). Die Effektstärke der direkten Beeinflussung der γ -Sekretase lag im Zellkulturmodell deutlich unter der in lebenden Zellen gemessenen Reduktion der Sekretase-Aktivität. Hieraus lässt sich vermuten, dass durch eine Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes *in vivo* im Gehirngewebe eine noch deutlichere Verminderung der amyloidogenen Prozessierung bewirkt werden könnte.

Die Konsequenz einer Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes *in vivo* im Gehirngewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand eines Mausmodells untersucht. Für die homozygoten Arylsulfatase A-defizienten Mäuse (ARSA^{-/-}-Mäuse) konnte in früheren Studien bereits eine Akkumulation von Sulfatiden u. a. in Neuronen nachgewiesen werden. Die heterozygoten ARSA^{+/-}-Mäuse zeigten gleichzeitig keinen entsprechenden Phänotyp und keinen erhöhten Sulfatid-Gehalt, sodass diese als Kontrolle verwendet wurden (ECKHARDT et al., 2007; MOLANDER-MELIN et al., 2004).

In den hier untersuchten Proben zeigte sich im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchung im Gehirn der defizienten Mäuse ein ca. zweimal höherer Sulfatid-Gehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 48). Dieser gesteigerte Sulfatid-Gehalt führte, ähnlich wie im Zellkulturmodell, zu einer signifikanten Reduktion der β -Sekretase-Aktivität um 15 %, und der γ -Sekretase-Aktivität um 49 % (Abbildung 49). Es ließ sich ebenfalls ein um 44 % verminderter Proteingehalt von BACE1 nachweisen (Abbildung 49), sodass man annehmen kann, dass der zugrundeliegende Mechanismus vergleichbar mit dem des Zellkulturmodells ist. Diese Ergebnisse bestätigen die *in vivo* Relevanz der im Zellkulturmodell nachgewiesenen Effekte auf die amyloidogene Prozessierung. Interessanterweise zeigte sich trotz der nur zweifachen Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes eine ca. 50%ige Aktivitätsreduktion für die γ -Sekretase. Im murinen Gehirngewebe ließen sich somit im Verhältnis zur Steigerung des Sulfatid-Gehaltes deutlich stärkere Effekte auf die γ -Sekretase-Aktivität nachweisen. *In vivo* im Mausmodell führte ein zweimal höherer Sulfatid-Gehalt zu einer 50%igen Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität während im Zellkulturversuch im SH-SY5Y ARSA KD eine 4–5fache Steigerung des Sulfatid-Gehaltes in einer nur 30%igen Verminderung der γ -Sekretase-Aktivität resultierte. Die im Vergleich zur Reduktion des Proteingehaltes

von BACE 1 (ca. 44%ige Reduktion) nur geringfügige Verminderung der β -Sekretase-Aktivität um ca. 15 % lässt sich am ehesten durch eine höhere Unspezifität des fluoreszenzbasierten Enzymversuchs im murinen Hirngewebe erklären.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass auch *in vivo* im Mausmodell durch eine Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes die amyloidogene Prozessierung gehemmt werden kann. Dies unterstützt die mögliche therapeutische Relevanz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Bei den hier verwendeten Mäusen handelt es sich nicht um Mäuse eines Alzheimer Mausmodells, sodass aufgrund der niedrigen Konzentration eine Analyse des zerebralen A β -Gehaltes mittels ELISA nicht möglich war. Ebenso kann aufgrund des Versuchsaufbaus keine Aussage zu einer Verbesserung der kognitiven Funktionen und der Plaque-Last durch Sulfatide getroffen werden. Um diese Fragestellungen zu adressieren müssten ergänzende Tierversuche im Alzheimer Mausmodell (z. B.: 5xFAD Mäuse) im Rahmen nachfolgender Studien durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die indirekte Beeinflussung des Sulfatid-Gehaltes durch beispielsweise Vitamin K bzw. Vitamin D und deren Effekt auf die amyloidogene Prozessierung genauer untersucht werden.

5.8 Beeinflussung der A β -Aggregation durch Sulfatide und andere Lipide

Neben der A β -Synthese und A β -Degradation, welche den zerebralen Gehalt der A β -Peptide im Gleichgewicht halten, spielt insbesondere die A β -Aggregation in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung eine besondere Rolle. Während für die unlöslichen, aus reifen A β -Fibrillen gebildeten senilen Plaques keine relevante toxische Wirkung auf neuronale Zellen belegt werden konnte, ließ sich für einige A β -Aggregationsformen, insbesondere die kleineren A β -Oligomere eine erhöhte Neurotoxizität nachweisen (CLEARY et al., 2005; RESENDE et al., 2008).

Mit Hilfe verschiedener Untersuchungen wurde daher der Einfluss der Sulfatide auf die A β -Aggregation untersucht. Ceramide, als Vorläuferlipide der Sulfatide, dienten dabei als Kontrolle. So konnte eine unspezifische Beeinflussung der Aggregation durch die Zugabe eines Lipides ausgeschlossen werden und der Effekt der Galactosyl-Sulfat-Gruppe untersucht werden. Mittels Rasterkraft-Mikroskopie ließen sich nach 24-stündiger Inkubation mit Ceramiden signifikant mehr Fibrillen nachweisen als nach der Inkubation mit Sulfatiden (Abbildung 50). Zur weiteren Quantifizierung wurde ergänzend im ThT-Versuch die Aggregationskinetik von synthetischem A β unter Zugabe von Sulfatiden bzw. Ceramiden untersucht. Durch Thioflavin T kann dabei die Konformationsänderung von den α -helikalen Strukturen der A β -Monomere zu den β -Faltblattstrukturen der A β -Fibrillen detektiert werden. Es zeigte sich durch die Zugabe von Sulfatiden eine signifikante Reduktion der Aggregationsgeschwindigkeit (ca. 20 %) und des Maximums (ca. 30 %) der Kinetik bei gleichzeitiger Zunahme der Verzögerungszeit im Vergleich zu Ceramiden (Abbildung 51). Wie bereits beschrieben wird heute den A β -Oligomeren aufgrund ihrer nachgewiesenen Toxizität die größte Bedeutung bei der A β -Aggregation zugeschrieben. Mit Hilfe eines

spezifischen Antikörpers gegen die oligomere Form von A β wurde daher auch der Einfluss von Sulfatiden auf diese Aggregationsform untersucht. Die A β -Oligomere zeigten sich in Folge der Inkubation mit Sulfatiden im Vergleich zu Ceramiden ebenfalls um ca. 15 % reduziert (Abbildung 51). Im hier verwendeten *in vitro* Modell reduzieren demnach Sulfatide die Aggregation von A β , wobei auch das Vorliegen der toxischen A β -Oligomere signifikant vermindert werden kann.

Für einige Lipide konnte eine Beeinflussung der A β Aggregation *in vitro* bereits beobachtet werden. Für die mehrfach ungesättigte ω 3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) ließ sich dabei eine starke Inhibition der A β -Aggregation nachweisen welche durch eine Stabilisierung der α -helikalen Struktur von A β bedingt war (HOSSAIN et al., 2009). Auf der anderen Seite konnte bereits vor ca. 25 Jahren ein spezielles an das Gangliosid GM1 gebundenes A β (GA β) detektiert werden (YANAGISAWA et al., 1995). Für dieses in den folgenden Jahren vielfach untersuchte Peptid, ließ sich eine Verstärkung der A β -Aggregation und Fibrillenbildung nachweisen (CHOO-SMITH et al., 1997; KAKIO et al., 2002). Die Entstehung von A β -Fibrillen ist dabei besonders ausgeprägt in einer Umgebung, die die Struktur von Lipid Raft-Mikrodomänen simuliert (OKADA et al., 2008). Ganglioside zählen wie Sulfatide zu den Glycosphingolipiden, sodass eine Strukturhomologie zu diesen besteht und eine ähnliche Auswirkung auf die A β -Aggregation denkbar gewesen wäre. Im Gegensatz zu GM1 scheinen entsprechend der oben genannten Ergebnisse Sulfatide die Aggregation von A β ₄₂ jedoch eher zu hemmen. Sulfatide besitzen im Vergleich zu Gangliosiden eine negative Ladung, sodass man vermuten könnte, dass diese für den hemmenden Effekt auf die Aggregation von besonderer Relevanz ist. In einigen neueren Studien konnte interessanterweise im Mausmodell eine Co-Lokalisation von GM1 mit A β -Plaques, bei gleichzeitiger Reduktion der Sulfatide in diesen Regionen, nachgewiesen werden (MICHNO et al., 2022). Letztere ließ sich u. a. durch den erhöhten ApoE-Gehalt im Bereich der Plaques erklären, welcher den Abtransport von Sulfatiden verstärken könnte (KAYA et al., 2020). Dieser Verlust der Sulfatide könnte, wie in dieser Arbeit am *in vitro* Modell gezeigt, zu einer weiteren Stimulation der A β -Aggregation führen.

Zum Zeitpunkt des Verfassens der Arbeit sind dies die ersten Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Sulfatiden auf die A β -Aggregation. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang auch, ob Sulfatide die durch GA β gesteigerte Fibrillogenese ebenfalls inhibieren könnten. Hierbei wäre eine direkte Konkurrenz um die A β -Bindung denkbar, die zu einer verstärkten Hemmung insbesondere in den Sulfatid-reichen Lipid Raft Domänen führen könnte. Dies müsste in weiteren *in vitro* Versuchen noch genauer analysiert werden.

5.9 Sulfatide als therapeutischer Ansatz bei der Alzheimer-Erkrankung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine protektive Wirkung von Sulfatiden bei der Alzheimer-Erkrankung, sowohl durch eine reduzierte A β -Synthese als auch eine verminderte A β -Aggregation,

möglich ist. In Abbildung 60 werden die vielfältigen Mechanismen über die Sulfatide einen positiven Effekt auf die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung ausüben nochmals zusammengefasst.

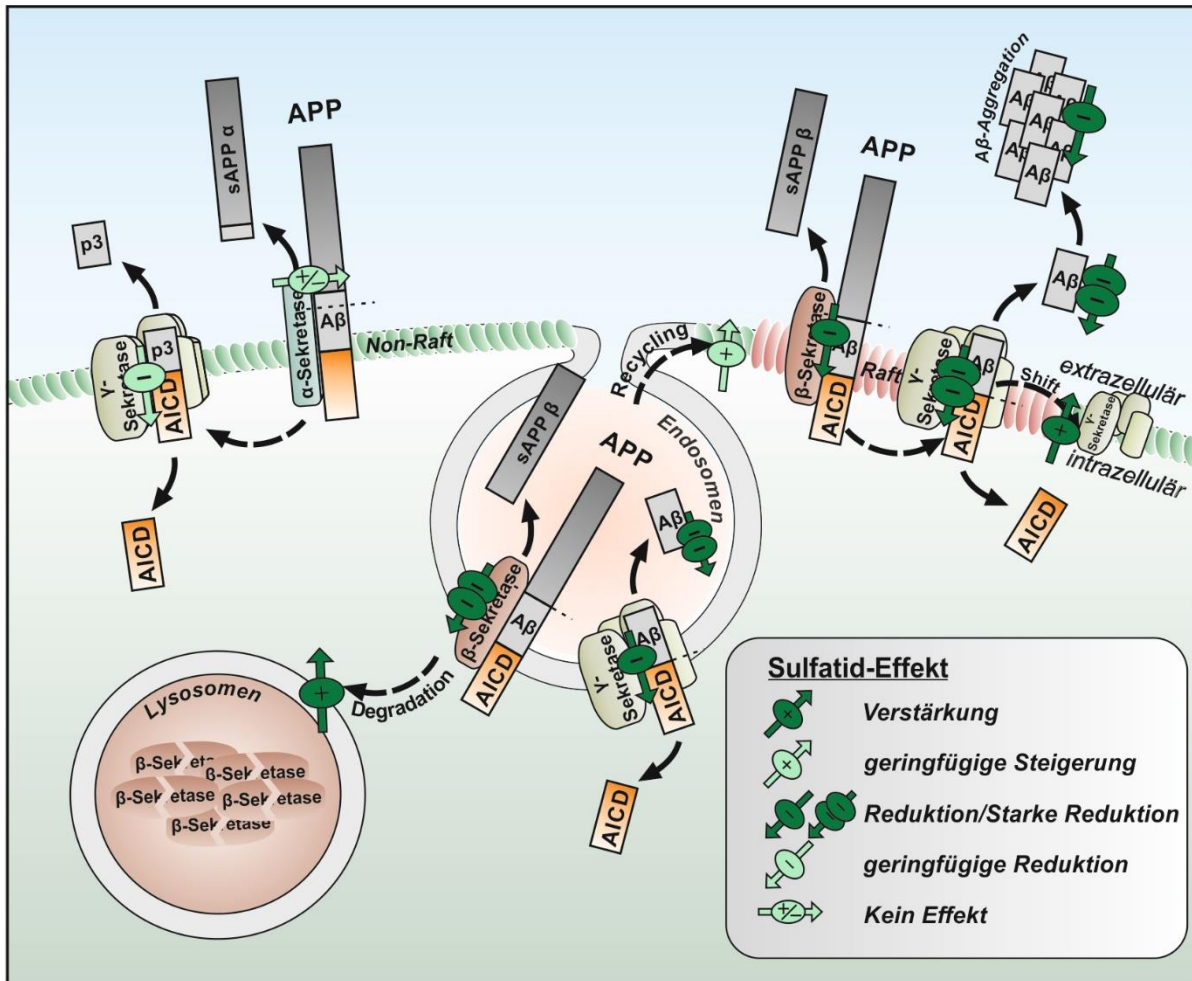


Abbildung 60: Positiver Einfluss der Sulfatide auf die pathophysiologischen Prozesse der Alzheimer-Erkrankung. Schematische Darstellung des positiven Effektes von Sulfatiden auf die APP-Prozessierung und A β -Aggregation. Sulfatide hemmen die amyloidogene Prozessierung durch eine gesteigerte BACE 1-Degradation. Die Reduktion der β -Sekretase-Aktivität erfolgt noch deutlicher innerhalb der Endosomen durch vermehrten Transport der β -Sekretase an die Plasmamembran. Gleichzeitig wird durch Sulfatide die γ -Sekretase-Aktivität reduziert. Durch die Umverteilung der γ -Sekretase von den Raft- in die Non-Raft-Domänen wird insbesondere die innerhalb der Raft-Domänen für die amyloidogene Prozessierung verantwortliche γ -Sekretase inhibiert. Sulfatide zeigen außerdem einen positiven Effekt durch eine Reduktion der A β -Aggregation.

Somit wäre ein Eingriff in die Sulfatid-Homöostase des Gehirns als therapeutischer Ansatz denkbar. Das hier verwendete Mausmodell der Arylsulfatase A-defizienten Mäusen dient dem Erforschen der MLD. Bei dieser Erkrankung kommt es in Folge der Sulfatid-Akkumulation meist bereits während der frühen Kindheit zu schweren Störungen der Myelinisierung und der motorischen Funktionen (HESS et al., 1996). Eine vollständige Inhibition der Sulfatid-Degradation als therapeutischer Ansatz für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung scheint somit aufgrund von starken unerwünschten Nebenwirkungen wenig erfolgsversprechend. Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass die Beeinflussung der Sulfatid-

Homöostase insbesondere während des Entwicklungsprozesses sich auf die Myelinisierung auswirkt. Bei einem Eingreifen erst im hohen Alter sind schwerwiegende Störungen der motorischen Funktionen nicht mehr zu erwarten.

Aufgrund der hohen Effektstärken und starken Aktivitätsreduktion der an der amyloidogenen Prozessierung beteiligten Sekretasen könnte jedoch eine geringe Veränderung der Sulfatid-Homöostase die Amyloid-Kaskade bereits positiv beeinflussen. Insbesondere aufgrund des im Alzheimer-Gehirn nachweisbaren Mangels an Sulfatiden, könnte eine Normalisierung des Sulfatid-Gehaltes sich bereits positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Eine therapeutische Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn von erkrankten Alzheimer-Patienten wäre dabei mit Hilfe verschiedener Ansätze denkbar.

Neben einem medikamentösen Eingreifen in den Sulfatid-Metabolismus durch Inhibition der Arylsulfatase A oder Aktivierung der CST wäre auch eine Steigerung des Sulfatid-Gehaltes durch Nahrungsergänzungsmittel möglich. Ob eine orale Zufuhr von bestimmten Lipidklassen oder Vorläuferlipiden tatsächlich zu einem Anstieg des zerebralen Sulfatid-Gehaltes führen kann, wurde bisher nur wenig untersucht. In diesem Zusammenhang konnte in einer neueren Studie im Tiermodell nachgewiesen werden, dass der Sphingolipid-Gehalt im Gehirn von Mäusen sich durch die diätetische Aufnahme von Cerebrosiden verändern lässt. Insbesondere der Sulfatid-Gehalt ließ sich im Gehirngewebe durch die Aufnahme von Seegurken-Glucoerebrosiden steigern, während der Gehalt an Ceramiden hierdurch reduziert werden konnte (SONG et al., 2017). Es konnte außerdem an Hand des SAMP8-Alzheimer-Mausmodells gezeigt werden, dass durch die Fütterung mit dem genannten Seegurken-Extrakt die kognitiven Funktionen der Mäuse sich besserten und sich die $A\beta_{42}$ -Konzentration im Hippocampus reduzierte (SONG et al., 2017). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Beeinflussung der Sulfatid-Homöostase durch eine spezielle Ernährung im Mausmodell möglich ist und sich hierdurch auch positive Effekte auf die kognitiven Leistungen ergeben könnten. Weitere Studien müssten jedoch zeigen, ob sich dieses Modell auf den humanen Organismus übertragen lässt und ob die verbesserten kognitiven Funktionen sich kausal auf den gesteigerten Sulfatid-Gehalt zurückführen lassen.

Neben einer Substitution von Cerebrosiden erscheint auch der Einsatz von Nahrungsergänzungsmitteln in Form von fettlöslichen Vitaminen ein interessanter Ansatz zur Erhöhung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes. Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben ließ sich im Mausmodell für die fettlöslichen Vitamine K und D eine Steigerung der zerebralen Sulfatid-Synthese nachweisen (POPESCU et al., 2018; SUNDARAM et al., 1996). Sundaram et al. konnten beobachten, dass die Fütterung mit Vitamin K-reicher Diät in einer ca. 18%igen Steigerung des Sulfatid-Gehaltes innerhalb von 14 Tagen resultierte (SUNDARAM et al., 1996). Betrachtet man die Daten der vorliegenden Arbeit, in welchen eine ca. 27%ige Reduktion der Sulfatide im Alzheimer-Gehirn nachgewiesen werden konnte, wäre somit alleine durch die Substitution von Vitamin K ein Angleichen des Sulfatid-Gehaltes an die nicht an Alzheimer

erkrankte Kontrollgruppe denkbar. In einer späteren Studie ließen sich ähnliche Effekte auch durch die Supplementierung von Vitamin D erreichen (POPESCU et al., 2018). Dies ist insbesondere von Relevanz, da Alzheimer-Patienten häufig einen Vitamin K und D Mangel aufweisen, sodass einer hierdurch bedingten Reduktion der Sulfatid-Synthese entgegengewirkt werden könnte. Studien über die Auswirkung einer Vitamin K-Substitution auf den zerebralen Sulfatid-Gehalt beim erwachsenen Menschen existieren nach Wissen des Autors bisher nicht. Eine neuere Studie zeigte darüber hinaus einen positiven Einfluss von mehrfachungesättigten Fettsäuren (PUFAs, engl.: polyunsaturated fatty acids) auf den zerebralen Sulfatid-Gehalt (WANG et al., 2020). In dieser Studie konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sich durch eine PUFA-arme Ernährung der Sulfatid-Gehalt im Gehirn durch eine gesteigerte Degradation der Sulfatide reduziert. Gleichzeitig ließen sich diese Veränderungen durch eine PUFA-reiche Ernährung vollständig umkehren (WANG et al., 2020). Interessanterweise konnten im Alzheimer-Mausmodell in einer früheren Studie durch eine PUFA-reiche Ernährung der A β ₄₂-Gehalt und die A β -Plaques reduziert werden (LIM et al., 2005). Möglicherweise könnte hierbei eine Steigerung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes auch eine Rolle spielen, wobei dies bisher nicht weiter untersucht wurde.

Betrachtet man die Möglichkeiten der therapeutischen Steigerung des Sulfatid-Gehaltes getrennt, könnte eine medikamentös oder alimentär induzierte Reduktion des Abbaus der Sulfatide ebenso wie eine Steigerung der Sulfatid-Synthese zu einer Erhöhung des Sulfatid-Gehaltes im Gehirn beitragen. Gleichzeitig würde aus einer vermehrten Synthese oder reduzierten Degradation eine Verschiebung des Sphingolipid-Gleichgewichtes unter Reduktion des Ceramid-Gehaltes resultieren. Für Ceramide sind negative Effekte sowohl auf die A β -Synthese, über eine Steigerung der BACE1-Aktivität, als auch eine Erhöhung der A β -Toxizität beschrieben (JAZVINŠČAK JEMBREK et al., 2015). Eine Verminderung der Ceramide würde sich somit, ergänzend zum Effekt der Sulfatide, positiv auf die Alzheimer-Pathologie auswirken und so eine noch stärkere therapeutische Wirkung erzielen. Weitere Studien im Tiermodell müssten folgen um diese Annahmen zu belegen.

5.10 Fazit und Ausblick

Die Literaturlage bezüglich des Zusammenhangs der Alzheimer-Erkrankung und des Sulfatid-Metabolismus hatte in der Vergangenheit keine eindeutigen Ergebnisse erbracht. Viele Studien belegten eine Reduktion des zerebralen Sulfatid-Gehaltes während der Alzheimer-Erkrankung, andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen. In dieser Arbeit ließ sich eine signifikante Reduktion der Sulfatide nachweisen, wobei durch die Untersuchung einer größeren Kohorte die Erkenntnisse früherer Studien, dass es im Rahmen der Erkrankung zu einem Sulfatid-Verlust kommt, bekräftigt werden konnten. Gleichzeitig lagen bisher wenig Untersuchungen dazu vor ob die Sulfatid-Reduktion Folge der Erkrankung ist, oder ob der Verlust der Sulfatide die pathophysiologischen Prozesse mit begünstigen könnte.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl auf Zellkulturebene als auch im Mausmodell ein Regulationsmechanismus zwischen der APP-Prozessierung und der Sulfatid-Synthese existiert. Dabei wurde beobachtet, dass AICD, als intrazelluläres Prozessierungsprodukt von APP, die Sulfatid-Synthese durch eine Reduktion der Genexpression der CST inhibiert. Die genregulatorische Wirkung von AICD wird in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert. Die hier beobachtete Beeinflussung der Transkription der CST unterstützt durch den Nachweis eines weiteren AICD-regulierten Gens die Annahme dieser physiologischen Eigenschaft von AICD. Ähnlich wie es auch für andere Gene nachgewiesen werden konnte, zeigte sich die inhibitorische Wirkung abhängig von dem AICD-Adapterprotein Fe65. Auch diesbezüglich waren die Ergebnisse früherer Studien nicht alle kongruent, sodass die FE65-vermittelte genregulatorische Wirkung von AICD aufgrund dieser Arbeit weitere Evidenz gewinnt. Ergänzende Untersuchungen sollten folgen, um den genauen Mechanismus der Genregulation aufzudecken. In diesem Zusammenhang wurde in früheren Studien an anderen Genen beobachtet, dass überwiegend aus der amyloidogenen Prozessierung stammendes AICD eine genregulatorische Funktion besitzt (GRIMM et al., 2015a). Um dieser Fragestellung nachzugehen, könnten zusätzliche Untersuchungen der CST-Genexpression in einer BACE-defizienten Zelllinie hilfreich sein. Wäre diese Annahme auch für die CST-Genexpression gültig, könnte eine verstärkte amyloidogene Prozessierung im Erkrankungsverlauf zu einer Reduktion der Sulfatid-Synthese beitragen und somit den Sulfatid-Gehalt im Gehirn senken. Neben der Sulfatid-Synthese spielt jedoch auch die Sulfatid-Degradation für das Gleichgewicht im Gehirn eine wichtige Rolle. Ziel weiterer Studien sollte es daher sein zu untersuchen, ob auch der Abbau der Sulfatide durch die Alzheimer-Pathologie beeinflusst werden könnte. Erste Hinweise hierfür ergaben sich während dieser Arbeit aufgrund einer im humanen Alzheimer-Gehirn gesteigerten Genexpression der ASA, was in einer verstärkten Degradation der Sulfatide in den Lysosomen resultieren könnte. Weitere Studien könnten untersuchen, ob die gesteigerte Expression auch in einem erhöhten Proteingehalt und einer erhöhten Enzymaktivität der ASA resultiert und folglich mitverantwortlich für den Sulfatid-Verlust bei der Alzheimer-Erkrankung ist.

Aufgrund der Ergebnisse früherer Studien sollten im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkungen eines veränderten Sulfatid-Gehaltes auf die pathophysiologischen Prozesse der Alzheimer-Erkrankung näher untersucht werden. Sowohl im Zellkulturmodell als auch im Mausmodell, ließ sich mit Hilfe verschiedener Ansätze durch eine Steigerung des Sulfatid-Gehaltes eine signifikante Reduktion der amyloidogenen Prozessierung von APP nachweisen. In den weiteren Analysen zeigte sich eine Inhibition der Enzymaktivität der β - und γ -Sekretase, was den in anderen Studien bereits beobachteten Einfluss der Lipidkomposition der Membranen auf die Sekretasen nochmals unterstreicht. Zusätzlich gelang im Rahmen dieser Arbeit die weitere Aufschlüsselung des zugrundeliegenden Mechanismus. Für die β -Sekretase ließ sich eine verstärkte lysosomale Degradation von BACE1 nachweisen, womit die Sulfatide als direkter Gegenspieler zu den BACE1-stabilisierenden Ceramiden gesehen werden können (PUGLIELLI et al., 2003). Die Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität ließ sich überwiegend auf eine Verschiebung der

γ -Sekretase in die non-Raft-Regionen, sowie eine direkte Inhibition der γ -Sekretase zurückführen. Hierbei ließ sich anhand der hiesigen Untersuchungen nur eine geringe direkte Inhibition beobachten. Weitere Studien an aufgereinigtem γ -Sekretase-Komplex müssten daher folgen um die postulierte direkte Interaktion mit den Sulfatiden bestätigen zu können. In diesem Zusammenhang wären auch weitere Untersuchungen, beispielsweise zur Analyse von Bindungsstellen sinnvoll, um hierdurch neue therapeutische Ansätze zu gewinnen.

Während für verschiedene Fettsäuren bereits eine Beeinflussung der A β -Aggregation nachgewiesen werden konnte bestanden in der Literatur bisher keine Studien zum Einfluss von Sphingolipiden wie Ceramiden und Sulfatiden auf die Aggregation von A β . Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich mit Hilfe verschiedener Methoden eine Reduktion der A β -Aggregation von synthetischem A β durch die Zugabe von Sulfatiden beobachten. Diese Ergebnisse sollten mit Hilfe weiterer Versuche bestätigt werden, wobei hierbei insbesondere Lipidgemische verwendet werden sollten, welche eine Lipidumgebung ähnlich der Plasmamembran bilden um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren.

Zukünftige Studien im Tierversuch, beispielweise am murinen Alzheimer-Modell, könnten den Zusammenhang zwischen dem zerebralen Sulfatid-Gehalt und der amyloidogenen Prozessierung unter pathophysiologischen Bedingungen noch näher untersuchen. Immunhistochemische Färbungen der Amyloid-Plaques könnten der Analyse des Effektes der reduzierten amyloidogenen Prozessierung auf die Plaque-Last im Gehirn dienen. Ebenfalls wären Tests zur Beurteilung von Gedächtnis- und Lernfunktionen wünschenswert um die klinische Relevanz der bisherigen Daten zu bestätigen. Ließe sich auch auf diese Parameter ein positiver Effekt beobachten könnte in der Folge untersucht werden, mit Hilfe welches therapeutischen Ansatzes eine Erhöhung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes ohne ausgeprägte Nebenwirkungen möglich wäre. Im Weiteren könnte analysiert werden ob sich dieses Modell in den humanen Organismus übertragen lässt. Aufgrund der beobachteten zerebralen Sulfatid-Reduktion bei Alzheimer-Patienten wäre darüberhinaus die Untersuchung von Sulfatiden im Serum oder Liquor als möglicher Biomarker zur Früherkennung der Erkrankung von Interesse. Diesbezüglich konnte in einer früheren Studie eine Reduktion der Sulfatide um ca. 40 % im Liquor von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (HAN et al., 2003b). In einer weiteren Studie ließ sich zudem eine Erhöhung der Ceramide im Liquor nachweisen (SATOI et al., 2005). Ein Serum-Biomarker zur Früherkennung wäre aufgrund der geringeren Invasivität im Vergleich zur Liquordiagnostik in der routinemäßigen Untersuchung vorteilhaft. Trotz intensiver Forschungen in den letzten Jahren, ließ sich bisher kein serologischer Biomarker mit einer ausreichenden Sensitivität und Spezifität für die Alzheimer-Erkrankung detektieren. Interessanterweise konnten Mielke et al. in einer longitudinalen Studie eine Erhöhung von Ceramiden und Sulfatiden im Serum mit dem späteren Auftreten einer Alzheimer-Erkrankung in Verbindung bringen (MIELKE et al., 2010a; MIELKE et al., 2010b)). Ein kausaler Zusammenhang könnte möglicherweise in einem verstärkten Transport der Sulfatide über die Blut-Hirn-Schranke bestehen (HAN et al., 2003b).

Sulfatide könnten somit Bestandteil eines Markers zur Früherkennung der Erkrankung bilden. In weiteren Studien könnten diese Zusammenhänge näher analysiert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte den mechanistischen Zusammenhang zwischen dem Sulfatid-Metabolismus und der Alzheimer-Erkrankung genauer darlegen. Betrachtet man die Ergebnisse im Ganzen könnte unter physiologischen Bedingungen ein sich selbst verstärkender Regelkreis bestehen, bei welchem Sulfatide durch eine Reduktion der amyloidenen Prozessierung ihre eigene Synthese steigern. Im Falle der Alzheimer-Erkrankung würde es in Folge des unter pathophysiologischen Bedingungen auftretenden multifaktoriellen Verlustes der zerebralen Sulfatide zu einer Steigerung der amyloidenen Prozessierung und hieraus resultierenden weiteren Reduktion der Sulfatide kommen. Der so entstehende *Circulus Vitiosus* würde zu einem immer stärkeren Verlust der Sulfatide und einer immer stärkeren Zunahme der A β -Synthese und -Aggregation führen. Die anhand dieses Modells vermuteten physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge sind in Abbildung 61 nochmals schematisch dargestellt. Ein Eingreifen in diese Vorgänge durch eine Erhöhung des zerebralen Sulfatid-Gehaltes könnte diesen Teufelskreis durchbrechen und somit therapeutisch von Nutzen sein.

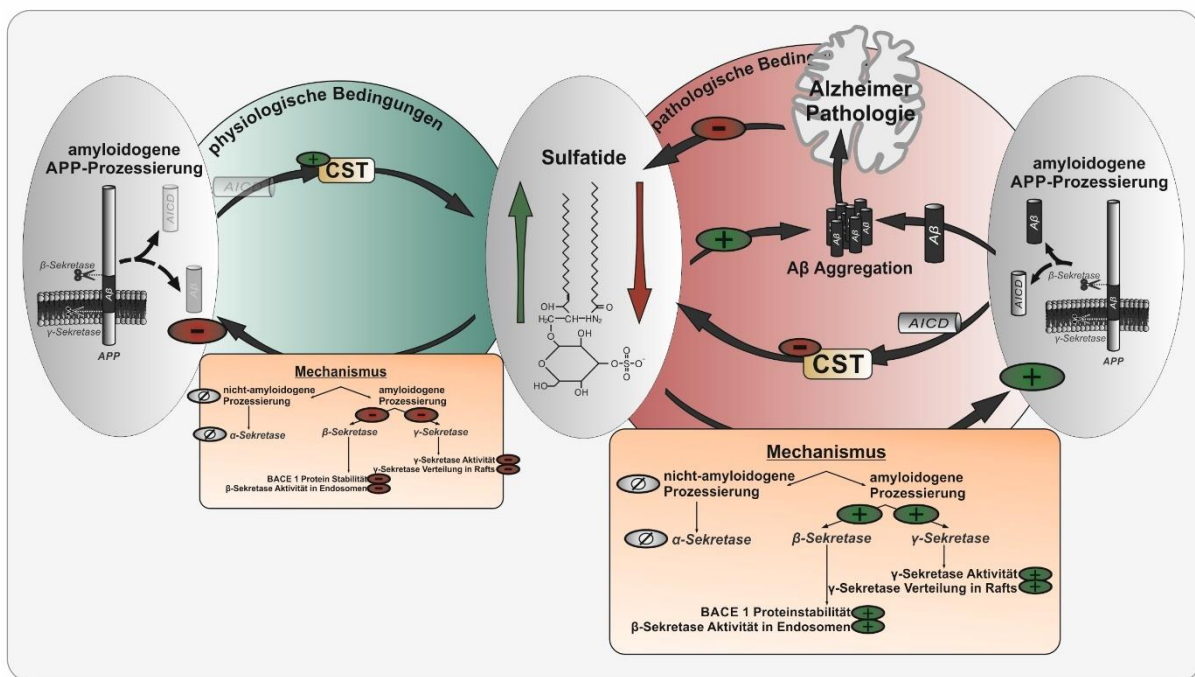


Abbildung 61: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Sulfatiden und der APP-Prozessierung. Unter physiologischen Bedingungen, führen Sulfatide durch eine Reduktion der amyloidenen Prozessierung zu einer verminderten Synthese von AICD aus der amyloidenen Prozessierung. Hieraus resultiert eine Stimulation der CST, wodurch noch mehr Sulfatide produziert werden, das System ist somit selbst verstärkend. Im Falle der Alzheimer-Erkrankung kommt es zu einer Reduktion des Sulfatid-Gehaltes, was wiederum die amyloide Prozessierung stimuliert. Diese Verstärkung der amyloidenen Prozessierung führt zu einer vermehrten Bildung von amyloidenem AICD und A β . Durch die Inhibition der CST kommt es zu einer weiteren Reduktion der Sulfatide. Gleichzeitig werden die pathophysiologischen Prozesse inkl. der A β -Aggregation noch zusätzlich verstärkt, was ebenfalls in einer weiteren Sulfatid-Reduktion resultiert. Ein Durchbrechen dieses *Circulus Vitiosus* könnte sich somit positiv auf die Erkrankung auswirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Acx H, Chávez-Gutiérrez L, Serneels L, Lismont S, Benurwar M, Elad N, De Strooper B (2014) Signature amyloid β profiles are produced by different γ -secretase complexes. *J Biol Chem* 289:4346-4355
2. Aguayo-Ortiz R, Straub JE, Dominguez L (2018) Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of γ -secretase. *Phys Chem Chem Phys* 20:27294-27304
3. Alberi L, Hoey SE, Brai E, Scotti AL, Marathe S (2013) Notch signaling in the brain: in good and bad times. *Ageing Res Rev* 12:801-814
4. Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74:342-352
5. Annweiler C, Beauchet O (2011) Vitamin D-mentia: randomized clinical trials should be the next step. *Neuroepidemiology* 37:249-258
6. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639
7. Association As (2015) 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 11:332-384
8. Atri A (2019) The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am* 103:263-293
9. Aycirix S, Gerber H, Osuna GM, Chami M, Stahlberg H, Shevchenko A, Fraering PC (2016) The lipidome associated with the γ -secretase complex is required for its integrity and activity. *Biochem J* 473:321-334
10. Aydin D, Weyer SW, Müller UC (2012) Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res* 217:423-434
11. Bandaru VV, Troncoso J, Wheeler D, Pletnikova O, Wang J, Conant K, Haughey NJ (2009) ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain. *Neurobiol Aging* 30:591-599
12. Banks R, Speakman JR, Selman C (2010) Vitamin E supplementation and mammalian lifespan. *Mol Nutr Food Res* 54:719-725
13. 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
14. Barbagallo AP, Wang Z, Zheng H, D'Adamio L (2011) A single tyrosine residue in the amyloid precursor protein intracellular domain is essential for developmental function. *J Biol Chem* 286:8717-8721
15. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR (2012) The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* 336:1168-1171
16. Barrier L, Ingrand S, Fauconneau B, Page G (2010) Gender-dependent accumulation of ceramides in the cerebral cortex of the APP(SL)/PS1Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:1843-1853
17. Barrow CJ, Zagorski MG (1991) Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* 253:179-182
18. Barucker C, Harmeier A, Weiske J, Fauler B, Albring KF, Prokop S, Hildebrand P, Lurz R, Heppner FL, Huber O, Multhaup G (2014) Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide A β 42 as a regulator of gene transcription. *J Biol Chem* 289:20182-20191

19. Basu S, Schultz AM, Basu M, Roseman S (1971) Enzymatic synthesis of galactocerebroside by a galactosyltransferase from embryonic chicken brain. *J Biol Chem* 246:4272-4279
20. Baumgart M, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H (2015) Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement* 11:718-726
21. Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10:94-100
22. Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, Hooper NM, Turner AJ (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285:41443-41454
23. Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S, Louis JC, Citron M, Vassar R (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* 275:37712-37717
24. Bennett S, Thomas AJ (2014) Depression and dementia: cause, consequence or coincidence? *Maturitas* 79:184-190
25. Beyreuther K, Masters CL (1997) Serpents on the road to dementia and death. Accumulating evidence from several studies points to the normal function of presenilin 1 and suggests how the mutant protein contributes to deposition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Nat Med* 3:723-725
26. Bhattacharyya R, Barren C, Kovacs DM (2013) Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *J Neurosci* 33:11169-11183
27. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, Wanker EE (2010) EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7710-7715
28. Bleckwenn M, Kleineidam L, Wagner M, Jessen F, Weyerer S, Werle J, Wiese B, Lühmann D, Posselt T, König HH, Brettschneider C, Mösch E, Weeg D, Fuchs A, Pentzek M, Luck T, Riedel-Heller SG, Maier W, Scherer M (2017) Impact of coronary heart disease on cognitive decline in Alzheimer's disease: a prospective longitudinal cohort study in primary care. *Br J Gen Pract* 67:e111-e117
29. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
30. Blomqvist M, Osterbye T, Månsson JE, Horn T, Buschard K, Fredman P (2002) Sulfatide is associated with insulin granules and located to microdomains of a cultured beta cell line. *Glycoconj J* 19:403-413
31. Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P (2002) Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *J Neurochem* 80:799-806
32. Boer JM, Ehnholm C, Menzel HJ, Havekes LM, Rosseneu M, O'Reilly DS, Tired L (1997) Interactions between lifestyle-related factors and the ApoE polymorphism on plasma lipids and apolipoproteins. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1675-1681
33. Bolós M, Perea JR, Avila J (2017) Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol Concepts* 8:37-43
34. Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B (1996) The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 16:6229-6241

35. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
36. Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-278; discussion 278-284
37. Braak H, Braak E (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18:351-357
38. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398
39. Brunnström HR, Englund EM (2009) Cause of death in patients with dementia disorders. *Eur J Neurol* 16:488-492
40. Bruun JM, Roeske-Nielsen A, Richelsen B, Fredman P, Buschard K (2007) Sulfatide increases adiponectin and decreases TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 263:142-148
41. Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267:546-554
42. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grösgen S, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingärtner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lütjohann D, Hartmann T, Grimm MO (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33:16072-16087
43. Burg VK (2014) Dissertation: Sterine und die molekularen Mechanismen der APP Prozessierung: Zusammenhänge und Implikationen für die Alzheimer Krankheit. Universität des Saarlandes
44. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J (1994) beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 200:710-715
45. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664-670
46. Cao X, Südhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120
47. Cao X, Südhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279:24601-24611
48. Capell A, Steiner H, Willem M, Kaiser H, Meyer C, Walter J, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275:30849-30854
49. Carrié I, Bélanger E, Portoukalian J, Rochford J, Ferland G (2011) Lifelong low-phyloquinone intake is associated with cognitive impairments in old rats. *J Nutr* 141:1495-1501
50. Cataldo JK, Prochaska JJ, Glantz SA (2010) Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J Alzheimers Dis* 19:465-480
51. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, Wenk MR, Shui G, Di Paolo G (2012) Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287:2678-2688
52. Chao KL, Kulakova L, Herzberg O (2017) Gene polymorphism linked to increased asthma and IBD risk alters gasdermin-B structure, a sulfatide and phosphoinositide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1128-e1137

53. Cheng H, Vetrivel KS, Drisdell RC, Meckler X, Gong P, Leem JY, Li T, Carter M, Chen Y, Nguyen P, Iwatsubo T, Tomita T, Wong PC, Green WN, Kounnas MZ, Thinakaran G (2009) S-palmitoylation of gamma-secretase subunits nicastrin and APH-1. *J Biol Chem* 284:1373-1384
54. Cheng H, Wang M, Li JL, Cairns NJ, Han X (2013) Specific changes of sulfatide levels in individuals with pre-clinical Alzheimer's disease: an early event in disease pathogenesis. *J Neurochem* 127:733-738
55. Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Surewicz WK (1997) Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem* 272:22987-22990
56. Chow VW, Savonenko AV, Melnikova T, Kim H, Price DL, Li T, Wong PC (2010) Modeling an anti-amyloid combination therapy for Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 2:13ra11
57. Choy RW, Cheng Z, Schekman R (2012) Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β (A β) production in the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E2077-2082
58. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674
59. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84
60. Congdon EE, Sigurdsson EM (2018) Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 14:399-415
61. Cook JJ, Wildsmith KR, Gilberto DB, Holahan MA, Kinney GG, Mathers PD, Michener MS, Price EA, Shearman MS, Simon AJ, Wang JX, Wu G, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Acute gamma-secretase inhibition of nonhuman primate CNS shifts amyloid precursor protein (APP) metabolism from amyloid-beta production to alternative APP fragments without amyloid-beta rebound. *J Neurosci* 30:6743-6750
62. 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
63. Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ (2003) Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11735-11740
64. Cui X, Pelekanos M, Liu PY, Burne TH, McGrath JJ, Eyles DW (2013) The vitamin D receptor in dopamine neurons; its presence in human substantia nigra and its ontogenesis in rat midbrain. *Neuroscience* 236:77-87
65. Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B (2001) The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* 78:1168-1178
66. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075
67. Czubowicz K, Strosznajder R (2014) Ceramide in the molecular mechanisms of neuronal cell death. The role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Neurobiol* 50:26-37
68. Daigle I, Li C (1993) apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12045-12049

69. Dasch B, Bausewein C, Feddersen B (2018) Place of death in patients with dementia and the association with comorbidities: a retrospective population-based observational study in Germany. *BMC Palliat Care* 17:80
70. Dawson G, Goswami R, Kilkus J, Wiesner D, Dawson S (1998) The formation of ceramide from sphingomyelin is associated with cellular apoptosis. *Acta Biochim Pol* 45:287-297
71. de la Monte SM, Wands JR (2006) Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:167-181
72. De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12
73. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43:333-344
74. Degroote S, Wolthoorn J, van Meer G (2004) The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol* 15:375-387
75. Díaz M, Fabelo N, Martín V, Ferrer I, Gómez T, Marín R (2015) Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/A β PP interaction in early stages of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 43:1185-1198
76. Dickerson BC, Goncharova I, Sullivan MP, Forchetti C, Wilson RS, Bennett DA, Beckett LA, deToledo-Morrell L (2001) MRI-derived entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and very mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:747-754
77. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R (2013) A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369:341-350
78. Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746
79. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavado E, Crutch S, Dartigues JF, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert MO, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo JL, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack CR, Jr. (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 12:292-323
80. Duering M, Grimm MO, 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
81. Dulin F, Léveillé F, Ortega JB, Mornon JP, Buisson A, Callebaut I, Colloc'h N (2008) P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582:1865-1870
82. Eckhardt M, Hedayati KK, Pitsch J, Lüllmann-Rauch R, Beck H, Fewou SN, Gieselmann V (2007) Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci* 27:9009-9021
83. Eckhardt M (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93-103
84. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6:2087-2089

85. 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
86. Egan MF, Kost J, Tariot PN, Aisen PS, Cummings JL, Vellas B, Sur C, Mukai Y, Voss T, Furtek C, Mahoney E, Harper Mozley L, Vandenberghe R, Mo Y, Michelson D (2018) Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 378:1691-1703
87. Egan MF, Kost J, Voss T, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL, Tariot PN, Vellas B, van Dyck CH, Boada M, Zhang Y, Li W, Furtek C, Mahoney E, Harper Mozley L, Mo Y, Sur C, Michelson D (2019) Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 380:1408-1420
88. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123
89. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A, Wanker EE (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15:558-566
90. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498
91. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PK, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquets X, Horváth I, Barceló-Coblijn G (2008) Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med* 12:829-875
92. Fabelo N, Martín V, Santpere G, Marín R, Torrent L, Ferrer I, Díaz M (2011) Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* 17:1107-1118
93. Fabelo N, Martín V, Marín R, Moreno D, Ferrer I, Díaz M (2014) Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol Aging* 35:1801-1812
94. Fan YG, Guo T, Han XR, Liu JL, Cai YT, Xue H, Huang XS, Li YC, Wang ZY, Guo C (2019) Paricalcitol accelerates BACE1 lysosomal degradation and inhibits calpain-1 dependent neuronal loss in APP/PS1 transgenic mice. *EBioMedicine* 45:393-407
95. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* 278:1349-1356
96. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4162-4167
97. 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
98. Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ (2012) Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 29:537-547
99. Filley CM, Rollins YD, Anderson CA, Arciniegas DB, Howard KL, Murrell JR, Boyer PJ, Kleinschmidt-DeMasters BK, Ghetti B (2007) The genetics of very early onset Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol* 20:149-156

100. Fleck D, Garratt AN, Haass C, Willem M (2012) BACE1 dependent neuregulin processing: review. *Curr Alzheimer Res* 9:178-183
101. Gauthier SR-N, P.; Morais, J.; Webster, C. (2021) World Alzheimer report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. . London, England: Alzheimer's Disease International 2021
102. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706
103. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5066-5070
104. González de San Román E, Manuel I, Giralt MT, Ferrer I, Rodríguez-Puertas R (2017) Imaging mass spectrometry (IMS) of cortical lipids from preclinical to severe stages of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859:1604-1614
105. Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U (2009) Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci* 122:3703-3714
106. Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495
107. Grimm MO, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschäpe JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7:1118-1123
108. Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:11302-11311
109. Grimm MO, Grösgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdörfer B, Haupenthal VJ, Friess P, Müller U, Fassbender K, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T (2011a) Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:695413
110. Grimm MO, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B, Péter M, Vígh L, Grimm HS, Hartmann T (2011b) Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286:14028-14039
111. Grimm MO, Zinser EG, Grösgen S, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Burg VK, Kaestner L, Bayer TA, Lipp P, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2012) Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 7:e34095
112. Grimm MO, Haupenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grösgen S, Hundsdörfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013a) Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 14:5879-5898
113. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T (2013b) Nephrilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5:98
114. Grimm MO, Hundsdörfer B, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Rothhaar TL, Lehmann J, Pätzold A, Zinser EG, Tanila H, Shen J, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2014a) PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 34:92-110
115. Grimm MO, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Haupenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2014b) Impact of

- Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid- β peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 13:75-81
116. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Haupenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015a) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77
117. Grimm MO, Stahlmann CP, Mett J, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Lehmann J, Hundsdörfer B, Endres K, Grimm HS, Hartmann T (2015b) 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
118. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Blümel T, Stötzel H, Grimm HS, Hartmann T (2016) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid- β by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochem Cell Biol* 94:534-542
119. Grimm MO, Mett J, Grimm HS, Hartmann T (2017a) APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* 10:63
120. Grimm MOW, Michaelson DM, Hartmann T (2017b) Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J Lipid Res* 58:2083-2101
121. 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 (2017c) Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *Int J Mol Sci* 18
122. Grösgen S (2013) Dissertation: Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheit. Universität des Saarlandes
123. Group AsDC (1995) The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* 11:219-222
124. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917
125. Grziwa B, Grimm MO, Masters CL, Beyreuther K, Hartmann T, Lichtenthaler SF (2003) The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *J Biol Chem* 278:6803-6808
126. Gulbins A, Schumacher F, Becker KA, Wilker B, Soddemann M, Boldrin F, Müller CP, Edwards MJ, Goodman M, Caldwell CC, Kleuser B, Kornhuber J, Szabo I, Gulbins E (2018) Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin-ceramide. *Mol Psychiatry* 23:2324-2346
127. Gulbins E, Palmada M, Reichel M, Lüth A, Böhmer C, Amato D, Müller CP, Tischbirek CH, Groemer TW, Tabatabai G, Becker KA, Tripal P, Staedtler S, Ackermann TF, van Brederode J, Alzheimer C, Weller M, Lang UE, Kleuser B, Grassmé H, Kornhuber J (2013) Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med* 19:934-938
128. Guo J, Wang Z, Liu R, Huang Y, Zhang N, Zhang R (2020) Memantine, Donepezil, or Combination Therapy-What is the best therapy for Alzheimer's Disease? A Network Meta-Analysis. *Brain Behav* 10:e01831
129. Haapasalo A, Kovacs DM (2011) The many substrates of presenilin/ γ -secretase. *J Alzheimers Dis* 25:3-28

130. Hallett PJ, Huebeker M, Brekk OR, Moloney EB, Rocha EM, Priestman DA, Platt FM, Isacson O (2018) Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. *Neurobiol Aging* 67:189-200
131. Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818
132. Han X, Cheng H, Fryer JD, Fagan AM, Holtzman DM (2003a) Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. Modulation of sulfatide content. *J Biol Chem* 278:8043-8051
133. Han X, Fagan AM, Cheng H, Morris JC, Xiong C, Holtzman DM (2003b) Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia. *Ann Neurol* 54:115-119
134. Hansen DV, Hanson JE, Sheng M (2018) Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 217:459-472
135. Hattori C, Asai M, Onishi H, Sasagawa N, Hashimoto Y, Saido TC, Maruyama K, Mizutani S, Ishiura S (2006) BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J Neurosci Res* 84:912-917
136. He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH (2010) Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:398-408
137. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rülcke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951-7963
138. Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo j* 23:4106-4115
139. 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
140. Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14821-14826
141. Hicks DA, Nalivaeva NN, Turner AJ (2012) Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol* 3:189
142. Hirahara Y, Tsuda M, Wada Y, Honke K (2000) cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *Eur J Biochem* 267:1909-1917
143. Ho A, Südhof TC (2004) Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2548-2553
144. Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2012) Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified γ -secretase. *Biochemistry* 51:3565-3575
145. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2892-2897
146. Honke K (2018) Biological functions of sulfoglycolipids and the EMARS method for identification of co-clustered molecules in the membrane microdomains. *J Biochem* 163:253-263

147. Hossain S, Hashimoto M, Katakura M, Miwa K, Shimada T, Shido O (2009) Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-S5Y5 cells. *J Neurochem* 111:568-579
148. Huang SM, Mouri A, Kokubo H, Nakajima R, Suemoto T, Higuchi M, Staufenbiel M, Noda Y, Yamaguchi H, Nabeshima T, Saido TC, Iwata N (2006) Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem* 281:17941-17951
149. Hubbard BM, Anderson JM (1981) A quantitative study of cerebral atrophy in old age and senile dementia. *J Neurol Sci* 50:135-145
150. Huenniger K, Krämer A, Soom M, Chang I, Köhler M, Depping R, Kehlenbach RH, Kaether C (2010) Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci* 67:3187-3196
151. Hundsdörfer B (2014) Dissertation: Lipide bei der Alzheimer Krankheit: Einfluss auf die Amyloid-beta Aggregation und der bidirektionale Zusammenhang zwischen Gangliosiden und der Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins. Universität des Saarlandes
152. Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Frånberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO (2008) Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *Febs j* 275:1174-1187
153. Hurtado DE, Molina-Porcel L, Iba M, Aboagye AK, Paul SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2010) A{beta} accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. *Am J Pathol* 177:1977-1988
154. 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
155. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:198-210
156. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6:143-150
157. Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* 24:991-998
158. Jack CR, Jr., Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Snijders ML, Knopman DS, Shiung MM, Gunter JL, Boeve BF, Kemp BJ, Weiner M, Petersen RC (2009) Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1355-1365
159. Jadot M, Andrianaivo F, Dubois F, Wattiaux R (2001) Effects of methylcyclodextrin on lysosomes. *Eur J Biochem* 268:1392-1399
160. Jazvinščak Jembrek M, Hof PR, Šimić G (2015) Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and Aβ Accumulation. *Oxid Med Cell Longev* 2015:346783
161. Jiang M, Vanan S, Tu HT, Zhang W, Zhang ZW, Chia SY, Jang SE, Zeng XX, Yu WP, Xu J, Guo KH, Zeng L (2020) Amyloid precursor protein intracellular domain-dependent regulation of FOXO3a inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Neurobiol Aging* 95:250-263

162. Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K (2002) Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* 41:7385-7390
163. Kakuda N, Funamoto S, Yagishita S, Takami M, Osawa S, Dohmae N, Ihara Y (2006) Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. *J Biol Chem* 281:14776-14786
164. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK (2008) Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:155-161
165. Kang EL, Cameron AN, Piazza F, Walker KR, Tesco G (2010) Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem* 285:24108-24119
166. 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 A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736
167. Katsel P, Li C, Haroutunian V (2007) Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 32:845-856
168. Kaya I, Jennische E, Lange S, Tarik Baykal A, Malmberg P, Fletcher JS (2020) Brain region-specific amyloid plaque-associated myelin lipid loss, APOE deposition and disruption of the myelin sheath in familial Alzheimer's disease mice. *J Neurochem* 154:84-98
169. Kehoe PG, Wilcock GK (2007) Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 6:373-378
170. Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, Egan M, Ereshefsky L, Hodgson RA, Hyde LA, Jhee S, Kleijn HJ, Kuvelkar R, Li W, Mattson BA, Mei H, Palcza J, Scott JD, Tanen M, Troyer MD, Tseng JL, Stone JA, Parker EM, Forman MS (2016) The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Sci Transl Med* 8:363ra150
171. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 151:229-238
172. Kiebish MA, Young DM, Lehman JJ, Han X (2012) Chronic caloric restriction attenuates a loss of sulfatide content in PGC-1 α ^{-/-} mouse cortex: a potential lipidomic role of PGC-1 α in neurodegeneration. *J Lipid Res* 53:273-281
173. Kim LD, Factora RM (2018) Alzheimer dementia: Starting, stopping drug therapy. *Cleve Clin J Med* 85:209-214
174. Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS, Selkoe DJ (2000) The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275:3173-3178
175. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H (2002) Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med* 137:149-155
176. Klevanski M, Herrmann U, Weyer SW, Fol R, Cartier N, Wolfer DP, Caldwell JH, Korte M, Müller UC (2015) The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior. *J Neurosci* 35:16018-16033

177. Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG (1996) Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740:6-14
178. Koelsch G (2017) BACE1 Function and Inhibition: Implications of Intervention in the Amyloid Pathway of Alzheimer's Disease Pathology. *Molecules* 22
179. Koh YH, von Arnim CA, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G (2005) BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 280:32499-32504
180. Koivisto H, Grimm MO, Rothhaar TL, Berkecz R, Lütjohann DD, Giniatullina R, Takalo M, Miettinen PO, Lahtinen HM, Giniatullin R, Penke B, Janáky T, Broersen LM, Hartmann T, Tanila H (2014) Special lipid-based diets alleviate cognitive deficits in the APP^{swE}/PS1^{dE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease independent of brain amyloid deposition. *J Nutr Biochem* 25:157-169
181. Kontush K, Schekatolina S (2004) Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1031:249-262
182. Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1683-1688
183. Kowall NW (1994) Beta amyloid neurotoxicity and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15:257-258
184. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K (2011) Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res* 1371:161-170
185. Lambert JC, Wavrant-De Vrièze F, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 351:1787-1788
186. Lauer AA, Mett J, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, Ritzmann F, Schrul B, Müller UC, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2020) Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 19:e13264
187. Lauwers E, Goodchild R, Verstreken P (2016) Membrane Lipids in Presynaptic Function and Disease. *Neuron* 90:11-25
188. Le Brocq D, Henry A, Cappai R, Li QX, Tanner JE, Galatis D, Gray C, Holmes S, Underwood JR, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (1998) Processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in *Pichia pastoris*: immunodetection of alpha-, beta-, and gamma-secretase products. *Biochemistry* 37:14958-14965
189. Lee JT, Xu J, Lee JM, Ku G, Han X, Yang DI, Chen S, Hsu CY (2004) Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol* 164:123-131
190. Li HL, Roch JM, Sundsmo M, Otero D, Sisodia S, Thomas R, Saitoh T (1997) Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid beta/A4 (A beta) protein precursor found in familial Alzheimer's disease. *J Neurobiol* 32:469-480
191. Li M, Pehar M, Liu Y, Bhattacharyya A, Zhang SC, O'Riordan KJ, Burger C, D'Adamio L, Puglielli L (2015) The amyloid precursor protein (APP) intracellular domain regulates translation of p44, a short isoform of p53, through an IRES-dependent mechanism. *Neurobiol Aging* 36:2725-2736
192. Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y (2004) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3632-3637

193. Lichtenthaler SF (2012) Alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein: proteolysis regulated by signaling pathways and protein trafficking. *Curr Alzheimer Res* 9:165-177
194. Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N, Jr., Frautschy SA, Cole GM (2005) A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 25:3032-3040
195. Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G (2007) Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56:66-78
196. Liu Q, Trotter J, Zhang J, Peters MM, Cheng H, Bao J, Han X, Weeber EJ, Bu G (2010) Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J Neurosci* 30:17068-17078
197. 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
198. Llewellyn DJ, Lang IA, Langa KM, Melzer D (2011) Vitamin D and cognitive impairment in the elderly U.S. population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66:59-65
199. Lomakin A, Chung DS, Benedek GB, Kirschner DA, Teplow DB (1996) On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1125-1129
200. Lu MH, Ji WL, Xu DE, Yao PP, Zhao XY, Wang ZT, Fang LP, Huang R, Lan LJ, Chen JB, Wang TH, Cheng LH, Xu RX, Liu CF, Puglielli L, Ma QH (2019) Inhibition of sphingomyelin synthase 1 ameliorates alzheimer-like pathology in APP/PS1 transgenic mice through promoting lysosomal degradation of BACE1. *Exp Neurol* 311:67-79
201. Luo LQ, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849-3861
202. Mahammad S, Parmryd I (2015) Cholesterol depletion using methyl- β -cyclodextrin. *Methods Mol Biol* 1232:91-102
203. Marin R, Fabelo N, Martín V, Garcia-Esparcia P, Ferrer I, Quinto-Aleman D, Díaz M (2017) Anomalies occurring in lipid profiles and protein distribution in frontal cortex lipid rafts in dementia with Lewy bodies disclose neurochemical traits partially shared by Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurobiol Aging* 49:52-59
204. Marsh L (2013) Depression and Parkinson's disease: current knowledge. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:409
205. Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, Díaz M (2010) Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimers Dis* 19:489-502
206. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249
207. Matthews FE, Stephan BC, Robinson L, Jagger C, Barnes LE, Arthur A, Brayne C (2016) A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II. *Nat Commun* 7:11398
208. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330:1774
209. McCarthy JV, Twomey C, Wujek P (2009) Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell Mol Life Sci* 66:1534-1555

210. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., 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
211. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866
212. Medoro A, Bartollino S, Mignogna D, Passarella D, Porcile C, Pagano A, Florio T, Nizzari M, Guerra G, Di Marco R, Intrieri M, Raimo G, Russo C (2018) Complexity and Selectivity of γ -Secretase Cleavage on Multiple Substrates: Consequences in Alzheimer's Disease and Cancer. *J Alzheimers Dis* 61:1-15
213. Mendelson K, Evans T, Hla T (2014) Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 141:5-9
214. Mett J (2017) Dissertation: Die Regulation A β -degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase. Universität des Saarlandes
215. Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683-12688
216. Michno W, Wehrli PM, Zetterberg H, Blennow K, Hanrieder J (2019) GM1 locates to mature amyloid structures implicating a prominent role for glycolipid-protein interactions in Alzheimer pathology. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1867:458-467
217. Michno W, Wehrli PM, Koutarapu S, Marsching C, Minta K, Ge J, Meyer SW, Zetterberg H, Blennow K, Henkel C, Oetjen J, Hopf C, Hanrieder J (2022) Structural amyloid plaque polymorphism is associated with distinct lipid accumulations revealed by trapped ion mobility mass spectrometry imaging. *J Neurochem* 160:482-498
218. Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, Rabins PV, Lyketsos CG, Carlson MC (2010a) Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol Aging* 31:17-24
219. Mielke MM, Haughey NJ, Bandaru VV, Schech S, Carrick R, Carlson MC, Mori S, Miller MI, Ceritoglu C, Brown T, Albert M, Lyketsos CG (2010b) Plasma ceramides are altered in mild cognitive impairment and predict cognitive decline and hippocampal volume loss. *Alzheimers Dement* 6:378-385
220. Mielke MM, Haughey NJ, Bandaru VV, Weinberg DD, Darby E, Zaidi N, Pavlik V, Doody RS, Lyketsos CG (2011) Plasma sphingomyelins are associated with cognitive progression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 27:259-269
221. Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, Xia J, Fried LP, Yasar S, Albert M, Varma V, Harris G, Schneider EB, Rabins PV, Bandeen-Roche K, Lyketsos CG, Carlson MC (2012) Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 79:633-641
222. Mikulka CR, Sands MS (2016) Treatment for Krabbe's disease: Finding the combination. *J Neurosci Res* 94:1126-1137
223. Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, Hersh LB, Thiele DL (2003) Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6221-6226
224. Miners JS, Verbeek MM, Rikkert MO, Kehoe PG, Love S (2008) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* 167:229-236

225. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486
226. Molander-Melin M, Pernber Z, Franken S, Gieselmann V, Månsson JE, Fredman P (2004) Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. *J Neurocytol* 33:417-427
227. Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci* 15:656-663
228. Moyano AL, Li G, Lopez-Rosas A, Månsson JE, van Breemen RB, Givogri MI (2014) Distribution of C16:0, C18:0, C24:1, and C24:0 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 467:31-39
229. Mucke L, Abraham CR, Masliah E (1996) Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 777:82-88
230. Mukadam N (2018) Improving the diagnosis and prediction of progression in mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr* 30:1419-1421
231. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347
232. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5:197-206
233. Mylonas NT (2015) Masterarbeit: Massenspektrometrische Lipidanalyse der Cholesterin-, Ceramid- und Sphingomyelin-Spezies von Alzheimer post mortem Gehirnen. Universität des Saarlandes
234. Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ (1992) Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1671-1675
235. Nixon RA (2017) Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *Faseb j* 31:2729-2743
236. Nunes VS, Cazita PM, Catanozi S, Nakandakare ER, Quintão ECR (2018) Decreased content, rate of synthesis and export of cholesterol in the brain of apoE knockout mice. *J Bioenerg Biomembr* 50:283-287
237. Nunez K, Kay J, Krotow A, Tong M, Agarwal AR, Cadenas E, de la Monte SM (2016) Cigarette Smoke-Induced Alterations in Frontal White Matter Lipid Profiles Demonstrated by MALDI-Imaging Mass Spectrometry: Relevance to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 51:151-163
238. Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A (2009) Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 61:89-104
239. O'Brien JS, Sampson EL (1965) Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 6:537-544
240. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26:10129-10140
241. Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Joulé B, Torp R, LaFerla FM (2007) Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of Abeta pathology in transgenic mice. *J Neurochem* 102:1053-1063

242. Okada T, Ikeda K, Wakabayashi M, Ogawa M, Matsuzaki K (2008) Formation of toxic Abeta(1-40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in Abeta(1-40) fibrils. *J Mol Biol* 382:1066-1074
243. Osawa S, Funamoto S, Nobuhara M, Wada-Kakuda S, Shimojo M, Yagishita S, Ihara Y (2008) Phosphoinositides suppress gamma-secretase in both the detergent-soluble and -insoluble states. *J Biol Chem* 283:19283-19292
244. Osenkowski P, Ye W, Wang R, Wolfe MS, Selkoe DJ (2008) Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem* 283:22529-22540
245. Panpalli Ates M, Karaman Y, Guntekin S, Ergun MA (2016) Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 325:124-131
246. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Müller U, St George Hyslop P, Checler F (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541-554
247. Pernber Z, Molander-Melin M, Berthold CH, Hansson E, Fredman P (2002) Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. *J Neurosci Res* 69:86-93
248. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-308
249. Pinnix I, Ghiso JA, Pappolla MA, Sambamurti K (2013) Major carboxyl terminal fragments generated by γ -secretase processing of the Alzheimer amyloid precursor are 50 and 51 amino acids long. *Am J Geriatr Psychiatry* 21:474-483
250. Popescu DC, Huang H, Singhal NK, Shriver L, McDonough J, Clements RJ, Freeman EJ (2018) Vitamin K enhances the production of brain sulfatides during remyelination. *PLoS One* 13:e0203057
251. Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G (2008) Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc* 108:2095-2099
252. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M (2015) World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends).
253. Probst S, Riese F, Kägi L, Krüger M, Russi N, Nitsch RM, Konietzko U (2021) Lysine acetyltransferase Tip60 acetylates the APP adaptor Fe65 to increase its transcriptional activity. *Biol Chem* 402:481-499
254. Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM (2003) Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* 278:19777-19783
255. Qing H, Zhou W, Christensen MA, Sun X, Tong Y, Song W (2004) Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb j* 18:1571-1573
256. Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K (2014) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *Faseb j* 28:978-997
257. Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C (2008) Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* 155:725-737
258. Riemer J, Kins S (2013) Axonal transport and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 12:111-124
259. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfner DP, Müller UC (2007) The secreted beta-amyloid precursor

- protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27:7817-7826
260. Robinson A, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Hauptenthal VJ, Hundsdörfer B, Stahlmann CP, Slobodskoy Y, Müller UC, Hartmann T, Stein R, Grimm MO (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
261. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 582:46-53
262. Roeske-Nielsen A, Fredman P, Mansson JE, Bendtzen K, Buschard K (2004) Beta-galactosylceramide increases and sulfatide decreases cytokine and chemokine production in whole blood cells. *Immunol Lett* 91:205-211
263. Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR (1996) Morphology and toxicity of A β (1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:20631-20635
264. Rothhaar TL, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012:141240
265. Rothhaar TL (2013) Dissertation: Lipide bei der Alzheimer Krankheit – Der Einfluss von trans-Fettsäuren, Plasmalogenen und Sphingomyelinase-Inhibitoren auf die Prozessierung des Amyloiden Vorläufer Proteins. Universität des Saarlandes
266. Roy A, Jana M, Corbett GT, Ramaswamy S, Kordower JH, Gonzalez FJ, Pahan K (2013) Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Cell Rep* 4:724-737
267. Ryan MM, Morris GP, Mockett BG, Bourne K, Abraham WC, Tate WP, Williams JM (2013) Time-dependent changes in gene expression induced by secreted amyloid precursor protein-alpha in the rat hippocampus. *BMC Genomics* 14:376
268. Saha P, Sen N (2019) Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging. *Mech Ageing Dev* 178:72-79
269. Sakae N, Liu CC, Shinohara M, Frisch-Daiello J, Ma L, Yamazaki Y, Tachibana M, Younkin L, Kurti A, Carrasquillo MM, Zou F, Sevlever D, Bisceglia G, Gan M, Fol R, Knight P, Wang M, Han X, Fryer JD, Fitzgerald ML, Ohyagi Y, Younkin SG, Bu G, Kanekiyo T (2016) ABCA7 Deficiency Accelerates Amyloid- β Generation and Alzheimer's Neuronal Pathology. *J Neurosci* 36:3848-3859
270. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S, Reichert M, Ketter N, Nejadnik B, Guenzler V, Miloslavsky M, Wang D, Lu Y, Lull J, Tudor IC, Liu E, Grundman M, Yuen E, Black R, Brashear HR (2014) Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370:322-333
271. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1994) APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiol Dis* 1:13-24
272. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996) APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 777:281-287
273. Saravanan K, Büssow H, Weiler N, Gieselmann V, Franken S (2007) A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci Methods* 161:223-233

274. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condrón MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835-841
275. Satir TM, Agholme L, Karlsson A, Karlsson M, Karila P, Illes S, Bergström P, Zetterberg H (2020) Partial reduction of amyloid β production by β -secretase inhibitors does not decrease synaptic transmission. *Alzheimers Res Ther* 12:63
276. Sato H, Tomimoto H, Ohtani R, Kitano T, Kondo T, Watanabe M, Oka N, Akiguchi I, Furuya S, Hirabayashi Y, Okazaki T (2005) Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 130:657-666
277. 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
278. Scheinfeld MH, Matsuda S, D'Adamio L (2003) JNK-interacting protein-1 promotes transcription of A beta protein precursor but not A beta precursor-like proteins, mechanistically different than Fe65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1729-1734
279. Schoenfeld HA, West T, Verghese PB, Holubasch M, Shenoy N, Kagan D, Buono C, Zhou W, DeCristofaro M, Douville J, Goodrich GG, Mansfield K, Saravanan C, Cumin F, Webb RL, Bateman RJ (2017) The effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitor, sacubitril/valsartan, on central nervous system amyloid- β concentrations and clearance in the cynomolgus monkey. *Toxicol Appl Pharmacol* 323:53-65
280. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Südhof T, Yu G (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122:435-447
281. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-2875
282. Shen L, Ji HF (2015) Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J* 14:76
283. Sherrington R, Rogae EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760
284. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
285. Singh PK, Kumbhakar M, Pal H, Nath S (2009) Ultrafast torsional dynamics of protein binding dye thioflavin-T in nanoconfined water pool. *J Phys Chem B* 113:8532-8538
286. Slack BE, Ma LK, Seah CC (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J* 357:787-794
287. Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, Sisodia SS (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269:2637-2644
288. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
289. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (1991) Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26:421-425

290. Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA (2009) Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:75-80
291. Song Y, Cong P, Lu L, Wang Y, Tang Q, Zhang H, Xu J, Xue C (2017) Effects of dietary glucocerebrosides from sea cucumber on the brain sphingolipid profiles of mouse models of Alzheimer's disease. *Food Funct* 8:1271-1281
292. Soto C, Brañes MC, Alvarez J, Inestrosa NC (1994) Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 63:1191-1198
293. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:280-292
294. Stahlmann CP (2019) Dissertation: Der Einfluss der intrazellulären Domäne von APP auf die Lipidhomöostase und der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung. Universität des Saarlandes
295. Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T (2005) Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem* 280:42364-42374
296. Sun ZX, Zhou QH, Sui SF (2005) Cholesterol depletion inhibits the degradation of amyloid beta-peptide in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci Lett* 391:71-75
297. Sundaram KS, Lev M (1988) Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *J Lipid Res* 29:1475-1479
298. Sundaram KS, Fan JH, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW, Lev M (1996) Vitamin K status influences brain sulfatide metabolism in young mice and rats. *J Nutr* 126:2746-2751
299. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L (1994) Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J Neurochem* 63:1802-1811
300. Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T, Tomita T (2015) Synthetic ceramide analogues increase amyloid- β 42 production by modulating γ -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 457:194-199
301. Tamaoka A, Kondo T, Odaka A, Sahara N, Sawamura N, Ozawa K, Suzuki N, Shoji S, Mori H (1994) Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 205:834-842
302. Tamboli IY, Prager K, Barth E, Heneka M, Sandhoff K, Walter J (2005) Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 280:28110-28117
303. Tarasiuk J, Kapica-Topczewska K, Kułakowska A, Halicka D, Drozdowski W, Kornhuber J, Lewczuk P (2012) Increased concentration of the CSF Tau protein and its phosphorylated form in the late juvenile metachromatic leukodystrophy form: a case report. *J Neural Transm (Vienna)* 119:759-762
304. Ten Kate M, Dicks E, Visser PJ, van der Flier WM, Teunissen CE, Barkhof F, Scheltens P, Tijms BM (2018) Atrophy subtypes in prodromal Alzheimer's disease are associated with cognitive decline. *Brain* 141:3443-3456

305. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580
306. Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang SH, Zhong Z, Shen Y, Simpkins JW, Tanzi RE (2007) Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 54:721-737
307. Toh WH, Chia PZC, Hossain MI, Gleeson PA (2018) GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes, which moderates A β production. *Mol Biol Cell* 29:191-208
308. Torre B, Canale C, Ricci D, Braga PC (2011) Measurement methods in atomic force microscopy. *Methods Mol Biol* 736:19-29
309. 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
310. Tsubuki S, Takaki Y, Saido TC (2003) Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet* 361:1957-1958
311. Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305
312. Urano Y, Hayashi I, Isoo N, Reid PC, Shibasaki Y, Noguchi N, Tomita T, Iwatsubo T, Hamakubo T, Kodama T (2005) Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res* 46:904-912
313. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T (2022) Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*
314. van Rappard DF, Boelens JJ, Wolf NI (2015) Metachromatic leukodystrophy: Disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:261-273
315. Vanmierlo T, Weingärtner O, van der Pol S, Husche C, Kerksiek A, Friedrichs S, Sijbrands E, Steinbusch H, Grimm M, Hartmann T, Laufs U, Böhm M, de Vries HE, Mulder M, Lütjohann D (2012) Dietary intake of plant sterols stably increases plant sterol levels in the murine brain. *J Lipid Res* 53:726-735
316. Vassar PS, Culling CF (1959) Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* 68:487-498
317. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741
318. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18:561-569
319. Vetrivel KS, Meckler X, Chen Y, Nguyen PD, Seidah NG, Vassar R, Wong PC, Fukata M, Kounnas MZ, Thinakaran G (2009) Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem* 284:3793-3803
320. Vetrivel KS, Thinakaran G (2010) Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta* 1801:860-867

321. von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC, Strickland DK, Hyman BT (2005) The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280:17777-17785
322. von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448
323. Waldron E, Isbert S, Kern A, Jaeger S, Martin AM, Hébert SS, Behl C, Weggen S, De Strooper B, Pietrzik CU (2008) Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Exp Cell Res* 314:2419-2433
324. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274:25945-25952
325. Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276:14634-14641
326. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25:1219-1225
327. Wang Y, Nakajima T, Diao P, Yamada Y, Nakamura K, Nakayama J, Tanaka N, Aoyama T, Kamijo Y (2020) Polyunsaturated fatty acid deficiency affects sulfatides and other sulfated glycans in lysosomes through autophagy-mediated degradation. *Faseb j* 34:9594-9614
328. Wessels AM, Tariot PN, Zimmer JA, Selzler KJ, Bragg SM, Andersen SW, Landry J, Krull JH, Downing AM, Willis BA, Shcherbinin S, Mullen J, Barker P, Schumi J, Shering C, Matthews BR, Stern RA, Vellas B, Cohen S, MacSweeney E, Boada M, Sims JR (2020) Efficacy and Safety of Lanabecestat for Treatment of Early and Mild Alzheimer Disease: The AMARANTH and DAYBREAK-ALZ Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol* 77:199-209
329. Wheeler S, Sillence DJ (2020) Niemann-Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. *J Neurochem* 153:674-692
330. Whitmer RA (2007) Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:373-380
331. Whyte LS, Lau AA, Hemsley KM, Hopwood JJ, Sargeant TJ (2017) Endo-lysosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 140:703-717
332. Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664-666
333. Wittke D, Hartmann D, Gieselmann V, Lüllmann-Rauch R (2004) Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol* 108:261-271
334. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517
335. Wong HK, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P, Nukina N (2005) beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280:23009-23017

-
336. Wong MW, Braidy N, Poljak A, Pickford R, Thambisetty M, Sachdev PS (2017) Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimers Dement* 13:810-827
 337. Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y (1995) GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1:1062-1066
 338. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58:321-329
 339. Yang Y, Feng Y, Zhang X, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Aoyama T (2016) Activation of PPAR α by Fatty Acid Accumulation Enhances Fatty Acid Degradation and Sulfatide Synthesis. *Tohoku J Exp Med* 240:113-122
 340. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14670-14675
 341. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297:97-100
 342. Yin J, Nielsen M, Carcione T, Li S, Shi J (2019) Apolipoprotein E regulates mitochondrial function through the PGC-1 α -sirtuin 3 pathway. *Aging (Albany NY)* 11:11148-11156
 343. Yin KJ, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, Bateman R, Song H, Hsu FF, Turk J, Xu J, Hsu CY, Mills JC, Holtzman DM, Lee JM (2006) Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci* 26:10939-10948
 344. Yu C, Kim SH, Ikeuchi T, Xu H, Gasparini L, Wang R, Sisodia SS (2001) Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J Biol Chem* 276:43756-43760
 345. Zeng Y, Han X (2008) Sulfatides facilitate apolipoprotein E-mediated amyloid-beta peptide clearance through an endocytotic pathway. *J Neurochem* 106:1275-1286
 346. Zha Q, Ruan Y, Hartmann T, Beyreuther K, Zhang D (2004) GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* 9:946-952
 347. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1:9-21

7 Anhang

7.1 Publikationen

1. **Zimmer, V.C.**, Lauer, A.A., Haupenthal, V.J., Stahlmann, C.P., Mett, J., Grösgen, S., Hundsdorfer, B., Rothhaar, T.L., Endres, K., Eckhardt, M., Grimm, H.S., Hartmann, T., and Grimm, M.O.W. (2022). A bidirectional link between sulfatide and Alzheimer's disease. *Submitted to Cell Chemical Biology*.
2. Grimm, M.O.*, Mett, J.*, Stahlmann, C.P., Grosgen, S., Haupenthal, V.J., Blumel, T., Hundsdorfer, B., **Zimmer, V.C.**, Mylonas, N.T., Tanila, H., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gammasecretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7, 77.
3. Grimm, M.O.*, Stahlmann, C.P.*, Mett, J., Haupenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, Lehmann, J., Hundsdorfer, B., Endres, K., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on A β Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19,646-656.
4. Grimm, M.O.*, Hundsdorfer, B.*, Grosgen, S., Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Lehmann, J., Patzold, A., Zinser, E.G., Tanila, H., Shen, J., Muller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 34, 92-110.
5. Grimm, M.O.*, Lehmann, J.*, Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Grosgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2014). Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloidbeta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative diseases* 13, 75-81.
6. Robinson, A., Grosgen, S., Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Haupenthal, V.J., Hundsdorfer, B., Stahlmann, C.P., Slobodskoy, Y., Muller, U.C., Hartmann, T., Stein, R., and Grimm, M.O. (2014). Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13, 263-272.
7. Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grosgen, S., Hundsdorfer, B., Haupenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, Mett, J., Weingartner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T.,

- Lütjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33, 16072-16087.
8. Grimm M.O.W.*, Haupenthal V.J.*, Rothhaar T.L., **Zimmer V.C.**, Grösgen S., Hundsdörfer B., Lehmann J., Grimm H.S., Hartmann T. (2013). Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 14(3): 5879-5898.
 9. Grimm MO, **Zimmer VC**, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T. (2013) The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:814390. doi: 10.1155/2013/814390. Epub 2014 Feb 19.
 10. Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5, 98.

7.2 Posterpräsentationen

- **Zimmer, V.C.**, Lehmann, J., Mett, J., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Hundsdörfer, B., Stahlmann, C.P., Tanila, H., Müller, U., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T. *(2013). Bidirectional link between sulfatides and amyloid precursor protein processing: Consequence for Alzheimer's disease. *Neuroscience 2013, San Diego, U.S.A.*
- Burg, V.K., Grimm, H.S., Rothhaar, T.L., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Haupenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, Mett, J., Weingärtner, O., Laufs, U., Broersen, L.M., Tanila, H., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Hartmann, T., and Grimm, M.O. (2013). Plant Sterols - the better cholesterol in Alzheimer's Disease? A mechanistical study. *Neuroscience 2013, San Diego, U.S.A.*
- Mett, J., Stahlmann, C.P., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Hundsdörfer, B., **Zimmer, V.C.**, Mylonas, N.T., Tanila, H., Müller, U., Grimm, H.S., Hartmann, T. *, and Grimm, M.O. *(2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.*
- Stahlmann, C.P., Mett, J., Haupenthal, V.J., **Zimmer, V.C.**, Lehmann, J., Hundsdörfer, B., Blümel, T., Endres, K., Grimm, H.S., Hartmann, T. *, and Grimm, M.O. * (2015). Impact of α -, γ - and d-tocopherol on A β generation and degradation in neuroblastoma cells. *Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.*

- Lehmann, J.*, Blümel, T.*, Mett, J., **Zimmer, V.C.**, Grösgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdörfer, B., Hauptenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T.* (2015). Impact of vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid- β peptide degradation in Alzheimer's disease. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

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

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

Homburg, 20.12.2022

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Tobias Hartmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Schaffung des finanziellen Rahmens, sowie das mir gegenüber erbrachte Vertrauen, die das Erstellen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Besonders herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Marcus Grimm für die hervorragende, intensive und stets geduldige wissenschaftliche Betreuung sowohl während des gesamten Zeitraums im Labor als auch beim Verfassen dieser Arbeit. Seine motivierenden Worte und seine immer kompetenten und zielführenden Lösungsvorschläge waren für das Vorankommen dieser Arbeit maßgeblich verantwortlich. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die investierte Zeit in die vielen konstruktiven Diskussionen sowie für die kritische Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Dr. Heike Grimm danke ich für die herzliche Zusammenarbeit und ihre kompetente fachliche Unterstützung bei allen Tätigkeiten im Labor sowie bei der Erstellung der Manuskripte.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern, Doktoranden und Praktikanten der Arbeitsgruppe Hartmann möchte ich für die stets kollegiale und freundliche Zusammenarbeit sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Im Einzelnen gilt dieser Dank insbesondere Dr. Verena Burg, Dr. Sven Grösgen, Dr. Viola Hauptenthal, Dr. Benjamin Hundsdörfer, Dr. Johannes Lehmann, Dr. Janine Mett, Dr. Tatjana Rothhaar, Dr. Christoph Stahlmann, Inge Tomic, Lukas Schwarz und Anna Lauer. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Dr. Janine Mett für ihre geduldige und kompetente Betreuung während meiner praktischen Arbeit im Labor bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren ständigen Rückhalt diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dr. Johannes Lehmann danke ich für die vielen aufheiternden und motivierenden Worte sowie die bedingungslose Unterstützung während der letzten Jahre. Dr. Daniel Grün danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion:	07.11.2023
Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. Tobias Hartmann Prof. Dr. David Mick Prof. Dr. Jochen Walter