

Aus dem Institut für Experimentelle Neurologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Einfluss von ADAM10 und dessen Modulatoren sowie
von Methylxanthinen auf die molekularen Mechanismen,
die zur Alzheimer-Erkrankung führen, insbesondere durch
Veränderung der Lipidhomöostase und Genexpression**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023**

vorgelegt von Cornel Manuel Bachmann
geboren am 29.06.1995 in Chemnitz

Tag der Promotion: 14.06.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Marcus O. W. Grimm
Prof. Dr. Eckart Meese
Prof. Dr. Gunter P. Eckert

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

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 in der Kooperationstabelle 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 (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Münster, Juni 2023

C. Manuel Bachmann

Kooperationsverzeichnis

Ein Teil der erhaltenen Daten und Ergebnisse sind im Rahmen von Kooperationen entstanden. In der nachfolgenden Kooperationstabelle sind sowohl die Projekte als auch die beteiligten Personen und deren Anteil oder Funktion aufgelistet.

Kooperationstabelle: Auflistung aller an Kooperationen beteiligten Personen und deren Anteil an der vorliegenden Arbeit.

Projekt	Abbildung/Tabelle	Kooperation
Statistische Datenauswertung und graphische Darstellung aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lipiddaten	Abb. 11 – Abb. 16, Abb. 19 – Abb. 26	Anleitung zur Durchführung erfolgte durch Daniel Janitschke und Anna A. Lauer, Durchführung erfolgte durch Cornel M. Bachmann
MTX-Inkubation von SH-SY5Y-Zellen	-	Durchführung erfolgte durch Daniel Janitschke
Prozessierung der SH-SY5Y-Zellen nach MTX-Inkubation	-	Durchführung erfolgte durch Daniel Janitschke
Statistische Datenanalyse, qRT-PCR-Analysen der SH-SY5Y-Zellen nach MTX-Inkubation und Erstellung der Abbildungen	Abb. 27 – Abb. 39	Gemeinsame Durchführung erfolgte durch Daniel Janitschke, Anna A. Lauer, Martin Seyfried und Cornel M. Bachmann
Auswahl der zu untersuchenden Gene, Primer-Erstellung, experimentelle HKG-Selektion nach MTX-Behandlung	Tab. 38, Tab. 25, Abb. 28 – Abb. 30	Gemeinsame Durchführung erfolgte durch Daniel Janitschke, Anna A. Lauer und Cornel M. Bachmann
Inkubation von HepG2- und Calu-3-Zellen mit Methylxanthinen	Abb. 38	Gemeinsame Durchführung erfolgte durch Anna A. Lauer, Daniel Janitschke und Cornel M. Bachmann
Planung und Supervision der vorliegenden Arbeit	-	Prof. Dr. rer. nat. Marcus Otto Walter Grimm, Dr. rer. nat. Heike Sabine Grimm

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary.....	1
1.1	Der Einfluss von ADAM10 und dessen Modulatoren sowie von Methylxanthinen auf die molekularen Mechanismen, die zur Alzheimer-Erkrankung führen, insbesondere durch Veränderung der Lipidhomöostase und Genexpression.....	1
1.2	The influence of ADAM10 and its modulators, as well as methylxanthines, on the molecular mechanisms leading to Alzheimer's disease, particularly by altering lipid homeostasis and gene expression	4
2	Einleitung	6
2.1	ADAM10	6
2.1.1	Molekulare Grundlagen.....	6
2.1.2	Der Einfluss von ADAM10 auf verschiedene Krankheiten	7
2.1.3	Die Rolle von ADAM10 im Lipidhaushalt.....	12
2.2	Der Einfluss von ADAM10-Modulatoren auf die Lipidhomöostase	13
2.2.1	Epigallocatechin-3-gallat	14
2.2.2	Tamibarotene.....	16
2.2.3	Gemfibrozil.....	17
2.3	Der Einfluss von Methylxanthinen auf die Alzheimer-Erkrankung	20
2.3.1	Molekulare Grundlagen.....	20
2.3.2	Einsatzgebiete	21
2.3.3	Wirkmechanismen.....	22
2.4	Fragestellung der Arbeit.....	24
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Material	26
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
3.1.2	Geräte.....	28
3.1.3	Zelllinien.....	29
3.1.4	Substanzen	29
3.1.5	Antikörper	30
3.1.6	Kommerzielle Kits	30
3.1.7	Plasmide	31
3.1.8	Oligonukleotide	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Mikro- und molekularbiologische Methoden	32
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	45
3.2.3	Verarbeitung der verwendeten Substanzen.....	53
3.2.4	Lipidanalytische Methoden.....	54
3.2.5	Statistische Datenauswertung.....	61
4	Ergebnisse	64

4.1	Der Einfluss der <i>ADAM10</i> -Gendeletion auf die Lipidhomöostase von HEK-Zellen	64
4.1.1	Effekt der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf die sAPP α -Freisetzung	64
4.1.2	Veränderungen der Lipidhomöostase in HEK-Zellen durch die <i>ADAM10</i> -Gendeletion.....	66
4.2	Der Einfluss der <i>ADAM10</i> -Modulatoren EGCG, Am80 und Gemfibrozil auf SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen.....	80
4.2.1	Bestimmung der Zell-Viabilität.....	80
4.2.2	Effekt auf die sAPP α -Freisetzung.....	81
4.2.3	Der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat und Tamibarotene auf die Lipidhomöostase in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen.....	84
4.2.4	Der Einfluss von Gemfibrozil auf die Lipidhomöostase in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen	88
4.3	Der Einfluss von Methylxanthinen auf die Genexpression von Alzheimer-relevanten Genen in SH-SY5Y-Zellen.....	99
4.3.1	Auswahl der Alzheimer-relevanten Gene	100
4.3.2	Auswahl der <i>housekeeping</i> -Gene	104
4.3.3	Effekte von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf die Transkription in SH-SY5Y-Zellen.....	109
4.3.4	Vergleich von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin bezüglich ihrer transkriptionellen Effekte in SH-SY5Y-Zellen	113
4.3.5	Analyse der beobachteten Methylxanthin-vermittelten Effekte auf unterschiedliche Zelltypen.....	118
4.3.6	Analyse der unterschiedlichen Methylxanthine auf dosisabhängige Effekte.....	119
5	Diskussion.....	121
5.1	Einfluss der <i>ADAM10</i> -Gendeletion auf die Lipidhomöostase von HEK-Zellen.....	121
5.1.1	Lipide und die Alzheimer-Erkrankung.....	121
5.1.2	<i>ADAM10</i> -Knockout bedingte Lyso-Phosphatidylcholin-Erhöhung in HEK-Zellen.....	123
5.1.3	Einfluss des <i>ADAM10</i> -Knockouts auf weitere Phospholipide	127
5.1.4	Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine.....	131
5.1.5	Auswirkungen des <i>ADAM10</i> -Knockouts auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung.....	133
5.2	Einfluss von <i>ADAM10</i> -Modulatoren auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen	136
5.2.1	Effekt von EGCG, Am80 und Gemfibrozil auf die sAPP α -Freisetzung.....	136
5.2.2	Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren-, und Lungenzellen	136
5.2.3	Einfluss von Tamibarotene auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen.....	139

5.2.4	Bedeutung der Lipidveränderungen durch EGCG und Tamibarotene und deren möglicher Einsatz zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung ...	141
5.2.5	Einfluss von Gemfibrozil auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen.....	143
5.3	Einfluss von Methylxanthinen auf Alzheimer-relevante Gene in SH-SY5Y-Zellen ...	152
5.3.1	Ursachen für die exklusive Funktion von Koffein auf genregulatorische Effekte in SH-SY5Y-Zellen.....	153
5.3.2	Methylxanthin-vermittelte Effekte auf AD-relevante Gene	156
5.3.3	Auswirkungen von Methylxanthinen auf die AD-Prävention.....	158
6	Publikationen.....	161
6.1	Publizierte Artikel (<i>peer-reviewed</i>)	161
6.2	Poster	162
7	Literaturverzeichnis	163
8	Abkürzungsverzeichnis	187
9	Abbildungsverzeichnis.....	190
10	Tabellenverzeichnis.....	192
11	Danksagung	194
12	Lebenslauf	195

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Der Einfluss von ADAM10 und dessen Modulatoren sowie von Methylxanthinen auf die molekularen Mechanismen, die zur Alzheimer-Erkrankung führen, insbesondere durch Veränderung der Lipidhomöostase und Genexpression

Die Alzheimer-Erkrankung stellt heutzutage die häufigste Form der Demenz dar. Die sekundär daraus resultierenden Folgeerkrankungen bilden eine der häufigsten Todesursachen in Industrienationen. Weltweit leiden Millionen von Menschen an dieser neurodegenerativen Erkrankung, welche unter anderem durch den Verlust von Neuronen, eine hippocampale Atrophie, intrazelluläre Ansammlung von Tau-Fibrillen, einen erhöhten oxidativen Stress-Level, eine veränderte Lipidzusammensetzung und extrazelluläre Amyloid- β -Plaques gekennzeichnet ist. Durch die proteolytische Aktivität der β - und γ -Sekretase kommt es zur sequenziellen amyloidogenen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins und zur Bildung und Akkumulation extrazellulärer amyloider Plaques, welche ein Charakteristikum in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung darstellen. Durch die proteolytische Spaltung von APP innerhalb der A β -Sequenz mittels α -Sekretasen kann die Ablagerung der charakteristischen Amyloid-Plaques verhindert werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich sowohl beim Amyloid-Vorläuferprotein als auch bei den proteolytischen Enzymen um Transmembranproteine handelt, ist eine Beeinflussung der Prozessierung durch die Lipidumgebung zu vermuten.

ADAM10 konnte als ein Hauptvertreter der α -Sekretase-Familie identifiziert werden, dessen Bedeutung an der nicht-amyloidogenen Prozessierung vom Amyloid-Vorläuferprotein mittlerweile wissenschaftlich belegt ist. Als Typ-I-Transmembranprotein ist es in die Plasmamembran aller Zellen integriert und steht somit in unmittelbarer Beziehung zur Lipidzusammensetzung der Zelle. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern das Fehlen von ADAM10 Auswirkungen auf den Lipidmetabolismus von Phospholipiden, Acetyl- und Acyl-Carnitinen und Triglyceriden in HEK-Zellen hat.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Knockout von *ADAM10* eine massive Verschiebung der Lipidzusammensetzung zur Folge hatte. Aufgrund einer signifikanten Erhöhung der Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies und gleichzeitiger signifikanter Reduzierung der Phosphatidylcholin- und Plasmalogen-Spezies könnte eine verstärkte Phospholipase A2-Aktivität, deren Beteiligung an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung diskutiert wird, bedingt durch den *ADAM10*-Knockout, angenommen werden.

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung gibt es bis dato keine kausale Therapie der Alzheimer-Erkrankung. Aus diesem Grund ist die Prävention der Erkrankung weiterhin von

großer Bedeutung. Da sich eine gezielte Inhibition der β - oder γ -Sekretase als nicht erfolgsversprechend herausgestellt hat und eine A β -Antikörperbehandlung noch weiterführend in klinischen Studien beurteilt werden muss, könnten etablierte Medikamente oder Substanzen, die eine ADAM10-aktivierende Wirkung entfalten, eine Option in der Behandlung der Erkrankung darstellen. Sowohl die beiden Medikamente Gemfibrozil und Tamibarotene als auch der sekundäre Pflanzenstoff Epigallocatechin-3-gallat erfüllen diese Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit konnte der positive Einfluss von Tamibarotene und Epigallocatechin-3-gallat auf ADAM10 in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen nachgewiesen werden. Bezüglich der Lipidzusammensetzung in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen zeigten sich Unterschiede zwischen beiden Substanzen. Dabei konnte für Epigallocatechin-3-gallat keine negative Beeinflussung der Lipidzusammensetzung beobachtet werden, es zeigte sich sogar ein für die Alzheimer-Erkrankung präventiver Trend in der Zusammensetzung der Phospholipide. Tamibarotene hingegen wies sowohl in Nieren- als auch in Nervenzellen teilweise signifikante Veränderungen in der Lipidzusammensetzung auf, weshalb die Verschreibung dieses Medikaments mit Vorsicht betrachtet werden sollte.

Gemfibrozil wird als Triglycerid-senkendes Medikament seit 40 Jahren angewandt. Als Ligand für den Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor α induziert es die Transkription zahlreicher Gene für den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel und hat darüber hinaus auch transkriptionellen Einfluss auf die Expression von *ADAM10*. Jedoch ist bisher nicht bekannt, inwiefern Gemfibrozil die intrazelluläre Lipidhomöostase beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, wurden sowohl Nerven- als auch Nieren- und Lungenzellen mit Gemfibrozil inkubiert und anschließend deren Lipidzusammensetzung analysiert. Dabei konnte in allen drei untersuchten Zellreihen ein starker Anstieg der intrazellulären Triglycerid-Spiegel beobachtet werden, was auf eine verbesserte intrazelluläre Aufnahme derer zurückzuführen sein könnte. Neben dem generellen Anstieg der Triglyceride konnten zelllinienspezifische Veränderungen in der Acylcarnitin-Zusammensetzung beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass Gemfibrozil in Nervenzellen den Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien erhöht und dadurch der Umsatz von Fettsäuren in zusätzliche Energie für die Zelle gesteigert wird. Dies könnte speziell für die Alzheimer-Erkrankung, in der ein generelles Energiedefizit besteht, von Bedeutung sein.

Methylxanthine sind in unserer Ernährung und als Pharmazeutika weit verbreitet. Es handelt sich um eine Stoffgruppe, die sich von der Purinbase Xanthin ableitet und unterschiedliche Methylgruppenzusammensetzungen aufweist. Ihre positiven Eigenschaften bei neurodegenerativen Erkrankungen wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht. Dabei konnten für die Xanthin-Derivate Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin mehrere präventive molekulare Mechanismen identifiziert werden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese den Amyloid- β -Spiegel reduzieren, indem sie die

nicht-amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins intensivieren. Koffein führte dabei zu einer ADAM10-Proteinstabilitätszunahme, zu einer Reduzierung der β -Sekretase-Expression und einer direkten Verringerung der γ -Sekretase-Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der fünf aufgeführten Methylxanthine auf die Transkriptionsregulation verschiedener Gene, die mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung stehen, untersucht. Die untersuchten Gene konnten dabei, je nachdem in welchen Signal- oder Stoffwechselweg sie involviert sind, in Prozesse wie oxidativen Stress, Lipid- und Energiemetabolismus, Signaltransduktion, Transkriptionsregulation und neuronale Funktionswege gegliedert werden. Interessanterweise ergab die Untersuchung eine Alleinstellung des Methylxanthins Koffein verglichen zu den anderen vier untersuchten Xanthin-Derivaten, was auf eine besondere Rolle von Koffein bei der Genregulation Alzheimer-relevanter Gene hindeutet.

1.2 The influence of ADAM10 and its modulators, as well as methylxanthines, on the molecular mechanisms leading to Alzheimer's disease, particularly by altering lipid homeostasis and gene expression

Alzheimer's disease is the most common form of dementia today. The secondary resulting diseases are one of the most frequent causes of death in industrialized nations. Millions of people worldwide suffer from this neurodegenerative disease, which is characterized, among other factors, by the loss of neurons, hippocampal atrophy, intracellular accumulation of tau fibrils, increased oxidative stress levels, altered lipid composition, and extracellular amyloid- β plaques. Proteolytic activity of β - and γ -secretase results in sequential amyloidogenic cleavage of amyloid precursor protein and the formation and accumulation of extracellular amyloid plaques, which are a feature in the pathogenesis of Alzheimer's Disease. Proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein within the A β -sequence by α -secretases can prevent the deposition of the characteristic amyloid plaques. Due to the fact that both the amyloid precursor protein and the proteolytic enzymes are transmembrane proteins, an influence of the processing by the lipid environment can be suspected.

ADAM10 has been identified as a major member of the α -secretase family whose importance in the non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein is now scientifically established. As a type I transmembrane protein, it is integrated into the plasma membrane of all cells and is thus directly related to the lipid composition of the cell. This work addresses the question of how the absence of ADAM10 affects the lipid metabolism of phospholipids, acetyl- and acyl-carnitines, and triglycerides in HEK cells. Here, we demonstrated that knockout of *ADAM10* resulted in a massive shift in lipid composition. Due to a significant increase of lysophosphatidylcholine species and a simultaneous significant reduction of phosphatidylcholine and plasmalogen species, an enhanced phospholipase A2 activity, whose involvement in the pathogenesis of Alzheimer's disease is discussed, could be assumed to be caused by the ADAM10 knockout.

Despite decades of intensive research, there is still no causal therapy for Alzheimer's disease. For this reason, prevention of the disease remains of great importance. Since targeted inhibition of β - or γ -secretase has not proven promising and A β -antibody treatment still needs to be further evaluated in clinical trials, established drugs or substances that exert an ADAM10-activating effect could represent an option in the treatment of the disease. Both drugs gemfibrozil and tamibarotene as well as the secondary plant compound epigallocatechin-3-gallate fulfill these properties. In the present work, the positive influence of tamibarotene and epigallocatechin-3-gallate on ADAM10 in nerve, kidney, and lung cells was demonstrated. Regarding the lipid composition in nerve, kidney and lung cells, differences between both substances were shown. No negative effect on lipid composition was observed for

epigallocatechin-3-gallate, and there was even a preventive trend for Alzheimer's disease in the composition of phospholipids. Tamibarotene, on the other hand, showed partially significant changes in lipid composition in both kidney and nerve cells, which is why the prescription of this drug should be considered with caution.

Gemfibrozil has been used as a triglyceride-lowering drug for 40 years. As a ligand for the peroxisome proliferator activator receptor α , it induces transcription of numerous genes for carbohydrate and lipid metabolism and also has transcriptional influence on the expression of ADAM10. However, the extent to which gemfibrozil affects intracellular lipid homeostasis is not yet known. To address this question, nerve cells as well as kidney and lung cells were incubated with gemfibrozil and subsequently their lipid composition was analyzed. A strong increase in intracellular triglyceride levels was observed in all three cell series studied, which could be due to enhanced intracellular uptake of these. In addition to the general increase in triglycerides, cell line-specific changes in acylcarnitine composition were observed. These results may suggest that gemfibrozil in neurons increases the transport of fatty acids into mitochondria, thereby increasing the turnover of fatty acids into additional energy for the cell. This could be specifically relevant to Alzheimer's disease, in which there is a general energy deficit.

Methylxanthines are widely used in our nutrition and as pharmaceuticals. They are a group of substances derived from the purine base xanthine and have different methyl group compositions. Their beneficial properties in neurodegenerative diseases have been intensively researched in recent years. Several preventive molecular mechanisms have been identified for the xanthine derivatives caffeine, theobromine, theophylline, pentoxifylline and propentofylline. For example, these were shown to reduce amyloid- β levels by intensifying nonamyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. In this context, caffeine led to an ADAM10 protein stability increase, a reduction in β -secretase expression, and a direct reduction in γ -secretase activity. In the present work, the effect of the five listed methylxanthines on the transcriptional regulation of various genes associated with Alzheimer's Disease was investigated. Depending on the signaling or metabolic pathway they are involved in, the genes studied could be categorized into processes such as oxidative stress, lipid and energy metabolism, signal transduction, transcriptional regulation, and neuronal functional pathways. Interestingly, the study revealed a sole position of the methylxanthine caffeine compared to the other four xanthine derivatives studied, suggesting a specific role of caffeine in gene regulation of Alzheimer-related genes.

2 Einleitung

2.1 ADAM10

2.1.1 Molekulare Grundlagen

Das Protein ADAM10 (engl.: *a disintegrin and metalloproteinase 10*) gehört, neben 22 weiteren humanen Vertretern, zur Familie der Metalloproteinasen (ADAM) [313]. Die ADAM-Superfamilie stellt dabei eine große Gruppe sogenannter „molekularer Scheren“ dar.

ADAM10 ist eine Typ-I-Transmembran-Endopeptidase, die laut *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) in allen menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert wird (NCBI-Gene-ID:102).

Das humane ADAM10 besteht aus 748 Aminosäuren (729 Aminosäuren ohne Signalpeptid) und seine Synthese zum multimodulären Transmembranprotein erfolgt in Form eines inaktiven Zymogens im endoplasmatischen Retikulum (ER). Als Typ-I-Transmembranprotein besitzt es ein C-terminales Ende im Zytoplasma und eine N-terminale-Signalsequenz außerhalb der Zelle. ADAM10 lässt sich in fünf Domänen gliedern, welche sich in eine zytoplasmatische, eine Transmembran-, eine cysteinreiche, eine Disintegrin- und eine Zink-bindende Metalloproteinase-Domäne aufteilen lassen. Diese Zink-bindende Metalloproteinase-Domäne bildet das katalytische Zentrum des Proteins und ist mit einer für alle ADAM-Mitglieder charakteristischen **HEXGHNLGxxHD**-Sequenz ausgestattet [319]. Der schematische Aufbau von ADAM10 im inaktiven Zustand ist in Abbildung 1 dargestellt.

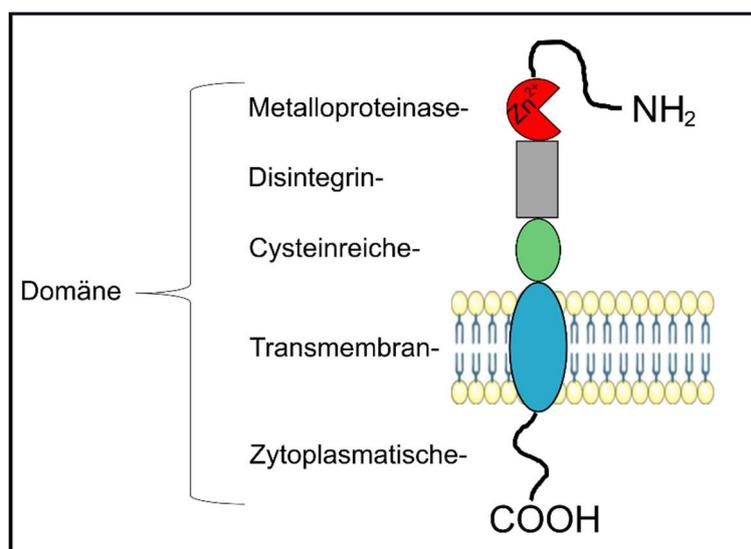


Abbildung 1: schematischer Aufbau von ADAM10 im inaktiven Zustand. ADAM10 kann in eine C-terminale, zytoplasmatische-, in eine transmembranöse-, eine cysteinreiche-, eine Disintegrin- und eine Zn²⁺-Metalloproteinase-Domäne gegliedert werden. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von *Servier Medical Art* gezeichnet. *Servier* ist unter *Creative Commons Attribution 3.0. Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Abbildung abgeändert nach [135].

Über das ER, in dem das Protein noch eine Pro-Domäne besitzt und das Zink-Ion über einen „Cystein-Switch-Mechanismus“ in latent inaktivem Zustand gehalten wird [24], wird das Protein durch das Synapsen-assoziierte Protein 97 (SAP-97) in den Golgi-Apparat geschleust [267] und anschließend auf dem Weg zur Plasmamembran an vier Stellen glykosyliert und durch einen Proprotein-Konvertase-Komplex mittels Furin die Prodomäne entfernt [24,320]. Auf diesem Weg unterliegt die Synthese von ADAM10 einer vielschichtigen transkriptionellen, translationalen und posttranslationalen Regulation [281]. ADAM10 befindet sich in der Plasmamembran und führt dort zu zahlreichen Interaktionen. Nach aktuellem Kenntnisstand sind mittlerweile über 40 Substrate für ADAM10 bekannt. Zu den bekanntesten zählen Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin), Chemokine (z.B. CX3CL1), Wachstumsfaktoren (z.B. epidermal growth factor – EGF, Tumornekrose-Faktor- α – TNF- α), Signalrezeptoren (z.B. Notch-Rezeptor), Liganden (Fas-Ligand, PD-L1), MHC-Moleküle (MICA oder MICB) oder das Amyloid-Vorläuferprotein (APP, engl.: *amyloid precursor protein*) [24,281]. Anhand dieser Vielzahl an unterschiedlichen Substraten kann die Funktion von ADAM10 nicht auf einen einzigen Signalweg reduziert werden. In der hier vorliegenden Arbeit wird sich deshalb nur auf ausgewählte Funktionen von ADAM10 konzentriert.

Prinzipiell ist ADAM10 an der Prozessierung vieler einzelner transmembrangebundener Proteine beteiligt, die sich, wie oben beschrieben, von Zelloberflächenrezeptoren über Zytokine bis hin zu Wachstumsfaktoren erstrecken. Eine wichtige Funktion aller ADAM-Proteine ist dabei die Abspaltung der Ektodomäne bestimmter Proteine an der Zellmembran (engl.: *ectodomain shedding*), weshalb ihnen auch der Name „Scheddasen“ gegeben wird. Durch die Abspaltung bestimmter Ektodomänen kommt es zu grundsätzlichen Veränderungen der Zelloberflächenkonformation, die erheblichen Einfluss auf die Kommunikation der Zelle oder aber auch auf therapeutische Maßnahmen nehmen kann. Durch die Abspaltung entstehen im extrazellulären Raum freie regulatorisch wirksame Proteine, welche ebenfalls neue Effekte hervorrufen können [21].

2.1.2 Der Einfluss von ADAM10 auf verschiedene Krankheiten

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von ADAM10 auf der Oberfläche der Zellen und die Interaktion mit über 40 verschiedenen Substraten spielt ADAM10 sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So ist ADAM10 über die Interaktion mit dem Notch-Rezeptor in der Embryonalentwicklung bei der Entwicklung aller Organe beteiligt und bestimmt durch Zell-Zell-Interaktionen die Größe der Organe [24]. In einer Studie an *ADAM10*-Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass die Tiere an Tag 9,5 der Embryogenese starben und multiple Defekte in der Entwicklung des zentralen Nervensystems und des kardiovaskulären Systems aufwiesen [109]. Außerdem konnte der Einfluss von ADAM10 bei der Entstehung einiger Tumorentitäten identifiziert werden. Somit spielt ADAM10

beispielsweise eine Rolle bei der Entstehung des Glioblastoms, indem es unter anderem die Freisetzung von Neuroligin-3 fördert oder mit den MHC-Molekülen MICA und MICB interagiert [149,298,306]. Durch die Spaltung und Interaktion von HER2 (engl.: *human epidermal growth factor receptor 2*) kann ADAM10 Einfluss auf den Therapieerfolg von invasiven duktalem Mamma-Karzinomen nehmen und diese entscheidend beeinflussen [12,177,344].

Als Hauptvertreter der α -Sekretasen spaltet ADAM10 das Amyloid-Vorläuferprotein. Außerdem nimmt es auf Entzündungen, Apoptose, Zelladhäsionen, verschiedene Stoffwechselwege und die Entstehung verschiedener Krebsarten Einfluss.

2.1.2.1 Der Einfluss von ADAM10 auf die Alzheimer-Erkrankung

Bei der Alzheimer-Erkrankung (AD: engl.: *Alzheimer's Disease*) handelt es sich um eine progressive, irreversible, neurodegenerative Form der Demenz, die nach ihrem Erstbeschreiber von 1906, Alois Alzheimer, benannt wurde. Aktuell sind weltweit mehr als 55 Millionen Menschen an einer Demenz erkrankt. Diese Zahl wächst jedes Jahr um circa 10 Millionen Neu-Diagnosen [272]. Auch in Deutschland steigt die Zahl der Alzheimer-Patient*innen rapide an. Ende des Jahres 2021 lebten circa 1,8 Millionen Menschen in Deutschland mit einer Demenz. Im Jahr 2021 sind etwa 440.000 Menschen, mit einem Alter über 65 Jahren, neu an einer Demenz erkrankt [22]. Dies hängt auch mit einer Zunahme der mittleren Lebenserwartung und dem demographischen Wandel in Deutschland zusammen. Anhand dessen ist mit einem vermehrten Neuauftreten neurodegenerativer Erkrankungen in naher Zukunft zu rechnen [28,113,328]. Im Zeitraum von 2000 bis 2019 konnten die Diagnosen Schlaganfall, Myokardinfarkt oder HIV-Infektion als Todesursache in den USA stetig reduziert werden, während die Alzheimer-Erkrankung als Todesursache um 145 % gestiegen ist [349]. Aktuell gibt es keine kurative Therapieform für diese Erkrankung, weshalb diese Demenzform weiterhin einen intensiven Gegenstand der aktuellen Forschung darstellt und der Prävention eine besonders große Rolle zukommt.

Unter allen Demenzformen stellt die Alzheimer-Erkrankung mit 50-70 % die häufigste Form dar, wobei die Prävalenz mit dem Alter weiter zunimmt und bei den über 80-jährigen Patient*innen bei 30-40 % liegt [248]. Neben der Alzheimer-Demenz stellen die vaskuläre Demenz, die Lewy-Körper-Demenz oder die frontotemporale Demenz weitere Formen dar [349]. Unter anderem können auch weitere Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Chorea-Huntington mit einer Demenz einhergehen [22].

Die Betroffenen einer Alzheimer-Erkrankung klagen zumeist über Gedächtnisstörungen und Werkzeug-, Orientierungs- und Wortfindungsstörungen. Anhand der Symptomatik lässt sich die Erkrankung in drei Stadien einteilen, wovon die milde kognitive Beeinträchtigung (engl.: *mild cognitive impairment*, MCI) abgegrenzt werden muss [66]. Je nach Eintrittsalter wird zwischen einer präsenilen (vor dem 65. Lebensjahr, early onset AD, EOAD, oder familiäre

Form der AD, FAD) und einer senilen, sporadischen (nach dem 65. Lebensjahr, late-onset AD, LOAD) Demenzform unterschieden [168]. Mit circa 7 % aller Alzheimer-Demenzen in Deutschland tritt die präsenile Form deutlich seltener als die senile Form auf [19]. Für das Auftreten sowohl der sporadischen als auch der präsenilen und der familiären Form sind neben dem Alter für die senile Form auch genetische Faktoren verantwortlich. Dazu zählen unter anderem *APOE4*-Genotyp-Veränderungen für die sporadisch auftretende Form [155] und genomische Veränderungen für beispielsweise APP, Presenilin-1 oder 2 für die präsenile Form [156].

Meist äußern sich die Symptome mit einer deutlichen Latenz im Vergleich zum histopathologischen Korrelat, welches sich über Jahre hinweg schleichend entwickelt und meist schon zehn bis 15 Jahre vor den ersten Symptomen beginnt [122].

Unter neuropathologischen Gesichtspunkten sind vor allem die mikroskopischen Veränderungen von besonderem Interesse, da makroskopisch außer einer unspezifischen kortikalen Atrophie keine spezifischen Auffälligkeiten für die Alzheimer-Erkrankung definiert werden können [55,235]. Auf mikroskopischer Ebene sind eine Reihe von charakteristischen Veränderungen zu verzeichnen. Dazu gehören die extrazelluläre Amyloid- β -Plaques-Ablagerung, neuritische Ablagerungen, zerebrale Amyloid-Angiopathien, Ansammlung neurofibrillärer Bündel und eine granulovakuoläre Degeneration [55]. Grundsätzliche Voraussetzungen für die Diagnosestellung aus neuropathologischer Sicht sind extrazelluläre Amyloid-Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Konglomerate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Finales Ergebnis dieser mikroskopischen Läsionen stellen der Verlust von Synapsen und Neuronen dar, die die oben beschriebenen Symptome bedingen. Auf zellulärer Ebene führen weitere Prozesse, beispielsweise im Energie-Metabolismus, der Neuroinflammation der Mikroglia [294], oxidativer Stress [40], transkriptionelle Regulierung [216] oder auch Veränderungen in der Lipidhomöostase [80,96] zum Ausbrechen der Erkrankung.

Die extrazelluläre Ablagerung von $A\beta$ -Plaques im Gehirn ist zum einen durch Veränderungen im Gleichgewicht der proteolytischen Spaltung von APP und zum anderen durch den Katabolismus von anfallendem $A\beta$ durch Nepriylisin oder das Insulin-degradierende Enzym bedingt [197].

APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das sich auf der Zell-Oberfläche befindet und auf zwei unterschiedliche Weisen prozessiert wird. Dabei steht der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg dem amyloidogenen Prozessierung gegenüber. Beim Ablauf der nicht-amyloidogenen Prozessierung erfolgt die initiale Spaltung von APP innerhalb der $A\beta$ -Sequenz zwischen den Aminosäuren Lysin-16 und Leucin-17 [339]. Daraus resultiert zum einen die Ektodomäne sAPP α (engl.: *soluble APP α*), welches mehrere neuroprotektive Eigenschaften

besitzt, und das α -C-terminale Fragment (α -CTF)[116]. In gleicher Weise erfolgt die Prozessierung von APP auf dem amyloidogenen Weg, indem hier APP durch die β -Sekretase, BACE1 (engl.: *β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), prozessiert wird. Hierbei entstehen die Ektodomäne sAPP β (engl.: *soluble APP β*) und das β -C-terminale Fragment (β -CTF). In einem weiteren Schritt spaltet der γ -Sekretase-Komplex die beiden membranständigen C-terminalen Fragmente. Der γ -Sekretase-Komplex setzt sich aus vier Komponenten zusammen, diese sind Presenilin-1 und 2 (PS-1, PS-2), der Presenilin-Verstärker-2 (PEN-2), Nicastrin (NCT) und der anteriore Pharynxdefekt (Aph-1). Daraus resultiert in beiden Fällen die APP-intrazelluläre Domäne (engl.: *APP intracellular domain*, AICD) und auf dem nicht-amyloidogenen Weg das p3-Protein, auf amyloidogenem Wege das neurotoxische extrazelluläre A β [39,218], welches über die Bildung von Oligomeren zu A β -Plaque-Ablagerung führt. Gerade die Bildung der A β -Oligomere hat einen besonders hohen neurotoxischen Effekt [136]. Zahlreiche Studien haben belegen können, dass AICD in den Zellkern wandert und dort für die Expression vieler Gene, die für die APP-Prozessierung von Bedeutung sind, kodiert [34,93]. Der Ablauf beider Prozessierungswege ist in **Abbildung 2** schematisch abgebildet.

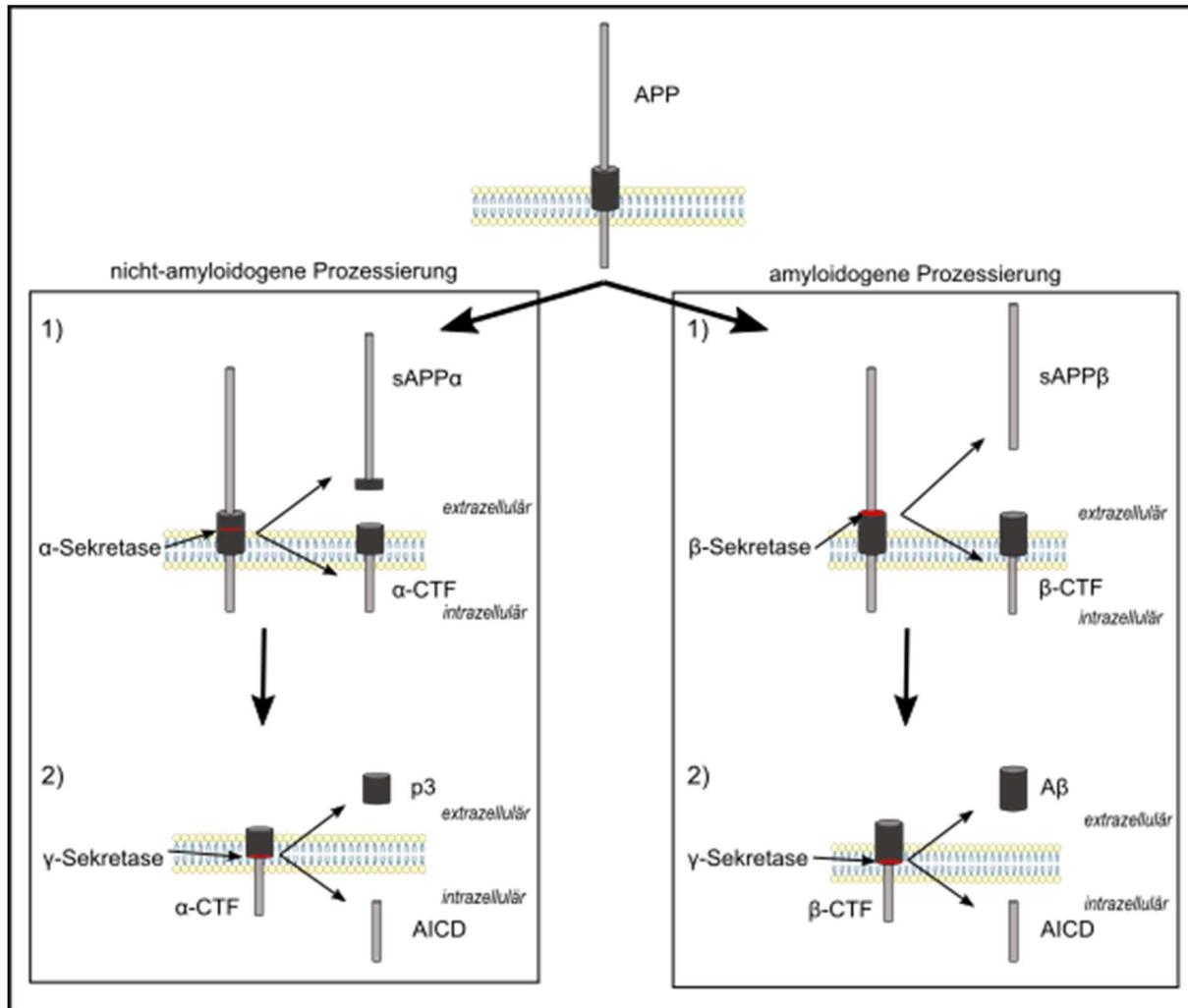


Abbildung 2: APP-Prozessierung. Die Prozessierung des Typ-I-Transmembranproteins APP (engl.: *amyloid precursor protein*) kann über zwei Wege erfolgen. Rechts: Proteolytische Prozessierung von APP durch die β -Sekretase BACE1 (engl.: *β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), führt zur Bildung von extrazellulärem sAPP β (engl.: *soluble APP β*) und dem membranständigen β -CTF (engl.: *β -C-terminal fragment*). Im Anschluss wird β -CTF durch den γ -Sekretasekomplex in A β und AICD (engl.: *APP intracellular domain*) prozessiert. Links: Proteolytische Prozessierung von APP durch die α -Sekretasen der ADAM-Familie, was in der Bildung von sAPP α (engl.: *soluble APP α*) und α -CTF (engl.: *α -C-terminal fragment*) resultiert. In einem zweiten Schritt wird das α -CTF in das neuroprotektive Protein p3 und AICD gespalten. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Servier Medical Art gezeichnet. Servier ist unter Creative Commons Attribution 3.0. Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Die Abbildung wurde verändert nach [97].

Bei den Proteasen, die die Enzymaktivität der α -Sekretase vermitteln, handelt es sich um Metalloproteinasen aus der ADAM-Familie [154]. Als Hauptvertreter der α -Sekretasen wurden ADAM9, ADAM10 und ADAM17 identifiziert [340]. ADAM17, auch bekannt als TACE (engl.: *tumor necrosis factor- α converting enzyme*), stellt dabei neben ADAM10 den Hauptanteil der α -Sekretasen, dar [1]. In ADAM10-Knockout Mäusen wurde festgestellt, dass die α -Sekretase-vermittelte Verarbeitung von APP in Neuronen dieser Mäuse massiv reduziert war [129], was darauf schließen lässt, dass ADAM10 ebenfalls einen großen Anteil der α -Sekretaseaktivität besitzt.

Als ein Hauptvertreter der α -Sekretasen spielt ADAM10 in neuronalem Gewebe eine zentrale Rolle. Durch die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins innerhalb der A β -Sequenz wird eine extrazelluläre Ablagerung der A β -Plaques verhindert. Aus diesem Grund stehen sowohl ADAM17 als auch ADAM10 im Fokus der Erforschung Alzheimer-spezifischer Therapieoptionen [152]. Da sich sowohl APP als auch die α -Sekretase ADAM10 als Transmembranproteine in und um die Plasmamembran der Zelle befinden, stehen sie auch direkt mit der sie umgebenden Lipidzusammensetzung in Verbindung. Dabei wurde herausgefunden, dass die amyloidogene Prozessierung von APP in bestimmten Arealen, sogenannten *lipid rafts*, der Zellmembran lokalisiert ist [8,242], während die nicht-amyloidogene Prozessierung außerhalb dieser *lipid rafts* stattfindet. Dadurch ist es naheliegend, dass die Lipidumgebung auch einen direkten Einfluss auf die APP-Prozessierung haben kann.

2.1.3 Die Rolle von ADAM10 im Lipidhaushalt

Der Einfluss von ADAM10 sowohl in gesundheitsfördernder als auch gesundheitsschädlicher Sicht ist in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. Einige seiner Funktionen stellen mittlerweile zentrale Ausgangspunkte für die potenzielle Therapie einzelner Erkrankungen dar. So ist die α -Sekretaseaktivität von ADAM10 bei der APP-Prozessierung in Nervenzellen mit einem verstärkten Ablauf der nicht-amyloidogenen Prozessierung und damit einhergehend weniger A β -Produktion verbunden. Aufgrund dessen stellen sowohl ADAM10 als auch ADAM17 weiterhin einen intensiven Gegenstand zur Erforschung möglicher Therapieoptionen in der Alzheimer-Erkrankung dar.

Interessanterweise wurden allerdings nicht nur positive Effekte von ADAM10 auf den menschlichen Organismus herausgefunden. Es spielt, wie zuvor beschrieben, durch die Interaktion mit bestimmten Substraten auch eine Rolle bei der Entstehung einzelner Tumor- oder Nierenerkrankungen [12,306,311].

Als Typ-I-Transmembranprotein ist ADAM10 in die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran und somit auch in den Lipidhaushalt der Membranen integriert. Es ist somit aber auch auf optimale Umgebungsbedingungen innerhalb der Plasmamembran angewiesen, um seine jeweiligen Funktionen ausführen zu können. Ob sich ADAM10 allerdings auch auf die Bedingungen innerhalb der Membran und den gesamten Lipidhaushalt einer Zelle auswirkt, wurde bis dato nicht untersucht. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit unter anderem damit, wie sich die Deletion des Gens *ADAM10* in humanen embryonischen Nierenzellen auf die Lipidhomöostase auswirkt.

2.2 Der Einfluss von ADAM10-Modulatoren auf die Lipidhomöostase

ADAM10 befindet sich, aufgrund seiner Beteiligung an unterschiedlichsten Funktionen, seit langer Zeit im Fokus der Forschung. Dabei wurden, wie bereits beschrieben, mittlerweile über 40 Substrate identifiziert, worüber ADAM10 in verschiedenste Prozesse, Stoffwechselwege und Regulierungen eingreift. Zusätzlich wird es aber auch mit der Entstehung einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder in Verbindung gebracht, weshalb es als Ziel für verschiedene therapeutische Ansätze diskutiert wird.

Allerdings stellt die gezielte Inhibition einzelner Proteasen, wie beispielsweise auch ADAM10, weiterhin eine große Herausforderung für die aktuelle Forschung und Pharmaindustrie dar [314]. Durch sein ubiquitäres Vorkommen und die Vielzahl an Substraten ist bei der Inhibition von ADAM10 mit einer Reihe an unerwünschten Nebenwirkungen zu rechnen, weshalb es sich als attraktiv herausstellen könnte über die Verabreichung anderer Medikamente, die auch auf ADAM10 Einfluss nehmen, eine wirksame therapeutische Option zu generieren [314]. Je nach Krankheitsbild könnten Medikamente zur ADAM10-Aktivitätssteigerung- oder Senkung eingesetzt werden. Gerade bei Krankheitsbildern, die bis dato noch keine kurativen Therapieoptionen besitzen, ist dieser Ansatz sinnvoll. Mit Blick auf die Alzheimer-Erkrankung könnte ein verstärkter Ablauf der nicht-amyloidogenen Prozessierung durch eine Aktivitätssteigerung der α -Sekretasen bei Patient*innen mit milder kognitiver Einschränkung sinnvoll sein. Dabei könnte unter anderem eine erhöhte transkriptionelle Regulation von *ADAM10* helfen.

Auf der Grundlage dieser Idee erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Literaturrecherche, welche Medikamente Einfluss auf die Transkription von *ADAM10* nehmen. Dabei stellten sich vor allem Gemfibrozil und Tamibarotene als potenzielle Substanzen heraus, die die Expression von *ADAM10* beeinflussen [314]. Außerdem hat der Hauptbestandteil des Trockengewichts von grünem Tee, das Epigallocatechin-3-gallat, einen positiven Einfluss auf die Translation von ADAM10 [70].

Aus diesen Gründen könnten diese drei Substanzen als potenzielle ADAM10-Modulatoren zur Prävention der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung in Betracht gezogen werden. Gemfibrozil und Tamibarotene wirken nach ihrer oralen Aufnahme systemisch auf den gesamten menschlichen Organismus [200,244]. Durch den Konsum von grünem Tee wird Epigallocatechin-3-gallat aufgenommen und gelangt über die Resorption im Darm ins Blut und wirkt somit ebenfalls auf alle Organe [79]. Durch ihr systemisches Wirken nehmen sie also Einfluss auf eine Vielzahl von unterschiedlichen menschlichen Geweben. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Gemfibrozil, Tamibarotene und Epigallocatechin-3-gallat auf die Lipidhomöostase einzelner Zellen. Im Folgenden werden die drei ausgewählten Substanzen näher beschrieben.

2.2.1 Epigallocatechin-3-gallat

Grüner Tee ist ein weltweit beliebtes Getränk und wird aus den Blättern der Pflanze *Camelia sinensis* hergestellt. Jährlich werden circa 600.000 Tonnen grüner Tee getrunken, wobei sich der Hauptanteil der Nutzung auf die asiatischen Länder verteilt [292]. Die Hauptbestandteile bilden Katechine und Theanin. Beiden werden gesundheitsfördernde Auswirkungen auf den menschlichen Organismus nachgesagt. Als wichtigster Vertreter der Katechine in grünem Tee stellt das Polyphenol Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) mit 50-80 % die Mehrheit aller Katechine in diesem Getränk dar [143,288,341]. Andere Katechine in grünem Tee sind Epigallocatechin, Epicatechin-3-gallat und Epicatechin.

Die chemische Struktur von EGCG besteht aus einem Carbonsäureester der Gallussäure mit einem Alkohol und dem Katechin Epigallocatechin (siehe Abbildung 3).

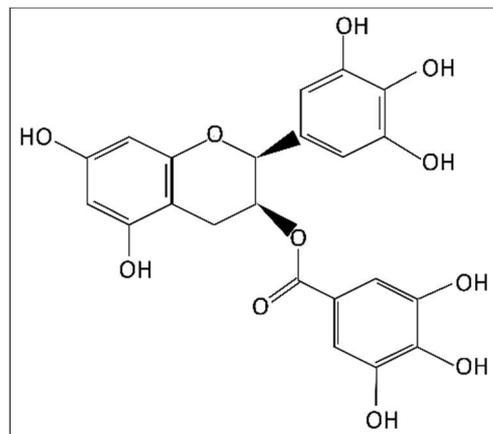


Abbildung 3: Strukturformel von Epigallocatechin-3-gallat. Eigene Abbildung

Die Einflüsse von EGCG auf den menschlichen Organismus und seine damit verbundenen protektiven Effekte wurden in der Vergangenheit bereits eingehend untersucht und beschrieben. Somit soll EGCG unter anderem einen protektiven Einfluss auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen haben, da Katechine allgemein als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bekannt sind [65,164]. Außerdem ist der Einfluss auf die Angiogenese in den letzten Jahren intensiv untersucht worden, weshalb EGCG auch anti-karzinogene Eigenschaften zugeschrieben werden [157], die unter anderem in Bezug auf Lungen- und Brustkrebs eingehend untersucht wurden [144]. Als starkes Antioxidans und Radikalfänger kann EGCG positiven Einfluss auf das Fortschreiten bei chronischen Nierenerkrankungen nehmen, indem es über den NF- κ B- und Nrf2-Signalweg zelluläre Mechanismen verändert [14]. Der Einfluss von EGCG auf die Unterdrückung von oxidativem Stress, die damit verbundenen hepatischen Stoffwechselstörungen, Entzündungen und Fibrose wurde auch auf die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD; engl.: *non-alcoholic fatty liver disease*) untersucht. In mehreren randomisierten klinischen Studien,

systematischen Reviews und Meta-Analysen wurde der Effekt von EGCG auf die Entstehung und Linderung der NAFLD unterstrichen [296].

Darüber hinaus wurden infektionshemmende Eigenschaften von EGCG auf eine Vielzahl viraler Erkrankungen belegt. Dabei wurden verschiedene Wirkungsweisen auf unterschiedliche Virusfamilien, wie beispielsweise Flaviviridae, Retroviridae, oder Orthomyxoviridae nachgewiesen. Wichtige Vertreter dieser Familien sind z.B. das Influenza-Virus oder das Hepatitis-C-Virus [288]. Interessanterweise kann EGCG als Nrf2-Aktivator, welches als zytoprotektiver Transkriptionsfaktor viele verantwortliche Gene für die oxidative Stressregulation, Entgiftung, Entzündung, Immunität und antivirale Reaktionen exprimiert, auch das Eindringen und die Replikation von SARS-CoV-2 verringern [341]. Somit scheint EGCG auch in der aktuellen Corona-Pandemie eine Möglichkeit zur Verhinderung eines schlechten Verlaufs einer SARS-CoV-2-Infektion darzustellen.

In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass der Verzehr von grünem Tee das Risiko an einer Demenz zu erkranken verringern kann. In mehreren Tier- und Zellmodellen wurde der modulierende Einfluss von EGCG auf die molekularen Mechanismen zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung untersucht. Dabei konnte beispielsweise in einem Experiment im AD-Mausmodell die Gabe von 2 mg/kg/Tag oder 6 mg/kg/Tag EGCG über vier Wochen die Anhäufung von A β signifikant reduzieren [111]. Der pathogenen A β -Bildung steht die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung mittels α -Sekretasen gegenüber. EGCG erhöhte in AD-Tiermodellen die sAPP α -Konzentration, die einen sekundären Nachweis für die vermehrte α -Sekretase-Aktivität darstellt [87]. Über diese Mechanismen kann der Verzehr von grünem Tee einen protektiven Effekt auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise die Alzheimer-Erkrankung, nehmen. Eine Zusammenfassung der protektiven Effekte von EGCG auf den menschlichen Organismus ist in Abbildung 4 dargestellt. Wie zuvor beschrieben wurde der Einfluss von grünem Tee auf unterschiedliche gesundheitliche Aspekte schon eingehend untersucht und ist auch weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Allerdings gibt es bis dato nur wenige veröffentlichte Daten, wie und ob EGCG die Lipid-Homöostase einzelner Zellen beeinflusst oder verändert.

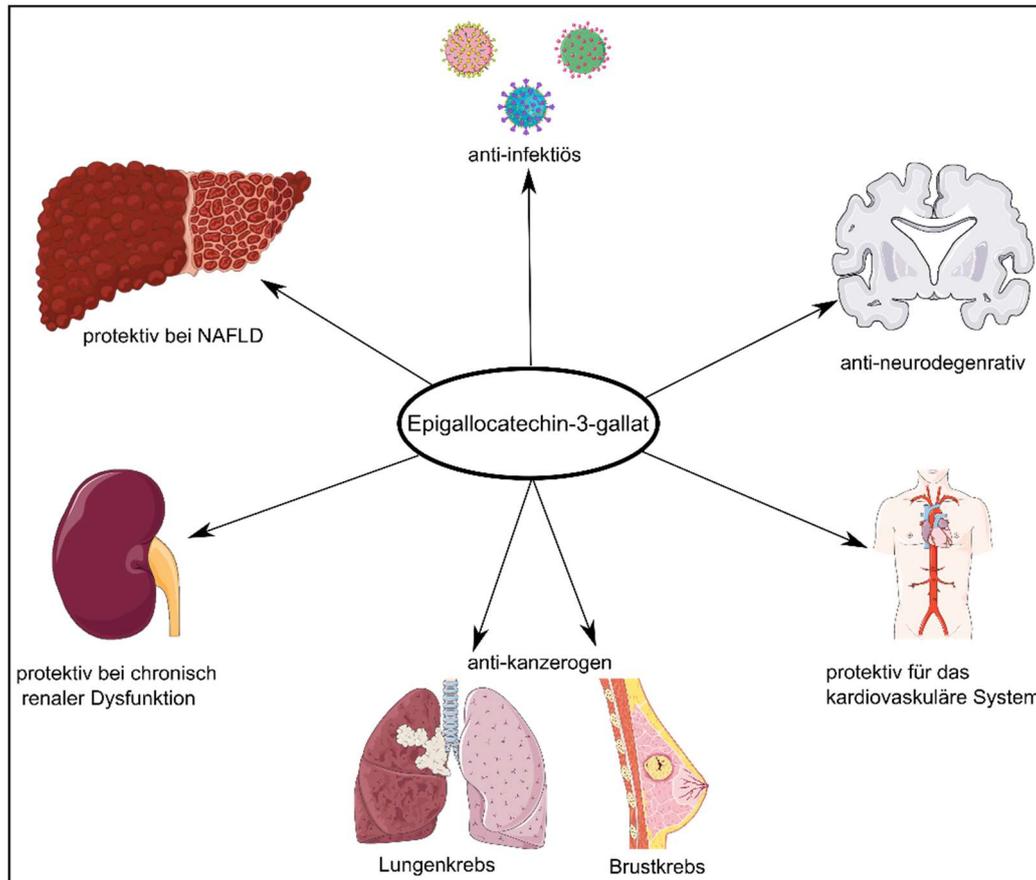


Abbildung 4: Gesundheitsfördernde Effekte von Epigallocatechin-3-gallat auf den menschlichen Organismus. NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease*, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von *Servier Medical Art* gezeichnet. *Servier* ist unter *Creative Commons Attribution 3.0. Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Eigene Abbildung.

2.2.2 Tamibarotene

Tamibarotene, auch Am80 genannt, ist ein seit 2005 ausschließlich in Japan eingesetztes synthetisches Medikament zur Behandlung der rezidivierenden oder refraktären akuten Promyelozyten-Leukämie (APL). Dazu wird Am80 in zwei Dosen mit insgesamt $6\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$ oral für maximal 8 Wochen verabreicht [200].

Es wird eingesetzt, wenn die Erstlinien-Therapie mit all-trans-Retinsäure (ATRA) in Kombination mit Arsentrioxid nicht zur Remission führt. Tamibarotene ist ein synthetisch hergestelltes Retinoid, das einen spezifischen Agonismus zum Retinsäurerezeptor (RAR) α/β besitzt [131]. Verglichen zu ATRA, einem natürlich vorkommenden Retinoid, ist Am80 chemisch weitaus stabiler und deutlich wirksamer. Tamibarotene hält die Plasmakonzentration weitaus länger aufrecht als ATRA. In japanischen klinischen Studien wurde gezeigt, dass Am80 bei APL-Patient*innen nach Rückfall bei einer ATRA-induzierten vollständigen Remission wirksam war [200].

Tamibarotene, auch 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl) carbamoyl] benzoessäure, besitzt ein stabiles aromatisches Derivat der Retinsäure, welches zwei jeweils

durch eine Amidbindung verbundene Benzolringe besitzt [200]. Die chemische Struktur ist in Abbildung 5 dargestellt.

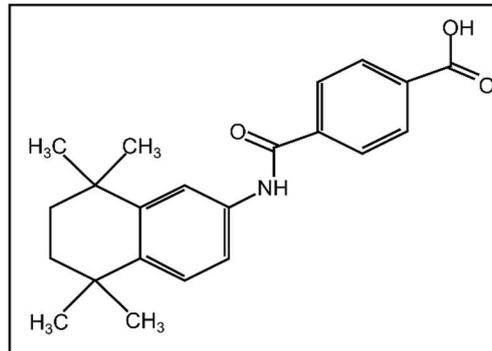


Abbildung 5: Strukturformel von Tamibarotene. Eigene Abbildung.

Retinoat-Rezeptoren werden auch im menschlichen Gehirn exprimiert und spielen durch ihre Regulation der Transkription eine zentrale Rolle bei neuronalen Stoffwechselwegen, die unter anderem auch die Transkription mehrerer bei der Alzheimer-Erkrankung involvierter Gene kontrollieren. Am80, als synthetisches Retinoid, gilt daher als Kandidat für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung [78]. In einem APP23-AD-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tamibarotene die Ablagerung von A β reduziert [137]. Durch die zusätzliche Interaktion von Am80 mit den RAR/RXR-Rezeptoren kann außerdem Einfluss auf die Expression von *ADAM10*, durch die Regulierung der Transkription, genommen werden [314].

2.2.3 Gemfibrozil

Gemfibrozil ist ein Arzneimittel, das seit 1982 zur Senkung erhöhter Triglycerid- und Cholesterinwerte im Blutplasma eingesetzt wird [327]. Neben Bezafibrat und Fenofibrat gehört es zu den Fibrinsäurederivaten (FSD) [36]. Es ist als unterstützende Behandlung zusätzlich zu einer Diät oder einer unwirksamen medikamentösen Therapie mit anderen hypo-lipidämischen Medikamenten bei schwerer Hypertriglyceridämie mit und ohne erniedrigtem *High-Density-Lipoprotein* (HDL)-Cholesterinspiegeln, bei gemischter Hyperlipidämie, wenn ein Statin kontraindiziert ist oder nicht vertragen wird, oder bei primärer Hypercholesterinämie bei Statin-Intoleranz indiziert (Fachinformation Gevilon, Pfizer; [195]). Alle FSD bewirken eine starke Senkung der Triglyceride ((TAG) 40-60 %), der *very low-density* Lipoproteine (VLDL), der *low-density* Lipoproteine (LDL (10-20 %)) und erhöhen den HDL-Spiegel (5-20 %) [102,244]. Chemisch gesehen wird Gemfibrozil durch eine Ringmethylgruppe oxidiert und bildet ein Hydroxymethyl- und ein Carboxymetabolit (siehe Abbildung 6).

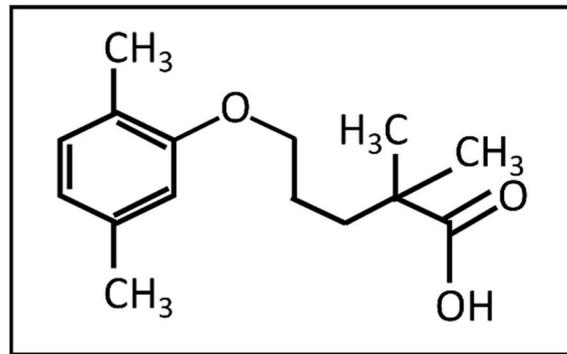


Abbildung 6: Strukturformel von Gemfibrozil. Eigene Abbildung.

Eine Studie an kortikalen Neuronen von Mäusen aus dem Jahr 2013 zeigte, dass Gemfibrozil die Blut-Hirn-Schranke passiert und somit auch in das zentrale Nervensystem gelangt [45]. Die Hauptwirkung aller Fibrate beruht auf ihrem Agonismus am Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-alpha (PPAR α). PPARs gehören im Allgemeinen zur Familie der Kernrezeptoren, welche die Genregulation des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels beeinflussen [195]. Dieser Rezeptor wird prinzipiell in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Hauptsächlich allerdings in metabolisch aktiven Geweben wie der Leber, dem Gehirn oder dem Herzen. Zudem wurde auch eine Expression des Rezeptors in Lungen- und Nierengewebe nachgewiesen (Gene-ID: 25747; [102,183,318]).

Die Bindung von Gemfibrozil an PPAR α führt zu einer Konformationsänderung, auf die die Bildung eines Heterodimers mit einem anderen Kernrezeptor, dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), mit Hilfe von rekrutierten Ko-Aktivatoren, folgt. Dieser Komplex bindet an PPAR-Response-Elemente, welche an die Promotorregion der Zielgene andocken. Dadurch findet eine Regulierung der Genexpression statt [195]. Die VLDL-Spiegel werden gesenkt, da Gemfibrozil den Abbau von VLDL-Triglyceriden in Hepatozyten fördert, indem es die Aktivität der extrazellulären Lipoproteinlipase erhöht, was in der Folge zu einem Rückgang der Triglyceride im Serum führt. Dementsprechend fördert die Aktivierung von PPAR α die Lipolyse von VLDL und Triglyceriden im Blut (schematische Darstellung in Abbildung 7 beispielhaft für TAG und VLDL).

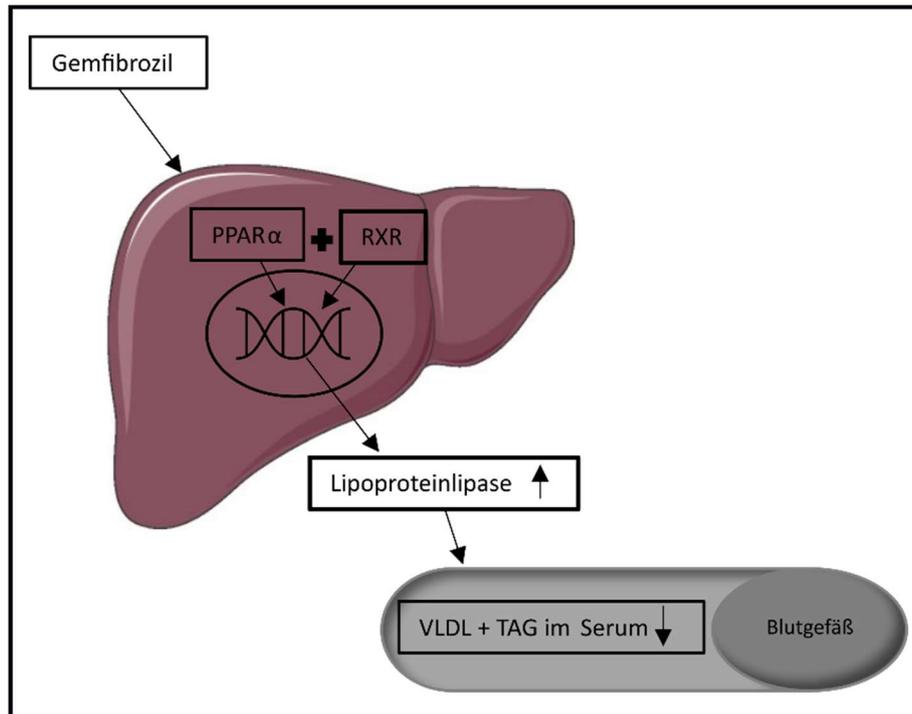


Abbildung 7: schematischer Wirkmechanismus von Gemfibrozil. PPAR α : Peroxisome-proliferator-activated-receptor α ; RXR: Retinoid-X-receptor; VLDL: very low-density lipoprotein; TAG: Triglyceride. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Servier Medical Art gezeichnet. Servier ist unter Creative Commons Attribution 3.0. Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Abb. abgewandelt nach [11].

Darüber hinaus hemmt Gemfibrozil gleichzeitig die Synthese und erhöht die Clearance des VLDL-Trägers Apolipoprotein B [102]. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus dazu ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt [244].

Außerdem wurde herausgefunden, dass Gemfibrozil die HDL-Cholesterinkonzentration im Plasma erhöhen kann und daher möglicherweise die Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verringern kann [184].

Gemfibrozil wird in einer Dosierung von 600 mg zweimal täglich 30 Minuten vor den Mahlzeiten am Morgen und am Abend empfohlen und wird nach der Einnahme schnell und vollständig resorbiert. Nach einer Einzeldosis von 600 mg Gemfibrozil wird nach ein bis zwei Stunden eine Spitzenplasmakonzentration von 20 mg/l (= 79,89 μ mol/l) erreicht. Ein Steady-State wird innerhalb von ein bis zwei Wochen erreicht, wenn 600 mg Gemfibrozil zweimal täglich eingenommen wird. Es ist zu 97 % an Serumalbumin gebunden und wird nach der Metabolisierung in der Leber größtenteils über den Urin (70 %) durch Bindung an Glucuronidkonjugate ausgeschieden [244]. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit von Gemfibrozil beträgt 7,6 Stunden. Es kann mehrere Monate dauern, bis die maximale Wirkung von Gemfibrozil erreicht ist. Das Medikament ist bei allen Patient*innen mit Dyslipidämie vom Typ II oder höher sowie bei Patient*innen mit deutlich erhöhten Serum-Triglyceridwerten (>7,5 g/l) und erhöhtem Pankreatitisrisiko indiziert [244].

Die am häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen betreffen den Magen-Darm-Trakt, wie Durchfall und Übelkeit. Hautausschlag, Muskuloskelettale-Beschwerden (Myalgie, Rhabdomyolyse) und Cholelithiasis sind ebenfalls beschrieben worden. Neben einer schweren Nieren- oder Leberinsuffizienz sind Schwangerschaft und Stillzeit die häufigsten Kontraindikationen für die Anwendung von Gemfibrozil, ebenso wie Erkrankungen des Gallensystems [302]. Bei kombinierter Einnahme von Statinen und Gemfibrozil wurde eine erhöhte Inzidenz von Rhabdomyolyse beobachtet [302].

Aufgrund der Bindung an PPAR α und dessen Expression in einer Vielzahl verschiedener Gewebe, ist davon auszugehen, dass Gemfibrozil auch auf andere Organe Einfluss nehmen kann.

Zahlreiche Studien weisen auf eine zusätzliche Wirkung von Gemfibrozil auf andere Krankheiten hin. So hat Gemfibrozil nachweislich einen positiven Effekt auf die Vorbeugung der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. der Alzheimer-Erkrankung [60]. In der *Helsinki Heart Study* wurde gezeigt, dass eine Langzeittherapie mit Gemfibrozil das Auftreten von kardialen Ereignissen signifikant reduziert [77].

Im Laufe der Jahre wurden sowohl die Wirksamkeit von Gemfibrozil als Fibrat zur Senkung der Blutfette als auch sein Wirkmechanismus eingehend untersucht. Dagegen gibt es nur wenige Daten, wie Gemfibrozil auf verschiedene Organe und deren Lipid-Homöostase in peripheren Zellen wirkt.

2.3 Der Einfluss von Methylxanthinen auf die Alzheimer-Erkrankung

2.3.1 Molekulare Grundlagen

Methylxanthine sind Derivate der Purinbase Xanthin (2,6-Dihydroxypurin), die mit zusätzlichen Methylgruppen am Stickstoff der Xanthinstruktur (R1, R2, R3) verbunden sind (siehe Abbildung 8). Das natürlich vorkommende Methylxanthin Koffein (K) ist durch drei zusätzliche Methylgruppen gekennzeichnet (1,3,7-Trimethylxanthin), während Theophyllin (TP) und Theobromin (TB) zwei zusätzliche Methylgruppen an unterschiedlichen Positionen aufweisen (Theophyllin = 1,3-Dimethylxanthin; Theobromin = 3,7-Dimethylxanthin). Insbesondere synthetische Methylxanthine, die als Arzneimittel verwendet werden, haben neben der Methylgruppe an der Position R2 weitere funktionelle Gruppen an den Positionen R1 und R3. So hat Pentoxifyllin (P) neben den Methylgruppen an R2 und R3 eine Oxohexylgruppe an R1 (3,7-Dimethyl-1-(5-oxohexyl)purin-2,6-dion), und Propentofyllin (PF) hat anstelle einer Methylgruppe eine Propylpuringruppe an R3 (3-Methyl-1-(5-oxohexyl)-7-propylpurin-2,6-dion).

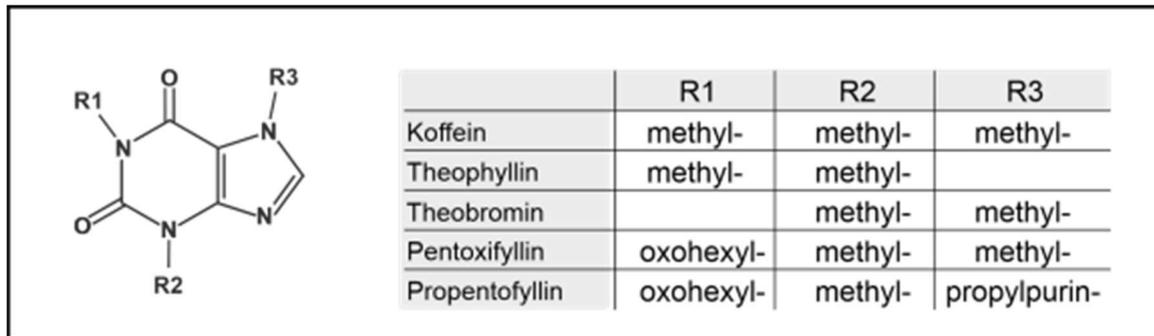


Abbildung 8: chemische Grundstruktur des Xanthins. Die Tabelle zeigt die Kombination der Seitenketten für die unterschiedlichen Xanthin-Derivate Koffein, Theophyllin, Theobromin, Pentoxifyllin und Propentofyllin. Abb. abgeändert aus [125].

2.3.2 Einsatzgebiete

Interessanterweise hat sich die kritische Sicht auf Koffein, das in Kaffee vorkommt, als beliebtestes MTX drastisch verändert. Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass die Einnahme von Koffein bei vielen Krankheiten kontraindiziert ist oder nachteilige Wirkungen hat, zeigen neuere Erkenntnisse potenziell positive Wirkungen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Erkrankung [221]. Die weiteren natürlich vorkommenden Methylxanthine Theophyllin und Theobromin werden weltweit in großem Umfang konsumiert und sind in grünem oder schwarzem Tee (K, TP) und Kakao (TB) enthalten [74,271]. 81,2 % der Teilnehmer*innen einer Studie unter deutschen Bürger*innen, in der die zeitliche Entwicklung des Konsums nichtalkoholischer Getränke untersucht wurde, gaben an, häufig Kaffee zu trinken [270]. Neben Kaffee sind vor allem grüner und schwarzer Tee hinter Wasser die häufigsten nicht-alkoholischen Getränke. Methylxanthine können nach oraler Aufnahme leicht aus dem Verdauungstrakt resorbiert werden und sind für ihre psychostimulierende Wirkung bekannt [209]. Außer der natürlichen oralen Aufnahme durch Kaffee, Tee oder kakaohaltiger Schokolade, finden Methylxanthine auch im medizinischen Rahmen Anwendung, wo vor allem die beiden synthetisch hergestellten Methylxanthine Pentoxifyllin und Propentofyllin genutzt werden. Alle Xanthin-Derivate beeinflussen nachweislich die Thrombozytenfunktion und die arterielle Gefäßerweiterung, weshalb diskutiert wird, ob sie Bluthochdruck, arterielle Thrombosen oder sogar Myokardinfarkte verhindern können [212]. Methylxanthine können die Bluthirnschranke passieren und wirken dementsprechend auch im zentralen Nervensystem. Über ihre antagonistische Wirkung am Adenosin-Rezeptor werden ihnen positive Eigenschaften bei neuronalen Erkrankungen wie beispielsweise der Schizophrenie, Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben [124,221,261]. In der Neonatologie wird Koffein bei Früh- und Neugeborenen zur Verhinderung von Apnoen eingesetzt. Dies wird erreicht, indem es einen stimulierenden Einfluss auf das Atemzentrum nimmt [295]. Des Weiteren werden MTX zur Bekämpfung von Atemwegserkrankungen in der Pädiatrie eingesetzt [220]. In der

Pulmologie wird diskutiert, ob Methylxanthine zur supportiven Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und Asthma eingesetzt werden könnten, da sie Bronchialkrämpfe lindern sollen [348].

2.3.3 Wirkmechanismen

Der Konsum von Koffein löst zahlreiche pharmakologische Effekte aus. Dazu zählen neben der Stimulation des zentralen Nervensystems auch eine Tachykardie, Blutdrucksteigerungen, Bronchodilatation oder eine gesteigerte Darmperistaltik und Diurese [35]. Anwendung findet es daher vor allem als mildes Psychostimulans.

Ursache für diese Wirkungen sind verschiedene molekularchemische Ansatzpunkte. Alle Methylxanthine wirken über den Antagonismus der purinergen P1-Rezeptoren, vor allem der Adenosin-A1- und A2A-Rezeptoren [75]. Durch diese Blockierung wird das hemmende endogene Adenosin reduziert und verschiedene zelluläre Signalwege moduliert. Auf diesem Wege wird beispielsweise die dopaminerge Wirkung im zentralen Nervensystem erhöht und somit eine psychostimulierende Wirkung erzielt. In höheren, nicht durch Kaffee-, Tee- oder Kakaokonsum zu erreichenden, Dosen können Methylxanthine durch die Hemmung der zyklischen Nukleotidphosphodiesterasen eine Modulation der γ -Aminobuttersäurerezeptoren erreichen [10]. Außerdem nehmen Methylxanthine über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Transkription. Koffein, Theobromin und Theophyllin binden dosisabhängig über Wasserstoffbrückenbindungen an alle Basenpaare der nativen Doppelhelix-DNS [128]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Koffein und Theophyllin die Replikation des humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) unterdrücken können, indem sie spezifische Kinasen, die für die retrovirale DNS-Integration verantwortlich sind, hemmen [215]. Des Weiteren scheinen Methylxanthine die Adenosin-Rezeptor-Genexpression zu regulieren. Durch die Bindung an den Adenosin-Rezeptor wird ein G-Protein-abhängiger Einfluss auf die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bewirkt. cAMP wirkt als allosterischer Effektor für die Proteinkinase A, die Transkriptionsfaktoren wie das cAMP-Response-Element-bindende Protein (CREB) phosphoryliert [198]. Interessanterweise können Beeinträchtigungen der CREB-Signalübertragung, die für die neuronale Plastizität und die Bildung des Langzeitgedächtnisses wichtig ist, mit pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht werden, die bei neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Erkrankung auftreten [269]. Neben diesen Wirkmechanismen, einschließlich Adenosinrezeptoren, direkter Interaktion mit der DNA und Modulation von Histondeacetylasen, könnten Methylxanthine auch direkt wirken, beispielsweise als Antioxidans. In einer 2019 veröffentlichten Studie von Janitschke *et al.* zum Effekt von Methylxanthinen auf die A β -Homöostase in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, konnte gezeigt werden, dass

Methylxanthine außerdem einen positiven Effekt auf die Proteinstabilität der α -Sekretase ADAM10 besitzen und somit den nicht-amyloiden Prozessierungsweg begünstigen [124].

2.4 Fragestellung der Arbeit

Aus dem Bericht der WHO zur Alzheimer-Erkrankung aus dem Jahr 2022 geht hervor, dass weltweit mehr als 55 Millionen Menschen an Alzheimer erkrankt sind (WHO-Bericht, 2022). Neben der zunehmenden Lebenserwartung und der steigenden Prävalenz an Demenz im fortgeschrittenen Alter zu erkranken, ist davon auszugehen, dass diese Zahl weiter steigen wird. Ein histopathologisches Korrelat und Charakteristikum der Erkrankung stellt die extrazelluläre Amyloid- β -Plaques-Ablagerung dar. Diese kann durch eine vermehrt ablaufende nicht-amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins, durch eine Intensivierung der α -Sekretasen, verringert werden. Als ein Hauptvertreter der α -Sekretasen konnte ADAM10 identifiziert werden. Als Typ-I-Transmembranprotein ist es in die Plasmamembran der Zellen eingelagert und steht somit in direkter Verbindung zur umgebenden Lipidkonstellation der Zelle.

Diese Arbeit beschäftigt sich im ersten Teil mit der Frage, inwiefern das Fehlen von ADAM10 Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung der Zelle hat. Dazu wurde mittels CRISPR-Cas9-Methode der Knockout von *ADAM10* in HEK-Zellen bedingt und diese anschließend semiquantitativ mittels Massenspektrometrie analysiert.

Aktuell besteht noch kein Durchbruch in der Therapie der Alzheimer-Demenz, weshalb der Prävention der Erkrankung weiterhin eine besondere Rolle zukommt. Solange allerdings noch keine Therapie der Alzheimer-Erkrankung bekannt ist, könnte die Nutzung etablierter Medikamente oder Substanzen, die einen aktivitätsfördernden Effekt auf ADAM10 haben, eine Option in der Reduzierung der A β -Plaques und dementsprechend in der Behandlung darstellen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde sich daher mit der Frage auseinandergesetzt, inwiefern sich die ADAM10-Modulatoren Epigallocatechin-3-gallat, Tamibarotene und Gemfibrozil auf die Lipidzusammensetzung in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen auswirken.

Gerade in den frühen Stadien der Erkrankung können präventive Interventionen ein Vorschreiten der Erkrankung verlangsamen, was mit einer verringerten Zahl der Demenz-Patient*innen einhergehen würde und somit die negativen Auswirkungen auf unser Gesundheitssystem in den nächsten Jahren reduzieren könnte. Eine Möglichkeit präventiv einzuwirken, wäre die Aufnahme von Methylxanthinen über die Nahrung oder als Pharmazeutika. Methylxanthine werden weltweit in großem Maße konsumiert und haben zusätzlich ein breites Anwendungsspektrum in der klinischen Medizin. So werden sie nicht nur als supportive Therapie in der Neonatologie oder Pulmologie zur Behandlung von Atemwegserkrankungen eingesetzt, sondern haben auch einen positiven Einfluss auf

neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung, Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Multiple Sklerose.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit soll die Frage adressiert werden, inwiefern die natürlich vorkommenden Methylxanthine Koffein, Theobromin und Theophyllin und die synthetischen Xanthin-Derivate Pentoxifyllin und Propentofyllin Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Alzheimer-relevanten Genen nehmen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 1 und der Tabelle 2 sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien inklusive deren Hersteller- bzw. Kooperationspartner aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Am80 (Tamibarotene)	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Ammoniumacetat	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Ampicillin	Carl Roth
Bicinchoninsäure	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
BSA	Carl Roth
BSA, fettsäurefrei	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
CaCl ₂	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Chloroform, HPLC-grade	Merck Millipore
DMEM	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
DMEM-F12	Thermo Fisher
DMSO	Carl Roth
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösungen (Western Lightning Plus ECL)	Perkin Elmer
EDTA	Carl Roth
Epigallocatechin-3-gallat	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol, HPLC-grade	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
FCS	PAN Biotech
Fixiererlösung	Kodak
Gemfibrozil	Gevilon ©, Pfizer
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hefe-Extrakt	Carl Roth
Hepes	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Isopropanol, HPLC-grade	VWR
Kaliumacetat	Carl Roth
Koffein	Thermo Fisher Scientific
L-Glutamin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Lipofectamine 2000	Life Technologies
MnCl ₂	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
MEM-Aminosäure-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Methanol, HPLC-grade	VWR
Magermilchpulver (Fette ≤ 1,5 %)	Merck Millipore
MOPS	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
NaCl	AppliChem
NaOH	Carl Roth
Natriumpyruvat	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
NP-40	Substitute Fluka
Opti-MEM	Life Technologies

Penicillin/Streptomycin-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Pentoxifyllin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
PITC	Merck Millipore
Propentofyllin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Propidium Iodid	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Proteingrößenmarker <i>Page Ruler</i>	Promega
Pyridin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
RbCl	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Saccharose	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Saint PhD	Synvolux Therapeutics
SDS	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Theobromin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Theophyllin	Thermo Fisher Scientific
Tricin	Biomol
Tris	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Triton X-100	Merck Millipore
Trizma Base	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
TRIzol Reagenz	Life Technologies
Trypsin/EDTA-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Tween-20	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Wasser, HPLC-grade	VWR
Wasser, RNase-frei	Qiagen

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 cm Zellkultur-Schalen	Sarstedt
12-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
24-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
6-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
96-Tiefvertiefungsplatte	Nunc
96-Vertiefungsplatte für RT-PCR, 6x16, weiß	Thermo Fisher Scientific
96-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
96-Vertiefungsplatte, MaxiSorp, schwarz	VWR
96-Vertiefungsplatte, schwarz	Costar
96-Vertiefungsplatte, transparent	Greiner
96-Vertiefungsplatte, weiß	Nunc
96-Vertiefung-Sammelplatte	Nunc
96-Vertiefung-Sterilfilterplatte	Merck Millipore
ECL-Hyperfilm	Amersham
Einfrier-Röhrchen, 1.8 ml	Nunc
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolie DIN A4	Xerox
Glasflaschen, 2 ml	NeoLab
Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 0,5 mm	PEQLAB Biotechnology
Glaspipetten	NeoLab
Glasröhrchen	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein
Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4 mm	PEQLAB Biotechnology
Nitrozellulosemembran 0,45 µm Porengröße	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäß (PCR) 200 µl	Biozym Scientific
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf
Silikonmatte	Nunc
Spritzen 1 ml	Becton, Dickinson and Company

Tris-Tricin-Gele, 10-20 %	Anamed Gelelektrophorese
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Vertiefungsplatten	PEQLAB Biotechnology
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber	Corning

3.1.2 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Zubehör sowie deren Hersteller sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte und Zubehör, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

Gerät / Zubehör	Hersteller
Analysewaage ABS 80-4	Kern & Sohn
Autosampler (1200 Serie HPLC)	Agilent Technologies
Autoklav, V-Serie	Systec
Blotkammer Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories
Brutschrank, 37 °C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipipette M4	Eppendorf
Elektrophoresekammer Xcell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific
ESI-MS 4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometer	AB Sciex
Gefrierschrank, -20 °C Premium	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Hamilton Kapillare	Hamilton
Heizblock Thermoshaker	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Mikrowelle	Continent
Minilys Homogenisator	PEQLAB Biotechnology
N ₂ Abdampfvorrichtung EVA-EC	VLM
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Superior Marienfeld
PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	PEQLAB Biotechnology
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Fisher Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Pipettenset Research	Eppendorf
Power Supply Consort EV231	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Präzisionswaage EW	Kern
Röntgenkassette Quanta III	Dupont
Rotor JA-10	Beckman Coulter
Rotor JA-25.50	Beckman Coulter
Rotor SW40	Beckman Coulter
Rotor TLA-55	Beckman Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus
Software Analyst 1.5	AB Sciex
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software R Studio	R Studio
Software Piko Real 2.1	Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank, -196 °C GT 140	Air Liquide

TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Turbo Spray-Ionenquelle	AB Sciex
Übertopftaunler Reax2	Heidolph Instruments
Ultraschallsonde Sonopuls HD2070	Bandelin
Ultraschall-Wasserbad USR1	Julabo
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Wärmeschrank UT12	Heraeus
Wasserbad	GFL
Wheaton-Schüttler Multi Reax	Heidolph Instruments
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Wipptisch Rocky	Labortechnik Fröbel
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus
8-Kanal-Pipette, elektronisch	Eppendorf

3.1.3 Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zusätzlich befindet sich in dieser Tabelle eine kurze Beschreibung der jeweiligen Zelllinie inklusive Herkunft der entsprechenden Zelllinie.

Tabelle 4: Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung/Herkunft
Calu-3 Wt	Humane Lungenkrebs-Zelllinie (Wildtyp) [73]
HEK Wt	Humane embryonale Nieren-Zelllinie (Wildtyp) [89]
HEK ADAM10 ^{-/-}	HEK-Zelllinie mit per CRISPR-Cas9 Methode (nach [247]) deletiertem ADAM10-Gen / generiert im Rahmen dieser Arbeit
HEK mock zu ADAM10 ^{-/-}	HEK-Zelllinie mit stabiler Überexpression des CRISPR-Cas9 Leerplasmids pSpCas9-2A-(BB)-Puro; [247]; Kontrollzelllinie zu HEK-ADAM10 ^{-/-} / generiert im Rahmen dieser Arbeit
Hep-G2 Wt	Humane Leberkrebs-Zelllinie (Wildtyp) [2]
SH-SY5Y Wt	Humane Neuroblastom-Zelllinie (Wildtyp) [258]

3.1.4 Substanzen

Die in Tabelle 5 aufgeführten Substanzen wurden in ihrem jeweiligen Lösungsmedium zu Stocklösungen von 1 mM für Am80, Gemfibrozil und alle Methylxanthine und von 2,5 mM für EGCG gelöst und zur Inkubation auf verschiedene Zellen genutzt.

Tabelle 5: Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Substanzen.

Substanz	Handelsname	Herkunft	Gelöst in
Am80	Amnolake®	Sigma-Aldrich	DMSO
EGCG	-	Sigma-Aldrich	ddH ₂ O
Gemfibrozil	Gevilon® (Pfizer)	Pfizer	Ethanol
Koffein	-	Thermo Fisher Scientific	ddH ₂ O
Pentoxifyllin	-	Merck	ddH ₂ O
Propentofyllin	-	Merck	ddH ₂ O
Theobromin	-	Merck	ddH ₂ O
Theophyllin	-	Thermo Fisher Scientific	ddH ₂ O

3.1.5 Antikörper

Tabelle 6 listet die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für proteinbiochemische Analysen auf. Die spezifischen, für den immunologischen Proteinnachweis gewählten, Blockier- und Inkubationsbedingungen sind der Tabelle 35, Kapitel 3.2.2.13 zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Antikörper.

Bezeichnung	Epitop	Klonalität	Verwendung	Hersteller / Quelle
W02	APP (Aminosäuren fünf bis zehn der humanen A β -Sequenz)	monoklonal	sAPP α -Western Blot	Millipore, Billerica, MA, USA
P0260	Maus-IgG	polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	DAKO

3.1.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 7 listet alle in der vorliegenden Arbeit genutzten kommerziellen Kits auf.

Tabelle 7: Übersicht, über die in dieser Arbeit zur Verwendung gekommenen kommerziellen Kits.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit	Laktatdehydrogenase (LDH) Analyse	Roche
EndoFree Plasmid Maxi-Kit	Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	Qiagen
GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep	Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen	Sigma Aldrich
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Komplementäre DNS-Synthese zur Genexpressionsanalyse	Thermo Fisher Scientific
QIAquick PCR Purification Kit	Restriktionsverdau von DNS	Qiagen
Fast-Link DNA Ligation Kit	Ligation von DNS-Fragmenten	Epicentre

3.1.7 Plasmide

In Tabelle 8 ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht, über das in dieser Arbeit genutzte Plasmid.

Plasmid	Verwendung	Selektion
pSpCas9(BB)-2A-Puro ADAM10-KO	Deletion von humanem ADAM10	<i>E. coli</i> DH5 α : Amp. 100 μ g/ml, HEK: Puromycin: 2 μ g/ml

3.1.8 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide verwendet, die von *Eurofins Genomics* (Ebersberg) hergestellt wurden. Es wurden Stocklösungen mit ddH₂O in der Konzentration von 100 μ M angefertigt. Tabelle 9 listet die Oligonukleotide auf, die zur Erstellung eines Plasmids zur Gendelektion mittels CRISPR/Cas9-Methode (Kapitel 3.2.1.12) verwendet wurden.

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Deletion von ADAM10 mittels CRISPR/Cas9-Methode.

Gen	Name	Nukleotidsequenz (5' -> 3')
<i>ADAM10</i>	ADAM10-KO-fwd	<u>CACCGGTG</u> TAAATATGAGAGGTATC
	ADAM10-KO-rev	AA <u>ACCACATT</u> TATACTCTCCATAGC

3.2 Methoden

3.2.1 Mikro- und molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien

(nach [107])

Unter dem Begriff Chemokompetenz wird die Fähigkeit verstanden, fremde Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus dem umliegenden Medium aufzunehmen beziehungsweise transformieren zu können [44]. Diese Fähigkeit können sich *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α -Zellen, benannt nach dem amerikanischen Biologen Douglas Hanahan, nach Einbringen der Chemokompetenz zu Nutze machen. Zunächst wurde dafür ein Verdünnungsausstrich einer *E. coli* DH5 α -Kultur auf LB-Agar (engl.: *lysogeny broth*) (siehe Tabelle 10) angefertigt und dieser über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde, um eine Vorkultur herstellen zu können, eine Einzelkolonie steril in 2 ml LB-Medium (siehe Tabelle 11) überführt. Diese Vorkultur wurde dann bis zu einer sichtbaren Trübung bei 37°C für circa sechs bis acht Stunden schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Trübung wurde die Vorkultur vollständig unter sterilen Bedingungen in 200 ml LB-Medium, welches auf 37°C vorgewärmt wurde, in einem Erlenmeyerkolben pipettiert und im Anschluss weiterhin bei 37°C schüttelnd inkubiert. Um übermäßiges Wachstum der Kultur zu vermeiden, wurde die optische Dichte (OD) regelmäßig kontrolliert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur auf Eis gestellt, um weiteres Wachstum zu verhindern und die Kultur abzentrifugiert. Dafür wurden die Bakterienkulturen auf autoklavierte Zentrifugenröhrchen (Nalgene) verteilt und in der Beckman-Zentrifuge (Avanti J-20 XP, Rotor JA-25.50) bei 7.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die pelletierten *E.coli* DH5 α -Zellen mit 64 ml 4°C kaltem TFB1-Puffer (siehe Tabelle 12) resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Kulturen wurden im Anschluss erneut für 10 min bei 7.000 x g und 4°C in der Beckman-Zentrifuge zentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden in insgesamt 6,4 ml 4°C kaltem TFB2-Puffer (Tabelle 13) resuspendiert und in 100 μ l-Aliquots auf sterile 1,5ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zur Lagerung wurden sie in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert. Vorher wurde zur Reinheitskontrolle der Kultur ein Kontrollausstrich auf LB-Agar bei 37°C über Nacht inkubiert.

Tabelle 10: LB-Agarplatten für Bakterien.

Komponente	Konzentration
LB-medium	siehe oben
Agar	1,5 % (w/v)

In Wasser lösen, autoklavieren und nach Abkühlung auf circa 60°C in Petrischalen gießen und aushärten lassen.

Tabelle 11: LB-Medium für DH5α-Zellen.

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

In ddH₂O lösen, auf pH 7,0 einstellen mit HCl und autoklavieren, nach Abkühlung zugeben von 100 µg/ml Ampicillin.

Tabelle 12: Zusammensetzung des TFB1-Puffers.

Komponente	Konzentration
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CH ₃ COOK	30 mM
Glycerin	15 % (v/v)

In ddH₂O lösen, mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

Tabelle 13: Zusammensetzung des TFB2-Puffers.

Komponente	Konzentration
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
MOPS	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

In ddH₂O lösen, mit NaOH pH 8 einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

3.2.1.2 Retransformation chemokompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS

(nach [262])

Mit dieser Methode sollte die Vermehrung von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNS) durch Bakterien erfolgen, womit in späteren Schritten eine Transfektion humaner Zellen durchgeführt werden konnte. Dafür wurden die vorher generierten chemokompetenten *E. coli* DH5α-Zellen langsam aufgetaut, um nach Hinzugabe von circa 100 ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNS die Lösung für 20 min auf Eis zu inkubieren. Daraufhin wurden die Zellen für 90 s zum Hitzeschock in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt, um die Plasmid-DNS in die Bakterien einzubringen. Parallel dazu wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Plasmid-DNS identisch verarbeitet. Der Ansatz zur Transformation wurde anschließend in 1 ml LB-Medium, welchem Kaliumchlorid (10 mM) und Magnesiumsulfat (4 mM) hinzugefügt wurden, resuspendiert. Diese Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm für 60 min inkubiert. Nach Überführung der Bakterienzellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurden diese für 2 min bei 4000

x g und 4°C zentrifugiert und sedimentiert. Die Pellets wurden in 200 µl NaCl aufgenommen. Ein verdünnter und ein unverdünnter Ansatz wurden anschließend auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte, mit einer Endkonzentration des Antibiotikums von 100 µg/ml, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden unter sterilen Bedingungen einzelne Klone der Bakterienkolonien zum Animpfen einer Vorkultur verwendet. Die Vorkultur bestand aus 2 ml Ampicillin-versetztem LB-Medium. Diese wurden für sechs Stunden bei 37°C und 220 U/min inkubiert. Im Anschluss wurde zum Animpfen einer Übernacht-Kultur die Vor-Bakterienkultur in 250 ml Ampicillin-versetztes LB-Medium überführt und erneut bei 220 U/min und 37°C inkubiert. Durch die geringe Verdopplungszeit von DH5α-Zellen kam es zu einer Amplifizierung der Plasmid-DNS, welche am nächsten Tag isoliert werden konnte (siehe Kapitel 3.2.1.4).

3.2.1.3 Stammkonservierung

(nach [262])

Um den gewonnenen transformierten *E. coli* DH5α-Stamm zu konservieren, wurden trübe Kulturen in 1,5 ml Kryoröhrchen pipettiert und mit 20 % Glycerin zu einem Gesamtvolumen von 1 ml versetzt. Anschließend wurden die Kulturen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.4 Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

(nach Herstellerprotokoll Endo Free® Qiagen Plasmid Maxi Kit, Version Dezember 2016)

Mittels dieses Kits konnte eine Endotoxin-freie Isolation von Plasmid-DNS für in der vorliegenden Arbeit folgende Transfektionen gewonnen werden. Dazu wurde das Endo Free® Qiagen Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben genutzt. Um die Reinheit der isolierten DNS von Zellmembran-Einheiten der Gram-negativen Bakterien, welche durch Lyse entstehen, zu gewährleisten, setzt das Kit auf spezielle Filtereinheiten.

Mithilfe des NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrometers konnten die Konzentration und die Reinheit der isolierten Plasmid-DNS ermittelt werden. Dabei kann über die ermittelte Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) Rückschluss auf die Konzentration der isolierten Plasmid-DNS gezogen werden. Eine Extinktion $E = 1$ bei doppelsträngiger DNS entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Extinktionsmaxima von Proteinen (280 nm) und organischen Verbindungen (230 nm) wurden zur Ermittlung des Reinheitsgrades der isolierten Plasmid-DNS zu Hilfe genommen. Mittels 260/230- und 260/280-Quotienten wurde somit das Maß an Verunreinigung durch Proteine oder organische Verbindungen der DNS bestimmt. Ein 260/280-Quotient von 2,2 entspricht reiner DNS, weshalb in der vorliegenden Arbeit nur DNS mit einem 260/280-Quotienten über 2,0 genutzt wurde.

Isolierte DNS wurde mit Endotoxin-freiem TRIS-EDTA-(TE-)Puffer (ebenfalls Bestandteil des oben erwähnten kommerziellen Kits) versetzt, auf 1 µg/µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

3.2.1.5 Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS)-Isolation aus Zellen

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

Das in dieser Arbeit zur Isolierung von Gesamt-RNS genutzte *TRIzol-Reagenz* ist eine Lösung bestehend aus Phenol (monophasische Lösung) und Guanidin-Isocyanat (chaotropes Denaturierungsreagenz). Die Zellen wurden in *TRIzol-Reagenz* abgeschabt und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend erfolgt die Isolierung nach Angabe des Herstellerprotokolls. In der Folge kommt es zur Bildung von drei unterschiedlichen Phasen. Die denaturierten Proteine befinden sich dabei in der unteren Phase (organische Phenol-Chloroform-Phase), während sich die RNS in der oberen, wässrigen Phase löst. Dazwischen findet sich die Interphase, in welcher sich die DNS befindet. Das in diesem Kit genutzte Phenol bindet aufgrund seines sauren pH-Wertes von 4,8 die DNS, weshalb die obere Phase ausschließlich aus RNS besteht.

In der *TRIzol*-Isolation wurden die Reinheit und die Konzentration der isolierten RNS mittels *NanoDrop8000* UV-Vis-Spektrometers [54] bestimmt. Eine gemessene Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) kann zur Berechnung der Konzentration der isolierten RNS genutzt werden. Eine Extinktion $E = 1$ bei RNS entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Auch in diesem Fall konnten, genauso wie in Kapitel 3.2.1.4 für die DNS beschrieben, mittels 260/280- und 260/230-Quotienten, Informationen über die Reinheit der isolierten RNS gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit lag die untere Grenze für den 260/280-Quotienten bei 2,0 und die des 260/230-Quotienten bei 1,8.

3.2.1.6 Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen

(nach Herstellerprotokoll *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep*, Sigma-Aldrich, Version 2016)

Das *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep* – Kit wurde zur Isolierung chromosomaler DNS aus Zellen verwendet. Die Kultur einer konfluent bewachsenen 10 cm Schale wurde für eine Isolation eingesetzt. Anschließend wurden die Konzentration und die Reinheit der isolierten genomischen DNS bestimmt (Kapitel 3.2.1.4). Eine Integritätskontrolle erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.1.11).

3.2.1.7 Synthese komplementärer DNS (cDNS)

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

In der vorliegenden Arbeit wurde das kommerzielle Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Life Technologies nach Herstellerangaben genutzt, um die isolierte RNS

in komplementäre DNS umzuschreiben. Dies ist nötig, damit mittels Genexpressionsanalyse Aussagen über die quantitative Transkription spezifischer Gene getroffen werden können. Als PCR-Zykler wurde ein *PRIMUS 25 Advanced* verwendet. In Tabelle 14 sind alle Bestandteile für den Ansatz zur Herstellung einer cDNS aufgelistet.

Tabelle 15 zeigt die dazugehörigen Zykler-Programmeinstellungen.

Tabelle 14: Ansatz für die cDNS-Synthese.

Komponente	Konzentration
RNS (eingestellt auf 0,2 µg/µl)	10 µl
10x RT-Puffer	2 µl
25xdNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
Multiscribe Reverse Transkriptase	1 µl
Nuklease-freies Wasser	4,2 µl

Tabelle 15: Zykler-Programm für die cDNS-Synthese.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
1	10 min	25 °C	1
2	120 min	37 °C	1
3	5 min	85 °C	1
4	∞	4 °C	/

Die gewonnene cDNS wurde im Verhältnis 1:10 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.1.8 Durchführung einer Kolonie-PCR

(nach [104])

Um selektieren zu können, ob die gewonnenen *E. coli* DH5α-Transformanten die gewünschten Plasmide aufgenommen haben, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei diente die in den *E. coli*-Zellen vorhandene DNS als Template für die PCR. Aufgrund der Erhitzung auf 98°C kommt es zum Aufbruch der Bakterienzelle und die in ihr enthaltene DNS liegt frei und kann von Primern und der DNS-Polymerase genutzt werden. Die Kolonie-PCR wurde bei der Klonierung des Plasmids pSpCas9(BB)-2A-Puro durchgeführt. Zur Durchführung wurden 200 µl-PCR-Reaktionsgefäße mit 20 µl PCR-Reaktionsansatz (siehe Tabelle 16) auf Eis gefüllt. Unter sterilen Bedingungen wurden einzelne *E. coli* DH5α-Kolonien gepickt, auf neue Selektionsplatten ausgestrichen und im PCR-Ansatz suspendiert. Mittels PCR (Einstellungsoptionen siehe Tabelle 17) mit spezifischen Primern konnte das Insert amplifiziert werden. In einer anschließend durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese der Reaktionsansätze wurden aufgrund der Größe der Vervielfältigungen (9153bp) nur DH5α-Klone verwendet, die das korrekte Insert trugen.

Tabelle 16: PCR-Reaktionsansatz für Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen
5x Phusion HF-Buffer	4 µl
dNTPs	0,4 µl
U6 fwd-Primer (1:10 verdünnt)	1 µl
Rev-Primer der entsprechenden gRNS	1 µl
Phusion Polymerase	0,2 µl
ddH ₂ O	13,4 µl

Tabelle 17: PCR-Programm für Kolonie-PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur
1 initiale Denaturierung	5 min	98 °C
2 Denaturierung	20 s	98 °C
3 Annealing	30 s	63 °C
4 Elongation	15 s	72 °C
5 vollständige Elongation	5 min	72 °C
6 Pause	∞	8 °C

Die Schritte 2-4 wurden 34-mal wiederholt

3.2.1.9 Restriktionsverdau von DNS

(nach [286])

Doppelsträngige DNS kann mittels Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen an oder zumindest in der Nähe spezifischer, meist kurzer Palindrom-Sequenzen, sogenannten Restriktionsschnittstellen [52,61,142,192,279] geschnitten werden. Um einen Restriktionsverdau durchzuführen, wurde DNS in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit einem Restriktionsansatz (siehe Tabelle 18) versetzt und im Anschluss bei 37°C im Wasserbad für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung des Reaktionsansatzes mittels *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben (QIAquick Spin Handbook, Version April 2015), um Enzyme und Puffer zu entfernen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind NheI und PstI vom Hersteller New England Biolabs und in der Tabelle 19 genauer aufgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.

Komponente	Volumen
10x NEBuffer 4	5 µl
BSA (100x) (nur für NheI-HF)	0,5 µl
Restriktionsenzymlösung	1 µl
DNS	≤ 4 µg
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme.

Enzym	Hersteller	Puffer	Zusatz
NheI-HF (20 U/µl)	New England Biolabs	10x NEBuffer 4	BSA (100x)
PstI-HF (20 U/ µl)	New England Biolabs	10x NEBuffer 4	-

3.2.1.10 Ligation von DNS-Fragmenten

(nach [286]; nach Herstellerprotokoll der Kits *Fast-Link DNA Ligation Kit*, Epicentre, Version Juni 2012)

Zu DNS-Ligasen zählen Enzyme, die DNS-Moleküle mittels Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids und der 5'-Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids verbinden. In der vorliegenden Arbeit wurden Kits auf Basis der DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 genutzt (Cozzarelli u. a. 1967; Weiss und Richardson 1967). Es wurden alle Ligrationsreaktionen mittels *Fast-Link DNA Ligation Kit* nach Herstellerprotokoll angesetzt. Der in Tabelle 20 aufgelistete Reaktionsansatz wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße zusammen pipettiert und circa 100 ng Plasmid-DNS hinzugefügt. Da in der vorliegenden Arbeit eine Ligation mittels kohäsiver Enden durchgeführt wurde, wurde auf einen molaren Überschuss an Insertmolekülen von 3:1 gegenüber Plasmidmolekülen geachtet. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 70°C im Heizblock für 15 min inaktiviert. Daraufhin wurden 5 µl der Ligrationsansätze in die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen eingesetzt.

Tabelle 20: Ligrationsansatz mit *Fast-Link DNA Ligation Kit*, Epicentre. Menge an Insertmolekülen berechnete sich aus dem dreifachen molaren Überschuss von Insert zu Plasmid.

Komponente	Volumen, Menge
Plasmid-DNS	ca. 100 ng/ µl
Insert-DNS	x ng
10x Fast-Link Ligation Buffer	1,5 µl
Fast-Link DNA Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

3.2.1.11 Agarose Gelelektrophorese

(nach [262])

Mittels Gelelektrophorese lassen sich geladene Teilchen, wie beispielsweise DNS-Fragmente, nach ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld auftrennen [224]. Die DNS wandert aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste im elektrischen Feld zur Anode [224]. Die Gelmatrix, bestehend aus Agarose in verschiedenen Konzentrationen, führt zur Auftrennung der Moleküle nach ihrer entsprechenden Größe. Dabei verringert sich die Laufgeschwindigkeit linear mit der Größe der Moleküle. Die DNS-Fragmente trennen sich in Phasen auf, welche aus Fragmenten ähnlicher Länge bestehen. Zur Visualisierung der Signale auf der Gelmatrix wird Ethidiumbromid, welches in die DNS interkaliert, genutzt und anschließend mit UV-Licht sichtbar gemacht [274].

In der vorliegenden Arbeit wurden 1-prozentige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 21) gelöst und in der Mikrowelle erwärmt. Nach anschließender Abkühlung wurde Ethidiumbromid (Stocklösung-Konzentration: 10 mg/ml) 1:10.000 in der TAE-/Agaroselösung verdünnt. Das Gemisch wurde

in einen Kunststoffschlitten gegossen, in welchem mittels mobilem Kamm nach dem Aushärten Taschen gebildet wurden. Der mit ausgehärtetem Agarosegel befüllte Kunststoffschlitten wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Jede Tasche wurde im Anschluss mit 5 µl Probe beladen, bestehend aus 3 µl PCR-Ansatz und 2 µl Ladepuffer. Sowohl in die vorderste als auch in die hinterste Tasche wurde 5 µl *GeneRuler DNS Ladder Mix* als Größenmarker pipettiert. Durchgeführt wurde die Elektrophorese bei einer elektrischen Spannung von 135 mV für 45 min. Im finalen Schritt wurden die DNS-Banden mittels UV-Licht detektiert.

Tabelle 21: Zusammensetzung des TAE-Puffers (50-fach konzentriert) für die Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Volumen, Menge
Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H ₂ O	ad 1 l

3.2.1.12 Knockout des Gens *ADAM10* – die CRISPR/Cas9-Methode

(modifiziert nach [247,286])

Für die Deletion des Gens *ADAM10* wurde das von Ran *et al.* 2013 veröffentlichte Protokoll als Grundlage für die CRISPR/Cas9-Methode (CRISPR: engl.: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) verwendet [247]. Dies ist eine leistungsstarke gentechnische Methode, womit genomische Veränderungen wie Deletionen oder Insertionen bestimmter DNS-Abschnitte in Zellen mit hoher Präzision vorgenommen werden können [211]. Dabei wird sich die Fähigkeit einer spezifischen Nuklease zu Nutze gemacht, gezielt Schnitte in die DNS einzufügen und dadurch einzelne Veränderungen an Genen eukaryotischer Zellen vorzunehmen (*Genome Editing*). Die CRISPR/Cas9-Methode basiert auf einem bakteriellen Abwehrmechanismus gegenüber Viren. Die Endonuklease Cas9 (engl.: *CRISPR-associated*, CRISPR-assoziiert), ein an jedem Genlokus DNS-schneidendes Enzym, bindet an eine bestimmte RNS-Sequenz (cr-RNA repeat-Sequenz), auf die eine weitere spezifische RNS-Sequenz (cr-RNA spacer-Sequenz) folgt, die wiederum komplementär an DNS binden kann. Durch diese Bindung und die damit entstandene räumliche Nähe, schneidet Cas9 die komplementär gebundene DNS, nachdem sie durch ein PAM-Motiv (engl.: *protospacer adjacent motif*) aktiviert wurde. Dafür ist eine bestimmte, spezifische sgRNS (engl.: *single guide RNS*) notwendig. Diese ist, angelehnt an den natürlichen bakteriellen Abwehrmechanismus (Ran *et al.* nutzten *S.pyogenes*), ähnlich der crRNS-Sequenz und besteht aus einer 20-Nukleotid-Sequenz, gefolgt vom PAM-Motiv. Um die Guide-Sequenz der sgRNS optimal auszuwählen, wurde explizit darauf geachtet, dass die gewünschte Sequenz Exon-Exon-Grenzen nicht übertritt. Die Bindung sollte so nah wie möglich am 5'-Bereich sein. Unmittelbar downstream des Protospacers muss sich das PAM-Motiv 5'-NGG-3' befinden, da

bei der Methodik, wie oben beschrieben, auf *Streptococcus pyogenes* zurückgegriffen wird [247]. Um potenzielle Guide-Sequenzen (sgRNS) zu ermitteln, wurde die Website CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>, Webseite zuletzt besucht am: 21.07.2020) genutzt. Als zusätzliche Auswahlkriterien wurde sich neben der Anzahl an ausgeknockten Isoformen, der Anzahl der *off-targets* der möglichen Sequenz auch auf eine möglichst geringe Anzahl an *mismatches* konzentriert. Dazu wurden die jeweils in Frage kommenden sgRNS-Sequenzen via NCBI-Blast (engl.: *National Center for Biotechnology Information*) geblastet. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Guide-Sequenz, deren NCBI-Referenzsequenzen und deren Position innerhalb der Referenzsequenzen ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Guide-Sequenz zur Deletion von humanem ADAM10.

Gen	Guide-Sequenz	NCBI-Referenzsequenz	Position	Strang
ADAM10	5'-GATACCTCTCATATTTACTGG-3'	NM_0011110.4 NM_001320570.2 XM_024449818.1	innerhalb des 3. Exons	-

Die Guide-Sequenz der sgRNS zur Deletion von *ADAM10* musste am 5'-Ende um ein Guanin ergänzt werden, da der U6 RNS-Polymerase III-Promotor Guanin als erste Base eines Transkripts bevorzugt [103]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), bereitgestellt von Feng Zhang (Addgene plasmid # 48139), besitzt genau diesen Promotor zur Expression der sgRNS [247]. Um das Gen *ADAM10* zu deletieren, wurde zunächst ein Paar an Oligonukleotiden als Primer konstruiert (siehe Kapitel 3.1.8). Dieses Paar ist über den Bereich der sgRNS komplementär, während die jeweiligen nicht-komplementären Überhänge der Ligation der DNS-Fragmente dienen. Im Anschluss kam es zur Klonierung des Vektors pSpCas9(BB)-2A-Puro und der DNS-Konzentrationseinstellung auf 1 µg/µl. Mittels Restriktionsverdau (beschrieben in Kapitel 3.2.1.9) wurde der Vektor durch die Endonukleasen NheI und PstI geschnitten. Um ein doppelsträngiges DNS-Insert zu entwerfen, wurden die Oligomere annealt und mithilfe der T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Tabelle 23 und Tabelle 24 listen sowohl den Reaktionsansatz als auch das verwendete Programm auf. Anschließend wurde der Vektor mit dem DNS-Insert ligiert und dieses dann 1:2000 in HPLC-grade-H₂O auf ein Endvolumen von 200 µl verdünnt.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für Annealing und Phosphorylierung des gRNS-Inserts.

Komponente	Volumen
Oligonukleotid fwd	1 µl
Oligonukleotid rev	1 µl
10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer	1 µl
T4 Polynucleotide Kinase	1 µl
ddH ₂ O	6 µl

Tabelle 24: Temperaturprogramm für Annealing und Phosphorylierung des gRNS-Inserts.

Temperatur	Zeit
37 °C	30 min
95 °C	5 min
Abkühlung auf 25 °C	5 °C / min

Das so entstandene DNS-Insert wurde im Anschluss für die Transfektion in HEK-Zellen weiterverwendet.

Um die Aufnahme der sgRNS im gewünschten DNS-Insert nachweisen zu können, wurde eine Sanger-Sequenzierung des entsprechenden Inserts durchgeführt, deren Ergebnis in der Abbildung 9 dargestellt ist.

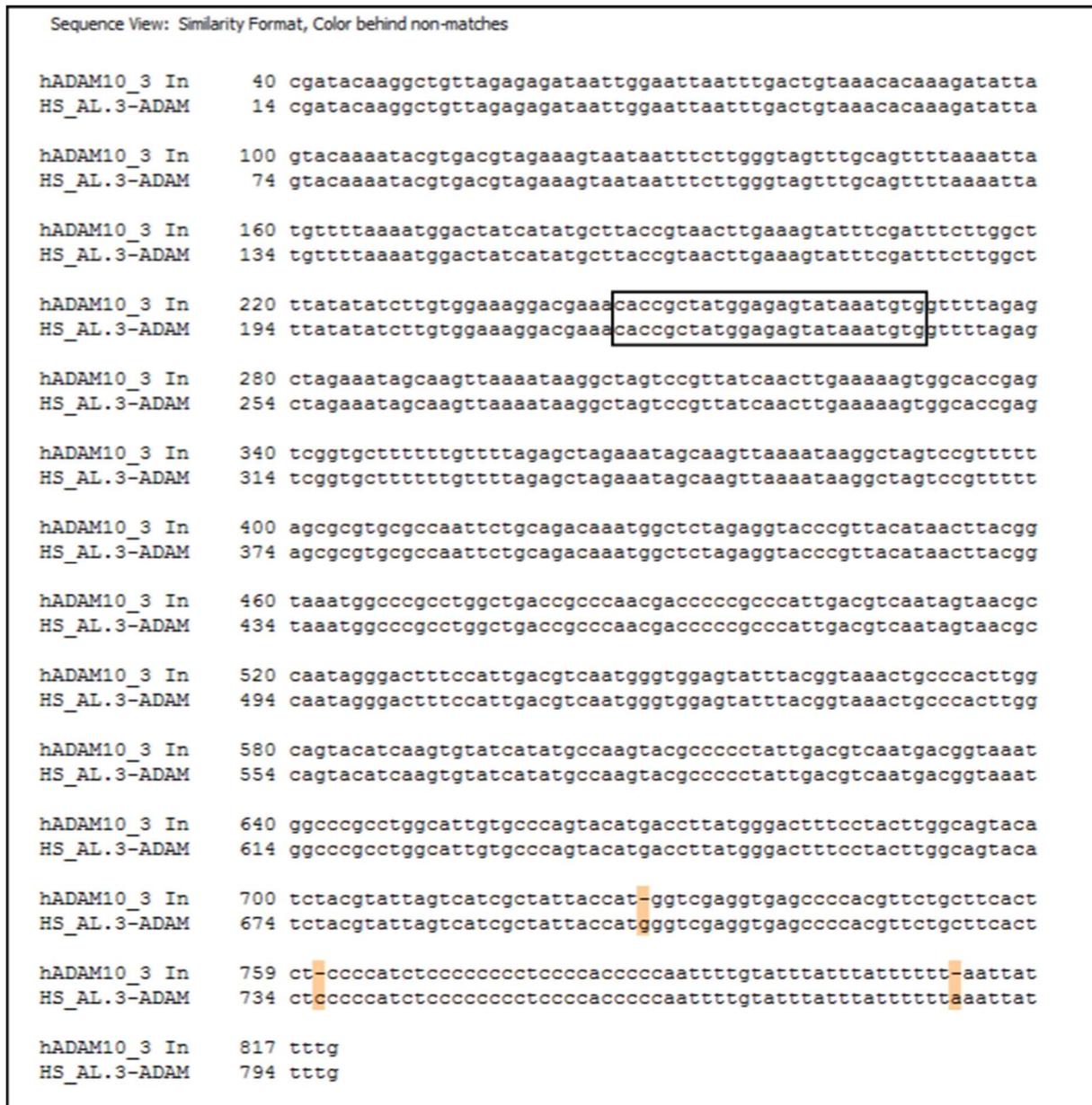


Abbildung 9: Sanger-Sequenzierungsergebnisse der sgRNS im DNS-Insert. hADAM10_3 In: Darstellung der bioinformatisch erstellten Referenzsequenz. HS_AL.3-ADAM: Sequenzierungsergebnisse des erstellten DNS-Inserts nach Sanger-Sequenzierung. Die erstellte sgRNS wurde eingerahmt.

3.2.1.13 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

(nach Herstellerprotokoll *Fast SYBR Green Master Mix Kit*, Thermo Fisher Scientific und [101]) Mittels qRT-PCR (engl.: *quantitative Real-Time polymerase chain reaction*) kann das Expressionsniveau verschiedener Gene quantitativ bestimmt werden. Ziel der Methode ist es, spezifische Gensequenzen aus der vorher aus RNS-Isolation (Kapitel 3.2.1.5) und reverser Transkription (Kapitel 3.2.1.7) gewonnenen cDNS zu vermehren und diese in Echtzeit zu detektieren. Dafür werden Gen-spezifische Primer verwendet [84,214]. In der vorliegenden Arbeit fand ein *PikoReal Real-Time PCR System* mit einem *Fast SYBR green Master Mix* Verwendung. Der Master Mix besteht aus *AmpliTaq®Fst DNS-Polymerase*, Desoxynukleotiden und einem *SYBR®green I* Fluoreszenzfarbstoff. Dieser diene als Nachweis, da er mit doppelsträngiger DNS interagiert [347]. Die genutzten Primer sind in der Tabelle 25 aufgeführt und wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Eberberg, Deutschland) synthetisiert. Um Unterschiede in der RT-Effizienz auszuschließen, wurden die fünf stabilsten *housekeeping*-Gene zur Normalisierung herangezogen.

Tabelle 25: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Primer. Die verwendeten *housekeeping* Gen-Kandidaten sind fett hinterlegt.

Gen	Forward Primer (5' – 3')	Reverse Primer (5' – 3')
<i>A2M</i>	GCCAACAAGGTGGATTTGAG	AGAGCTCAGCATCAGGCTTC
<i>AASS</i>	CTGTGGTGAGAGATGCAGTGA	TGCCATTGAAAGTGACTGA
<i>ABCA1</i>	TATGAGGGCCAGATCACCTC	TGCTCATCTCAGAGCGAATG
<i>ACAT1</i>	AAATTCATATGGGCAGCTGTG	GCTTCCCATGCTGCTTTACT
<i>ACHE</i>	CACTGGTGGGAATGACACAG	ATCTACCACAGGCACGAAGG
<i>ACTB</i>	CTTCCTGGGCATGGAGTC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>ALS2</i>	ATACCCTGACACCCAAGCAG	GGTACCTGAGATGGCACTGG
<i>APBA1</i>	CAGGAAGAAGGCTCCTGAAG	GGGTGGTCCATCATTGTCTC
<i>APBA3</i>	CATCTCCTACACAGCCGACA	GATGAGCTGGGCGTCTCTC
<i>APBB1</i>	TTTGGAAGGATGAACCCAGT	AAGCTTCTCCTCCTCTTGGG
<i>APBB2</i>	GACCCAGAAGCCAAGTGTTC	GGAAAGTTGCCTGATGCAGT
<i>APH1a</i>	CAGCCATTATCCTGCTCCAT	GGAATGTCAGTCCCAGATGTC
<i>APH1b</i>	GTGTCAGCCCAGACCTTCAT	CAGGCAGAGTTTCAGGCTTC
<i>APOA1</i>	CAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGA	CTCAGGCCCTCTGTCTCCTT
<i>APOE</i>	GCAGACCGAGTGGCAGAG	CATCAGCGCCCTCAGTTC
<i>APPBP1 / NAE1</i>	TCACCAAACAGACTCCATCATT	TTGCCTGAATCTGCAATCATA
<i>ATP5B</i>	GCAGGAAAGAATTACCACTACCAAG	TGGTAGCATCCAAATGGGCAA
<i>B2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
<i>BDNF</i>	TACTTTGGTTGCATGAAGGC	GCCAATGATGTCAAGCCTCT
<i>C1orf43</i>	AGCTCTGGATGCCATTTCGTACC	GTGTTTCGCAGATCCAGCAGGT
<i>CASP3</i>	AAGCACTGGAATGACATCTCG	ATCACGCATCAATTCCACAA
<i>CASP4</i>	GGAATGGAGCTGACTTTGACA	CTGACTCCATATCCCTGGCT
<i>CAT</i>	ATTCGATCTCACCAAGGTTTG	CTTGGGTCTGAAGGCTATCTG
<i>CDK5</i>	TGTGACCAGGACCTGAAGAA	TAGCACATTGCGGCTATGAC
<i>CDKL1</i>	AGGGACCAAAGGGAATAACC	CACCCAACGATGAGTGTTTG
<i>CLU</i>	CAGCCCTTCCTTGAGATGAT	CGTCGCCTTCTCGTATGAAT
<i>CSTB</i>	CAGGACAAGCACTACGGATACA	CACAGAGAAAGCTCCCTCCA
<i>CTSL</i>	CCTGTGAAGAATCAGGGTCAG	GCCCAGAGCAGTCTACCAGA
<i>DUOX1</i>	CTGGACATCCTGGTGGTCTT	ATCCTTGGAAATGAGGCCAT
<i>ECE1</i>	TGATGATCAAGGACGGGAGT	TCTACCATGCACTCGGTCTG

<i>ECE2</i>	ACCTGATCTGGAACCTGGTG	CTCGGCACACAGGACTTCTT
<i>EIF4A2</i>	TGCTCTGCATGGTGACATGGAC	ATCCCGCGAGCCAACAAGTC
<i>EMC7</i>	GTCAGACTGCCCTATCCTCTCC	CATGTCAGGATCACTTGTGTTGAC
<i>EP300</i>	TATGCCAACAGCAGCTCAAC	GGCTTGGACGAGTTTGTGA
<i>EPX</i>	GGCGTTGACTGTGAGAGGAC	GGAAGAAAGGGATGCAGTCA
<i>ERCC2</i>	GAGCCCTTTGACGACAGAAC	TGACAGACTGGAAACGCTCA
<i>ERCC6</i>	CAGCGGTTAAGGAGATGGAA	AAACCTTCGTCAAATTCAGCA
<i>ERN1</i>	GTAATCTCTGAGGGCAGCCA	GTCTTCGTGCTTCTCTGGGT
<i>GAPDH</i>	ATTCCACCCATGGCAAATTC	GGGATTTCCATTGATGACAAGC
<i>GAP43</i>	AGAGCAGCCAAGCTGAAGAG	CCGGGCACTTTCCTTAGGT
<i>GNAO1</i>	CAAATACTACCTGGACAGCCT	TGGGTTTCTACGATGCCAGT
<i>GNB1</i>	TTGTGATGCTTCAGCCAAAC	TTTGAAAGAAGCAAATGGC
<i>GNB2</i>	CCACTGGGTACCTGTCTG	GTCTGCTGGCCTGTCTCAAT
<i>GPI</i>	CCAAGTCCAGGGGCGTG	CTTGTTGACCTCTGGCATCACA
<i>GPX1</i>	AGTTTGGGCATCAGGAGAAC	GCACTTCTCGAAGAGCATGA
<i>GPX3</i>	AAGTCGAAGATGGACTGCCA	CCAGCATACTGCTTGAAGGG
<i>GPX7</i>	AACAGGAGCCTGACAGCAAC	AGTCTGGGCCAGGTACTTGAA
<i>GSK3a</i>	GGTTCAAGAACCGAGAGCTG	TCGTCTTCTTCTCGCCACT
<i>GSK3b</i>	CGGGATATTAACCGCAGAA	CGAAACATTGGGTTCTCCTC
<i>HADH2 / HSD17B10</i>	CTGTCAACTGTGCAGGCATC	GCCCATGAGATTACATCAAG
<i>HDAC1</i>	AGCCGGTTCATGTCCAAAGTA	TTGGCGTGTCTTTGATAGTT
<i>HMGR</i>	TCTTCCACGTGCTTGTGACT	CGTGCAAATCTGCTAGTGCT
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT
<i>IDH1</i>	TTTGAAGAAGGTGGTGGTGTT	TCAGATACAAAGGCCAACC
<i>IL1A</i>	GCAGTGAAATTTGACATGGGT	ATCTCCTTCAGCAGCACTGG
<i>INSR</i>	TATTGCCTCAAAGGGCTGAA	CTTTGGACAGGAGCAGCATT
<i>LPL</i>	GGGCATGTTGACATTTACCC	GCTGGTCCACATCTCCAAGT
<i>LRP1</i>	TGGACTACCAGGATGGGAAG	ATGTCCATGTTGTTGCTGGA
<i>LRP6</i>	CATGGGCCTAAAGGCTACAA	TTCAAAGCCAATAGGGCAAG
<i>MAP2</i>	AATACAGCCCACCTCAGCAG	GGAGGAAGGTCTTGGGAGAG
<i>MAPT</i>	AGCCAAGACATCCACACGTT	AGGGTTGGATCAGAGGGTCT
<i>MMP2</i>	ACGACCGCGACAAGAAGTAT	ATTTGTTGCCAGGAAAGTG
<i>MPRIP</i>	ATCTCAGCCATCGAAGCCAT	TGGCTCTTCTCCAGCTCCC
<i>NQO1</i>	AAAGGACCTTCCGGAGTAA	CTCTGAATTGGCCAGAGAATG
<i>NUDT15</i>	CCAACCTCCCTGGAGGTCA	AGCTGCTTCTTCCCAGGTTT
<i>PARK7</i>	TGGTGGTTCTACCAGGAGGT	GTAGGACCTGCACAGATGCC
<i>PKP4</i>	ACAGCATCTGGGACCTTCAC	GGAATCCGTAAGCCTGTCA
<i>PLAT</i>	GAGTGCACCAACTGGAACAG	TAGCACCAGGGCTTTGAGTC
<i>PLAU</i>	ACGACATTGCCTTGCTGAAG	GGCAGGCAGATGGTCTGTAT
<i>POLR2F</i>	CCCGAAAGATCCCCATCAT	CACCCCCCAGTCTTCATAGC
<i>PPP1R15B</i>	AGGTAGTCGGCTTCCAGACA	AGGCCTTCCGTAGAAAGAGG
<i>PRDX1</i>	CAACTGCCAAGTGATTGGTG	CAAAGGAATGTTTATGGGT
<i>PRDX2</i>	CACCTGGCTTGGATCAACA	GCCGTAATCCTCAGACAAGC
<i>PRDX6</i>	TTGTGAAGAGCCACAGAAA	AACAAACACCACACGAGCTG
<i>PRKAA1</i>	TGCACACATGAATGCAAAGA	GGCCTGCATACAATCTTCT
<i>PRKAA2</i>	CAAATTATGCAGCACCTGA	CATGCTCATCATCAAATGGG
<i>PRKCA</i>	ACTTCATGGGATCCCTTTCC	TCCATGTTTCTTCTCCTCGTC
<i>PRKCD</i>	AGGATGTGGTCTCTGATCGAC	AACAGGTGGTCTTGGTCTG
<i>PRKCE</i>	AGCTTTGGCAAGGTGATGTT	CAGTCCACGTATCATCCTG
<i>PRKCG</i>	CAGGAGGAGGGCGAGTATTA	ACCCGCTCATAACAATCCAG
<i>PRKCQ</i>	CGAGAAACCATGTTCCACAA	GGTCCCACAGTGTTACAGA
<i>PRKCZ</i>	ACAGACTACGGCATGTGCAA	ACGCTGAACCCGTACTCCT
<i>PRNP</i>	AACAAGCCGAGTAAGCCAAA	AAATGTATGATGGGCCTGCT
<i>PSENFEN</i>	CATCTTCTGGTTCTTCCGAGAG	AGAAGAGGAAGCCCACAGC
<i>PSMB4</i>	CTTGGTGTAGCCTATGAAGCCC	CCAGAACTTCTCGCAGCAGAG
<i>RN18S1</i>	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT
<i>RPL13A</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGATTTGTCAA

SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
SH2D3C / CHAT	CCAAGGAGATGCAGACCCTA	TGTGGAACCTTTCCAGCAG
SNCA	ACCAGTTGGGCAAGAATGAA	CCCTTCCTCAGAAGGCATTT
SNCB	CTGGGAGGAGCTGTGTTCTC	CCACTTCCTCTGGCTTCAGAT
SNRPD3	TGCCAGATGTCCAACATCACAGTC	ACATGGGTGCGTTCTTCAGCA
SOD1	CAGCAGGCTGTACCAGTGC	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
TBP	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTATC
TOP1	TGAAAGTCCGGCAGAGAGCTG	GCCCACAGTGTCCGCTGTTT
TXNIP	TGTGAAGGTGATGAGATTTCCA	GCCATTGGCAAGGTAAGTGT
TXNRD2	GCATGACTGGAGGAAGATGG	AAACCGTGTGCTCGTCAAC
UBC	GTGTCTAAGTTTCCCCTTTTAAGG	TTGGGAATGCAACAACCTTTATTG
UBQLN1	GCAACCTAGAAAGCATCCCA	TGGATTACCACCAAACCTGCTC
UCP3	ATTTCAAGGCCAGCATAACACC	GGCAAAGTTCCTTTCCACAG
UQCRC1	TGTCAGGAAGCTGTCTCGTG	TCTGGGCGAGGTCTAACAGT
UQCRC2	ATGGCTTTGATTGGACTTGG	TTCACCTCCACGGTAGTTGG
XPA	CAACCAGGACCTGTTATGGAA	TGCAGTTATCACAAGTTGGCA
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

3.2.1.14 Stabilitätsanalyse der *housekeeping*-Gene mithilfe des *NormFinder*-Algorithmus

(nach [125])

Unter dem Begriff *housekeeping*-Gen (deutsch: Haushalts-Gen, HKG) zählen molekularbiologisch all die Gene, die für die Aufrechterhaltung grundlegender zellulärer Prozesse notwendig sind und in allen Zellen des Organismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen idealerweise unverändert exprimiert werden [117]. Allerdings kann die Expression mancher *housekeeping*-Gene unter bestimmten Versuchsbedingungen variieren [90], weshalb in der vorliegenden Arbeit aus 19 potenziellen *housekeeping*-Genkandidaten die fünf für das vorliegenden Studiendesign optimalen HKG ausgewählt wurden. Kriterien für die Erstellung dieser Rangfolge, welche durch den *NormFinder*-Algorithmus erstellt wurde, waren neben des Cq-Wertes (engl.: *quantitation cycle*) auch die Stabilität des Gens. Um den Stabilitätswert für jedes einzelne HKG berechnen zu können, wurde der *NormFinder*-Algorithmus (<https://www.moma.dk/normfinder-software>), erstmals veröffentlicht in [7], verwendet. Dieser Algorithmus dient zur Identifizierung der optimalen Normierungsgene aus einer Reihe von potenziellen Kandidaten. Dabei wird eine Rangfolge der Kandidaten nach ihrer Expressionsstabilität in einem vorhandenen Probensatz und einem gegebenen Versuchsplan erstellt [7]. Die Berechnung erfolgte anhand des entsprechenden Hersteller-Protokolls mit den dafür vorgesehenen „R“-Funktionen.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

(nach [76])

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien wurde unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank mit zirkulierendem Luftstrom durchgeführt. Die Zellen wurden auf Petrischalen (Ø 10 cm) im jeweilig entsprechenden Zellkulturmedium (Tabelle 26) bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) im CO₂-Inkubator kultiviert. In regelmäßigen und auf die entsprechenden Zelllinien angepassten Abständen erfolgte eine Passage der Zellen, nachdem eine entsprechende Konfluenz erreicht wurde. Dazu wurde das nährstoffarme Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) oder DMEM-F12 (für Calu-3 Zellen) gewaschen und im Anschluss mit circa 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für maximal 2 min bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Durch die Zugabe von Trypsin kam es zum Ablösen der adhärenen Zellen vom Boden der Schale. Durch Zugabe von 8,5 ml frischem entsprechendem Zellkulturmedium (enthält 10 % FCS) wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Nach der Vereinzellung, die mithilfe einer serologischen Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in der Schale erfolgte, konnten die Zellen entweder erneut auf Petrischalen (Ø 10 cm) oder 6-, 12-, 24-, beziehungsweise 96-Wellplatten ausgesät werden.

Tabelle 26: Bestandteile der jeweiligen Zellkulturmedien.

Zelllinie	Medium	Antibiotika-Zusatz
SH-SY5Y Wt	DMEM 0,1 mM MEM-Aminosäurelösung 10 % (v/v) FCS	
Calu-3 Wt	DMEM-F12	0,1 mM Penicillin/Streptomycin
HEK Wt	DMEM 10 % (v/v) FCS	
HEK ADAM10 ^{-/-}	DMEM 10 % (v/v) FCS	2 µg/ml Puromycin*
HEK mock zu ADAM10 ^{-/-}	DMEM 10 % (v/v) FCS	2 µg/ml Puromycin*
Hep G2 Wt	DMEM 0,1 mM MEM-Aminosäurelösung 10 % (v/v) FCS	0,1 mM Penicillin/Streptomycin

*nur zur Selektion während der Transfektion genutzt.

3.2.2.2 Kryokonservierung/Rekultivierung eukaryotischer Zellen

(nach [76])

Um Zellen in flüssigem Stickstoff zu konservieren, wurden diese in ihrer exponentiellen Wachstumsphase (60 – 80 % Konfluenz) mittels Trypsin-Reaktion vom Boden der Schale

gelöst und die Reaktion durch Hinzugabe von 4,5 ml 10 %-FCS-haltigem Zellkulturmedium beendet. Die Suspension wurde dann in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei RT und 355 x g zentrifugiert. Überstehendes Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 4,5 ml Einfriermedium (Tabelle 27) aufgenommen und resuspendiert. Es erfolgte eine Aliquotierung in Kryogefäße zu je 1,5 ml. Um eine stufenweise Abkühlung um 1°C je Minute der Zellkulturen zu gewährleisten kamen diese in eine Einfrierbox gefüllt mit Isopropanol und wurden für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung.

Tabelle 27: Bestandteile des Einfriermediums.

Komponente	Volumen
FCS	5 ml
Dimethylsulfoxid	5 ml
Kultivierungsmedium	40 ml

Zur Wiederaufnahme der Zellkultur aus flüssigem Stickstoff wurden Zellen bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 8,5 ml frischem Kultivierungsmedium und eine Zentrifugation für 5 min bei 355 x g und RT. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und in eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt und im CO₂-Inkubator gelagert.

3.2.2.3 Transfektion von HEK-Zellen mittels Lipofektion

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

Der Begriff Lipofektion beschreibt das Einbringen fremder DNS oder RNS in eine eukaryotische Zelle mittels Liposomen. Mithilfe dieser kleinsten vesikulären Strukturen wird ein Lipidkomplex genutzt, der den gleichen Aufbau wie die Zellmembranen besitzt, um DNS zu transfizieren. Dabei gelangt die DNS entweder anhand von Endozytose des Liposoms oder durch direkte Membranfusionierung ins Zellinnere [69].

Um potenziell toxische Einflüsse von DMSO, welches Bestandteil des Einfriermediums ist, auf die zu transfizierenden Zellen auszuschließen, wurden die Zellen mindestens zwei Mal passagiert, nachdem sie rekultiviert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden HEK-Zellen unter Verwendung des Reagens *Lipofectamine 2000* nach Angaben des Herstellers stabil transfiziert. Dazu wurden die Zellen auf 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Tabelle 28 listet alle Volumina und DNS-Mengen, die zur Transfektion verwendet wurden, auf. Dabei wurden pro zu transfizierender Zellkultur und Well je zwei sterile Reaktionsgefäße mit Opti-MEM gefüllt. Eines wurde mit *Lipofectamine 2000* nach Herstellerangaben gefüllt, das andere mit Plasmid-DNS-Lösung und im Anschluss für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Lösungen vereinigt, gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zellkulturmedium der zu transfizierenden

Zellen gewechselt. Dafür wurde 1,5 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes, Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde im Anschluss zu den Zellen gegeben und durch kreisende Bewegungen der 6-Wellplatte mit dem Medium vermischt und anschließend bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und nach 4-6 Stunden durch entsprechendes Kulturmedium ersetzt. Aus der Tabelle **28** sind die Volumina und DNS-Mengen für die Transfektion zu entnehmen.

Tabelle 28: Volumina und DNS-Mengen für die Transfektion.

Platte	Opti-MEM	Plasmid-DNS	Lipofectamine 2000	Transfektionsansatz/Well
6-Well	2 x 250 µl	4 µg	10 µl	500 µl

3.2.2.4 Generierung stabil transfizierter HEK-Zellen

(nach Herstellerprotokoll Lipofectamine 2000, Invitrogen, Version Juli 2005, modifiziert nach [286])

Die in der vorliegenden Arbeit stabil transfizierten HEK-Zellen wurden zur Generierung auf 6-Wellplatten mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro transfiziert. Darüber hinaus wurde ein weiteres Well auf die gleiche Weise behandelt, mit dem Unterschied, dass auf die Plasmid-Zugabe verzichtet wurde. Dieses Well diente im weiteren Verlauf als Totkontrolle, um die Wirksamkeit des Antibiotikums zu beobachten. 24 h nach der Transfektion erfolgt der Ersatz des Zellkulturmediums durch Selektionsmedium mit Puromycin (Tabelle **26**). Dieses Selektionsmedium wurde bei allen weiteren Schritten verwendet und im Zeitraum von 48 h bis 72 h erneuert. Es erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Beurteilung des Zellwachstums unter Selektionsbedingungen. Ein Erfolg der stabilen Transfektion wurde dann verbucht, wenn die Zellen der Totkontrolle vollständig abgestorben und die transfizierten Zellen weiterhin lebensfähig waren. Diese wurden im Anschluss bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen der entstandenen Mischkultur wurden daraufhin mittels Trypsin-Reaktion vom Boden der Kulturschale abgelöst und durch eine Glaspipette vereinzelt. Die vereinzelt Zellen wurden dann in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 355 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Selektionsmedium aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde je 1 ml in schon vorgelegtes Selektionsmedium in einer Petrischale (Ø 10 cm) gegeben. Die restliche Zellsuspension wurde vollständig in eine Petrischale (Ø 10 cm) pipettiert und mit Selektionsmedium auf 10 ml aufgefüllt. Diese Schalen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und als Mischkultur konserviert (Kapitel **3.2.2.2**).

3.2.2.5 Generierung von Einzelklonen

(nach [247])

Zur Erzeugung isolierter Einzelzellklone wurde eine serielle Verdünnungsmethode verwendet, die in Ran *et al.* [247] ausführlich beschrieben ist. Dazu wurden die stabil transfizierten Zellen

aus den 6-Well-Platten mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und seriell in DMEM-Medium bis zu einer Endkonzentration von 0,5 Zellen pro 100 µl verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte pipettiert und für 3-4 Wochen expandiert. Nach einer Woche erfolgte der Wechsel auf Selektionsmedium, welches im Anschluss wöchentlich gewechselt wurde. Anhand regelmäßiger mikroskopischer Beobachtungen wurde das Zellwachstum der Einzelklone überwacht. Nach vier Wochen wurde die isolierte klonale Zelllinie aus der 96-Wellplatte in eine 48-Wellplatte überführt. Dazu wurde 25 µl Trypsin zum Ablösen der Zellen in die Wells pipettiert und nach 2-minütiger Inkubation mit 100 µl Selektionsmedium gestoppt. Mittels Mikro-Pipette erfolgte eine vorsichtige Vereinzelung der Zellen, um diese im Anschluss in 350 µl vorgelegtes Selektionsmedium in zwei Vertiefungen der 48-Wellplatte zu pipettieren. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte der schrittweise Wechsel auf 24-, 12- und 6-Wellplatten, bis hin zur Übertragung auf Petrischalen (Ø 10 cm). Daraufhin wurden die Zellen entweder für Folgeexperimente genutzt oder aber unter entsprechenden HEK-Zellkulturbedingungen, ohne Puromycinzusatz, kryokonserviert (Kapitel 3.2.2.2).

3.2.2.6 Inkubation von Zellen mit zusätzlichen Substanzen

(nach [160])

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Inkubation unterschiedlicher Zellen mit verschiedenen zusätzlichen Substanzen, wie in Tabelle 29 aufgelistet. Zur Inkubation wurden SH-SH5Y-, HEK-, HepG2- und Calu-3-Zellen (Tabelle 4) in 6-Wellplatten oder Petrischalen (Ø 10 cm) herangezogen. Dafür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 85 % - 90 % mit jeweils entsprechendem 10 %-FCS-haltigem Kulturmedium kultiviert. Da allerdings während der verschiedenen Inkubationen entweder mit einem FCS-Gehalt von 1 % (EGCG, Am80, Gemfibrozil) oder 0,1 % (Methylxanthine) gearbeitet wurde, kam es 16 Stunden vor Inkubationsbeginn zu einer Herabsenkung des FCS-Gehaltes von 10 % auf 1-beziehungsweise 0,1 %. Die FCS-Reduktion fand statt, um in späteren *Lipidomics*-Analysen diejenigen Lipide, die im FCS enthalten sind, vernachlässigen zu können.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit den in Tabelle 29 aufgelisteten Substanzen und ihren entsprechenden Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 Stunden mit einem Mediumwechsel alle 24 Stunden (0+24+48h) oder 24 Stunden mit einem Mediumwechsel nach 8 Stunden (8+16h). Jeweils parallel zu den Inkubationen der Zellen mit den beschriebenen Substanzen erfolgte eine Inkubation derselben Zellreihe mit dem jeweiligen Lösungsmittel, in dem die Substanz gelöst ist, als Kontrollgruppe.

Tabelle 29: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit genutzten Substanzen, ihre finalen Konzentrationen und ihre entsprechenden Lösungsmittel.

Substanz	finale Konzentration	gelöst in	Inkubationsdauer
Am80	1 µmol/l	DMSO	72 h (0+24+48h)
EGCG	10 µmol/l	ddH ₂ O	72 h (0+24+48h)
Gemfibrozil	100 µmol/l	Ethanol	72 h (0+24+48h)
Koffein	100; 50; 25; 12,5 µmol/l	ddH ₂ O	24 h (8+16h)
Pentoxifyllin	100; 50; 25; 12,5 µmol/l	ddH ₂ O	24 h (8+16h)
Propentofyllin	100; 50; 25; 12,5 µmol/l	ddH ₂ O	24 h (8+16h)
Theobromin	100; 50; 25; 12,5 µmol/l	ddH ₂ O	24 h (8+16h)
Theophyllin	100; 50; 25; 12,5 µmol/l	ddH ₂ O	24 h (8+16h)

3.2.2.7 Prozessierung von konditioniertem Medium

(nach [160])

Das konditionierte Zellkulturmedium wurde entweder in 15 ml-Zentrifugenröhrchen oder 2 ml-Reaktionsgefäße (je nach Plattengröße) pipettiert und anschließend bei 13.000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Dadurch wurden Zellfragmente oder abgestorbene Zellen vom Medium getrennt und der Überstand in frische Gefäße überführt. Je nach folgendem Experiment wurde das Medium sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.8 Prozessierung von Zellen

(nach [160])

Nach erfolgreicher Inkubation der Zelllinien mit verschiedenen Substanzen erfolgte eine Lipidanalyse. Dafür wurden die Zellen geerntet und zwei Mal mit eiskaltem HPLC-grade-Wasser gewaschen und mittels Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen in 180 µl Wasser aufgenommen und mittels Keramikugeln im Minilys für 60 s bei maximaler Intensität (5000 U/min) mechanisch homogenisiert.

Zur Proteinanalyse wurden Zell-Lysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen dreimal mit kaltem 1xPBS (siehe Tabelle 30) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mittels Lyse-Puffer (enthält Protease-Inhibitor-Cocktail mit und ohne EDTA, siehe Tabelle 31) lysiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und in Reaktionsgefäße pipettiert. Um die Zellreste aus dem Lysat zu entfernen, wurden die mit Zellensuspension gefüllten Reaktionsgefäße für 5 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand für nachfolgende Experimente genutzt.

Tabelle 30: Bestandteile von 1xPBS.

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

In ddH₂O lösen, auf pH = 7,5 mit HCl einstellen.

Tabelle 31: Inhalt des Standard-Lysepuffers.

Komponente	Menge
NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 7,4	50 mM
EDTA	2 mM
Nonidet P-40	0,1 % (v/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)

Direkt vor Verwendung Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugeben.

3.2.2.9 Bestimmung der Zellzytotoxizität mittels LDH-Analyse

(nach Herstellerprotokoll *Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Version März 2012*)

Nach erfolgreicher Inkubation der verschiedenen Zelllinien mittels unterschiedlicher Substanzen und deren entsprechenden Kontrollgruppen, erfolgte die Feststellung der Zytotoxizität der einzelnen Substanzen auf die Zellen nach Herstellerangaben des *Cytotoxicity Detection Kits*. Untersucht wurde mit diesem Kit die Konzentration an Laktatdehydrogenase (LDH) im konditionierten Medium, welches sich zum Schluss der Inkubation auf den Zellen befand. Die Laktatdehydrogenase ist ein ubiquitär vorkommendes zelluläres Enzym, dessen extrazelluläres Auftreten als Marker für einen Zellschaden verwendet werden kann [153]. Photometrisch kann im Anschluss an die nach Herstellerangaben durchgeführte Reaktion der Anteil an extrazellulärer LDH gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Inkubationsbedingungen inkludiert, bei denen die Zytotoxizität < 6 % entsprach.

3.2.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Analyse

(nach [280])

Um eine hohe Vergleichbarkeit der gewonnenen Zellproben zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe einer BCA-Analyse durchgeführt. Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, dass Cu^{2+} in Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu zu Cu^+ reduziert wird und dieses dann mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex eingeht, der anschließend photometrisch (violett - Absorption bei 562 nm) gemessen werden kann [308]. Die Proteinkonzentration der Proben konnte im Anschluss anhand einer mit Wasser und BSA angesetzten Verdünnungsreihe (von 0,1 mg/ml bis 1,1 mg/ml) berechnet werden. Um die BCA-Analyse durchzuführen, wurden 3-5 μl pro Probe als Dreifachbestimmung in die Wells einer farblosen 96-Well-Platte gegeben. Zusätzlich dazu wurden 20 μl der BSA-Standardreihe auf die gleiche Platte pipettiert und anschließend 200 μl der frisch angesetzten BCA-Reaktionslösung (bestehend aus 4 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und Bicinchoninsäure 1:39 (v/v)) mittels Achtkanal-Pipette zu jedem Well hinzugegeben. Die Platte wurde dann bei 37°C für 15 min im CO_2 -Inkubator inkubiert und für weitere 15 min bei RT und unter 200 U/min schüttelnd inkubiert. Im finalen Schritt erfolgte die Absorptionsmessung

mittels Platten-Photometer mit abschließender Einstellung der Proben auf eine einheitliche Konzentration. Anhand der dadurch gewonnenen Ergebnisse konnten die biologischen Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 10 mg/ml für die nachfolgenden Lipidanalysen eingestellt werden.

3.2.2.11 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(nach [193])

Anhand der SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) können Stoffgemische nach ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dieses Prinzip beruht auf einem diskontinuierlichen elektrophoretischen System. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit zehn- bis 20 -prozentige Tris/Tricin-Gradienten-Gele genutzt, um Lysate (Kapitel 3.2.2.8) durch eine elektrische Spannung aufzutrennen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit sechs µl 3x Protein-Probenpuffer (Tabelle 32) versetzt und bei 98°C für fünf min im Heizblock denaturiert. Aufgrund des im 3x Protein-Probenpuffer enthaltenen SDS bewegten sich die Proteine zur Anode, wobei eine Auftrennung anhand ihres Molekulargewichts erfolgt. Im Anschluss an die Hitzedenaturierung wurden die Proben für 15 s bei 13.000 x g zentrifugiert und die Geltaschen mittels Hamilton-Kapillare befüllt. Parallel zu den zu untersuchenden Proben wurde eine Geltasche mit *Page Ruler* als Größenstandard der Proteine beladen. Daran kann das molekulare Gewicht der Proben abgeschätzt werden. Der Gel-Lauf und die damit verbundene elektrische Auftrennung wurde bei 120 V über 45 bis 60 min durchgeführt. Die Kammer war dabei mit Laufpuffer (Tabelle 33) gefüllt.

Tabelle 32: Bestandteile des 3x Protein-Probenpuffers.

Komponente	Menge
SDS	6 % (w/v)
Glycerin	30 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	15 % (v/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Tris/HCl pH 6,8	187,5 mM

Aufnahme in ddH₂O

Tabelle 33: Bestandteile des Laufpuffers für SDS-PAGE.

Komponente	Menge
Tris/HCl pH 8,25-8,5	100 mM
Tricin	100 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Aufnahme in ddH₂O

3.2.2.12 Western Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach [160,193])

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht erfolgte ein Transfer (Western Blot), um die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran durch Anlage einer äußeren elektrischen Spannung zu übertragen. Dadurch konnte in einem nächsten Schritt der Nachweis einzelner Proteine mittels spezifischer Antikörper erfolgen. Um die Übertragung der Proteine aus den Gelen auf die 0,45 µm Nitrozellulosemembran zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit auf das „Sandwich-Prinzip“ zurückgegriffen. Dazu wurde das Tris-Tricin-Gel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und von beiden Seiten mit mindestens zwei Lagen Whatman-Filterpapier und einem Schwamm ummantelt. Das so entstandene Sandwich wurde in einem nächsten Schritt in eine Kammer platziert, die mit Transferpuffer (siehe Tabelle 34) gefüllt war. Hier erfolgte unter Anlegen von 380 mA und 4 °C für drei bis fünf Stunden der Transfer der durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode.

Tabelle 34: Bestandteile des Transferpuffers.

Komponente	Menge
Tris/HCl pH 7,8	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,025 % (w/v)

Aufnahme in ddH₂O

3.2.2.13 Immunologischer Nachweis von sAPP α auf Nitrozellulosemembranen

(nach [160,193])

Auf den Transfer der Proteine auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran folgte der immunologische Nachweis von Proteinen mithilfe spezifischer Primärantikörper.

Prinzipiell wird der Primärantikörper nach Bindung an sein Epitop von einem spezie-spezifischen Sekundärantikörper, der an HRP (engl.: *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) gebunden ist, erkannt. HRP ist anschließend in einer Reaktion als Katalysator aktiv, bei der bei Kontakt mit ECL-Reaktionslösung (engl.: *enhanced chemiluminescence*) eine Lichtreaktion abläuft. Dadurch können die Antikörper-markierten Proteine auf einem lichtempfindlichen Film nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das Protein sAPP α nachgewiesen. Dafür wurde die zu untersuchende Membran nach Proteintransfer zunächst für fünf min in 100 ml 1x PBS (Tabelle 30) bei 700 W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde eine Blockier-Lösung, die unspezifische Antikörperbindungen unterbindet, inkubiert [119]. Bevor der Primär-Antikörper W02 (Tabelle 6) für 90 min bei RT inkubiert wurde, wurde die Membran mindestens zwei Mal mit 1xPBS für jeweils fünf min gewaschen. Im Anschluss an die Inkubation von W02 erfolgten

erneut drei jeweils fünf min dauernde Waschschriffe mit 1xPBS und darauffolgend eine einstündige Inkubation des Sekundär-AK P0260 (Tabelle 6). Erneut wurde die Membran viermalig für jeweils fünf min mit 1xPBS gewaschen und im Anschluss die ECL-Reaktionslösung auf die Membran gegeben. Zur Darstellung der Lichtreaktion wurde die Membran zwischen zwei Kopierfolien platziert und in einer Dunkelkammer auf einem lichtempfindlichen ECL-Hyperfilm exponiert. Mithilfe des Programms *Image Gauge V3.45* (Fujifilm) konnten anschließend densitometrische Analysen der Signalstärken ausgewertet werden. In Tabelle 35 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Blockier- und Inkubationsbedingungen aufgeführt.

Tabelle 35: Übersicht über Blockier- und Inkubationsbedingungen zum Nachweis von sAPP α .

Protein	Blockier-Lösung, Inkubationsbedingungen	Primär-AK	Sekundär-AK
sAPP α	10 % Milchpulver (w/v) in 1 x PBS, 3-5 Stunden, 4 °C	W02, 1 μ g/ml in 1 % Milchpulver (w/v) in 1 x PBS, 90 min, RT	P0260, 1:5000 in 1 x PBS, 60 min, RT

3.2.3 Verarbeitung der verwendeten Substanzen

3.2.3.1 Epigallocatechin-3-gallat und Tamibarotene

Sowohl Am80 als auch EGCG wurden als Reinsubstanz von der Firma Merck (ehemals Sigma-Aldrich) erworben. Nach der Anlage einer Stocklösung von 1 mM für Am80 und 2,5 mM für EGCG benötigten diese Substanzen keine weiteren Vorbereitungen zur Behandlung. EGCG wurde mit einer Konzentration von 10 μ mol/l inkubiert. Bei der Auswahl der Konzentration wurde sich ebenfalls an anderen Zellinkubationsstudien mit EGCG konzentriert [42,59]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine im Vergleich zu anderen Zellinkubationsstudien mit EGCG geringere Konzentration gewählt, um einen möglichst physiologischen Effekt zu erzielen, da das im Grüntee vorkommende EGCG, als einzige natürliche Quelle, vom Körper nur in sehr geringen Maßen aufgenommen wird [62]. Zusätzlich wurde auf eine aus anderen Studien empfohlene Konzentration mit nachweislich geringer Zellzytotoxizität [42] zurückgegriffen.

Da Am80 aktuell ausschließlich in Japan zur Behandlung der akuten Promyelozyten-Leukämie angewendet wird, ist die Datenlage zu experimentellen Studien mit diesem Medikament gering. Bei der Auswahl der Konzentration wurde sich, analog zur Auswahl von EGCG und Gemfibrozil, auf bestehende Ergebnisse zur Zytotoxizität der Substanz bezogen. In einer Studie zur Untersuchung des Zellwachstums nach Am80-Behandlung mit Konzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M Tamibarotene konnten mit der Konzentration von 1 μ M Am80 aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden [265]. Auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit die Behandlung von Zellen mit Am80 in einer Konzentration von 1 μ mol/l verwendet.

3.2.3.2 Gemfibrozil

(nach [11])

Eine Tablette 600 mg Gevilon © (Pfizer) wurde nach dem Zerkleinern mit einem Mörser in 11,98 ml Ethanol gelöst und gevortext. Anschließend erfolgte eine 80-minütige Sonifizierung im Ultraschall-Wasserbad USR1 (Julabo, Deutschland) um eine Stocklösung von 1 mM herzustellen. Die Stocklösung wurde bei 4°C gelagert und vor jeder Inkubation 15 Minuten lang erneut sonifiziert. Die Endkonzentration der verwendeten Gemfibrozil-Lösung betrug 100 µmol/l. Diese Konzentration wurde auf der Grundlage der Berechnung der maximalen Plasmakonzentration nach 1-2 Stunden von 20 mg/l Gemfibrozil im menschlichen Körper (entspricht 79,89 µmol/l) und in Übereinstimmung mit mehreren anderen Zellinkubationsstudien mit Gemfibrozil [82,345] gewählt. Vor jeder Inkubation wurde die Lösung erneut für 15 min sonifiziert.

3.2.3.3 Methylxanthine

(nach [124])

Die Verarbeitung der verschiedenen Xanthin-Derivate Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin und Pentoxifyllin erfolgte durch Daniel Janitschke. Koffein und Theophyllin wurden von Thermo Fisher Scientific und die anderen drei Substanzen von Merck (ehemals Sigma Aldrich) bezogen. Nach Anlage einer Stocklösung von jeweils 1 mM erfolgte die Inkubation der unterschiedlichen MTX-Substanzen mit einer Konzentration von 100 µmol/l für 24 Stunden (8+16h). Die maximale Plasmakonzentration von Koffein beträgt beim Menschen 8 – 10 mg/l (entspricht circa 50 µmol/l) [350] und liegt somit knapp unterhalb der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration. Es wurde sich jedoch für eine supraphysiologische Konzentration entschieden, da es sich zum einen um eine kurzzeitige Inkubation (24 Stunden) handelte und zum anderen zu berücksichtigen ist, dass Kaffee ein über Jahre hinweg häufig konsumiertes Getränk darstellt. Des Weiteren stellt die Konzentration von 100 µmol/l ein häufig angewandtes Modell in Zellstudien dar. Es konnte unter diesen Bedingungen kein Einfluss auf die Zytotoxizität oder die Zellproliferation festgestellt werden [124].

3.2.4 Lipidanalytische Methoden

3.2.4.1 Lipidextraktion mittels Fest-Flüssig-Methode

(nach [94,160])

Mit der Fest-Flüssig-Lipidextraktion können bis zu 96 Proben zeitgleich extrahiert werden. Die massenspektrometrisch zu untersuchenden homogenisierten Zellproben wurden im Vorhinein mittels BCA-Analyse (Kapitel 3.2.2.10) auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 10 mg/ml in HPLC-grade-Wasser eingestellt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der

Fest-Flüssig-Lipidextraktion folgt dem in Detail beschriebenen Protokoll in Grimm *et al.* [94]. Kurz zusammengefasst wurde eine 96-Well-Platte mit einer 96-Well-Filterplatte abgedeckt und in die Vertiefungen der Filterplatte wurden anschließend Kreise aus Whatman-Filterpapier mit einem Durchmesser von 6 mm gelegt. Darauf wurde eine Lipidstandardmischung I pipettiert, gefolgt von 10 µl jeder vorbereiteten Probe. Nach dem 45-minütigen Trocknen der Proben unter einem Stickstoffstrom (1-2 bar) wurden 20 µl 5-prozentiges PITC verdünnt in Ethanol/Wasser/Pyridin (1:1:1, v/v/v) in die Vertiefungen gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Trockenschritt unter N₂ für 45 min erfolgte die Extraktion mittels 300 µl 4,93 mM Ammoniumacetat in Methanol pro Probe. Die Platte wurde anschließend für 30 min bei 450 rpm auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Mittels Zentrifugation bei 500 x g für 2 min wurden die Proben in die 96-Wellvertiefungsplatte überführt. Nach einer Verdünnung der Proben mit 600 µl 5 mM Ammoniumacetat in Methanol/Wasser (97:3, v/v) wurde die 96-Wellplatte mit einer Silikonmatte abgedeckt und erneut für 2 min bei 450 rpm unter RT geschüttelt. Im Anschluss konnten die Proben mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die während der Arbeit durchgeführten Untersuchungen fanden mit einer durchschnittlichen Extraktionseffizienz von über 80,7 % mit einer Intra-Tagesabweichung von 3,9 % und einer Linearität von $R^2 > 0,96$ (ermittelt durch Anna A. Lauer und veröffentlicht in [159]) statt.

3.2.4.2 Massenspektrometrie

([101,160,286])

Um Aussagen über das Lipidprofil der in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Zellen treffen zu können, wurde die massenspektrometrische Analyse angewendet. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte vierpolige Spektrometer 4000 QTRAP (engl.: *4000-quadropole-linear-ion trap*) der Firma AB Sciex inklusive einer Turbospray Ionenquelle, ermöglichte die Analyse einer Reihe von verschiedenen Lipidklassen. Im Rahmen dieser Analyse wurden in der vorliegenden Arbeit Diacyl-Phosphatidylcholin-Spezies (PC aa), Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies (PC ae), Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies (Lyso-PC), Sphingomyelin-Spezies (SM), Acetyl- und Acylcarnitin-Spezies (C) sowie Triglycerid-Spezies (TAG) untersucht.

Die Elektrosprayionisation (ESI) ist eine auf der Elektrospray-Methode basierende „sanfte“ Technik zur Ionenerzeugung unter Atmosphärendruck, welche durch John B. Fenn 1984 etabliert und 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Prinzipiell wird durch Anlage von Hochspannung an einer mit Analyt-Lösung befüllten Edelstahlkapillare durch Versprühen eines Stickstoffstroms eine Coloumb-Explosion herbeigeführt. Dadurch zerfallen die Lösungsmittel-Tröpfchen durch die Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen zu feinsten Tröpfchen und es bilden sich freie Ionen, welche im Anschluss mittels Massenanalysator im Hochvakuum nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Da die

Ladung, die auf die Analyt-Lösung einwirkt, gering ist, entstehen vor allem einfach positiv oder einfach negativ geladene Teilchen. Typisch für die ESI-Methode ist, dass grundsätzlich sogenannte Addukt-Ionen (=Anlagerungsprodukte) durch die Wechselwirkung zwischen Analyten und Bestandteilen des Lösungsmittel-Puffers entstehen.

Das in der vorliegenden Arbeit genutzte 4000-QTRAP-Massenspektrometer besteht aus einer integrierten Ionenfalle und vier Quadrupolen (Q0-Q3), wobei ein Quadrupol aus mehreren runden parallel angesetzten Metallstäben, mit entgegengesetzter Polarität aufgebaut ist, an denen eine Gleich- oder Wechselspannung angelegt werden kann. Dem Quadrupol kommt dabei eine besondere Rolle zu, da ihn nur definierte Massen, aufgrund des elektrischen Feldes, passieren können. Damit können Ionen anhand ihrer Ladung oder ihrer Masse selektiert werden, da ein Quadrupol als Massefilter die Teilchen nach ihrer definierten Masse m und ihrer Ladung z stabilisiert. Die Selektion der einzelnen Ionen erfolgt durch das Anlegen einer Spannung, wonach nur bestimmte Bahnen innerhalb des Quadrupols stabil sind. Stabile Bahnen verlaufen sinus-förmig und Teilchen dieser Bahnen mit dem gewünschten Masse/Ladung-Verhältnisses erreichen den Detektor, während Ionen, die sich auf instabilen Bahnen befinden, aus dem Bereich des elektromagnetischen Feldes abdriften. Das Phänomen der stabilen Bahnen wird durch die *Mathieusche Differentialgleichung* beschrieben [150].

Der Ablauf der einzelnen Quadrupole erfolgt von Q0 über Q1 und Q2 bis zu Q3. Dabei folgt Q0 direkt auf die Ionisationsquelle. Hier werden die Analyten gebündelt. Mittels spezifischer Spannungsanlage an Q1 kommt es zur Stabilisierung bestimmter Ionen, die anschließend Q2 erreichen. Hier werden die Ionen durch Interaktion mit N_2 als Inertgas fragmentiert. In Q3 werden die fragmentierten Teilchen durch einen spezifisch eingestelltes Masse-/Ladungs-Verhältnis erneut gefiltert. Daran anschließend befindet sich eine Ionenfalle (engl.: *ion trap*), worin die Analyten gespeichert und manipuliert werden können. Mithilfe dieser Ionenfalle können durch das Anlegen einer bestimmten Wechselspannung einzelne Ionen stabilisiert werden. Diese werden angereichert und punktuell entlassen, um anschließend detektiert werden zu können.

Für jede in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lipidanalyse wurden jeweils die möglicherweise auftretenden Matrixeffekte der jeweiligen Lipidklasse und die Inter- und Intra-Tagesabweichungen berechnet. Unter potenziellen Matrixeffekten werden die kombinierten Effekte von allen untersuchten Komponenten auf die Quantität ohne den Analyten selbst verstanden, wobei zwischen Verstärkung und Unterdrückung unterschieden werden muss [287]. Dementsprechend kann sich die Antwort eines Analyten in einer Standardlösung, von der desselben Analyten in einer biologischen Matrix unterscheiden [226]. Um diesen Effekt so gut wie möglich zu exkludieren, wurde der Quotient aus den verwendeten Lipidstandards (Tabelle 36) in Anwesenheit von Extrakten der Kontroll- und Analyseproben gebildet.

Tabelle 36: In der vorliegenden Arbeit genutzte Lipidstandards.

Lipidspezies	Standard	Hersteller
Phosphatidylcholine	06:0 PC (DHPC)	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylcholin-Plasmalogene	Splash II Lipidomix Mass Pec Internal Standard: C18(Plasm)-18:1 (d9) PC	Avanti Polar Lipids
Lyso-Phosphatidylcholine	19:0 Lyso PC	Avanti Polar Lipids
Sphingomyeline	06:0 SM (d18:1/6:0)	Avanti Polar Lipids
Carnitine	Octanoyl-L-Carnitin D3 + Palmitoyl-L-Carnitin D3	Supelco Analytical
Triglyceride	Splash II Lipidomix Mass Spec Internal Standard: 15:0-18:1(d7)-15:0 TG	Avanti Polar Lipids

Die massenspektrometrische Analyse der Lipidextrakte erfolgte in enger Kooperation mit Anna A. Lauer und Daniel Janitschke.

Um die einzelnen biologischen Proben der verschiedenen Lipidspezies zu detektieren, wurden in der vorliegenden Arbeit technische Triplikate mithilfe der Analyst 1.4.2 Software von AB Sciex ausgewertet. Ein HPLC-Apparat der 1200 Serie von Agilent wurde an das MS angeschlossen, um eine Fließinjektionsanalyse (engl.: *flow injection analysis*, FIA) anzuwenden. Um die Proben hoch-automatisiert und robust zuzuführen, wurde ein automatischer Probengeber (engl.: *Autosampler*) verwendet. Anhand dessen konnten Konzentrationsveränderungen und chromatische Beeinträchtigungen vernachlässigt und ein kurzer und konzentrierter Probenimpuls gewährleistet werden. Durch den *Autosampler* wurden je 20 µl Probe mit einem Laufpuffer, bestehend aus vier verschiedenen Phasen, in das Massenspektrometer injiziert.

Die durch diese Methode erhaltenen Daten sind mit einigen Einschränkungen in der Auswertung verbunden. Zum einen können durch diese Methode nur die Summe der Fettacyl-Kohlenstoffatome und die Summe der jeweiligen Doppelbindungen detektiert werden. Eine Darstellung der individuellen Anlage der Fettsäuren an sn1- oder sn2-Position ist damit nicht möglich. Zum anderen ist diese Methode für isobare Überlagerungen der M+2 Isotope mit dem monoisotopen Peak derjenigen Komponenten derselben Lipidklasse anfällig, die eine Doppelbindung weniger enthält [148]. Um diese Einschränkungen auf ein Minimum zu konzentrieren, wurde der Scanmodus *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) verwendet. Dabei findet die Fragmentierung der Ionen in Q2 statt, während die Teilchen in Q1 und Q3 selektiv weiter transportiert werden. Durch eine spezifische Paarung für jedes einzelne Molekül in Q1 und Q3 wird die gleichzeitige Analyse mehrerer Lipidspezies sichergestellt. Für jede Lipidklasse wurden dafür individuelle Parameter gewählt, die in Tabelle 37 detailliert aufgeführt sind.

Tabelle 37: Spezifische Parameter, die im Rahmen der MRM-Analyse verwendet wurden.

PCaa: Diacyl-Phosphatidylcholin; PC ae: Phosphatidylcholin-Plasmalogen; Lyso-PC: Lyso-Phosphatidylcholin; SM: Sphingomyelin; TG: Triglyceride; CX: Carnitine; Die Acyl-Carnitine sind als „C“ aufgeführt. Durch einen Doppelpunkt getrennt gibt die dahinterstehende Zahl die Anzahl der Doppelbindungen oder die Kettenlänge an. „OH“ repräsentiert eine Hydroxylgruppe, „DC“ steht für Dicarbonsäure. DP: *declustering potential*; CE: *collision energy*. Dicke Linien verdeutlichen Wechsel der Lipidklassen.

Lipid-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	DP [V]	CE [eV]
PC aa C20:0	566,2	184	94	31
PC aa C24:0	622,4	184	98	33
PC aa C26:0	650,5	184	103	35
PC aa C28:0	678,5	184	106	35
PC aa C28:1	676,5	184	106	35
PC aa C30:0	706,5	184	114	37
PC aa C30:2	702,5	184	111	37
PC aa C32:0	734,6	184	119	39
PC aa C32:1	732,6	184	118	39
PC aa C32:2	730,5	184	117	38
PC aa C32:3	728,5	184	117	38
PC aa C34:1	760,6	184	125	41
PC aa C34:2	758,6	184	123	40
PC aa C34:3	756,6	184	123	40
PC aa C34:4	754,5	184	122	40
PC aa C36:0	790,6	184	131	43
PC aa C36:1	788,6	184	131	43
PC aa C36:2	786,6	184	130	42
PC aa C36:3	784,6	184	130	42
PC aa C36:4	782,6	184	129	42
PC aa C36:5	780,6	184	128	42
PC aa C36:6	778,5	184	128	42
PC aa C38:0	818,7	184	138	45
PC aa C38:1	816,7	184	138	45
PC aa C38:3	812,6	184	136	44
PC aa C38:4	810,6	184	136	44
PC aa C38:5	808,6	184	136	44
PC aa C38:6	806,6	184	135	44
PC aa C40:0	846,7	184	145	47
PC aa C40:1	844,7	184	145	47
PC aa C40:2	842,7	184	144	47
PC aa C40:3	840,7	184	144	47
PC aa C40:4	838,6	184	144	47
PC aa C40:5	836,6	184	143	47
PC aa C40:6	834,6	184	143	46
PC aa C42:0	874,7	184	154	50
PC aa C42:1	872,7	184	153	50
PC aa C42:2	870,7	184	153	50
PC aa C42:4	866,7	184	152	50
PC aa C42:5	864,7	184	151	49
PC aa C42:6	862,6	184	150	49
PC aa C44:0	902,7	184	163	50
PC aa C48:0	958,8	184	170	50
PC ae C30:0	692,6	184	111	37
PC ae C30:1	690,5	184	109	36
PC ae C30:2	688,5	184	108	36
PC ae C32:1	718,6	184	115	38
PC ae C32:2	716,6	184	114	37
PC ae C34:0	748,6	184	122	40

PC ae C34:1	746,6	184	121	39
PC ae C34:2	744,6	184	120	39
PC ae C34:3	742,6	184	120	39
PC ae C36:0	776,7	184	128	42
PC ae C36:1	774,6	184	127	41
PC ae C36:2	772,6	184	127	41
PC ae C36:3	770,6	184	126	41
PC ae C36:4	768,6	184	126	41
PC ae C36:5	766,6	184	125	41
PC ae C38:0	804,7	184	135	44
PC ae C38:1	802,7	184	134	44
PC ae C38:2	800,7	184	133	43
PC ae C38:3	798,6	184	133	43
PC ae C38:4	796,6	184	133	43
PC ae C38:5	794,6	184	132	43
PC ae C38:6	792,6	184	132	43
PC ae C40:0	832,7	184	142	46
PC ae C40:1 / PC aa C40:8	830,7	184	141	46
PC ae C40:2	828,7	184	141	46
PC ae C40:3 / PC aa C40:10	826,7	184	140	46
PC ae C40:4	824,7	184	140	45
PC ae C40:5	822,6	184	139	45
PC ae C40:6	820,6	184	139	45
PC ae C42:0	860,8	184	150	49
PC ae C42:1	858,7	184	141	46
PC ae C42:2	856,7	184	149	48
PC ae C42:3	854,7	184	148	48
PC ae C42:4	852,7	184	148	48
PC ae C42:5	850,7	184	147	48
PC ae C44:3	882,7	184	156	51
PC ae C44:4	880,7	184	156	51
PC ae C44:5 / PC aa C44:12	878,7	184	155	51
PC ae C44:6	876,7	184	154	50
Lyso PC 06:0	356,2	184	72	31
Lyso PC 10:0	412,3	184	76	30
Lyso PC 12:0	440,4	184	78	30
Lyso PC 14:0	468,3	184	79	30
Lyso PC 16:0	496,3	184	81	31
Lyso PC 16:1	494,3	184	79	30
Lyso PC 17:0	510,3	184	82	31
Lyso PC 18:0	524,3	184	85	31
Lyso PC 18:1	522,3	184	82	31
Lyso PC 18:2	520,3	184	82	31
Lyso PC 18:3	518,4	184	82	31
Lyso PC 20:0	552,4	184	89	31
Lyso PC 20:3	546,3	184	87	31
Lyso PC 20:4	544,3	184	85	31
Lyso PC 20:5	542,4	184	84	31
Lyso PC 22:0	580,5	184	93	32
Lyso PC 22:6	568,4	184	90	32
Lyso PC 24:0	608,4	184	96	33
Lyso PC 26:0	636,5	184	101	34
Lyso PC 26:1	634,4	184	98	33
Lyso PC 28:0	664,5	184	105	35
Lyso PC 28:1	662,5	184	103	35

SM C32:2 OH	689,6	184	108	36
SM C34:1	703,6	184	112	37
SM C34:2	701,6	184	111	37
SM C34:2 OH	717,6	184	114	38
SM C36:1	731,6	184	117	38
SM C36:2	729,6	184	117	38
SM C38:3	755,6	184	123	40
SM C40:2 OH	801,7	184	134	43
SM C40:3 OH	799,7	184	133	43
SM C40:4	781,6	184	129	42
SM C42:1	815,7	184	137	45
SM C42:2	813,7	184	137	45
SM C42:2 OH	829,7	184	141	46
SM C44:1	843,7	184	145	47
SM C44:2	841,7	184	144	47
TG C48:0	824,8	551,8		
TG C50:3	846,8	573,8		
TG C50:2	848,8	575,8		
TG C50:1	850,8	577,8		
TG C50:0	852,8	579,8		
TG C52:6	868,7	595,7		
TG C52:5	870,8	597,8		
TG C52:4	872,8	599,8		
TG C52:3	874,8	601,8		
TG C52:2	876,8	603,8		
TG C52:1	878,8	605,8		
TG C52:0	880,8	607,8		
TG C54:9	890,7	595,7		
TG C54:8	892,7	597,7		
TG C54:7	894,8	599,8		
TG C54:6	896,8	601,8		
TG C54:5	898,8	625,8		
TG C54:4	900,8	627,8		
TG C54:3	902,8	629,8		
TG C54:2	904,8	631,8		
TG C54:1	906,9	633,9		
TG C56:8	920,8	625,8		
TG C56:7	922,8	627,8		
TG C56:6	924,8	629,8		
TG C56:5	926,8	631,8		
TG C56:4	928,8	633,8		
TG C56:3	930,9	635,9		
TG C56:2	932,9	659,9		
TG C56:1	934,9	661,9		
TG C58:7	950,8	655,8		
TG C58:6	952,8	657,8		
TG C58:5	954,8	659,8		
TG C58:4	956,9	661,9		
TG C58:3	958,9	663,9		
TG C58:2	960,9	659,9		
TG C60:6	980,9	685,9		
TG C60:5	982,9	687,9		
TG C60:4	984,9	689,9		
TG C60:3	986,9	687,9		
C00	162,1	85,1	61	27
C02	204,1	85,1	41	27
C03	218,1	85,1	46	29
C03 OH	234,1	85,1	53	30

C03:1	216,1	85,1	49	27
C04	232,2	85,1	46	29
C04 OH	248,1	85,1	55	32
C04:1	230,1	85,1	52	29
C05	246,2	85,1	46	29
C05 M DC	290,2	85,1	63	37
C05 OH	262,2	85,1	58	33
C05:1	244,2	85,1	55	31
C05:1 DC	274,1	85,1	60	35
C06	260,2	85,1	56	27
C06 OH	276,2	85,1	61	35
C06:1	258,2	85,1	57	33
C07 DC	304,2	85,1	66	39
C08	288,2	85,1	66	33
C08:1	286,2	85,1	63	37
C09	302,2	85,1	66	39
C10	316,2	85,1	56	37
C10:1	314,2	85,1	68	40
C10:2	312,2	85,1	67	40
C12	344,3	85,1	73	44
C12 DC	374,3	85,1	86	45
C12:1	342,3	85,1	73	44
C14	372,3	85,1	86	45
C14:1	370,3	85,1	78	47
C14:1 OH	386,3	85,1	81	50
C14:2	368,3	85,1	78	47
C14:2 OH	384,3	85,1	81	49
C16	400,3	85,1	84	51
C16 OH	416,3	85,1	87	53
C16:1	398,3	85,1	84	51
C16:1 OH	414,3	85,1	87	53
C16:2	396,3	85,1	83	51
C16:2 OH	412,3	85,1	86	53
C18:0	428,4	85,1	96	63
C18:1	426,4	85,1	89	55
C18:1 OH	442,4	85,1	92	57
C18:2	424,3	85,1	89	54

3.2.5 Statistische Datenauswertung

3.2.5.1 Statistische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen wurden mittels Excel (Version 2019) und R (R Core Team 2020, <http://www.r-project.org>) in enger Kooperation mit Daniel Janitschke und Anna A. Lauer durchgeführt.

Alle quantitativ erhobenen Daten zeigen den Mittelwert von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten, sofern nicht anders direkt im Text angegeben. Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die Grundgesamtheit der Stichprobe normalverteilt ist.

Um die statistische Signifikanz zweier unabhängiger Stichproben zu ermitteln, wurde der zweiseitige Student-t-Test verwendet. Sollten Mittelwerte mehrerer Gruppen miteinander verglichen werden, so wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: *analysis of variances*,

ANOVA) in Kombination mit Post-hoc-Tests berechnet. Waren die ANOVA in einem signifikanten Unterschied, so wurde auf den Tukey-HSD-Post-hoc-Test zur statistischen Differenzierung zwischen Gruppen zurückgegriffen. Bei normalverteilten Daten wurde die Methode von Pearson genutzt, um den Korrelationskoeffizienten zu berechnen.

3.2.5.1.1 Statistische Datenanalyse der Methylxanthin-Genexpressionsergebnisse

(nach [125])

Alle erhaltenen, quantifizierten Daten bilden den Durchschnitt aus vier unabhängigen Methylxanthin-Inkubationen. Anhand der $\Delta\Delta CT$ -Methode wurden die ΔCq -Werte jeder einzelnen Probe kalkuliert, indem der Cq -Wert jedes einzelnen *housekeeping*-Gens vom Cq -Wert des Gens von Interesse abgezogen wurde. Dies erfolgte zunächst für jedes *housekeeping*-Gen. Anschließend wurden die ΔCq -Werte jeder Probe mithilfe der $2^{-\Delta Cq}$ -Methode transformiert und dann für die fünf ermittelten *housekeeping*-Gene gemittelt. Daraufhin konnte die Normalisierung für jedes Gen von Interesse in gleicher Weise mit denselben *housekeeping*-Genen durchgeführt werden. Jede Inkubation wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und im Anschluss an jede Inkubation erfolgte die Analyse mittels quantitativer RealTime-PCR, was zu vier $2^{-\Delta Cq}$ -Werten für ein Gen führt. Diese vier Werte pro Gen wurden zur Ermittlung des Mittelwerts und des Standardfehlers für jedes Gen genutzt. Anhand dieser $2^{-\Delta Cq}$ -Werte konnten die erhaltenen Veränderungen im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde, kalkuliert werden. Um signifikante Veränderungen zwischen den Inkubationen mit den Methylxanthinen und denen mit Lösungsmittel behandelten Zellen zu erhalten, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die erhaltenen p-Werte wurden dann über die Falscherkennungsrate (FDR, engl.: *false discovery rate*) für alle 83 Gene angepasst, um das Auftreten eines Fehlers 1. Art zu korrigieren. Im Anschluss an eine signifikante ANOVA-Berechnung folgte eine Berechnung mit dem post hoc Dunnett-Test, um herauszufinden, ob es für jedes einzelne der fünf Methylxanthine signifikante Unterschiede verglichen zur Kontrollgruppe gab. Diese Ergebnisse sind in Form einer *Heatmap* dargestellt, welche mithilfe des Pakets „pheatmap“ (Raivo Kolde 2019; <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>) erstellt wurde.

Um signifikante Unterschiede in der Verteilung der signifikanten hoch- oder runterregulierten Gene für jedes MTX zu berechnen, wurde der exakte Test von Fisher berechnet und die erhaltenen p-Werte mittels FDR angepasst.

Um Unterschiede der einzelnen Methylxanthine innerhalb der untersuchten Signalwege zu ermitteln und darstellen zu können, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Gene berücksichtigt, die mindestens eine signifikante Veränderung zwischen einem MTX und der Kontrolle aufwiesen. Weitere Post-hoc-Analysen wurden mit

dem Tukey HSD-Test (engl.: *honestly significant difference*) berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz und der Hauptkomponentenanalyse erfolgten mittels „R“. [256].

3.2.5.2 Lipidanalysen

(nach [160])

Bei der Auswertung der in dieser Arbeit erhobenen Lipiddaten wurde die Analyst 1.4.2 Software (AB Sciex) verwendet. Damit konnten die CPS (engl.: *counts per second*, Zählungen pro Sekunde) für jede MRM-Paarung erfasst werden. Danach erfolgte die Normierung eines jeden analysierten Lipids auf seinen jeweiligen Standard der entsprechenden Lipidklasse. Anschließend erfolgte die Mittelwertbildung jedes Lipid/Standard-Quotienten aus den technischen Triplikaten. In den nachfolgenden Berechnungen wurden die relativen Häufigkeiten der untersuchten Lipide in den Zellen zu den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen. Anhand des zweiseitigen Student-t-Tests wurden die p-Werte für jeden einzelnen Lipidparameter, dargestellt in den Volcano Plots, berechnet.

3.2.5.3 Graphische Datendarstellung der Lipiddaten

(nach [160])

Das R-Paket „Enhanced Volcano“ (Kevin Blighe, Sharmila Rana, and Myles Lewis (2020). Version 1.6.0. <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>) wurde verwendet, um die in dieser Arbeit dargestellten Volcano Plots zu generieren. Diese wurden zur Darstellung der relativen Änderungen der untersuchten Lipidspezies gewählt. Dafür wurde auf der x-Achse die relative Änderung im Vergleich zum Signifikanzniveau (y-Achse) aufgetragen. Der durchschnittliche Standardfehler, individuell für jede Lipidspezies berechnet, wird durch die beiden vertikalen Linien visualisiert. Durch die horizontale Linie wird das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ abgebildet. Dementsprechend sind alle Lipidspezies, die sich oberhalb dieser Markierung befinden, statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert. Allerdings ist die statistische Signifikanz unter anderem von der statistisch angewendeten Methode und der Probenanzahl abhängig und stellt somit einen willkürlichen Aspekt der Beurteilung dar. In dieser Arbeit wurde sich, neben der statistischen Signifikanz, auch auf Veränderungen, die sich außerhalb des durchschnittlichen Standardfehlers befinden, konzentriert und in die Beurteilung der Ergebnisse mit einbezogen. Durch die Darstellung in Form von Volcano Plots konnte auf diesen Aspekt gesondert eingegangen werden. Außerdem erlaubten sie es eine Aussage über die Verteilung einer Lipidspezies innerhalb der eigenen Lipidklasse zu treffen.

Die dargestellten Abbildungen wurden mithilfe von *Inkscape Project* (Version 1.0.2) und *Corel Draw* (Version Graphics Suite 2021) angefertigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler des Mittelwerts (engl.: *standard error of the mean*, SEM). Die statistische Signifikanz wurde als * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$ und *** $\leq 0,001$ definiert.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit gliedern sich in drei Teile. Im ersten Teil wurde der Einfluss der *ADAM10*-Gendeletion auf die Lipid-Homöostase in HEK-Zellen untersucht. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der *ADAM10*-Modulatoren Gemfibrozil, Tamibarotene und Epigallocatechin-3-gallat auf die Lipid-Homöostase in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. Der dritte Teil beschäftigte sich mit dem Einfluss von Methylxanthinen auf die Regulation von Alzheimer-relevanten Genen in SH-SY5Y Wt-Zellen.

4.1 Der Einfluss der *ADAM10*-Gendeletion auf die Lipidhomöostase von HEK-Zellen

Wie in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben, stellt *ADAM10* eine ubiquitär vorkommende Sekretase dar, welche vielfältige Aufgaben im humanen Organismus übernimmt. Eine zentrale Rolle nimmt sie bei der nicht-amyloidogenen APP-Sequenzierung im Rahmen der Alzheimer-Genese ein. Sowohl die Struktur von *ADAM10* als auch die Wirkweise dieser Sekretase in diesem Mechanismus sind mittlerweile gut ergründet und verstanden. Dieser Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen des *ADAM10*-Knockouts auf das Lipidprofil von HEK-Zellen. Dazu erfolgte in HEK-Zellen unter Zuhilfenahme der CRISPR/Cas-Methode der Knockout von *ADAM10*, welcher im Anschluss mittels sAPP α -Western-Blot verifiziert wurde. Anschließend wurde eine Lipidomics-Analyse der transfizierten HEK-Zellen im Vergleich zu den mit einem Leerplasmid transfizierten HEK-Zellen durchgeführt.

4.1.1 Effekt der *ADAM10*-Gendeletion in HEK-Zellen auf die sAPP α -Freisetzung

Um die Gendeletion von *ADAM10* in HEK-Zellen mittels CRISPR/Cas9-Methode nachzuweisen, wurde sAPP α mittels Western-Blot detektiert. sAPP α (engl.: *soluble α -secreted APP*) ist das Spaltprodukt der α -Sekretasen in der APP-Prozessierung und wird extrazellulär sezerniert (siehe Abbildung 2) [218]. Da *ADAM10* eine Hauptprotease der α -Sekretase-Familie darstellt, kann der indirekte Nachweis über sAPP α im Kulturmedium der untersuchten Zellen Aufschluss über die Funktion von *ADAM10* in HEK-Zellen geben. Dazu wurden HEK-Wt-, HEK-mock- und HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und im Anschluss das Zellkulturmedium, welches für zehn Stunden kultiviert wurde, auf sAPP α -Gehalt mittels Western-Blot untersucht und die Signalstärken anschließend densitometrisch detektiert. Der sAPP α -Gehalt der HEK Wt-Zellen im Zellkulturmedium nach zehn Stunden wurde auf 100% gesetzt. α -Sekretasen sind eine Familie von Proteasen, deren Funktion unter anderem in der Spaltung des Transmembranproteins APP liegt. Dabei wird APP innerhalb der Zellmembran geschnitten [218]. Neben *ADAM10* gehören auch *ADAM9*, *ADAM17* und *ADAM19* zu den

Proteasen der α -Sekretase-Familie, wobei ADAM10 eine Hauptrolle zukommt [336]. Der in dieser Arbeit zum Nachweis der Gendeletion von *ADAM10* verwendete sAPP α -Blot weist allerdings nicht nur das von ADAM10, sondern das von allen Proteasen der α -Sekretase-Familie produzierte sAPP α nach. Dementsprechend ist eine Reduktion des sAPP α -Signals, welches in Abbildung 10 A und B dargestellt ist, im Kulturmedium von HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen um > 40 % (sAPP α -Gehalt in HEK-ADAM10^{-/-} verglichen zu HEK Wt-Zellen: 56,64 %) als Nachweis der Gendeletion anzunehmen. Da der sAPP α -Gehalt der HEK-mock-Zellen verglichen zum Gehalt der HEK Wt-Zellen 97,17% beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass die Transfektion des Plasmids mit dem Leervektor ohne Beeinflussung der APP-Prozessierung erfolgte. Eine Gendeletion mittels CRISPR/Cas9-Methode kann auch durch andere Verfahren nachgewiesen werden. Dazu zählen neben dem „fehlenden“ Proteinnachweis mittels Western-Blot auch die Sequenzierung der genomischen DNS, in der die gewünschte Deletion durchgeführt werden sollte oder die Sequenzierung des gesamten Genoms mit Nachweis des fehlenden DNS-Abschnitts. Da allerdings jede der drei aufgeführten Nachweismethoden jeweils für sich als ausreichend betrachtet werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine nachfolgende Sequenzierung verzichtet.

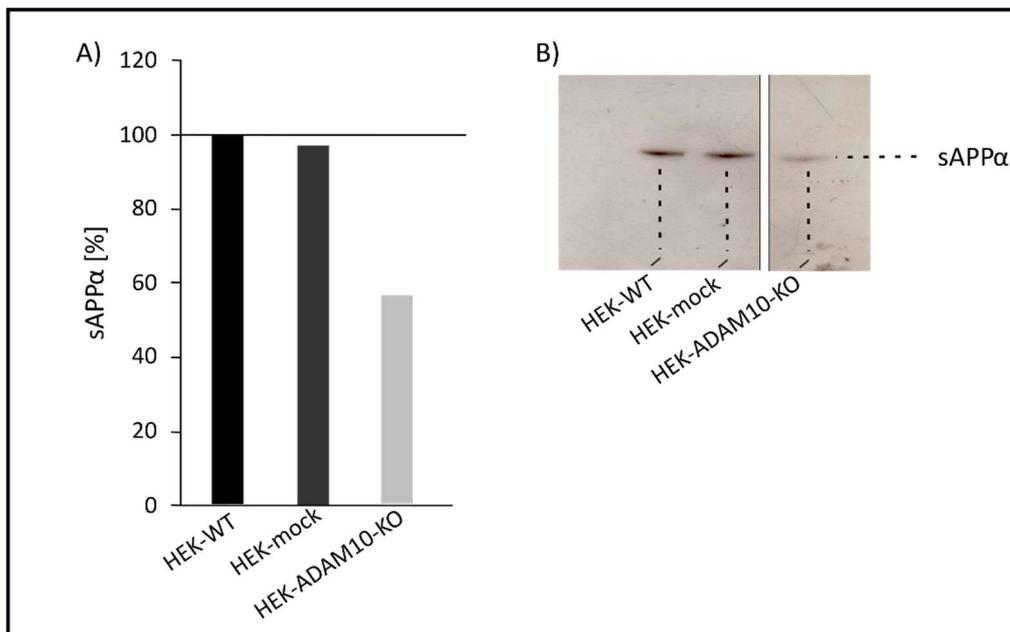


Abbildung 10: Verifizierung und Nachweis der Gendeletion von *ADAM10* in HEK-Zellen mittels sAPP α -Blot. (A) Reduzierte sAPP α -Expression in Prozent in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK Wt- und HEK-mock-Zellen (n=1, weshalb auf die Darstellung des Standardfehlers verzichtet wurde). (B) Verifizierung der *ADAM10*-Gendeletion mittels sAPP α -Blot aus dem 10-Stunden kultivierten Medium von HEK-Wt-, HEK-mock und HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurden im Anschluss alle anhand von HEK-ADAM10-KO-Einzelklonen generiert. Zur besseren Veranschaulichung wurde der gezeigte Blot geschnitten, um die für die vorliegende Arbeit relevanten Ergebnisse darzustellen. HEK-Wt: HEK-Wildtyp-Zellen; HEK-mock: HEK-Zellen, die mit dem Leerplasmid des Vektors pSpCas9(2A)-BB-Puro transfiziert wurden; HEK-ADAM10-KO: HEK-Zellen mit *ADAM10*-Gen-Knockout.

4.1.2 Veränderungen der Lipidhomöostase in HEK-Zellen durch die *ADAM10*-Gendeletion

Der Einfluss von ADAM10 auf verschiedene Pathologien ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden und weiterhin intensiver Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Rahmen der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung nimmt ADAM10 als Hauptvertreter der α -Sekretasen eine große Rolle ein. Durch die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins in sAPP α und α -CTF mit der Schnittstelle innerhalb der für die senilen Plaques verantwortlichen A β -Sequenz wird beispielsweise eine Ablagerung dessen und eine Formierung zu Oligomeren verhindert [336].

Da aktuell mehr als 40 Substrate für ADAM10 bekannt sind und ADAM10 nicht nur in Nervenzellen, sondern ubiquitär vorkommt, ist seine Funktion allerdings nicht auf die APP-Prozessierung beschränkt. Durch die Freisetzung von Neuroligin-3 (NLGN3) aus Neuronen und die Spaltung von N-Cadherin beeinflusst ADAM10 die Entstehung und Metastasierung von Glioblastomen [179]. Durch die Spaltung der Stressrezeptoren MICA, MICB und ULBP2 wird die Entstehung von Hodgkin-Lymphomen begünstigt [81,208] und über die Interaktion mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (engl.: *epidermal growth factor*) spielt ADAM10 zusätzlich eine Rolle in der Entstehung von Brustkrebs [344]. Allerdings ist über den Einfluss von ADAM10 auf die Lipidhomöostase bisher wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde sich in der vorliegenden Arbeit auf die Lipidzusammensetzung von Nierenzellen nach *ADAM10*-Gendeletion fokussiert.

Dafür wurden HEK-*ADAM10*^{-/-}-Einzelklone im Vergleich zu HEK-Zellen, die mit dem Leerplasmid pSpCas9-(2A)-BB-Puro (nachfolgend als „HEK-mock“ bezeichnet) transfiziert waren, semiquantitativ mittels Massenspektrometrie analysiert.

Da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten um Ergebnisse eines Einzelklons nach durchgeführter CRISPR/Cas9-Gendeletion von *ADAM10* handelt, sind einige Punkte bei der Interpretation der Daten zu beachten. Durch die Generierung von Einzelklonen und dem anschließenden Heranzüchten einer Population, welche aus diesem Einzelklon stammt, ist davon auszugehen, dass alle untersuchten Zellen das identische Erbgut mit einer einheitlichen Deletion des Gens *ADAM10* besitzen. Andererseits kann bei der einzelnen Betrachtung der Ergebnisse stammend aus einem Einzelklon die Gefahr bestehen, dass *off-targets* oder *second-site*-Mutationen entstanden sind, welche ebenfalls die Ursache für mögliche Veränderungen darstellen können. Um dieses Phänomen zu minimieren, wurde bei der Auswahl der optimalen sgRNS-Sequenz ein bestimmter Algorithmus verwendet, welcher in Kapitel 3.2.1.12 detailliert beschrieben ist.

Es wurden jeweils HEK-*ADAM10*^{-/-}-Einzelklone und HEK-mock-Zellen auf 6-Wellplatten bis zu einer Konfluenz von 90-95 % kultiviert. Vor der Prozessierung der Zellen und anschließender Analyse wurde das 10 %-FCS-haltige Selektionsmedium für 16 Stunden auf 1 % FCS

reduziert, um etwaige Effekte des FCS auf die Lipide zu minimieren. Nach dem Ernten der Zellen und entsprechender Aufbereitung der Proben (beschrieben in Kapitel **3.2.2.8** und **3.2.2.10**) wurde ein gezielter *shotgun lipidomics* Ansatz genutzt, wobei gezielt auf Phospholipide, (Acyl- und Acetyl-)Carnitine und Triglyceride (TAG) eingegangen wurde.

Phospholipide sind die größte Gruppe der Membranlipide, kommen ubiquitär vor und werden in der vorliegenden Arbeit in Phosphatidylcholine (PCaa), Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae), Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC) und Sphingomyeline (SM) unterteilt. Es ist bekannt, dass diese in vielen Pathologien verändert sind, beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen [161,229]. Triglyceride gehören zur Gruppe der Neutrallipide und dienen als Speicherort für freie Fettsäuren. Sie sind deswegen auch bei Erkrankungen mit intrazellulärer Lipidakkumulation von Interesse und stellen weiterhin einen Indikator für die Entstehung kleiner Lipidtröpfchen dar, die sowohl an physiologischen als auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind [219]. Des Weiteren wurde sich in der vorliegenden Arbeit auf die Gruppe der (Acyl- und Acetyl-)Carnitine konzentriert. Diese spielen eine wichtige Rolle im Rahmen des mitochondrialen Shuttle-Systems freier Fettsäuren. Freie Fettsäuren gelangen mittels Carnitin-Transports ins Mitochondrium und können hier über die β -Oxidation zur zellulären Energiegewinnung genutzt werden [230].

Zur Normalisierung der erhaltenen Daten wurden deuterierte Standards (wie in Tabelle **36** aufgelistet) für jede Lipidklasse verwendet. Diese Daten wurden anschließend als x-fache Veränderung zur Kontrollgruppe aufgetragen und in verschiedenen Abbildungen visualisiert. Um die relativen Lipidveränderungen in HEK-ADAM10^{-/-}-Einzelklonen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen darzustellen und eine schnelle Gruppenanalyse zu ermöglichen, wurde die Form von Volcano Plots genutzt, welche in Kapitel **3.2.5.3** eingehend beschrieben wurde. Direkt daneben verdeutlicht ein Säulendiagramm die prozentuale x-fache Veränderung der ungewichteten Effektstärke der gesamten Lipidklasse verglichen zur entsprechenden Kontrolle, welche mithilfe des Students-t-Test berechnet wurden. Um eine weitere Darstellung der prozessierten Daten zu geben und auf die Verteilung des Sättigungsgrads und der Kettenlänge innerhalb einer Lipidklasse eingehen zu können, wurde jeweils ein weiteres Säulendiagramm erstellt. Dabei wurde der Sättigungsgrad der Fettsäuren der untersuchten Proben in der x-fachen Veränderung in Mol % dargestellt. Es wurden dabei gesättigte Fettsäuren (kurz: SFA, engl.: *saturated fatty acids*) von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA, engl.: *mono unsaturated fatty acids*) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, engl.: *poly unsaturated fatty acids*) unterschieden. Außerdem wurde die unterschiedliche Kettenlänge der gebundenen Fettsäuren untersucht und dabei in kurz-, mittel- und langkettige Fettsäuren unterschieden. Je nach Lipidklasse ist die Kettenlänge unterschiedlich und diesbezüglich in den jeweiligen Beschreibungen der Abbildungen angegeben. Um die Hauptvertreter, die prozentual am häufigsten innerhalb einer Lipidklasse auftreten,

hervorzuheben, wurde eine *Heatmap* erstellt. Diese gibt diejenigen Lipidspezies an, die prozentual gemessen an allen Lipidspezies dieser Lipidklasse am häufigsten vertreten sind. Angegeben ist ihr Anteil am Gesamtanteil aller Lipidspezies dieser Klasse in Prozent. In Klammern ist die dazugehörige Effektstärke der entsprechenden Spezies angegeben.

4.1.2.1 Einfluss auf Phospholipide

4.1.2.1.1 Lyso-Phosphatidylcholine

Durch die katabole Aktivität der Phospholipase A2 (PLA2) werden Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC, 1- oder 2-Acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) aus Phosphatidylcholinen unter Abspaltung einer Fettsäuregruppe an der sn2-Position gewonnen (siehe Abbildung 40) [172]. Sie kommen in geringen Mengen in der Plasmamembran (< 3 %) und in freier Form im Blutplasma vor, wo sie durch Endothelkontakt einen frühen Vorboten der Atherosklerose darstellen können [268]. Außerdem besitzen sie durch sogenannte *find-me*-Signale die Möglichkeit, Phagozyten zur Apoptose zu rekrutieren [158].

Es wurden in der vorliegenden Arbeit 22 Lyso-PC-Spezies analysiert. Im Volcano Plot ist der Großteil der Lyso-PC-Spezies nach rechts oberhalb des Signifikanzniveaus verschoben (siehe Abbildung 11 A). Die Gesamtmenge der analysierten Lyso-PC-Spezies war in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen auf 169,2 % ± 6,2 % ($p \leq 0,001$) signifikant erhöht (siehe Abbildung 11 B). Bei Betrachtung des Sättigungsgrades war ein massiver Anstieg der gesättigten Lyso-PC-Spezies auf 195,7 Mol % ± 6,6 Mol % ($p \leq 0,001$) zu verzeichnen (siehe Abbildung 11 C). Ein deutlich weniger ausgeprägter Anstieg, aber dennoch signifikant erhöht, zeigt sich auch bei einfach ungesättigten Lyso-PC-Spezies auf 148,5 Mol % ± 8,2 Mol % ($p \leq 0,05$). Im Vergleich dazu waren die mehrfach ungesättigten Lyso-PC-Spezies sogar signifikant auf 82,3 Mol % ± 4,7 Mol % ($p \leq 0,05$) verringert, was in der Abbildung 11 C dargestellt wird. In Bezug auf die Kettenlänge (siehe Abbildung 11 D) war ein signifikanter Anstieg im Bereich der mittelkettigen Fettsäuren der Lyso-PC-Spezies der HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Fettsäuren auf 170,0 Mol % ± 5,4 Mol % ($p \leq 0,001$) zu verzeichnen. Zusätzlich waren die langkettigen Fettsäuren der Lyso-PC-Spezies auf 197,0 Mol % ± 15,7 Mol % ($p \leq 0,05$) ebenfalls signifikant erhöht.

Um die Wirkweise der katabolen Phospholipase A2, welche die Lyso-PC-Spezies aus den PCaa-Spezies generiert, genauer zu betrachten, wurde in einem weiteren Säulendiagramm das Verhältnis aus Lyso-PC-Spezies und Phosphatidylcholin-Spezies (PCaa-Spezies) (siehe Abbildung 11 E) dargestellt. Dabei war dieses Verhältnis in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen auf 256,4 % ± 10,4 % ($p \leq 0,001$) signifikant erhöht, was für einen massiven Anstieg der Lyso-Phosphatidylspezies aus den PCaa-Spezies spricht.

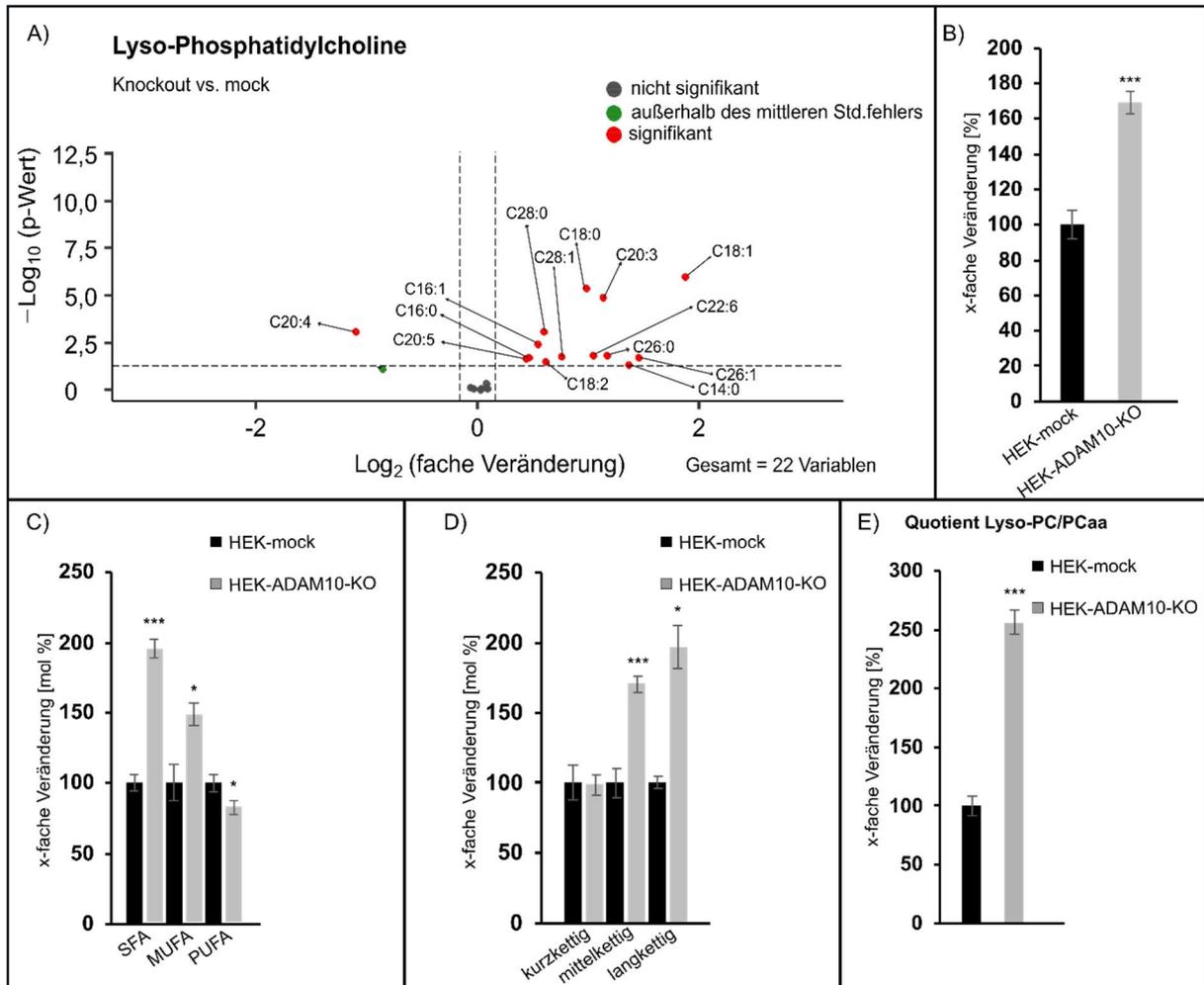


Abbildung 11: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies. (A) Die Spiegel an Lyso-PC in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. **(B)** Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurde, wobei ***p ≤ 0,001 gilt. **(C)** und **(D)** Die Säulendiagramme zeigen die Verteilung von Sättigungsgrad und Kettenlänge der analysierten Lyso-PC-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen mit HEK-mock-Zellen. Kurzkettig wurde in der gesamten Arbeit als < C16:X, mittelkettig als C16:X bis C20:X und langkettig als > C20:X für Lyso-PC-Spezies definiert. **(E)** Das Säulendiagramm stellt den Quotienten aus den Phospholipidspezies Lyso-PC und PCaa dar und vergleicht die Ergebnisse in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz mit * p ≤ 0,05 und *** p ≤ 0,001, ermittelt mittels ungepaartem Students-t-Test. Eigene Abbildung.

4.1.2.1.2 Phosphatidylcholine

35 % der Gesamt-Phospholipide sind Phosphatidylcholine [268]. Diese können in Diacyl-Phosphatidylcholine (PCaa; 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin), auch bekannt als Lecithine, und in Alkyl-Acyl-Phosphatidylcholine (PCae), auch bekannt als Plasmalogene, unterschieden werden. PCaa sind eine essenzielle Komponente der Membrandoppelschicht [268] und ubiquitär in allen Zellmembranen vorhanden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von 43 untersuchten PCaa-Spezies analysiert. Im Volcano Plot (siehe Abbildung **12 A**) war eine deutliche Linksverschiebung vom Großteil der 43 analysierten PCaa-Spezies zu sehen. Dabei war eine signifikante Abnahme der ungewichteten Effektstärke der analysierten Gesamt-PCaa-Spezies auf $67,00 \% \pm 3,9 \%$ ($p \leq 0,001$) der HEK-ADAM10^{-/-}-Einzelklone im Vergleich zu den HEK-mock-Zellen zu verzeichnen (siehe in Abbildung **12 B**). Sowohl die PCaa-Spezies mit mindestens einer (MUFA), als auch diejenigen mit mehreren Doppelbindungen (PUFA), waren signifikant verringert. Die Reduktion der MUFA auf $69,2 \text{ Mol } \% \pm 4,1 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) und der PUFA auf $51,9 \text{ Mol } \% \pm 3,7 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) war jeweils signifikant (siehe Abbildung **12 C**).

Mit Blick auf die Kettenlänge (siehe Abbildung **12 D**) war zu verzeichnen, dass sowohl die kurz-, als auch die mittel- und langkettigen Fettsäuren mit einer signifikanten Reduzierung in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen einhergehen. Kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge $< \text{C}32:\text{X}$ waren auf $89,1 \text{ Mol } \% \pm 3,7 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,05$) signifikant reduziert. Die Fettsäuren der PCaa-Spezies mit einer mittleren Kettenlänge von $\text{C}32:\text{X}$ bis $\text{C}36:\text{X}$ (mittelkettige Fettsäuren) waren auf $65,6 \text{ Mol } \% \pm 4,0 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) signifikant verringert. Ebenfalls signifikant verringert waren die Fettsäuren mit einer Kettenlänge $> \text{C}36:\text{X}$ (langkettige Fettsäuren) auf insgesamt $69,7 \text{ Mol } \% \pm 4,6 \%$ ($p \leq 0,001$). Die Heatmap in Abbildung **12 E** zeigt, dass die PCaa-Spezies C34:1 mit $38,58 \%$ die am häufigsten vertretene Spezies innerhalb aller PCaa-Spezies darstellte, gefolgt von PCaa C32:1 mit $12,93 \%$.

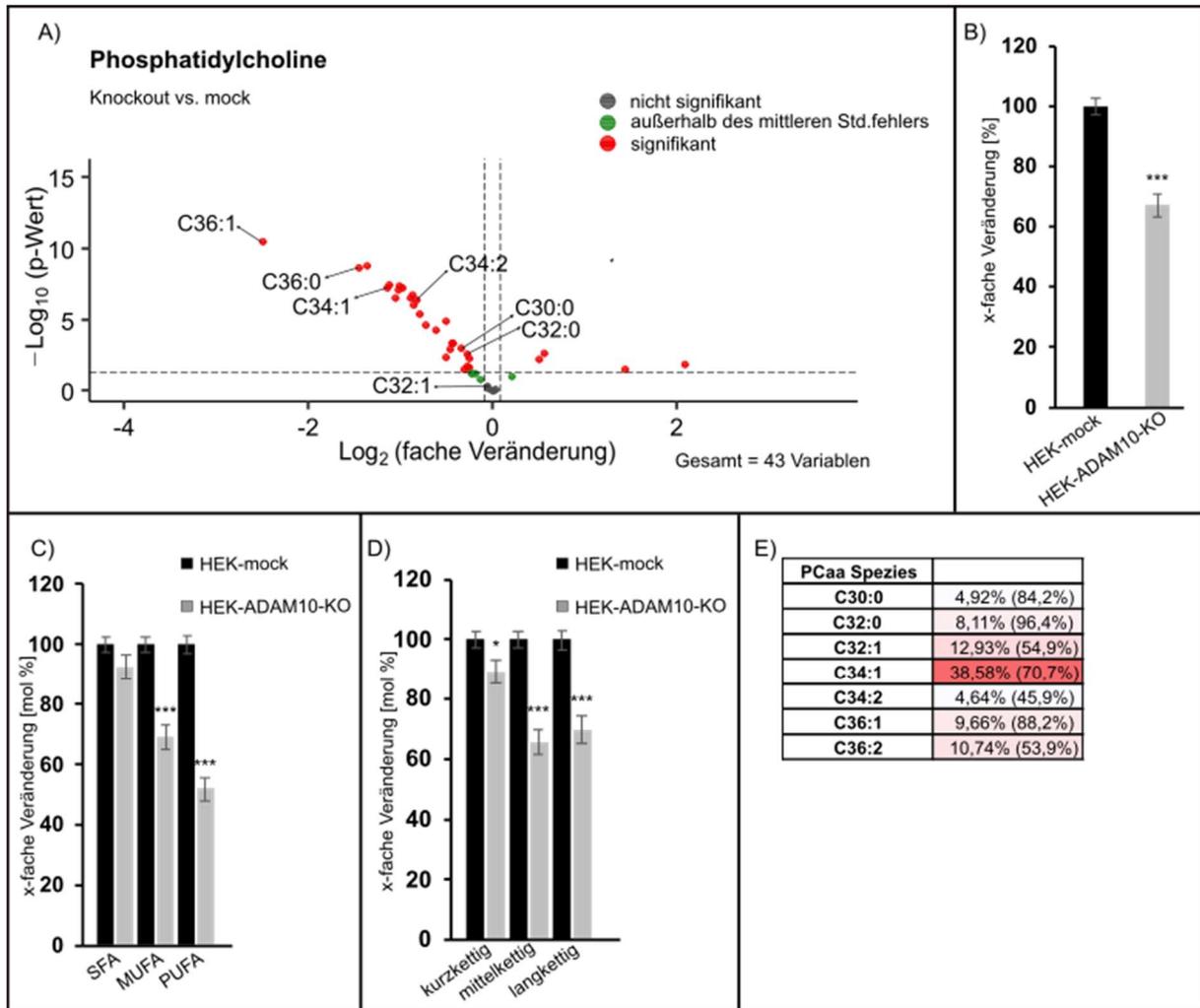


Abbildung 12: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Phosphatidylcholin-Spezies. (A) Die Spiegel an PCaa in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. Jeder Punkt symbolisiert eine PCaa-Spezies. Die beschrifteten Punkte visualisieren die am häufigsten vertretenen Spezies unter den Phosphatidylcholinen. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. (C) und (D) Das Säulendiagramm zeigt die Verteilung von gesättigten (SFA), einfach ungesättigten (MUFA) und mehrfach ungesättigten (PUFA) Fettsäuren aller PCaa-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}- und HEK-mock-Zellen. Das Säulendiagramm daneben zeigt die Verteilung von kurz-, mittel- und langkettigen PCaa-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}- und HEK-mock-Zellen. Kurzkettig wurde in der gesamten Arbeit als < C32:X, mittelkettig als C32:X bis C36:X und langkettig als > C36:X für alle PCaa-Spezies definiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz mit * p ≤ 0,05 und *** p ≤ 0,001 dar, ermittelt mittels ungepaartem Students-t-Test. (E) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten PCaa-Spezies, die prozentual am häufigsten vorkommen. Auf der Grundlage aller in dieser Studie untersuchten PCaa-Arten wurden die wichtigsten Vertreter mit dem prozentualen Anteil ihrer Arten am Gesamtanteil aufgeführt. Die jeweiligen Effektgrößen sind in Klammern angegeben. Eigene Abbildung.

4.1.2.1.3 Phosphatidylcholin-Plasmalogene

Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae; 1-alkyl, 2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) gehören, ähnlich wie die PCaa-Spezies, zur Klasse der Membran-Glycerophospholipide [268]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von 39 PCae-Spezies analysiert. Der Großteil der PCae-Spezies war im Volcano Plot nach links verschoben (siehe Abbildung **13 A**), wobei die meisten der Spezies oberhalb des Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ lagen. Mit Blick auf die Gesamt-PCae-Verteilung (siehe Abbildung **13 B**) war hier, analog zu den PCaa-Spezies, eine signifikante Abnahme aller PCae-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen auf $80,6 \% \pm 3,1 \%$ ($p \leq 0,001$) zu verzeichnen. In Bezug auf die Verteilung der Sättigung (dargestellt in Abbildung **13 C**) der PCae-Spezies führte die Deletion von ADAM10 in HEK-Zellen zu einem signifikanten Abfall der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren von MUFA auf $81,4 \text{ Mol } \% \pm 3,1 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) und PUFA auf $69,2 \text{ Mol } \% \pm 3,2 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$). In Bezug auf die Kettenlänge (siehe Abbildung **13 D**) waren sowohl die mittelkettigen auf $81,5 \text{ Mol } \% \pm 3,1 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) als auch die langkettigen PCae-Spezies auf $71,9 \text{ Mol } \% \pm 3,4 \text{ Mol } \%$ ($p \leq 0,001$) in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen signifikant verringert. Wird die Gesamtheit der PCae-Spezies betrachtet, so war PCae C34:1 mit 23,94 %, gefolgt von PCae C34:0 mit 12,13 %, die am häufigsten vorkommende Spezies in den HEK-ADAM10-Knockout-Zellen (siehe Abbildung **13 E**).

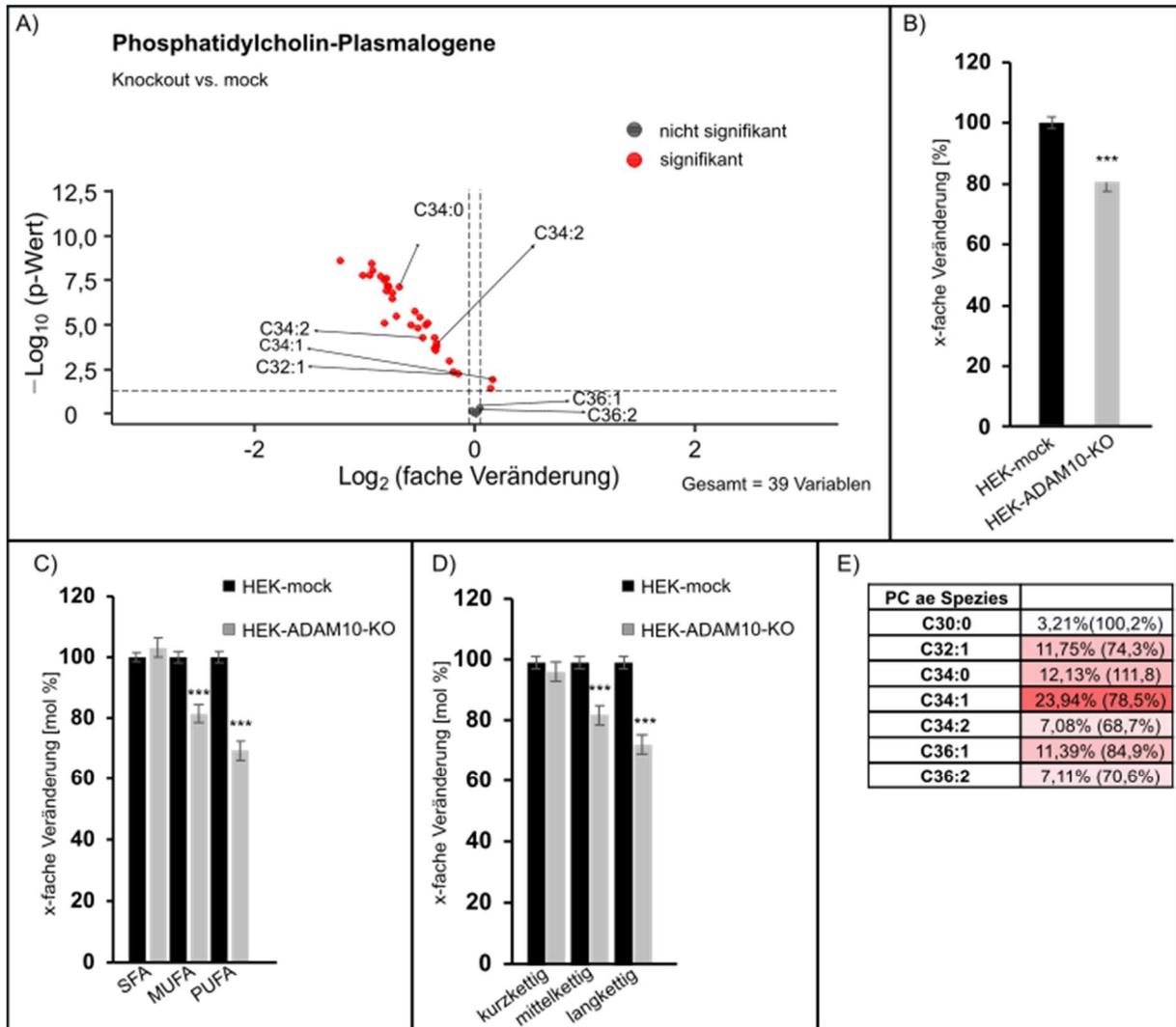


Abbildung 13: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies. (A) Die Spiegel an PCae in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurde, wobei ***p ≤ 0,001 gilt. (C) und (D) Die Säulendiagramme zeigen die Verteilung von Sättigungsgrad und Kettenlänge der analysierten Lyso-PC-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen mit HEK-mock-Zellen. Kurzketzig wurde in der gesamten Arbeit als < C32:X, mittelkettig als C32:X bis C36:X und langkettig als > C36:X für PCae-Spezies definiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz mit *** p ≤ 0,001, ermittelt mittels ungepaartem Students-t-Test, dar. (E) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten PCae-Spezies. Eine genauere Beschreibung ist in Abbildung 12 (E) aufgeführt. Eigene Abbildung.

4.1.2.1.4 Sphingomyeline

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 15 SM-Spezies analysiert. Dabei waren ausschließlich alle analysierten SM-Spezies im Volcano Plot nach links verschoben (siehe Abbildung **14 A**). In HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen war im Vergleich zu HEK-mock-Zellen eine signifikante Abnahme der ungewichteten Effektstärke auf 76,0 % ± 3,4 % ($p \leq 0,001$) zu erkennen (siehe Abbildung **14 B**). Bezüglich des Sättigungsgrades der SM-Spezies war eine signifikante Verringerung sowohl der gesättigten als auch der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren der HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen zu sehen. Dabei waren die SFA auf 77,8 Mol % ± 3,3 Mol % ($p \leq 0,01$), die MUFA auf 72,5 Mol % ± 3,7 Mol % ($p \leq 0,001$) und die PUFA auf 65,3 Mol % ± 3,4 Mol % ($p \leq 0,001$) verringert (siehe in Abbildung **14 C**). Analog dazu waren auch bezüglich der Kettenlänge deutlich signifikante Abnahmen der SM-Spezies der HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen zu sehen. Wie in der Abbildung **14 D** dargestellt, waren die kurzkettigen Fettsäuren der SM-Spezies auf 85,5 Mol % ± 3,2 Mol % ($p \leq 0,001$) signifikant verringert. Die mittelkettigen Fettsäuren der SM-Spezies waren ebenfalls auf 76,7 Mol % ± 3,3 Mol % ($p \leq 0,001$) und die langkettigen Fettsäuren auf 73,7 Mol % ± 3,8 Mol % ($p \leq 0,001$) signifikant reduziert. Um sich genauer auf den Anabolismus der Sphingomyeline zu fokussieren, wurde das Verhältnis aus der ungewichteten Effektstärke der Gesamt-Sphingomyelin-Spezies zu den Gesamt-Phosphatidylcholin-Spezies berechnet (siehe Abbildung **14 E**). In HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen kam es zu einem signifikanten Anstieg dieses Verhältnisses auf insgesamt 113,4 % ± 1,2 ($p \leq 0,001$). Unter den 15 analysierten Spezies ist SM C16:0 mit insgesamt 37,82 % die am häufigsten vertretene Spezies gemessen an der Gesamtheit aller SM-Spezies (siehe Abbildung **14 F**). Die deutliche Verringerung aller SM-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen lässt vermuten, dass ADAM10 auch einen Einfluss auf die SM-Homöostase haben könnte.

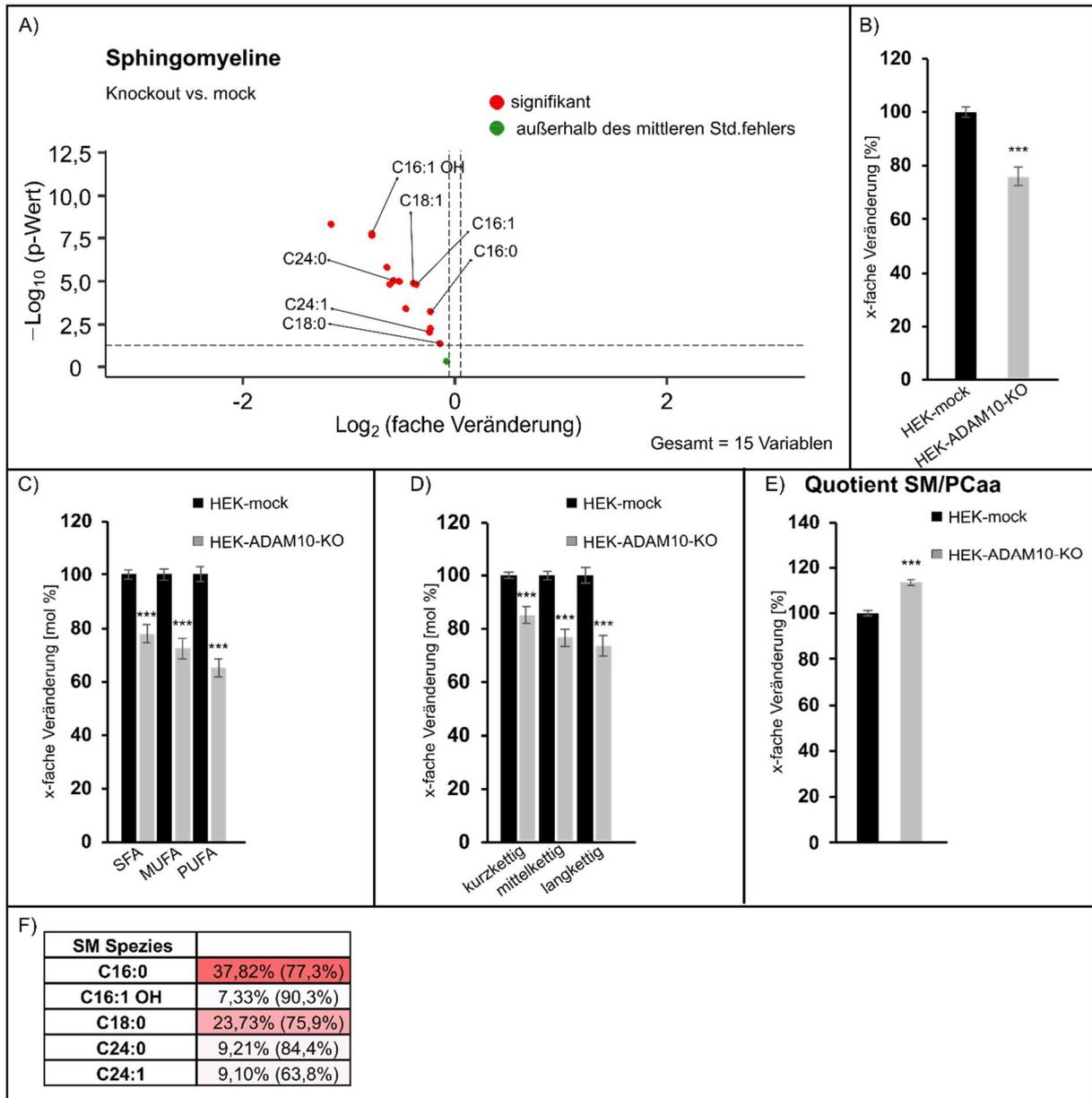


Abbildung 14: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Spingomyelin-Spezies. (A) Die Spiegel an SM-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-Test ermittelt wurde, wobei * p ≤ 0,05 und *** p ≤ 0,001 gilt. (C) und (D) Die Säulendiagramme zeigen die Verteilung von Sättigungsgrad und Kettenlänge der analysierten SEM-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen mit HEK-mock-Zellen. Kurzkettig wurde in der gesamten Arbeit als < C16:X, mittelkettig als C16:X bis C20:X und langkettig als > C20:X für SM-Spezies definiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz mit *** p ≤ 0,001, ermittelt mittels ungepaartem Students-t-Test. (E) Das Säulendiagramm verdeutlicht den Quotienten der ungewichteten Effektstärke aus allen SM-Spezies zu allen PCaa-Spezies. (F) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten SM-Spezies. Eine genauere Beschreibung ist in Abbildung 12 (E) aufgeführt. Eigene Abbildung.

4.1.2.2 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

4.1.2.2.1 Triglyceride

In dieser Arbeit wurden insgesamt 39 TAG-Spezies analysiert. Bei Betrachtung des Volcano Plots ist ein eindeutiger Rechts-Shift in der Gesamtverteilung aller TAG-Spezies von HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen zu erkennen, wobei einzelne Spezies über dem Signifikanzniveau von 0,05 liegen (siehe Abbildung 15 A). Die ungewichtete Effektstärke aller HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen war verglichen zu HEK-mock-Zellen auf insgesamt 249,1 % ± 38,4 % ($p = 0,1518$) deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöht (siehe Abbildung 15 B). Bei näherer Betrachtung des Sättigungsgrades waren sowohl die gesättigten als auch die ungesättigten Fettsäuren erhöht. Im Detail waren dies vor allem TAG X:0 (212,1 Mol % ± 23,0 Mol %; $p \leq 0,05$), TAG X:1 (268,0 Mol % ± 39,1 Mol %; $p = 0,141$), TAG X:2 (288,7 Mol % ± 54,2 Mol %; $p = 0,257$) sowie TAG X:4 (190,6 Mol % ± 11,0 Mol %; $p \leq 0,01$) und TAG X:6 (121,8 Mol % ± 4,7 Mol %; $p \leq 0,05$). Dabei entsprach TAG X:0 dem Anteil der TAG-Spezies mit gesättigten Fettsäuren, TAG X:1 dem Anteil der TAG-Spezies mit einer einfach ungesättigten Fettsäure und > TAG X:2 dem Anteil der TAG-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (siehe Abbildung 15 C). Bei der Analyse der Kettenlänge waren sowohl der Anteil der mittelkettigen als auch der Anteil der langkettigen Fettsäuren der TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Die mittelkettigen Fettsäuren waren auf 252,7 Mol % ± 38,7 Mol % ($p = 0,15$) und die langkettigen Fettsäuren auf 180,8 Mol % ± 30,3 Mol % ($p = 0,74$) erhöht (siehe Abbildung 15 D). Die häufigsten Spezies innerhalb aller TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen waren unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit TAG C50:1 mit 28,84 % und TAG C52:1 mit 16,70 % (siehe Abbildung 15 D).

Um die Kettenlänge der einzelnen Fettsäuren der TAG-Spezies analysieren zu können, waren in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lipidomics-Ansatz einige Limitierungen zu beachten. In der durchgeführten semiquantitativen Massenspektrometrie konnte hinsichtlich der Länge der einzelnen Fettsäuren, die mit dem Rückgrat des Glycerinskeletts verbunden sind, keine Unterscheidung getroffen werden. Es konnte beispielsweise bei der Angabe von TAG C52:X nicht unterschieden werden, ob am Glyceringerüst drei Fettsäuren mit der Länge C16:X + C18:X + C16:X oder beispielsweise drei Fettsäuren mit der Länge C14:X + C22:X + C16:X verestert sind. Dementsprechend waren lediglich grobe Aussagen bezüglich des Sättigungsgrades und der Kettenlänge möglich.

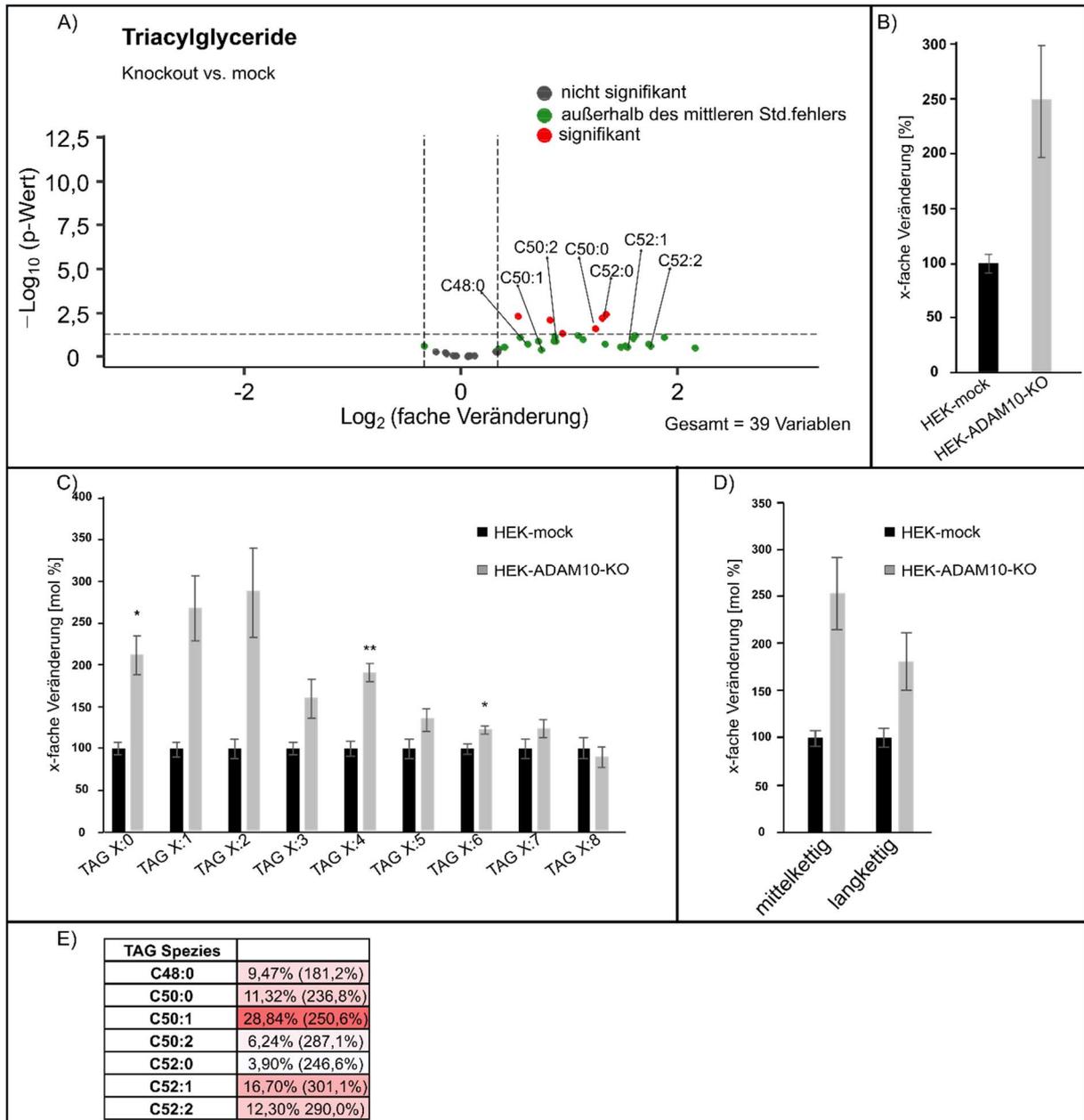


Abbildung 15: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Triglycerid-Spezies. (A) Die Spiegel an TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen mit HEK-mock-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurde, wobei * p ≤ 0,05 und *** p ≤ 0,001 gilt. (C) Im Säulendiagramm ist die Verteilung verschiedener Sättigungsgrade von TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen gezeigt, die mittels ungepaartem Student-t-test kalkuliert wurde, wobei * p ≤ 0,05 und ** p ≤ 0,01 gilt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (D) Das Säulendiagramm zeigt die Verteilung von mittel- und langkettigen TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}- und HEK-mock-Zellen. Mittelkettig wurde als C48:X bis C54:X und langkettig als C56:X bis C60:X für TAG-Spezies in der gesamten Arbeit definiert. Fehlerbalken repräsentieren den. (E) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der häufigsten TAG-Spezies, wie in Abbildung 12 (E) näher beschrieben. Eigene Abbildung.

4.1.2.2.2 Carnitine

Carnitine spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Fettsäuren aus dem Zytosol über die innere Mitochondrienmembran in das Mitochondrium, wo der Fettsäureabbau durch die β -Oxidation reguliert wird [230]. Levocarnitin (L-Carnitin) wird in Lebewesen aus den Aminosäuren Lysin und Methionin hergestellt [85]. Bei der Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit analysierten Carnitine war eine Unterscheidung in Acyl- und Acetyl-Carnitine sinnvoll. Bei den Acylcarnitinen handelt es sich um Carnitine, die mit einer Fettsäure beladen die innere Mitochondrienmembran durch die Übertragung von Acyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) passieren und diese im Mitochondrium zum Abbau bereitstellen, während Acetyl-Carnitine das oxidierte CoA-Molekül aus dem Inneren des Mitochondriums eliminieren [289]. In der vorliegenden Arbeit stehen dementsprechend alle Carnitin-Spezies „CX (X>3)“ für Acylcarnitine. Da durch die β -Oxidation zyklisch Kohlenstoffatome der Fettsäuren abgebaut werden und dabei Energie geliefert wird, kann die Auswertung der Carnitine Aufschluss über zelluläre Reaktionsmechanismen auf veränderte intrazelluläre Triglycerid-Spiegel geben. C0, als Hauptträger der Fettsäuren, C02 und C03 als Endprodukte der β -Oxidation und C16 und C18 als Hauptvertreter der Acyl-Carnitine waren bei der Auswertung von besonderem Interesse. Das Verhältnis aus (C16+C18)/C2 wurde als aussagekräftiges Maß für die abgelaufene β -Oxidation der geradzahligen Fettsäuren betrachtet.

Bei der Gruppenanalyse der 41 untersuchten Carnitin-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen im Volcano-Plot ließ sich keine homogene Verteilung der Spezies beobachten, was in der Abbildung **16 A** dargestellt ist. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Vertreter war ein signifikanter Anstieg von C0 auf 115,9 % \pm 3,0 % ($p \leq 0,01$) und C02 auf 157,3 % \pm 2,5 % ($p \leq 0,001$) zu verzeichnen, wobei gleichzeitig C03, als Endprodukt der ungeradzahligen Fettsäuren, auf 78,0 % \pm 3,3 % ($p \leq 0,001$) signifikant verringert war (siehe Abbildung **16 B**). Basierend auf den vorliegenden Daten ließ sich keine spezifische Reaktion der Carnitine auf die erhöhten intrazellulären TAG-Spiegel in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verzeichnen.

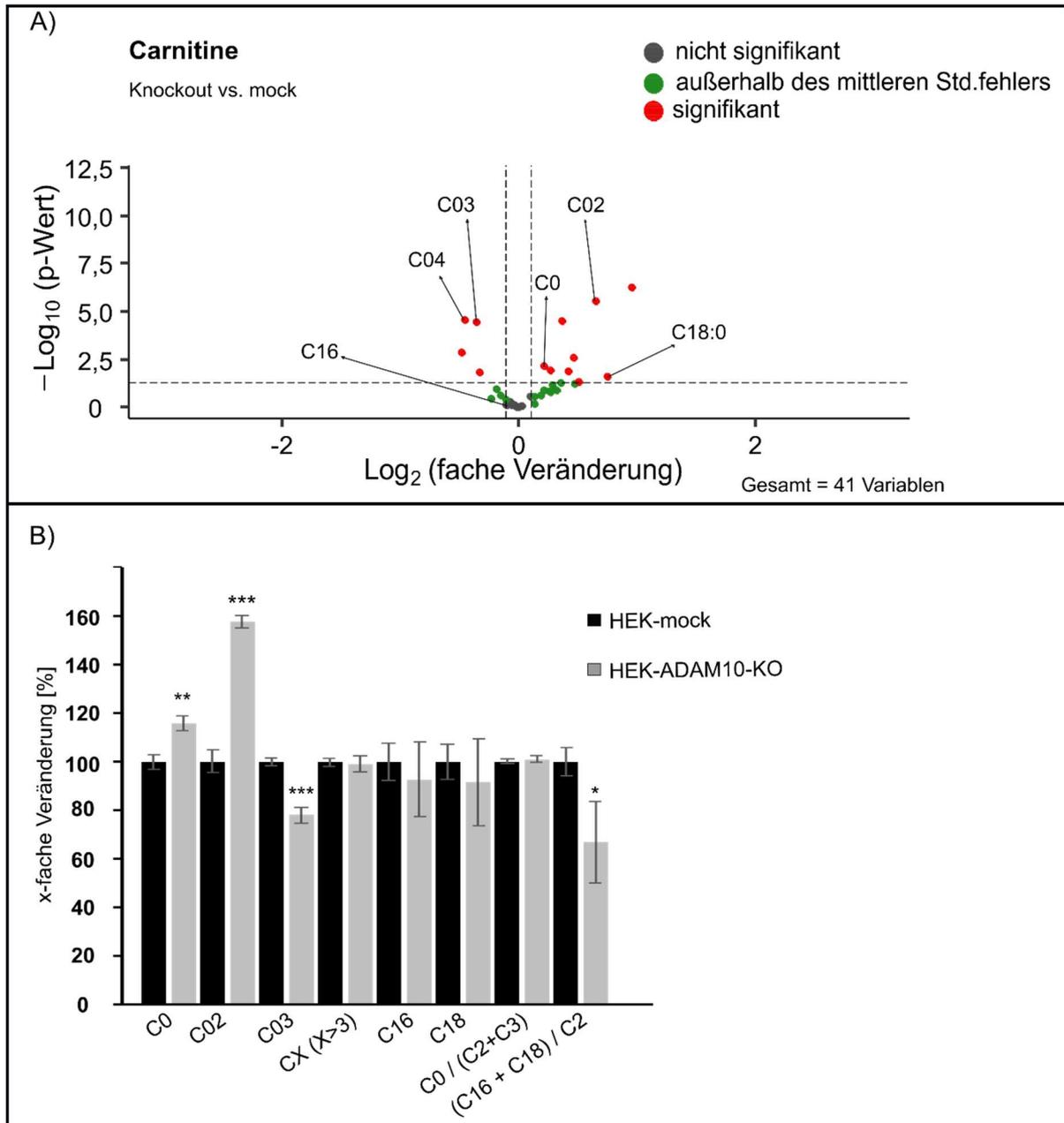


Abbildung 16: Effekte der ADAM10-Gendeletion in HEK-Zellen auf Carnitin-Spezies. (A) Die Spiegel an Carnitin-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in HEK-mock-Zellen (jeweils n=6) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen ausgewählter Carnitin-Spezies, die eine besondere Aussagekraft über den Energieverbrauch der HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen haben. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurde, wobei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Eigene Abbildung.

4.2 Der Einfluss der ADAM10-Modulatoren EGCG, Am80 und Gemfibrozil auf SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen

Nachdem sich gezeigt hat, dass die Deletion von *ADAM10* einen erheblichen Einfluss auf die Lipidhomöostase in HEK-Zellen hat, wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss von ADAM10-modulierenden Substanzen auf verschiedene Zellreihen untersucht. Da ADAM10 vor allem im Gehirn eine protektive Wirkung auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung hat und auch in anderen Organen vielfältige Wirkungen erzielt [48,281,311], fand im Folgenden eine Recherche nach ADAM10-modulierenden Substanzen statt. Dabei stellte sich heraus, dass die beiden Medikamente Gemfibrozil und Tamibarotene (Am80) laut aktueller Literaturlage transkriptionell Einfluss auf die *ADAM10*-Genexpression nehmen [46,147,314]. Außerdem soll die in grünem Tee vorkommende, natürliche Komponente Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) modulierenden Einfluss auf ADAM10 haben [70,217].

4.2.1 Bestimmung der Zell-Viabilität

Um einen Einfluss der Substanzen auf ADAM10 als Protein und den Einfluss der Substanzen auf die Lipidhomöostase verschiedener Zellen zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Wt-, HEK-Wt- und Calu-3-Wt-Zellen mit Gemfibrozil, EGCG und Am80 für 72 Stunden, in der Konzentration, welche auch für die weiterführenden Analysen genutzt wurde, inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass hier drei Zelllinien aus metabolisch aktiven Organen (Gehirn, Niere und Lunge) gewählt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Kapitel 0 beschrieben geerntet und prozessiert. Das Medium der Zellen wurde nach Beendigung der Inkubation auf Zellzytotoxizität mittels LDH-Assay analysiert und dadurch die Zell-Viabilität kalkuliert, um einen toxischen Effekt der Substanzen auf die Zellen ausschließen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet, dass eine Zytotoxizität > 6 % nicht überschritten wurde (siehe Abbildung 17).

Unter den gewählten Inkubationsbedingungen (siehe Kapitel 0) konnte kein Einfluss von 100 µmol/l Gemfibrozil, 1 µmol/l Am80 und 10 µmol/l EGCG auf die inkubierten Zellen bezüglich der Viabilität festgestellt werden. Das Ergebnis der Zytotoxizitätsanalyse ist in Abbildung 17 dargestellt.

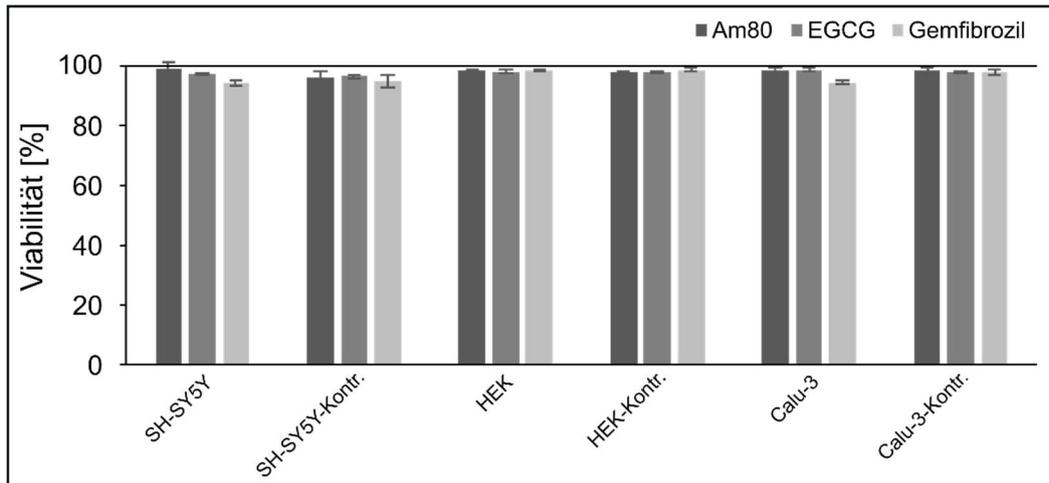


Abbildung 17: Einfluss der Adam10-Modulatoren auf die Zell-Viabilität von SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen. Nach 72-stündiger Inkubation von SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen mit den in der Arbeit verwendeten ADAM10-Modulatoren (100 $\mu\text{mol/l}$ Gemfibrozil, 1 $\mu\text{mol/l}$ Am80 und 10 $\mu\text{mol/l}$ EGCG) oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle wurde die Zell-Zytotoxizität mittels LDH-Analyse kalkuliert ($n=8$). Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler. Eigene Abbildung.

4.2.2 Effekt auf die sAPP α -Freisetzung

Um einen Einfluss von Gemfibrozil, Am80 und EGCG auf ADAM10 in SH-SY Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen feststellen zu können, wurden die sAPP α -Proteinlevel als indirekter Nachweis der ADAM10-Aktivität nach der Inkubation aus dem kultivierten Medium bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.13). Die Ergebnisse der durchgeführten sAPP α -Proteinlevel wurden anschließend quantifiziert und die sAPP α -Freisetzung in Form von Säulendiagrammen in der Abbildung 18 dargestellt. In SH-SY5Y Wt-Zellen bedingte Am80 einen signifikanten Anstieg der sAPP α -Proteinexpression auf $166,6 \% \pm 11,8 \%$ ($p \leq 0,05$) und EGCG auf $167,4 \% \pm 12,8 \%$ ($p \leq 0,05$), während die Inkubation von Gemfibrozil in SH-SY5Y Wt-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der sAPP α -Level auf $78,6 \% \pm 3,3 \%$ ($p \leq 0,05$) führte (siehe Abbildung 18 A). Analog dazu stieg die sAPP α -Proteinexpression von Am80 in HEK Wt-Zellen signifikant auf $118,8 \% \pm 0,3 \%$ ($p \leq 0,001$) und die Inkubation von EGCG auf HEK Wt-Zellen auf $146,5 \% \pm 4,5 \%$ ($p \leq 0,01$). Analog zu dem Ergebnis in SH-SY5Y Wt-Zellen kam es durch die Inkubation von HEK Wt-Zellen mit Gemfibrozil zu einer nicht-signifikanten Abnahme der sAPP α -Menge auf $76,7 \% \pm 15,4 \%$ (siehe Abbildung 18 C). Interessanterweise war nach Inkubation von Calu-3 Wt-Zellen mit Gemfibrozil eine signifikante Zunahme der sAPP α -Freisetzung auf $277 \% \pm 13,4 \%$ ($p \leq 0,001$) festzustellen. Die Inkubation von Calu-3 Wt-Zellen mit Am80 resultierte ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der sAPP α -Freisetzung auf $242,5 \% \pm 8,2 \%$ ($p \leq 0,001$). Gleiches wurde für die Inkubation mit EGCG beobachtet, hier kam es in Calu-3 Wt-Zellen zu einer signifikanten Zunahme der sAPP α -Level auf $240,8 \% \pm 4,9 \%$ ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 18 E).

Die isolierte Betrachtung von Am80 lieferte einen signifikanten zelllinienübergreifenden Effekt auf die sAPP α -Freisetzung im entsprechenden Kulturmedium, der in humanen

Lungenkrebszellen am deutlichsten ausgeprägt war. Gleiches konnte bei der isolierten Betrachtung von EGCG festgestellt werden. Auch hier war ein signifikanter Anstieg der sAPP α -Menge im entsprechenden Kulturmedium von allen untersuchten Zelllinien zu verzeichnen. Interessanterweise verhielt sich die Freisetzung von sAPP α nach Gemfibrozil-Inkubation im Kulturmedium von SH-SY5Y Wt- und HEK Wt-Zellen anders als in Calu-3 Wt-Zellen. Während Gemfibrozil sowohl in der neuronalen als auch in der renalen Zelllinie zu einer verringerten sAPP α -Expression führte, war der Effekt in Calu-3 Wt-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen am stärksten hochregulierend auf die sAPP α -Proteinlevel (siehe Abbildung **18**).

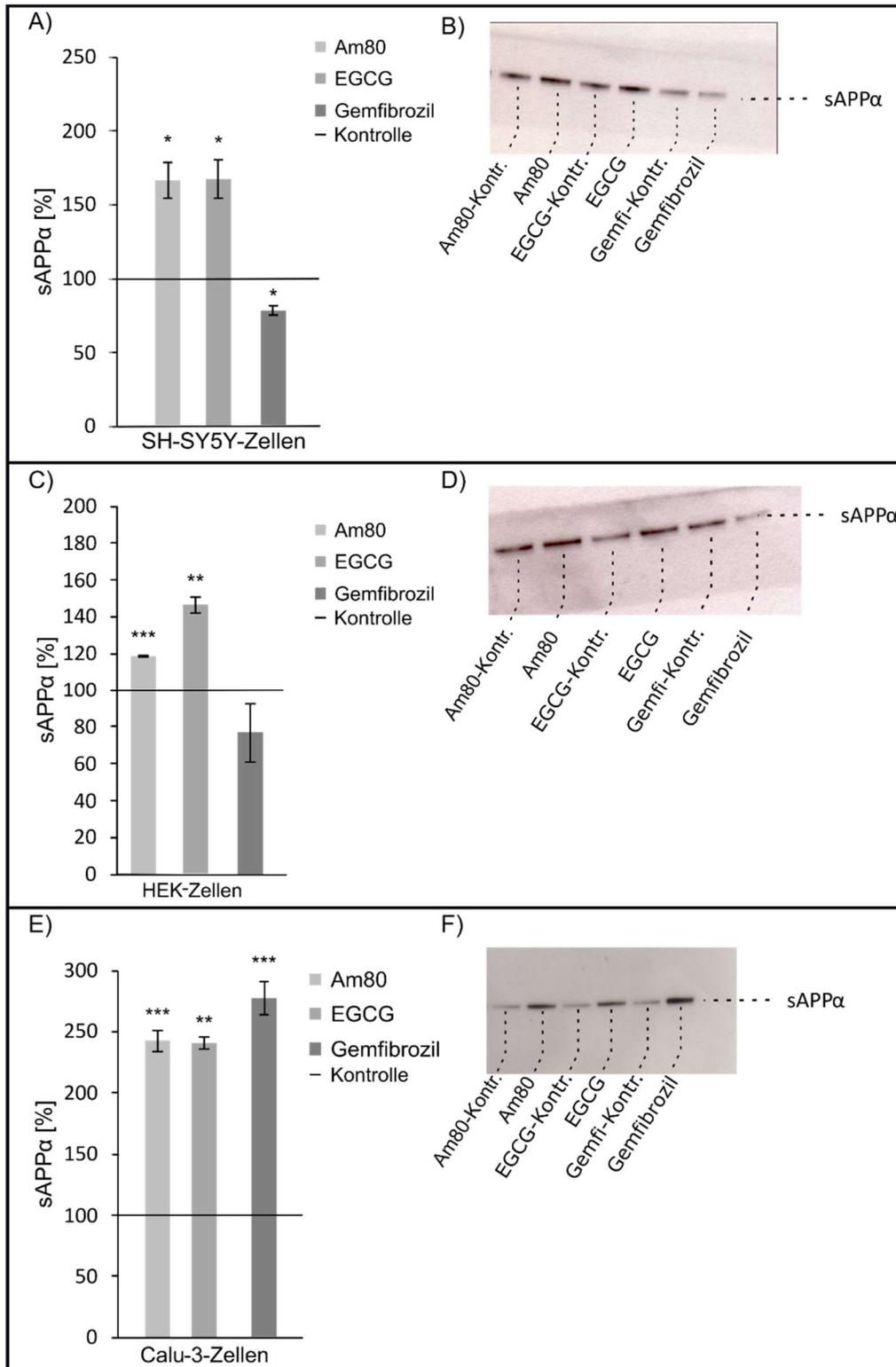


Abbildung 18: Nachweis der sAPP α -Freisetzung in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Inkubation von Am80, EGCG und Gemfibrozil mittels Western-Blot-Analyse. (A), (C) und (E) sAPP α -Menge in Prozent in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Am80-, EGCG- und Gemfibrozil-Inkubation im Vergleich zur jeweils entsprechenden Kontrollgruppe. Die Kontrolle wurde für jede Substanz auf 100 % gesetzt und ist durch die horizontale Linie verdeutlicht. Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurde, wobei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und * $p \leq 0,001$ gilt. (B), (D) und (F) exemplarische sAPP α -Western-Blot-Ergebnisse aus dem entsprechenden Kulturmedium (n=3) nach der Inkubation von entweder Am80, EGCG oder Gemfibrozil auf SH-SY5Y-Wt-, HEK-Wt- und Calu-3-Wt-Zellen. Eigene Abbildung.**

4.2.3 Der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat und Tamibarotene auf die Lipidhomöostase in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Auswirkung von EGCG und Am80 auf die Lipid-Komposition in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den beiden Substanzen behandelt, geerntet und ihre Lipide extrahiert. Im Anschluss erfolgte eine semiquantitative massenspektrometrische Analyse der Phospholipide, Neutrallipide und Carnitine, analog zu der in Kapitel 4.1.2 durchgeführten Untersuchung. Es wurde sich bei der Auswertung der Phospholipide, TAG und Carnitine auf die Auswirkungen der Substanzen auf die ungewichtete Effektstärke konzentriert, um einen groben Überblick über den Einfluss von Am80 und EGCG auf die behandelten Zelllinien im Vergleich zur jeweils entsprechenden Kontrollgruppe zu skizzieren.

4.2.3.1 Einfluss auf Phospholipide

Während bei der Behandlung mit Am80 eine Verringerung der ungewichteten Effektstärke in SH-SY5Y Wt-Zellen auf $90,9 \% \pm 11,7 \%$ ($p \leq 0,521$) und in HEK Wt-Zellen auf $84,3 \% \pm 4,5 \%$ ($p \leq 0,01$) im Vergleich zu den jeweiligen mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppen zu verzeichnen war, schien Am80 keinen Einfluss auf die Gesamteffektstärke der PCaa-Spezies der in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Lungenkrebszellen zu haben (ungewichtete Effektstärke: $100,7 \% \pm 5,2 \%$, $p = 0,904$) (siehe Abbildung 19 A). Mit Blick auf die signifikante Reduzierung der PCaa-Spezies durch Tamibarotene in HEK-Zellen ließ sich in der gruppenspezifischen Analyse im Volcano-Plot eine klare Linksverschiebung aller PCaa-Spezies dokumentieren, wobei die Mehrheit aller Spezies dabei oberhalb des Signifikanzniveaus mit $p \leq 0,05$ lag (siehe Abbildung 19 B).

In den mit EGCG behandelten Zelllinien stellte sich die Verteilung der PCaa-Spezies anders dar. EGCG führte in SH-SY5Y Wt-Zellen zu einer Steigerung der PCaa-Spezies auf $103,3 \% \pm 9,0 \%$ ($p = 0,77$) im Vergleich zur mit entsprechendem Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe. In HEK Wt-Zellen führte EGCG zu einer Verringerung der ungewichteten Effektstärke auf $95,3 \% \pm 8,1 \%$ ($p \leq 0,599$) und in Calu-3 Wt-Zellen auf $91,5 \% \pm 4,2 \%$ ($p = 0,109$) jeweils verglichen mit den Kontrollgruppen (siehe Abbildung 19 A).

Bei der Verteilung der Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies (PCae-Spezies) in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen waren nach der Behandlung mit EGCG und Am80 ähnliche Effekte zu verzeichnen. Generell war bei Betrachtung der ungewichteten Effektstärke für keine Zelllinie eine signifikante Veränderung durch Am80 oder EGCG im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu beobachten. Während Am80 in SH-SY5Y Wt-Zellen einen tendenziellen Anstieg der PCae-Spezies auf $108,7 \% \pm 11,3 \%$ ($p = 0,548$) und in Calu-3 Wt-Zellen auf $110,6 \% \pm 5,3 \%$ ($p = 0,128$) bedingte, kam es bei der Behandlung von HEK Wt-Zellen zu einer Verringerung auf $96,0 \% \pm 3,7 \%$ ($p = 0,403$). Die Behandlung mit EGCG führte in SH-SY5Y

Wt-Zellen zu einem minimalen Anstieg der PCae-Spezies auf $103,5 \% \pm 9,6 \%$ ($p = 0,767$) und in HEK-Wt-Zellen zu einer Verringerung auf $96,9 \% \pm 12,5 \%$ ($p = 0,725$) und in Calu-3 Wt-Zellen auf $99,3 \% \pm 4,5 \%$ ($p = 0,902$) (siehe Abbildung **19 C**).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Verteilung der Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies in den drei untersuchten Zelllinien nach der Behandlung mit Tamibarotene und EGCG. Am80 bedingte in der neuronalen Zelllinie eine Verringerung der Lyso-PC-Spezies auf $91,2 \% \pm 10,5 \%$ ($p = 0,440$) und in der renalen Zelllinie auf $97,0 \% \pm 4,7 \%$ ($p = 0,672$). In den untersuchten Lungenzellen bedingte Am80 eine Erhöhung der ungewichteten Effektstärke aller Lyso-PC-Spezies auf $111,9 \% \pm 5,5 \%$ ($p = 0,151$), ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Entgegengesetzt dazu verhielten sich die Lyso-PC-Spezies der Zelllinien nach Behandlung mit EGCG verglichen zur jeweiligen Kontrollgruppe. Hier war ein Anstieg der Lyso-PC-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen nach EGCG-Behandlung auf $110,8 \% \pm 9,5 \%$ ($p = 0,480$) zu verzeichnen, während kaum ein Effekt von EGCG auf HEK Wt-Zellen mit $100,4 \% \pm 12,4 \%$ ($p = 0,964$) zu sehen war. In Calu-3 Wt-Zellen bedingte EGCG dagegen eine tendenzielle Reduktion der Lyso-PC-Spezies auf $82,3 \% \pm 7,9 \%$ ($p = 0,07$) (siehe Abbildung **19 D**).

Die Behandlung mit Am80 vermittelte nur tendenzielle Effekte auf die Verteilung der SM-Spezies in den untersuchten Zelllinien. In SH-SY5Y Wt-Zellen stieg die ungewichtete Effektstärke nach Am80-Behandlung auf $102,5 \% \pm 12,5 \%$ ($p = 0,873$) an, während in HEK Wt-Zellen eine Reduzierung auf $94,2 \% \pm 3,7 \%$ ($p = 0,226$) zu sehen war. In Calu-3 Wt-Zellen bedingte die Behandlung mit Tamibarotene einen Anstieg der SM-Spezies auf $111,2 \% \pm 5,6 \%$ ($p = 0,139$).

Nach der Behandlung mit EGCG kam es in SH-SY5Y Wt-Zellen zu einem Anstieg der Gesamt-SM-Spezies auf $106,8 \% \pm 9,9 \%$ ($p = 0,480$) und in HEK Wt-Zellen zu einer Verringerung auf $94,0 \% \pm 10,2 \%$ ($p = 0,964$). In Calu-3 Wt-Zellen kam es ebenfalls zu einer Verringerung der SM-Spiegel auf $94,5 \% \pm 4,2 \%$ ($p = 0,075$) (siehe Abbildung **19 E**).

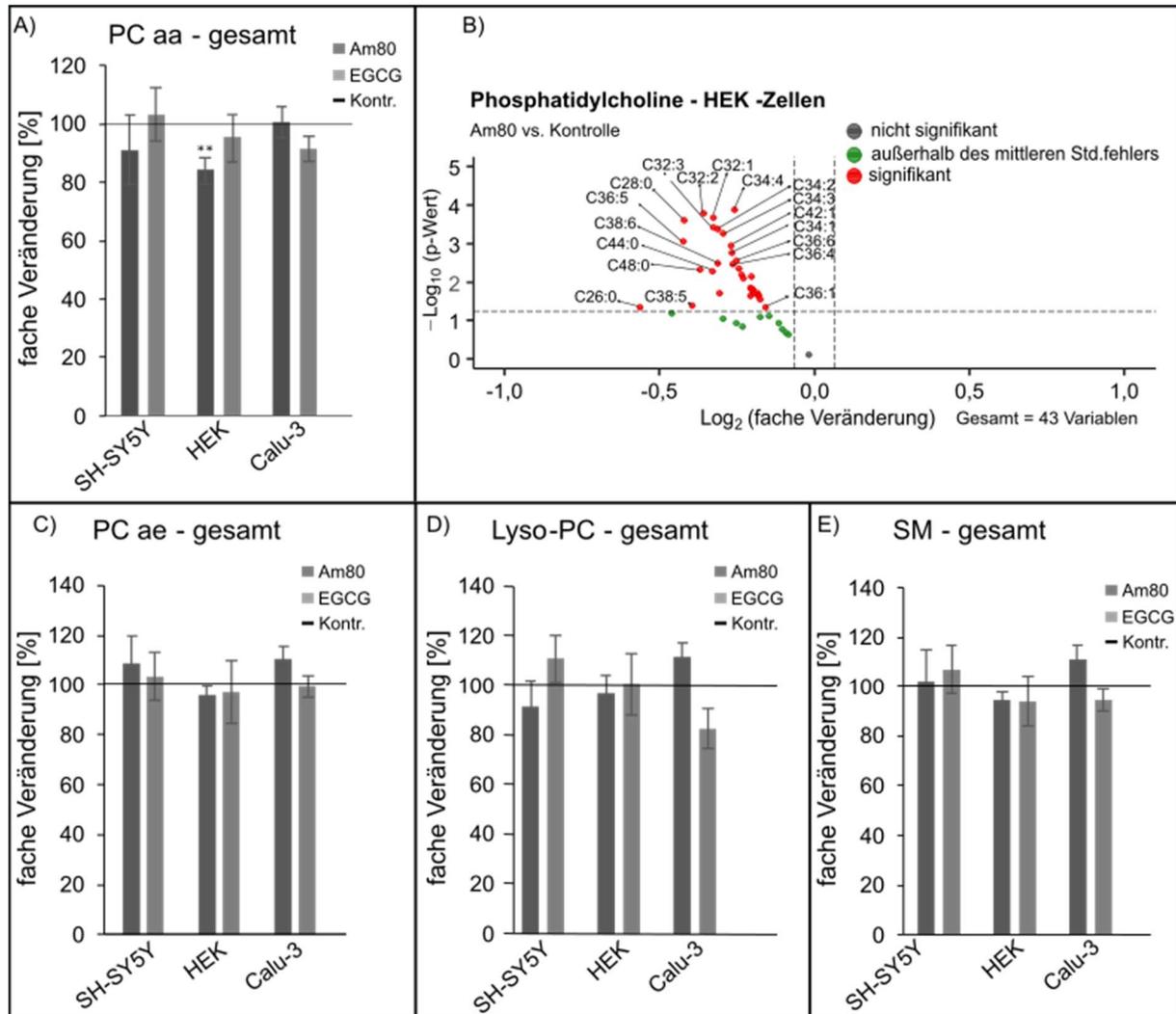


Abbildung 19: Effekte von Am80 und EGCG auf Phospholipide in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A), (C), (D) und (E) Die Säulendiagramme zeigen die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht SH-SY5Y WT-, HEK WT- und Calu-3 WT-Zellen jeweils entweder mit Am80 oder EGCG behandelt im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppen. Die Kontrollgruppe wurde jeweils auf 100 % gesetzt und ist als horizontale Linie dargestellt. (B) Die Spiegel an Phosphatidylcholin-Spezies in HEK-Zellen mit Am80 behandelt im Vergleich zu denjenigen Spiegeln mit der Lösungsmittelkontrolle (jeweils n=8) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurden, wobei ** $p \leq 0,01$ gilt. Eigene Abbildung.

4.2.3.2 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

Sowohl Am80 als auch EGCG zeigten nur geringe Effekte auf die analysierten Phospholipide in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. Im Folgenden werden die Auswirkungen der beiden Substanzen auf Triglyceride und Carnitine betrachtet.

Am80 bedingte dabei, abgebildet in der Abbildung 20 A in der behandelten Neuroblastom-Zelllinie einen signifikanten Anstieg der Triglycerid-Spiegel auf $175,0 \% \pm 11,2$ ($p \leq 0,01$), was in dem Volcano Plot (Abbildung 20 B) durch die Betrachtung der gruppenspezifischen Effekte zusätzlich unterstrichen werden konnte. Im Vergleich dazu stiegen die TAG-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen nach EGCG-Behandlung auf $103,9 \% \pm 5,9$ ($p = 0,797$). In den behandelten

HEK Wt-Zellen kam es nach Am80-Inkubation zu einer Verringerung der TAG-Spezies auf $90,2 \% \pm 7,0 \%$ ($p = 0,232$) und nach EGCG-Inkubation auf $97,4 \% \pm 8,9 \%$ ($p = 0,817$). In Calu-3 Wt-Zellen verhielten sich die beiden Substanzen unterschiedlich. Die Behandlung mit Am80 führte zu einem Anstieg auf $120,2 \% \pm 13,3 \%$ ($p = 0,264$), während eine Behandlung mit EGCG in Lungenzellen zu einer Abnahme der TAG-Spiegel auf $80,8 \% \pm 10,7 \%$ ($p = 0,180$) führte (siehe Abbildung 20 A).

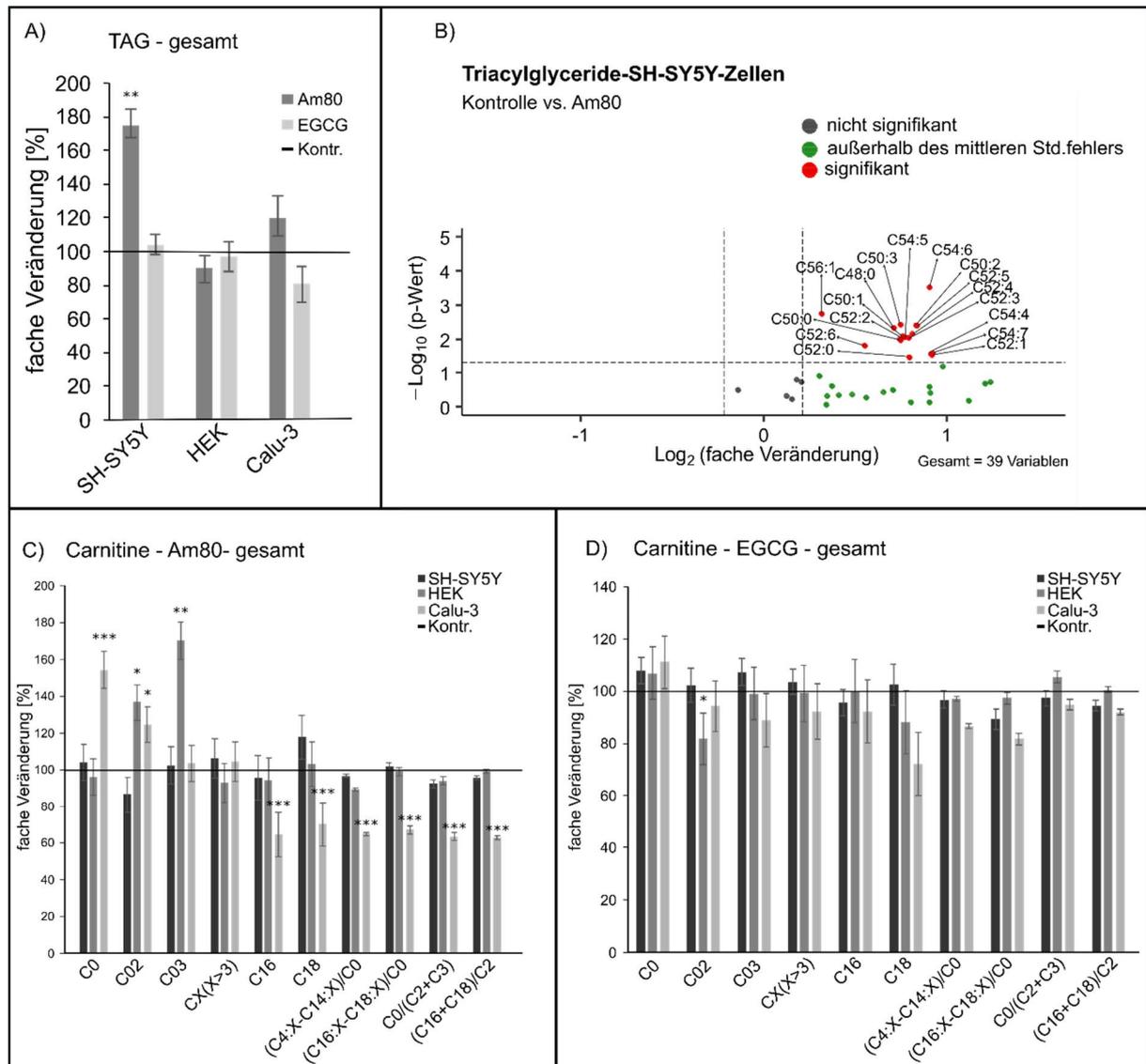


Abbildung 20: Effekte von Am80 und EGCG auf Triglycerid- und Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen jeweils entweder mit Am80 oder EGCG behandelt verglichen zu den mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppen, die jeweils auf 100 % gesetzt wurden und als horizontale Linie dargestellt werden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, die mittels ungepaartem Students-t-test ermittelt wurden, wobei ** $p \leq 0,01$ gilt. (B) Die Spiegel an Phosphatidylcholin-Spezies in HEK-Zellen mit Am80 behandelt im Vergleich zu denjenigen Spiegeln mit der Lösungsmittelkontrolle (jeweils $n=8$) in Form eines Volcano Plots. Ein detaillierter Aufbau der Volcano Plots ist in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben. (C) und (D) Die Säulendiagramme zeigen die relativen Veränderungen ausgewählter Carnitin-Spezies für Am80 (B) und EGCG (C) auf den jeweils untersuchten Zelllinien. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Eigene Abbildung.

Bei der Behandlung von SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen mit Am80 waren bezüglich der Verteilung der Carnitin-Spezies ausgeprägte Unterschiede zu verzeichnen. In SH-SY5Y Wt-Zellen führte die Behandlung mit Am80 zu einem Anstieg der TAG-Spezies auf $175,0 \% \pm 11,2 \%$ ($p \leq 0,01$). Interessanterweise waren die Carnitin-Spezies nach Am80-Behandlung nur in geringem Maße verändert und es wurde keine Reaktion auf den intrazellulären Triglycerid-Anstieg beobachtet (verdeutlicht in Abbildung 20 C).

Im Gegensatz dazu waren sowohl in HEK Wt- als auch in Calu-3 Wt-Zellen heterogene Ergebnisse in der Verteilung der Carnitin-Spezies zu beobachten. Sowohl C02 als auch C03, die Endprodukte des gerad- und ungeradzahligen Fettsäureabbaus, waren in HEK Wt-Zellen nach Am80-Behandlung signifikant erhöht, wobei C02 auf $136,9 \% \pm 9,7 \%$ ($p \leq 0,05$) und C03 auf $170,3 \% \pm 10,0 \%$ ($p \leq 0,01$) erhöht waren. Weitere wichtige Carnitin-Spezies, wie C16 oder C18, waren im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe nur in geringem Maße verändert. In Calu-3 Wt-Zellen war nach Am80-Inkubation ein signifikanter Anstieg von C0 auf $154,3 \% \pm 10,0 \%$ ($p \leq 0,001$) und von C02 auf $124,5 \% \pm 9,7 \%$ ($p \leq 0,05$) zu beobachten. Zusätzlich führte die Behandlung mit Am80 zu einer signifikanten Abnahme der C16- und C18-Spezies, mit C16 auf $64,3 \% \pm 12,1 \%$ ($p \leq 0,001$) und C18 auf $69,9 \% \pm 12,0 \%$ ($p \leq 0,001$).

Bei der Behandlung mit EGCG waren über alle drei Zelllinien übergreifend nur geringe Effekte auf die ausgewählten Carnitin-Spezies zu sehen (siehe Abbildung 20 D). In HEK Wt-Zellen führte die Behandlung von EGCG zu einer Abnahme der C02-Spezies auf $81,8 \% \pm 9,7 \%$ ($p \leq 0,05$).

4.2.4 Der Einfluss von Gemfibrozil auf die Lipidhomöostase in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen

Als Ligand für den Peroxisom-Proliferations-aktivierten-Rezeptor α (kurz: PPAR α) induziert Gemfibrozil in Hepatozyten die Transkription und Expression einer Vielzahl an Genen, die in den Fett- und Energiemetabolismus involviert sind. So wird unter anderem über PPAR α die mitochondriale, peroxisomale und mikrosomale Fettsäure-Oxidation, die Fettsäure-Bindung und Aktivierung, der Lipoproteinstoffwechsel (z.B. durch die Lipoproteinlipase), die Gluconeogenese und sowohl die Synthese als auch der Abbau der Triglyceride reguliert [141]. Dementsprechend kommt Gemfibrozil als PPAR α -Aktivator in Hepatozyten eine besondere pharmakologische Bedeutung zu. Über die vermehrte Aktivierung der Lipoproteinlipase können sowohl die erhöhten TAG- als auch die VLDL-Spiegel im Blut erfolgreich gesenkt werden [253]. Da PPAR α in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird und seine Funktion über die Regulation der Lipoproteinlipase hinausgeht und Gemfibrozil nicht nur auf Hepatozyten, sondern auch auf alle anderen Organe Einfluss nimmt, wurde der Effekt des Lipidsenkens auf die Lipidhomöostase anderer Organe in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Stellvertretend wurden dafür analog zur Inkubation von Am80 und EGCG SH-SY5Y Wt-Zellen, als Vertreter einer neuronalen Zellreihe und ein in Zellkulturstudien häufig verwendetes Modell in der Alzheimer-Forschung, herangezogen. Da PPAR α vor allem in metabolisch aktiven Geweben exprimiert wird, wurde sich zusätzlich auf HEK Wt-Zellen, als Vertreter einer renalen Zellreihe, und Calu-3 Wt-Zellen, als Vertreter einer pulmonalen Zellreihe, konzentriert. Diese wurden über 72 Stunden mit 100 μ mol/l Gemfibrozil inkubiert und im Anschluss massenspektrometrisch analysiert. Bei der Auswertung der verschiedenen Lipidklassen wurde sich auf eine Gruppenanalyse mittels Volcano Plot, auf die ungewichtete Effektstärke der Lipidklasse durch Gemfibrozil-Einfluss und auf die Hauptvertreter innerhalb der einzelnen Lipidklassen konzentriert, sofern es nicht anders angegeben ist.

Teile der Ergebnisse, die sich mit dem Einfluss von Gemfibrozil auf den Lipidhaushalt von SH-SY5Y-Wt-, HEK-Wt- und Calu-3-Wt-Zellen beschäftigen, wurden im International Journal of Molecular Sciences (MDPI Verlag, Impact Factor dieser Zeitschrift Stand Juni, 2023: 6,208) veröffentlicht:

Bachmann CM*, Janitschke D*, Lauer AA, Ehrhardt T, Hartmann T, Grimm MOW*, Grimm HS* *Gemfibrozil-induced intracellular Triglyceride increase in SH-SY5Y, HEK and Calu-3 cells.* *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 3;24(3):2972. doi: 10.3390/ijms24032972.

PMID: 36769295

*diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen.

4.2.4.1 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

4.2.4.1.1 Triglyceride

Wie bereits in Kapitel 4.1.2.2 erwähnt, stellen Triglyceride einen wichtigen Marker für den intrazellulären Energiestoffwechsel dar und dienen darüber hinaus durch die Bindung von Fettsäuren als Energiespeicher [189]. Bei erhöhter Akkumulation von intrazellulären Triglyceriden kommt es zur Bildung von kleinen Lipidtröpfchen (engl. *Lipid droplets*, kurz: LD) im Zytosol [310]. Die aus den TAG gewonnenen Fettsäuren können in den Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt werden. Zu diesem Zweck wird jede einzelne Fettsäure abgespalten und an Carnitin gebunden, um die mitochondriale Membran passieren zu können [3].

Interessanterweise führte die Behandlung mit Gemfibrozil in allen drei untersuchten Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der Triglycerid-Spiegel im Vergleich zu den jeweils mit entsprechendem Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppen. Bei Betrachtung der gesamten TAG-Gruppe pro Zelllinie fiel im Volcano Plot eine deutliche Verschiebung der meisten Lipidspezies nach rechts über alle drei untersuchten Zellreihen hinweg auf, wobei davon die meisten oberhalb des Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ lagen. Die wichtigsten Vertreter sind im Volcano Plot, Abbildung 21 A, beschriftet.

Bei näherer Betrachtung führte Gemfibrozil in SH-SY5Y Wt-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der ungewichteten Effektstärke der TAG-Spezies auf $170,3\% \pm 4,5\%$ ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung **21 B**). Von den 39 untersuchten TAG-Spezies waren in den mit Gemfibrozil-inkubierten Neuroblastom-Zellen 25 Spezies hochreguliert, wovon 15 Spezies das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ erreichten. In HEK Wt-Zellen kam es nach der Behandlung zu einem Anstieg auf $272,1\% \pm 6,0\%$ ($p \leq 0,001$). Innerhalb der 39 TAG-Spezies waren in den Nierenzellen insgesamt 23 TAG-Spezies erhöht, davon 18 Spezies signifikant. In Calu-3 Wt-Zellen erhöhte die Behandlung mit Gemfibrozil den Gesamtspiegel der TAG-Spezies auf $448,1\% \pm 3,9\%$ ($p \leq 0,001$). Dabei waren 27 der 39 analysierten Spezies erhöht, wovon 23 Spezies das Signifikanzniveau erreichten. Interessanterweise waren zwölf Spezies verringert, davon vier signifikant.

Das in Abbildung **21 C** gezeigte Venn-Diagramm veranschaulicht alle signifikant veränderten TAG-Spezies in einer Gegenüberstellung der drei untersuchten Zelllinien. Es wurden alle Spezies mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ berücksichtigt. Interessanterweise gab es zwölf TAG-Spezies, die in allen drei Zelllinien durch die Inkubation mit Gemfibrozil signifikant erhöht waren: TAG C48:0, TAG C50:0, TAG C50:1, TAG C50:2, TAG C 50:3, TAG C52:3, TAG C52:4, TAG C52:5, TAG C52:6, TAG C54:6, TAG C54:7 und TAG C54:8. Zusätzlich zu diesen Spezies gab es eine Reihe weiterer TAG-Spezies, die durch die Behandlung mit Gemfibrozil in den einzelnen Zelllinien signifikant verändert waren. TAG C52:0, TAG C54:9, TAG C56:7, TAG C56:8, TAG C58:7 und TAG C60:6 waren in HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen signifikant erhöht. TAG C52:2 und TAG C54:5 waren in SH-SY5Y Wt- und Calu-3 Wt-Zellen in ähnlicher Weise verändert. TAG C52:1 war nur in SH-SY5Y Wt-Zellen signifikant erhöht und TAG C54:1 nur in HEK Wt-Zellen. Im Allgemeinen waren in den behandelten Lungenzellen die meisten TAG-Spezies signifikant verändert. Zusätzlich zu den oben erwähnten TAG-Spezies war TAG C60:4 signifikant erhöht und interessanterweise traten auch signifikant verringerte Spezies auf (z.B. TAG C58:3 und TAG C58:6).

Die Tabelle in Abbildung **21 D** zeigt die wichtigsten Triglycerid-Spezies nach Gemfibrozil-Behandlung, welche prozentual am häufigsten auftraten. Ausgehend von den Spezies im Venn-Diagramm, die signifikant erhöht waren, wurden die Hauptvertreter mit dem prozentualen Anteil ihrer Spezies am Gesamtanteil aller TAG-Spezies aufgeführt. Die jeweiligen Effektgrößen sind in Klammern angegeben. Über alle drei untersuchten Zelllinien hinweg war die am häufigsten auftretende Spezies C50:2, die in HEK-Zellen mit einem Prozentsatz von 33,1 %, in Calu-3 Zellen zu 32,34 % und in SH-SY5Y-Zellen zu 23,82 % vorkam. Zusammenfassend war zu erkennen, dass die Behandlung von SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen mit Gemfibrozil zu einem zelllinienübergreifenden massiven intrazellulären Triglycerid-Anstieg führte.

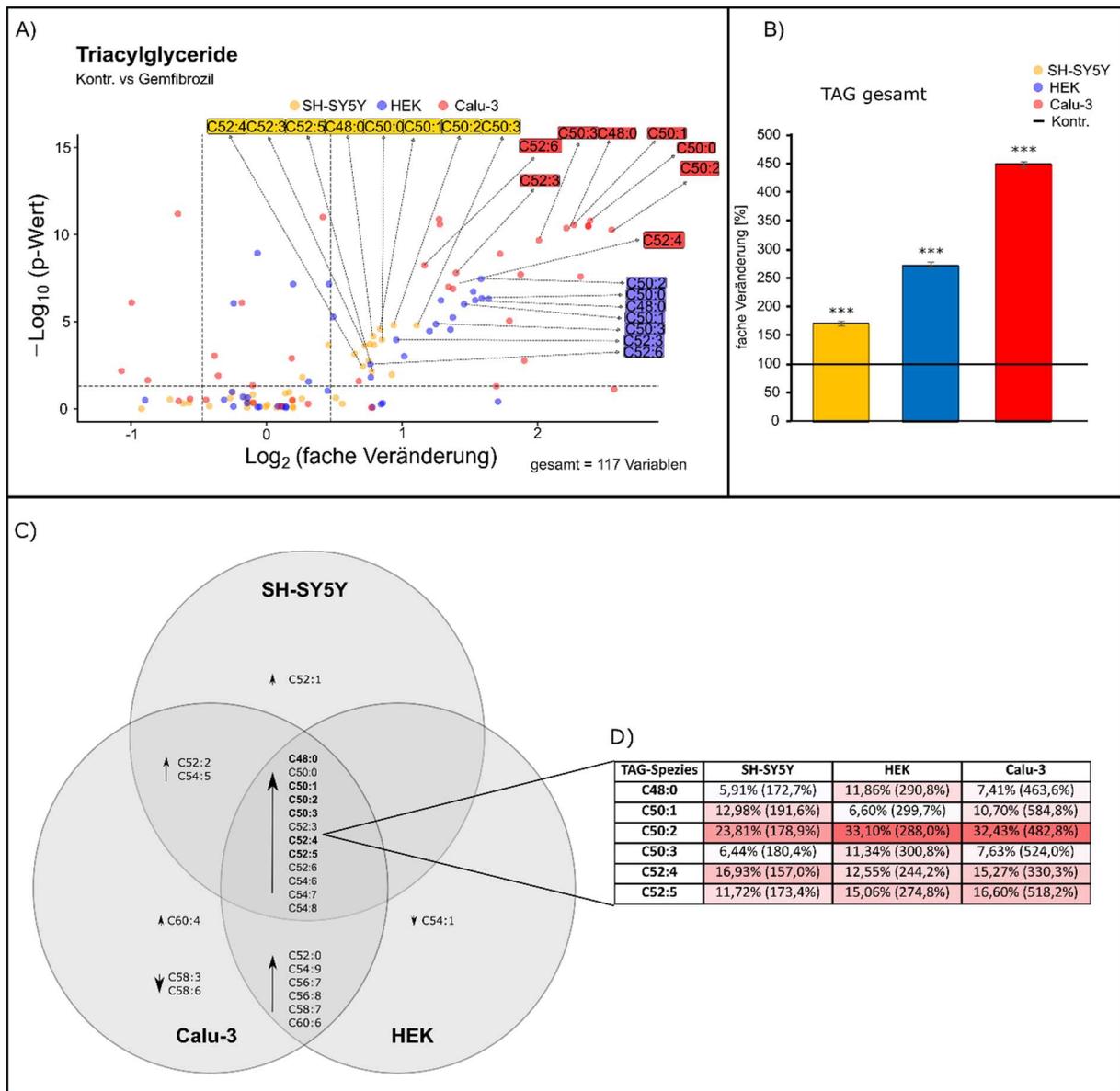


Abbildung 21: Effekte von Gemfibrozil auf Triglycerid-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) Spiegel an TAG-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung (n=8) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils n=7) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.3 zu entnehmen. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleicht die mit Gemfibrozil behandelten Zelllinien mit den jeweiligen Kontrollgruppen, die in Form einer horizontalen Linie dargestellt sind und auf 100 % gesetzt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne geben die statistische Signifikanz, berechnet durch den ungepaarten Students-t-Test wieder, wobei *** $p < 0,001$ gilt. (C) Venn-Diagramm mit allen statistisch signifikant veränderten TAG-Spezies in den jeweiligen Zelllinien im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. (D) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten TAG-Spezies, die prozentual am häufigsten vertreten sind. Die jeweiligen Effektgrößen sind in Klammern angegeben. Abbildung abgeändert nach [11].

4.2.4.1.2 Carnitine

Carnitine stellen den Transport langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran ins Mitochondrium sicher und spielen deswegen eine essenzielle

Rolle im zellulären Energiemetabolismus [230]. Da Gemfibrozil einen massiven intrazellulären Triglycerid-Anstieg in den untersuchten Zellreihen induzierte, folgte daraufhin eine genaue Betrachtung der unterschiedlichen Carnitin-Spezies. Hierbei zeigte das Verhalten der Carnitin-Spezies in den neuronalen Zellen deutliche Unterschiede im Vergleich zu denjenigen Spezies in HEK- und Calu-3 Zellen.

In den mit Gemfibrozil behandelten SH-SY5Y-Zellen fiel bei der Analyse der gesamten Carnitin-Spezies im Volcano Plot eine ausnahmslos nach rechts verlagerte Hochregulation auf (siehe Abbildung **22 A**). Bei genauerer Betrachtung der Hauptvertreter der Carnitin-Spezies ist eine Erhöhung der beiden Endprodukte C02 und C03 zu erkennen, wobei C02 auf $115,9 \% \pm 9,7 \%$ ($p \leq 0,318$) und C03 signifikant auf $140,2 \% \pm 10,1 \%$ ($p \leq 0,05$) erhöht war. Ebenfalls signifikant erhöht war das Verhältnis von $(C16+C18)/C2$ auf $113,6 \% \pm 2,9 \%$ ($p \leq 0,01$). Die Summe aller Acylcarnitine ($CX (X>3)$) war insgesamt auf $130,7 \% \pm 10,7 \%$ ($p = 0,112$) erhöht (Abbildung **22 B**).

Da das Verhältnis von $(C16+C18)/C2$ ein aussagekräftiges Maß für den Ablauf der β -Oxidation darstellt, kann durch die signifikante Hochregulation dieses Verhältnisses Rückschluss auf eine vermehrt ablaufende Fettsäure-Oxidation als Reaktion auf die intrazelluläre TAG-Zunahme gezogen werden. Generell ließ sich eine Hochregulation aller Carnitine in SH-SY5Y Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung feststellen, was auf einen vermehrten Verbrauch in Form der durch die TAG bereitgestellten Fettsäuren schließen lässt und somit als eine vermehrte Energiebereitstellung im neuronalen Gewebe interpretiert werden kann.

Im Gegensatz dazu war die Verteilung der Carnitin-Spezies in HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung sehr heterogen (siehe Abbildung **22 C**). Während C0, als Haupt-Carrier der Fettsäuren sowohl in Calu-3 als auch in HEK-Zellen kaum verändert war, so war insbesondere bei der Spezies C03 eine signifikante Verringerung auf $57,7 \% \pm 10,1 \%$ ($p \leq 0,001$) in HEK-Zellen und auf $73,6 \% \pm 10,1 \%$ ($p = 0,155$) in Calu-3 zu verzeichnen (siehe Abbildung **22 D**). Es war aufgrund dieser heterogenen Verteilung nicht davon auszugehen, dass die durch den massiven intrazellulären Triglycerid-Anstieg angesammelten Fettsäuren zum Energieverbrauch genutzt werden, sondern eher eine vermehrte Ansammlung der TAG in Lipidtröpfchen vorstellbar ist. Verglichen zum Verhalten der Carnitin-Spezies in SH-SY5Y-Zellen war in der renalen und in der pulmonalen Zellreihe keine starke Erhöhung zu beobachten.

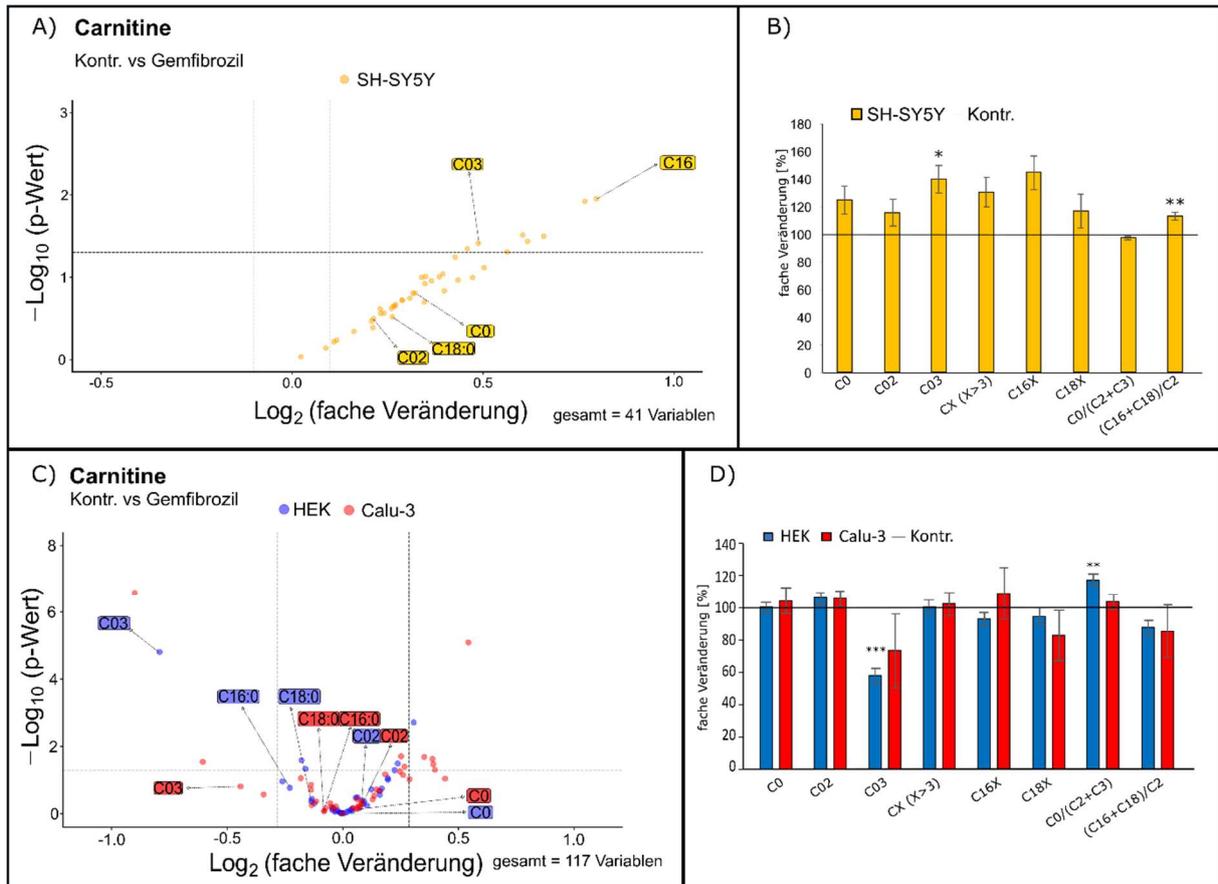


Abbildung 22: Effekte von Gemfibrozil auf Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) und (C) Spiegel an Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung (n=8) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils n=7) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.2 zu entnehmen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler und Sterne geben die statistische Signifikanz, berechnet durch den ungepaarten Students-t-Test wieder, wobei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. (B) und (D) Die Säulendiagramme zeigen die relative Verteilung ausgewählter Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen (B) und HEK WT- und Calu-3 Wt-Zellen (D) nach Gemfibrozil-Behandlung im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe, die als horizontale Linie dargestellt ist und auf 100 % gesetzt wurde. Abbildung abgeändert nach [11].

4.2.4.2 Einfluss auf Phospholipide

4.2.4.2.1 Phosphatidylcholine

Wie ebenfalls schon detailliert in Kapitel **4.1.2.1.2** erläutert, stellen Phosphatidylcholine mit 30-35 % den Hauptanteil der Phosphoglyceride in biologischen Membranen dar [268]. Neben dieser und weiterer Funktionen, stellen PCaa-Spezies als Monolayer die hydrophile Komponente der Membran der intrazellulären Lipidtröpfchen dar [316]. Diese Lipidtröpfchen bilden sich durch Sequestrierung am Endoplasmatischen Retikulum. Ihr Kern besteht vorrangig aus Triglyceriden und verestertem Cholesterin, während die Membran zu einem Großteil aus Phosphatidylcholinen besteht. Da der massive intrazelluläre TAG-Anstieg in allen drei Zellreihen zu einer vermehrten Ansammlung von intrazellulären Lipidtröpfchen führt, ist das Verhalten der PCaa-Spezies innerhalb der drei Zellreihen von besonderem Interesse. Bei der Gruppenanalyse der in der vorliegenden Arbeit 43 untersuchten PCaa-Spezies war im Volcano Plot eine leichte Rechtsverschiebung vom Großteil aller PCaa-Spezies über alle drei Zelllinien hinweg festzustellen (siehe Abbildung **23 A**). Bei Betrachtung der ungewichteten Effektstärken der drei Zellreihen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen zeigte sich in Abbildung **23 B** analog zum jeweiligen zellspezifischen TAG-Anstieg auch ein Anstieg der Gesamt-PCaa-Spezies (Calu-3 > HEK > SH-SY5Y). In den mit Gemfibrozil behandelten SH-SY5Y Wt-Zellen kam es verglichen zu der mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe zu einem Anstieg der PCaa-Spezies auf $103,0 \% \pm 5,0 \%$ ($p = 0,662$) und in HEK Wt-Zellen auf $118,1 \% \pm 4,9 \%$ ($p = 0,108$). In Calu-3 Wt-Zellen führte die Behandlung mit Gemfibrozil zu einem signifikanten Anstieg der PCaa-Gesamtspezies auf $127,6 \% \pm 6,8 \%$ ($p \leq 0,05$). Auf den ersten Blick erschien die vergleichsweise geringe Erhöhung der PCaa-Spezies nicht in Verbindung zum massiven Anstieg der Triglyceride zu stehen, bei der räumlichen Vorstellung der Ansammlung der Lipidtröpfchen wird diese Korrelation jedoch verständlicher. Da es sich bei der Ansammlung der TAG im Inneren der Lipidtröpfchen um eine Ansammlung im dreidimensionalen Raum handelt, also eine Ausbreitung in drei Ebenen, kommt es zu einem massiven Anstieg der TAG-Spezies in der massenspektrometrischen Analyse. Im Vergleich dazu bildet der aus PCaa-Spezies bestehende Monolayer als Hülle der Lipidtröpfchen um den hydrophoben Kern eine Ausbreitung im zweidimensionalen Raum. Dadurch ist die Erhöhung der PCaa-Spezies trotz vermehrter LD-Ansammlung nicht analog zur TAG-Erhöpfung zu erwarten.

Die PCaa-Spezies C34:1 stellte in allen drei Zell-Linien die am häufigsten vorkommende Spezies innerhalb der Klasse der Phosphatidylcholine (siehe Abbildung **23 C**) dar.

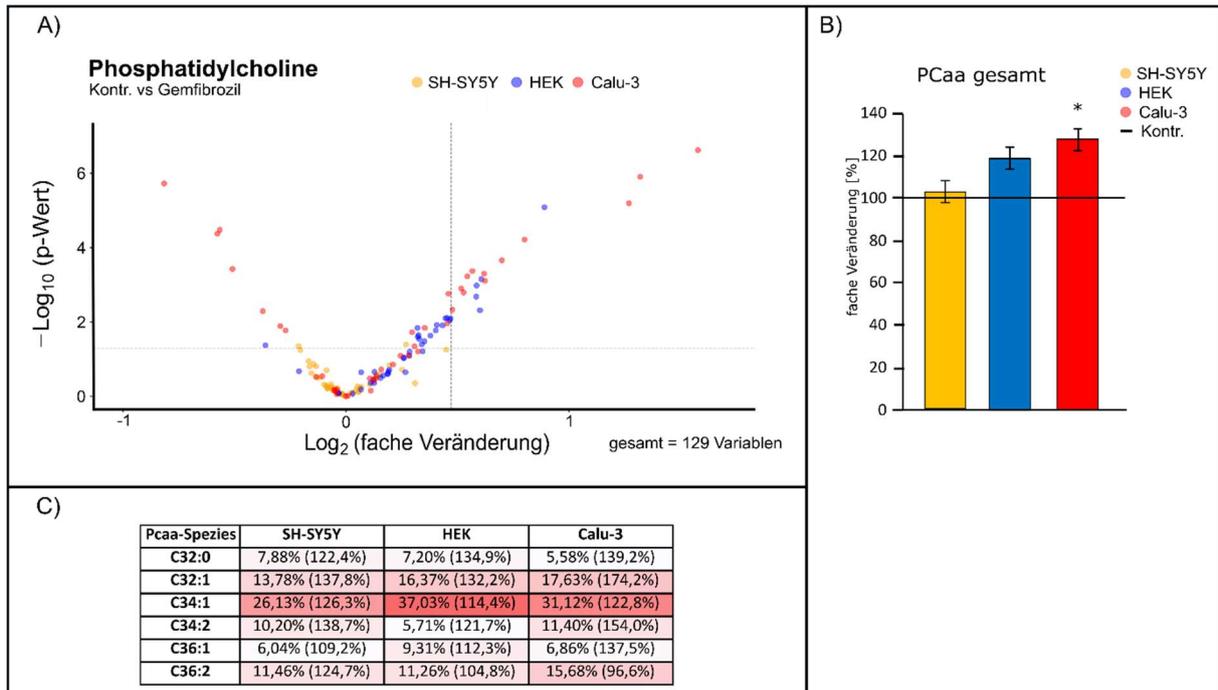


Abbildung 23: Effekte von Gemfibrozil auf Phosphatidylcholin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) Spiegel an Pcaa-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung (n=8) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils n=7) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.2 zu entnehmen. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relative Verteilung aller Pcaa-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen-, HEK WT- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe wird in einem Säulendiagramm verdeutlicht. Die Kontrollgruppen wurden als horizontale Linie dargestellt und auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne verdeutlichen das Signifikanzniveau, welches mittels ungepaartem Students-t-Test ermittelt wurde und * $p \leq 0,05$ gilt. (C) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten Pcaa-Spezies, die prozentual am häufigsten vertreten sind. Die jeweiligen Effektgrößen sind in Klammern angegeben. Abbildung abgeändert nach [11].

4.2.4.2.2 Phosphatidylcholin-Plasmalogene

Als zweiter wichtiger Baustein der biologischen Membranen und *second messenger* wird im Folgenden der Einfluss von Gemfibrozil auf die Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen ausgewertet. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede innerhalb der drei untersuchten Zelllinie. Die Ergebnisse waren im Volcano Plot durch die Verteilung jeder einzelnen Spezies der Plasmalogene dargestellt (Abbildung 24 A). Auffällig war, dass eine Vielzahl der PCae-Spezies in Calu-3-Zellen nach links oberhalb des Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ und außerhalb des mittleren Standardfehlers verschoben waren. Im Vergleich dazu war eine homogene Verteilung der PCae-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen nach rechts zu beobachten. Während der Gesamtanteil der PCae-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen auf $129,9 \% \pm 12,5 \%$ ($p = 0,159$) ansteigt, führte die Behandlung von Calu-3-Zellen mit Gemfibrozil zu einer signifikanten Abnahme der PCae-Spezies auf $84,4 \% \pm 6,3 \%$ ($p \leq 0,05$). In HEK-Zellen hatte die Inkubation mit Gemfibrozil verglichen zur Kontrollgruppe, die nur mit Lösungsmittel behandelt wurde, keinen Einfluss auf das Verhalten der PCae-Spezies: $98,1 \% \pm 3,8 \%$ ($p = 0,833$) (siehe Abbildung 24 B).

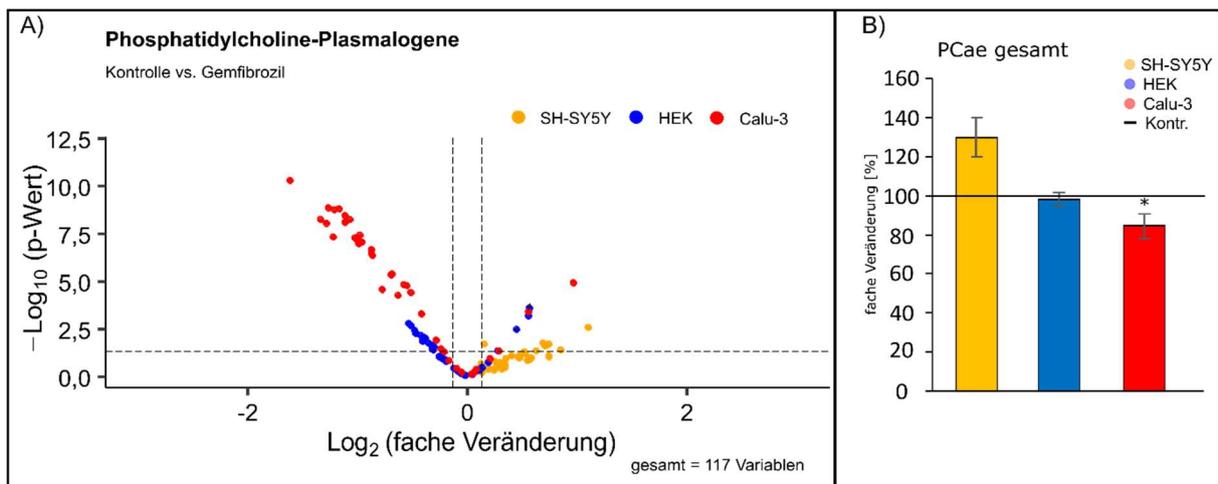


Abbildung 24: Effekte von Gemfibrozil auf Phosphatidylcholin-Plasmalogenespezies in SH-SY5Y WT-, HEK WT- und Calu-3 WT-Zellen. (A) Spiegel an PCae-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung ($n=8$) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils $n=7$) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.2 zu entnehmen. (B) Die relative Verteilung aller PCae-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen-, HEK WT- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe, die als horizontale Linie dargestellt ist und auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne verdeutlichen das Signifikanzniveau, welches mittels ungepaartem Students-t-Test ermittelt wurde und $* p \leq 0,05$ gilt. (C) Die Tabelle repräsentiert eine Auswahl von Vertretern der wichtigsten PCaa-Spezies, die prozentual am häufigsten vertreten sind. Die jeweiligen Effektgrößen sind in Klammern angegeben. Abbildung abgeändert nach [11].

4.2.4.2.3 Lyso-Phosphatidylcholine

Bei Betrachtung der 22 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies in den drei Zellreihen nach Behandlung mit Gemfibrozil war ein zellreihenübergreifender Effekt zu erkennen. In allen drei Zellreihen führte Gemfibrozil zu einer Zunahme der Lyso-PC-Spezies. Mit Blick auf das gruppenspezifische Verhalten der Spezies in den unterschiedlichen Zelllinie war im Volcano Plot eine deutliche Rechts-Verlagerung zahlreicher Spezies über alle drei untersuchten Zellreihen hinweg zu erkennen (siehe Abbildung 25 A). In SH-SY5Y Wt-Zellen kam es zu einem tendenziellen Anstieg der ungewichteten Effektstärke, welche in Form des Säulendiagramms in der Abbildung 25 B dargestellt ist, auf $121,0 \% \pm 12,4 \%$ ($p \leq 0,291$), in HEK Wt-Zellen signifikant auf $126,8 \% \pm 2,7 \%$ ($p \leq 0,01$) und in Calu-3-Zellen signifikant auf $143,2 \% \pm 10,8 \%$ ($p \leq 0,05$).

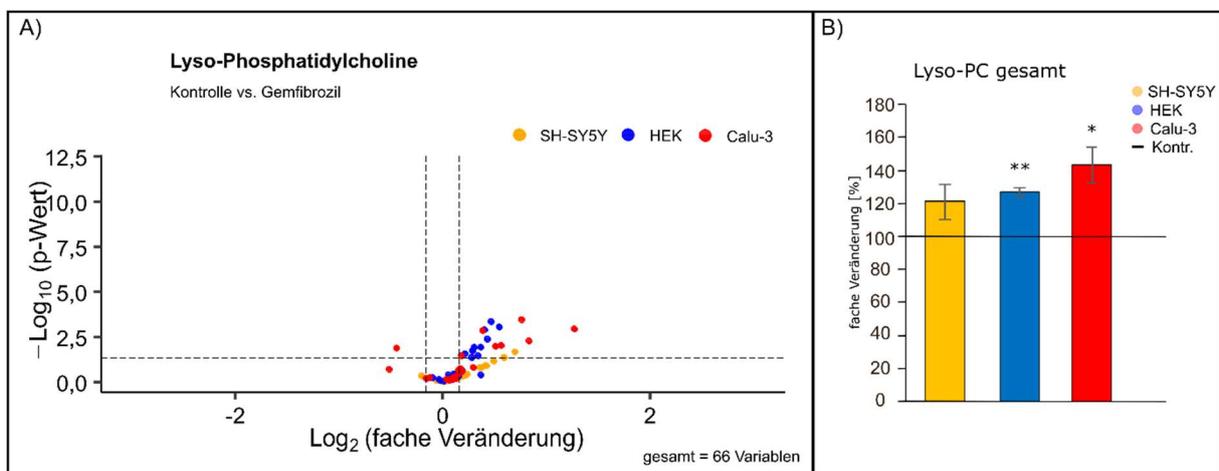


Abbildung 25: Effekte von Gemfibrozil auf Lyso-Phosphatidylcholinspezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) Spiegel an Lyso-PC-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung ($n=8$) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils $n=7$) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.2 zu entnehmen. (B) Das Säulendiagramm zeigt die relative Verteilung aller Lyso-PC-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe, die als horizontale Linie dargestellt ist und auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne verdeutlichen das Signifikanzniveau, welches mittels ungepaartem Students-t-Test ermittelt wurde und * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gilt. Abbildung abgeändert nach [11].

4.2.4.2.4 Sphingomyeline

Da Sphingomyeline vor allem in Neuronen eine wichtige Funktion übernehmen, wurde im Folgenden ihre Verteilung, in erster Linie in SH-SY5Y Wt-Zellen, aber auch in HEK- und Calu-3-Zellen, nach Gemfibrozil-Behandlung ausgewertet. Die Verteilung der Spezies innerhalb einer Zelllinie war mit Blick auf die Analyse des Volcano Plots in Abbildung 26 A sehr heterogen. Bei der Betrachtung der ungewichteten Effektstärke fiel in allen drei Zellreihen eine Zunahme der SM-Spiegel auf, welche in den SH-SY5Y Wt-Zellen mit $128,6 \% \pm 10,2 \%$ ($p = 0,116$) am höchsten war. In HEK-Zellen führte Gemfibrozil zu einer Zunahme aller SM-Spezies auf $121,0 \% \pm 3,5 \%$ ($p \leq 0,05$) und in Calu-3-Zellen auf $110,8 \% \pm 7,0 \%$ ($p = 0,237$) (siehe Abbildung 26 B).

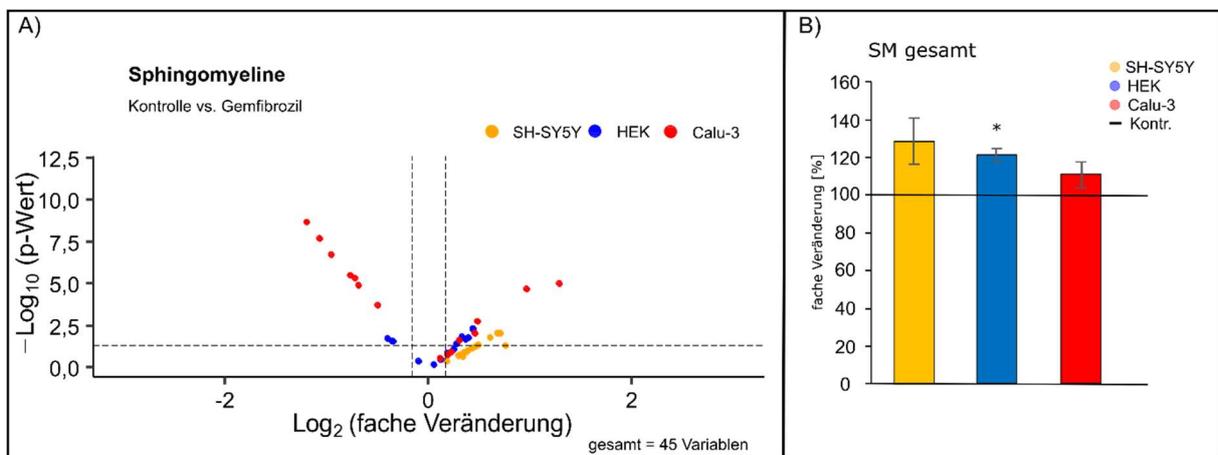


Abbildung 26: Effekte von Gemfibrozil auf Sphingomyelin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen. (A) Spiegel an SM-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung ($n=8$) verglichen zu denjenigen Spiegeln der jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe (jeweils $n=7$) sind in einem Volcano Plot dargestellt. Eine genaue Beschreibung ist Kapitel 3.2.5.3 zu entnehmen. **(B)** Die relative Verteilung aller SM-Spezies in SH-SY5Y Wt-Zellen-, HEK WT- und Calu-3 Wt-Zellen nach Gemfibrozil-Behandlung im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe dargestellt in einem Säulendiagramm. Die horizontale Linie stellt die Kontrollen dar und ist auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne verdeutlichen das Signifikanzniveau, welches mittels ungepaartem Students-t-Test ermittelt wurde und * $p \leq 0,05$ gilt. Abbildung abgeändert nach [11].

4.3 Der Einfluss von Methylxanthinen auf die Genexpression von Alzheimer-relevanten Genen in SH-SY5Y-Zellen

Interessanterweise zeigte die Inkubation von Gemfibrozil auf Nervenzellen einen protektiven Effekt auf die Lipidkomposition in Bezug auf die Genese der Alzheimer-Erkrankung. Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von Methylxanthinen auf die Genexpression von Alzheimer-relevanten Genen in Nervenzellen.

In einer Studie von Janitschke *et al.* aus dem Jahr 2019 konnte der protektive Einfluss der Methylxanthine Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung mechanistisch näher erklärt werden [124]. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Methylxanthine (Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin) eine Reduzierung der A β -Spiegel bedingten, indem nach Anwesenheit der Methylxanthine eine Verlagerung der Spaltung des APP vom A β -produzierenden amyloidogenen Weg auf den nicht-amyloidogenen Weg stattfand. Die Aktivität der α -Sekretase wurde erhöht, indem Koffein die Proteinstabilität der wichtigen α -Sekretase ADAM10 erhöht und gleichzeitig die Expression von BACE1 reduziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass analog zur Literatur alle Methylxanthine den oxidativen Stress, den Cholesterinspiegel in Nervenzellen und die A β 1-42-Aggregation verringerten [124]. Diese Erkenntnisse ergänzend, ist mittlerweile bekannt, dass Methylxanthine über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Transkription nehmen. Die natürlich vorkommenden Methylxanthine (Koffein, Theobromin und Theophyllin) binden dosisabhängig über Wasserstoffbrückenbindungen an alle Basenpaare der nativen Doppelhelix-DNS [128]. Koffein und Theophyllin können über die Inhibition spezifischer Kinasen, die für die retrovirale DNS-Integration unabdingbar sind, die Replikation des humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) unterdrücken [215]. Theophyllin kann in hohen Dosen die Aktivität der Histon-Deacetylasen erhöhen. Über die Regulierung dieser Acetylasen kann die Transkription von Entzündungsgenen, wie beispielsweise in Epithelzellen oder Makrophagen, reguliert werden [121].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern Methylxanthine auf die Transkription Alzheimer-relevanter Genen wirken. Des Weiteren wurde untersucht, ob es einen linearen Effekt über alle Methylxanthine hinweg gibt oder ob Unterschiede in der Transkription innerhalb der Methylxanthine vorliegen. Dafür wurden SH-SY5Y-Zellen mit 100 μ mol/l entsprechendem Methylxanthin (Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin oder Pentoxifyllin) für 24 Stunden inkubiert und anschließend mittels RT-qPCR bezüglich ihrer transkriptionellen Effekte auf AD-relevante Gene analysiert und ausgewertet.

Die Ergebnisse, die sich mit der Veränderung von AD-relevanten Genen durch den Einfluss von Methylxanthinen beschäftigen, wurden im *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI Verlag, *Impact Factor* dieser Zeitschrift Stand Juni 2023: 6,208) veröffentlicht:

Bachmann CM*, Janitschke D*, Lauer AA*, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Unique Role of Caffeine Compared to Other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD Relevant Genes in Neuroblastoma SH-SY5Y Wild Type Cells*. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 27;21(23):9015. doi: 10.3390/ijms21239015. PMID: 33260941; PMCID: PMC7730563.

*diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

4.3.1 Auswahl der Alzheimer-relevanten Gene

Es wurde sich bei der Auswahl der für die Alzheimer-Erkrankung relevanten Gene auf eine Beteiligung derer an bestimmten Signalwegen orientiert. Dabei wurden fünf Signalwege, die bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sind, identifiziert. Neben oxidativem Stress waren dies Gene, die am Lipid- und Energiemetabolismus der Zelle, an der Signaltransduktion und Genexpression, an der A β - und Taupathologie und Neuroinflammation beteiligt sind und weitere neuronale Gene (siehe Abbildung 27). Dafür erfolgte im Vorfeld eine Literaturrecherche über *pubmed* zur Identifikation einzelner Gene, die in die oben genannten Signalwege involviert sind. Es konnten insgesamt 83 Gene, auf fünf Signalwege aufgeteilt, gefunden werden. In der Abbildung 27 ist das Design der Studie schematisch dargestellt.

Nach der Auswahl der zu analysierenden Gene erfolgte die Inkubation von SH-SY5Y, Hep-G2- und Calu-3 Zellen (n=4) mit den entsprechenden Methylxanthinen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ oder der mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe für 24 Stunden (8 + 16h). Nach entsprechender Prozessierung der Zellen (Kapitel 3.2.1.5 und 3.2.1.7) erfolgte die Analyse der Proben mittels RT-qPCR. Mithilfe des *NormFinder*-Algorithmus wurden die fünf optimalen *housekeeping*-Gene für jede Zellreihe zur Normalisierung der zu analysierenden Gene ausgewählt.

Die Auswertung der 83 Gene erfolgte in Form einer *Heatmap*, um alle Effekte der einzelnen Methylxanthine im Vergleich zur Kontrollgruppe darzustellen. Anschließend erfolgte anhand einer Hauptkomponentenanalyse eine Untersuchung der Effekte innerhalb der einzelnen Methylxanthine, um sowohl Überschneidungen als auch Alleinstellungen darzustellen. Um die erhaltenen Effekte auch in anderen Zellreihen zu untersuchen, erfolgte im Anschluss eine Analyse ausgewählter Gene in Hep-G2- und Calu-3-Zellen. Außerdem wurden dosisabhängige Untersuchungen der Methylxanthine in SH-SY5Y-Zellen durchgeführt, um zu ermitteln, ab welcher Dosierung die Effekte auftreten. Dafür erfolgte die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 12,5 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$ und 50 $\mu\text{mol/l}$.

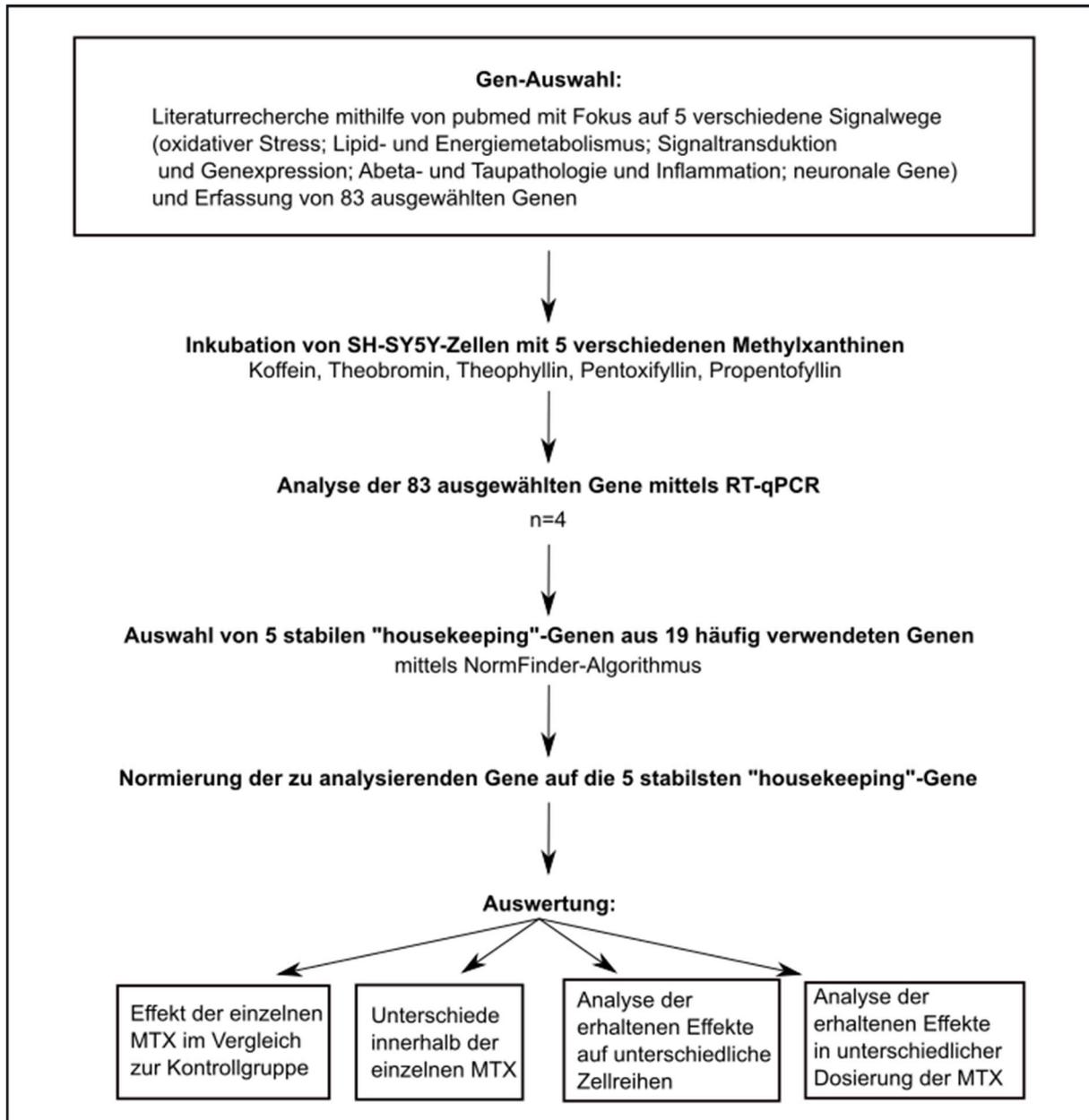


Abbildung 27: Schematischer Ablauf zur Untersuchung des transkriptionellen Effektes von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf SH-SY5Y-, Hep-G2- und Calu-3-Zellen. MTX: Methylxanthin. Abbildung abgeändert nach [125].

Die 83 analysierten Gene sind in Tabelle 38 ihren entsprechenden Signalwegen zugeordnet.

Tabelle 38: Auflistung aller 83 analysierten Gene und ihre Zugehörigkeit zum entsprechenden Stoffwechselweg.

Signalweg	Gen	Signalweg	Gen	
oxidativer Stress:	<i>CAT</i> (Catalase)	Lipid- und Energie-metabolismus:	<i>ABCA1</i> (ATP-binding cassette, subfamily A, member 1)	
	<i>GPX1</i> (Glutathion peroxidase 1)		<i>ACAT1</i> (Acetyl-CoA acetyltransferase 1)	
	<i>GPX3</i> (Glutathion peroxidase 2)		<i>APOA1</i> (apolipoprotein A-1)	
	<i>GPX7</i> (Glutathion peroxidase 7)		<i>HMGCR</i> (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)	
	<i>NQO1</i> (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1)		<i>APOE</i> (Apolipoprotein E)	
	<i>NUDT12</i> (Nudix type motif 15)		<i>HADH2</i> (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II)	
	<i>PARK7</i> (Parkinsonism associated deglycase)		<i>LRP6</i> (Low density lipoprotein receptor-related protein 6)	
	<i>PPP1R15B</i> (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B)		<i>LPL</i> (lipoprotein lipase)	
	<i>PRDX1</i> (Peroxiredoxin 1)		<i>INSR</i> (Insulin receptor)	
	<i>PRDX2</i> (peroxiredoxin 2)		<i>PRKAA1</i> (Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit)	
	<i>PRDX6</i> (Peroxiredoxin 6)		<i>PRKAA2</i> (Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit)	
	<i>SOD1</i> (Superoxide dismutase 1)		<i>ERN1</i> (Endoplasmatic reticulum to nucleus signaling 1)	
	<i>TXNIP</i> (Thioredoxin interacting Protein)		<i>CLU</i> (Clusterin)	
	<i>TXNRD2</i> (Thioredoxin reductase 2)		<i>AASS</i> (Aminoaldehyde synthase)	
	<i>UCP3</i> (uncoupling protein 3)		Aβ- und Tauopathie und Neuro-inflammation:	<i>CDKL1</i> (Cyclin-dependent kinase-like 1)
	<i>UQCRC1</i> (ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1)			<i>GAP43</i> (Growth associated protein 43)
	<i>UQCRC2</i> (ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2)			<i>GSK3a</i> (Glycogen synthase kinase 3 alpha)
	<i>CDK5</i> (cyclin-dependent kinase 5)			<i>GSK3b</i> (Glycogen synthase kinase 3 beta)
	<i>DUOX1</i> (dual oxidase 1)			<i>APBA1</i> (APP binding, family A, member 1)
	<i>IDH1</i> (isocitrate dehydrogenase 1 (NADP ⁺))			<i>APBA3</i> (APP binding, family A, member 3)
<i>ERCC2</i> (ERCC excision repair 2 TFIIH core complex helicase subunit)	<i>APBB1</i> (APP binding, family B, member 1)			
<i>ERCC6</i> (ERCC excision repair 6, chromatin remodeling factor)	<i>APBB2</i> (APP binding, family B, member 2)			

Signaltrans- duktion und Gen- expression:	<i>XPA</i> (xeroderma pigmentosum, complementation group A)	<i>APPBP1/NAE1</i> (APP binding protein 1)
	<i>PRKCA</i> (Protein kinase C, alpha)	<i>UBQLN1</i> (ubiquitin 1)
	<i>PRKCD</i> (Protein kinase C, delta)	<i>APH1a</i> (aph1 homolog A, gamma secretase subunit)
	<i>PRKCE</i> (Protein kinase C, epsilon)	<i>APH1b</i> (aph1 homolog B, gamma secretase subunit)
	<i>PRKCG</i> (Protein kinase C, gamma)	<i>CTSB</i> (cathepsin B)
	<i>PRKCQ</i> (Protein kinase C, theta)	<i>CSTL</i> (cathepsin L)
	<i>PRKCZ</i> (Protein kinase C, zeta)	<i>PSENEN</i> (presenilin enhancer, gamma secretase subunit)
	<i>ALS2</i> (alsin Rho guanine nucleotide exchange factor)	<i>A2M</i> (alpha-2-macroglobulin)
	<i>GNAO1</i> (G protein subunit alpha o1)	<i>ECE1</i> (endothelin converting enzyme 1)
	<i>GNB1</i> (Guanine nucleotide binding protein (G-protein) beta polypeptide 1)	<i>ECE2</i> (endothelin converting enzyme 2)
	<i>GNB2</i> (Guanine nucleotide binding protein (G-protein) beta polypeptide 2)	<i>LRP1</i> (low density lipoprotein receptor-related protein 1)
	<i>EP300</i> (E1A (adenovirus early region 1A) binding protein p300)	<i>MMP2</i> (matrix metalloproteinase 2)
	<i>HDAC1</i> (Histone deacetylase 1)	<i>PKP4</i> (plakophilin 4)
	neuronale Gene:	<i>PRNP</i> (prion protein)
<i>MAP2</i> (Microtubule-associated protein 2)	<i>SNCA</i> (synuclein, alpha)	
<i>MAPT</i> (Microtubule-associated protein tau)	<i>CASP4</i> (Caspase 4)	
<i>PLAU</i> (Plasminogen activator, urokinase)	<i>IL1A</i> (Interleukin1, alpha)	
<i>PLAT</i> (Plasminogen activator, tissue)	<i>SH2D3C/CHAT</i> (SH2 domain containing 3C)	
<i>ACHE</i> (Acetylcholinesterase)		
<i>BDNF</i> (Brain-derived neurotrophic factor)		

4.3.2 Auswahl der *housekeeping*-Gene

Der Begriff *housekeeping*-Gen wurde in Kapitel **3.2.1.14** eingehend definiert und erläutert. Das unverzichtbare Merkmal eines *housekeeping*-Gens stellt die konstante Expression sowohl unter Versuchs- als auch unter Kontrollbedingungen dar. Um herauszufinden, welche *housekeeping*-Gene unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht durch Methylxanthine beeinflusst wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Vorauswahl an 19 verschiedenen, in der Literatur bekannten, HKG getroffen [231,304]. Zusätzlich zu einer stabilen Expression sollte das *housekeeping*-Gen auch ein vergleichbares Expressionsniveau wie das zu analysierende Gen aufweisen oder, wenn mehrere Gene untersucht wurden, einen breiten Expressionsniveaubereich abdecken. Hierzu wurde der in Kapitel **3.2.1.14** detailliert beschriebene *NormFinder*-Algorithmus verwendet. Um auch die zweite Bedingung zu erfüllen, variierten die Cq-Werte (engl.: *quantitation cycle*) der ausgewählten HKGs von 9,98 (*RN18S1*) bis 22,81 (*GPI*), wie in Abbildung **28 A** dargestellt.

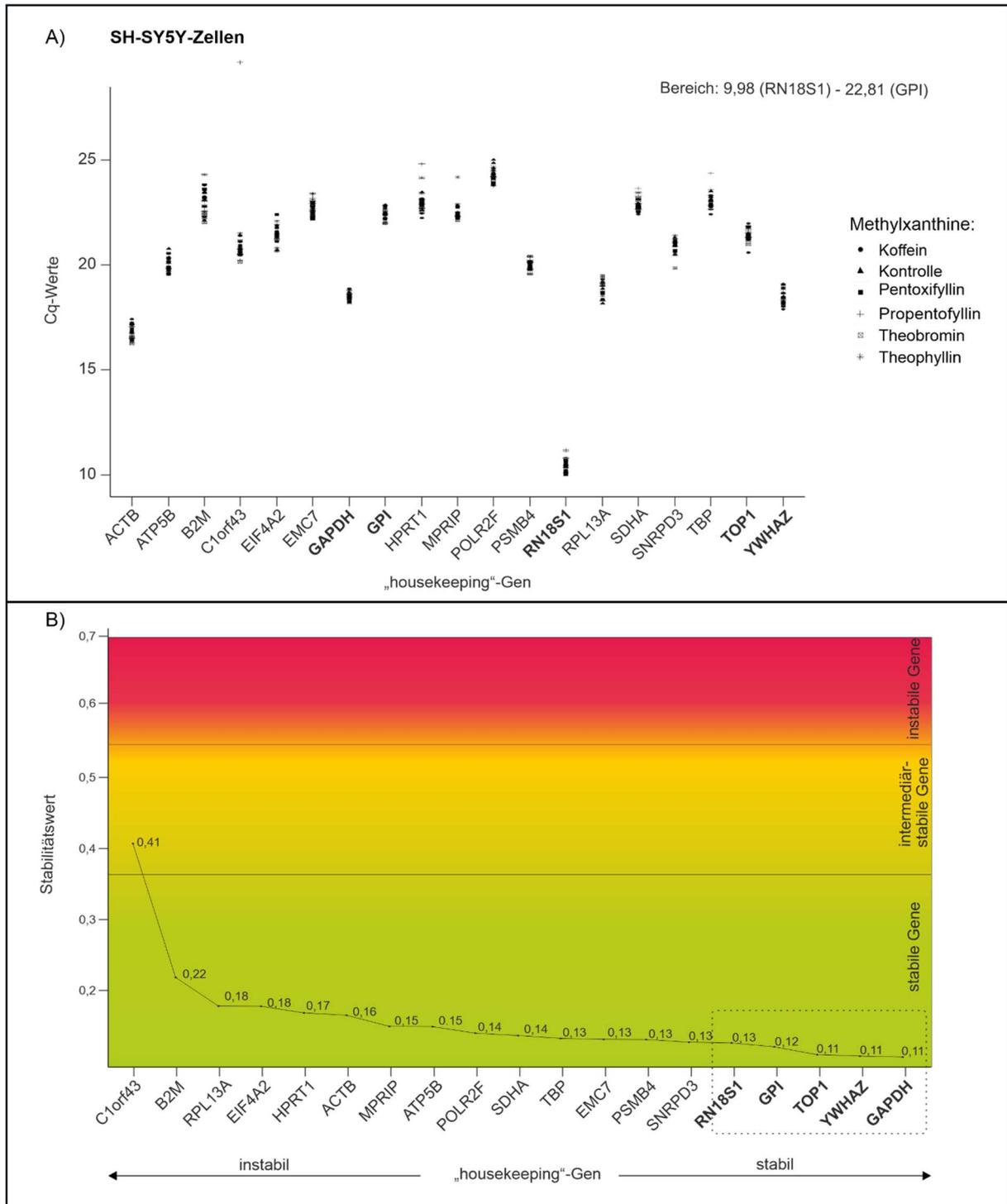


Abbildung 28: Auswahl der *housekeeping*-Gene zur Normalisierung in SH-SY5Y-Zellen. (A)

Expressionswerte der ausgewählten potenziellen HKG, angegeben in Form der mittels quantitativer RealTime-PCR-Cq-Werte in SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin, Pentoxifyllin oder der Lösungsmittelkontrolle. Die fünf stabilsten Gene sind in fett hervorgehoben. **(B)** Expressionsstabilitätswerte für die 19 potenziellen HKGs wurden mithilfe des *NormFinder*-Algorithmus berechnet und mithilfe von „R“ visualisiert. Die Klassifizierung der Stabilitätswerte in stabile Gene ($0 < \text{Stabilitätswert} < 0,37$; grün), intermediär-stabile Gene ($0,37 < \text{Stabilitätswert} < 0,53$; gelb) und instabile Gene ($0,53 < \text{Stabilitätswert} < 0,69$; rot) erfolgte in Übereinstimmung mit [231]. Anhand dieser Form der Betrachtung waren für SH-SY5Y-Zellen die fünf stabilsten HKG: *RN18S1*, *GPI*, *TOP1*, *YWHAZ* und *GAPDH*, hervorgehoben durch die gestrichelte Umrandung. Abb. abgeändert nach [125].

Um einen Stabilitätswert für jedes Gen berechnen zu können, wurde der *NormFinder*-Algorithmus angewendet. Anhand dessen ließ sich eine Rangfolge der analysierten Gene nach ihrer Stabilität aufstellen (siehe Abbildung **28 B**). Auf der Grundlage der Stabilitätswerte und des Expressionsniveaus wurden die fünf optimalen HKGs ausgewählt, die einen breiten Expressionsbereich für SH-SY5Y-Zellen abdeckten: *GAPDH*, *GPI*, *RN18S1*, *TOP1* und *YWHAZ*. Außerdem wichtig ist die Erkenntnis, dass die ausgewählten Gene an unterschiedlichen Stoffwechselwegen beteiligt sind. In diesem Fall waren die fünf ausgewählten Gene Bestandteile des Kohlenhydrat- oder Glukosestoffwechsels, der Transkription, der Proteinbiosynthese und der Signaltransduktion. Für die folgende Analyse wurden die durchschnittlichen Cq-Werte dieser fünf optimalen HKGs verwendet, um zufällige Veränderungen in den untersuchten Genen noch unwahrscheinlicher zu machen.

Um die erhaltenen Effekte in SH-SY5Y-Zellen auch auf andere Zellen übertragen zu können, fand eine zusätzliche Auswahl der optimalen HKG in Analogie zum oben beschriebenen Vorgehen in Calu-3 und Hep-G2-Zellen statt. Bei analoger Anwendung des *NormFinder*-Algorithmus zur Ermittlung der fünf optimalen HKG ergaben sich für Calu-3-Zellen folgende Gene: *YWHAZ*, *ACTB*, *PSMB4*, *ATP5B* und *SDHA* (siehe Abbildung **29 A** und **B**). Im Vergleich dazu konnten für Hep-G2-Zellen die Gene *SNRPD3*, *ATP5B*, *SDHA*, *ACTB* und *Elf4A2* ermittelt werden (siehe Abbildung **30 A** und **B**).

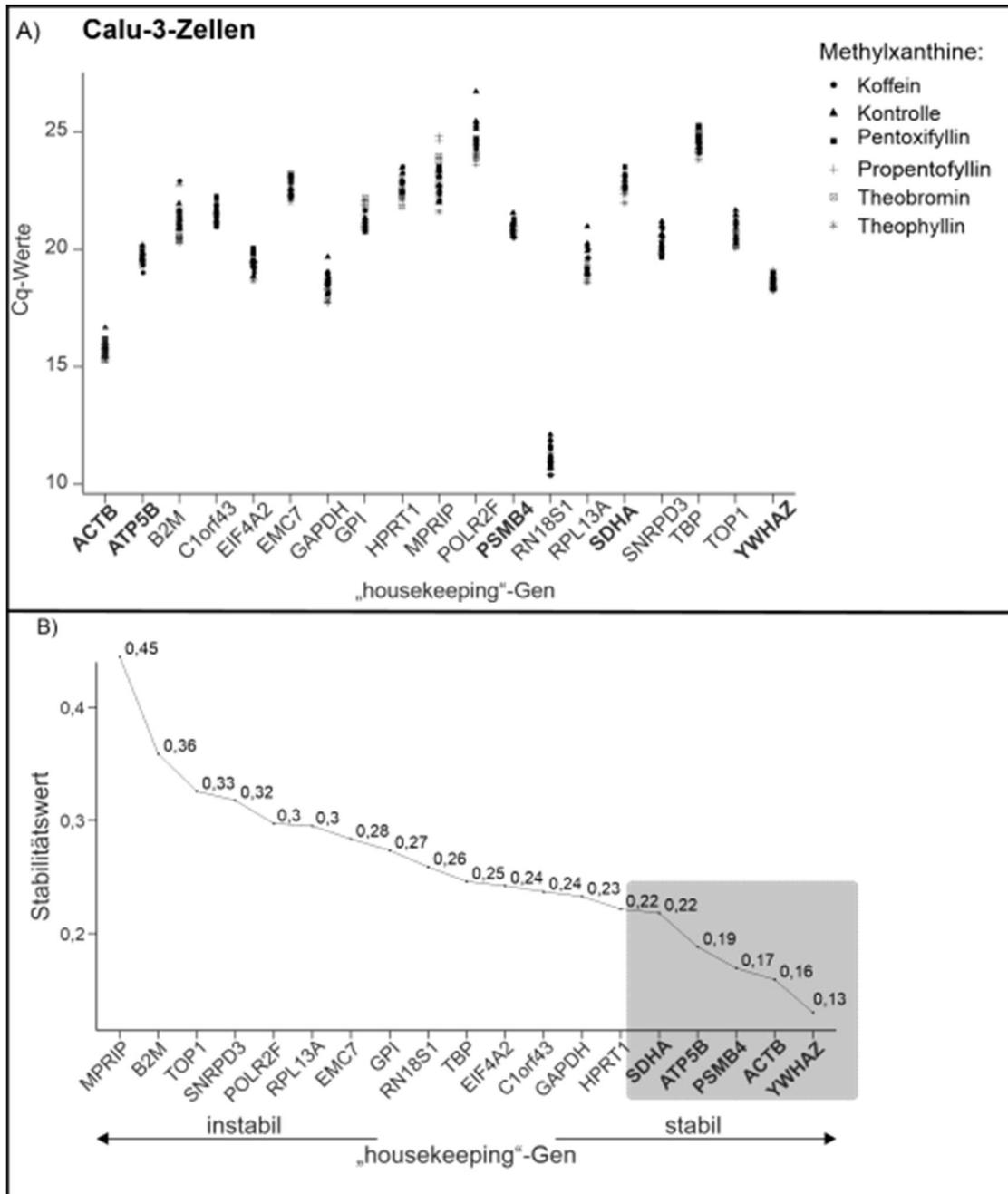


Abbildung 29: Auswahl der *housekeeping*-Gene zur Normalisierung in Calu-3-Zellen. Analog zu in Abb. 27 beschrieben, erfolgte die Auswahl der optimalen HKGs anhand des Expressions- und Stabilitätswertes für die Gene in Calu-3-Zellen. **(A)** Expressionswerte der ausgewählten potenziellen HKG. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abb. 27. **(B)** Expressionsstabilitätswerte für die 19 potenziellen HKG, welche mithilfe des *NormFinder*-Algorithmus berechnet wurden. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abb. 27. Abb. abgeändert nach [125].

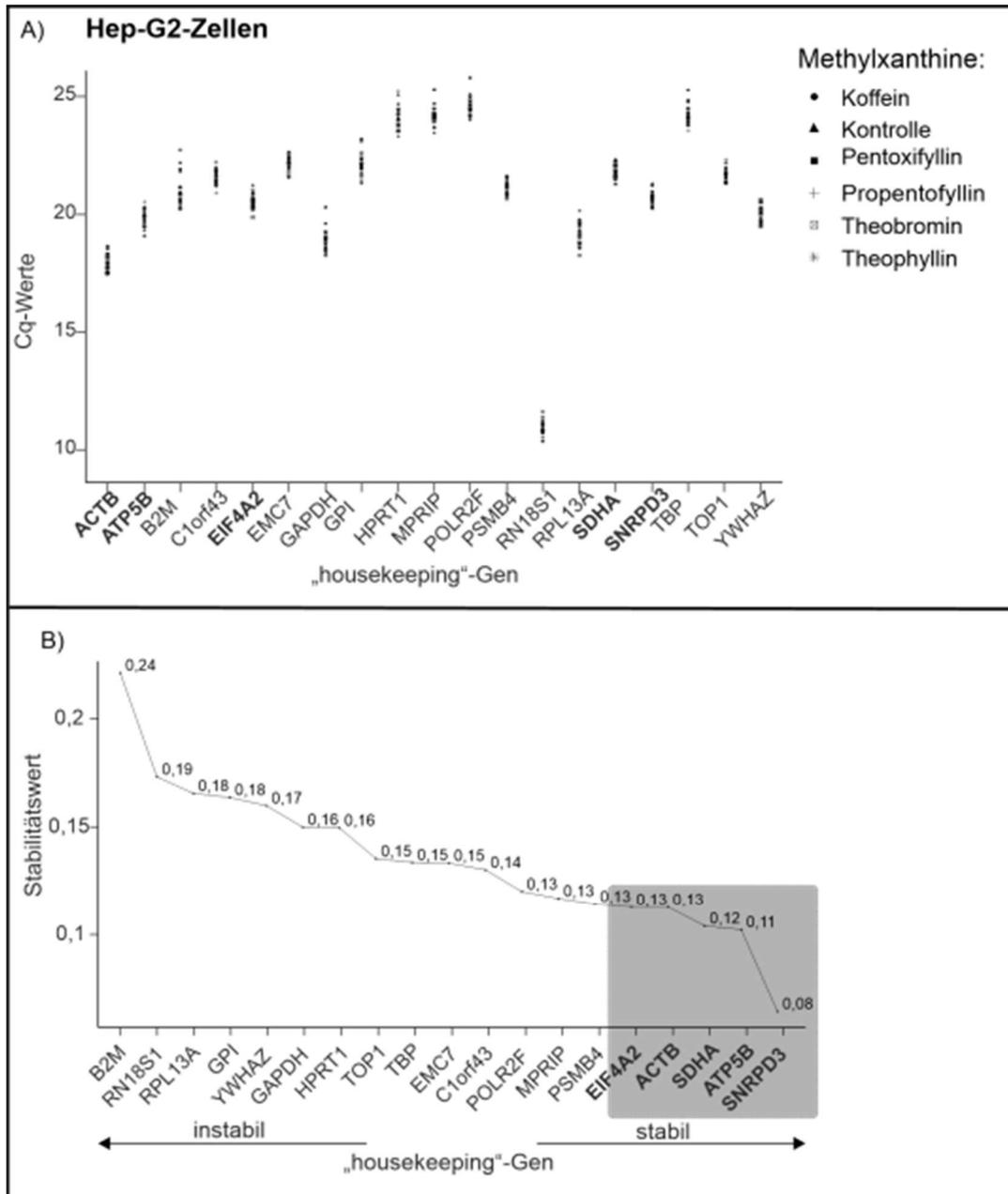


Abbildung 30: Auswahl der *housekeeping*-Gene zur Normalisierung in Hep-G2-Zellen. Wie in Abb. 27 beschrieben, erfolgte die Auswahl der optimalen HKG anhand des Expressions- und Stabilitätswertes für die Gene in Calu-3-Zellen. **(A)** Expressionswerte der ausgewählten potenziellen HKG. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abb. 27. **(B)** Expressionsstabilitätswerte für die 19 potenziellen HKG, welche mithilfe des *NormFinder*-Algorithmus berechnet wurden. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abb. 27. Abb. abgeändert nach [125].

4.3.3 Effekte von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf die Transkription in SH-SY5Y-Zellen

Wie oben bereits detailliert beschrieben, beeinflussen Methylxanthine die Genexpression über unterschiedliche Wirkweisen. Es wurden 83 Gene ausgewählt, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung stehen und über verschiedene Signalwege Einfluss nehmen. Die Gene und ihre Zugehörigkeit zum jeweiligen Signalweg sind Tabelle 38 zu entnehmen. Interessanterweise sind mehrere dieser Signalwege auch bei der Entstehung anderer Erkrankungen wie beispielsweise koronare Herzkrankheiten, Lungen- oder Lebererkrankungen involviert, von denen ebenfalls berichtet wird, dass sie durch Methylxanthine beeinflusst werden [220,251]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Methylxanthinen auf die Expression von Genen untersucht, die an transversalen biologischen Prozessen beteiligt sind. Dafür wurden in Abbildung 31 die Gene in die fünf genannten Stoffwechselwege gegliedert. Die hier gefundenen potenziellen Veränderungen der Genexpression durch Methylxanthine sind daher meist nicht spezifisch für neurodegenerative Erkrankungen anzusehen, sondern müssen als allgemeinere Mechanismen, relevant für die Entstehung vieler verschiedener Erkrankungen, betrachtet werden.

Die Ergebnisse der RT-qPCR-Daten sind in der *Heatmap* in Abbildung 31 A zusammengefasst. Sie bildet eine Zusammenfassung aus den einzelnen Effektstärken, des Standardfehlers des Mittelwerts und der p-Werte für jedes einzelne Methylxanthin und Gen. In der Abbildung 31 B ist die Anzahl der Gene, die durch jedes analysierte Methylxanthin signifikant hoch- oder herunterreguliert wurde in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Um zu zeigen, dass es signifikante Unterschiede in der Verteilung der hoch- oder herunterregulierten Gene gab und das Schema zu analysieren, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Dabei fiel insbesondere bei der Betrachtung von Koffein im Vergleich zu allen anderen untersuchten Methylxanthinen eine Hochregulierung von 17 Genen auf, was darauf hindeutet, dass Koffein unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine einzigartige entgegengesetzte oder andere Wirkung verglichen zu den anderen Methylxanthinen hatte. Dies verdeutlichte auch eine gruppierte Analyse der *Heatmap*, wo bei einigen Genen eine entgegengesetzte Wirkung von Koffein verglichen zu den anderen MTX zu sehen ist (z.B. *ERCC2*, *ERCC6*, *ERN1*, *APH1a*, *APH1b* oder *MMP2*).

Bei detaillierter Betrachtung erhöhte Koffein die Expression von drei mit oxidativem Stress verbundenen Genen (*PARK7*, *TXNRD2*, *ERCC2*) signifikant, während Pentoxifyllin, Theobromin und Propentofyllin die Expression zwei anderer, ebenfalls mit oxidativem Stress verbundener Gene hochregulierten (*PRDX1*, *PRDX6*). Bei Betrachtung der Gene verbunden mit oxidativem Stress hatte Propentofyllin die stärkste herunter regulierende Wirkung, indem es die Expression von *PARK7*, *SOD1*, *TXNRD2* und *ERCC2* signifikant im Vergleich zur

Kontrollgruppe reduzierte. Die Expression von zwei beziehungsweise drei Genen wurde durch Theophyllin und Theobromin in diesem Stoffwechselweg verringert (TP: *TXNIP*, *ERCC2*; TB: *SOD1*, *ERCC2*, *ERCC6*).

Bei Betrachtung des Fett- und Energiemetabolismus zeigten Koffein und Theobromin die stärksten hochregulierenden Eigenschaften. Sie führten zu einer Erhöhung von jeweils drei Genen (K: *HADH2*, *LPL*, *ERN1*; TB: *APOA1*, *LPL*, *AASS*). Die Expression von *APOA1* war außerdem nach der Behandlung mit Pentoxifyllin und Propentofyllin signifikant erhöht. Die Behandlung von Theobromin und Propentofyllin führte zu einer signifikanten Reduzierung von *ABCA1* und *HADH2* (nur PF).

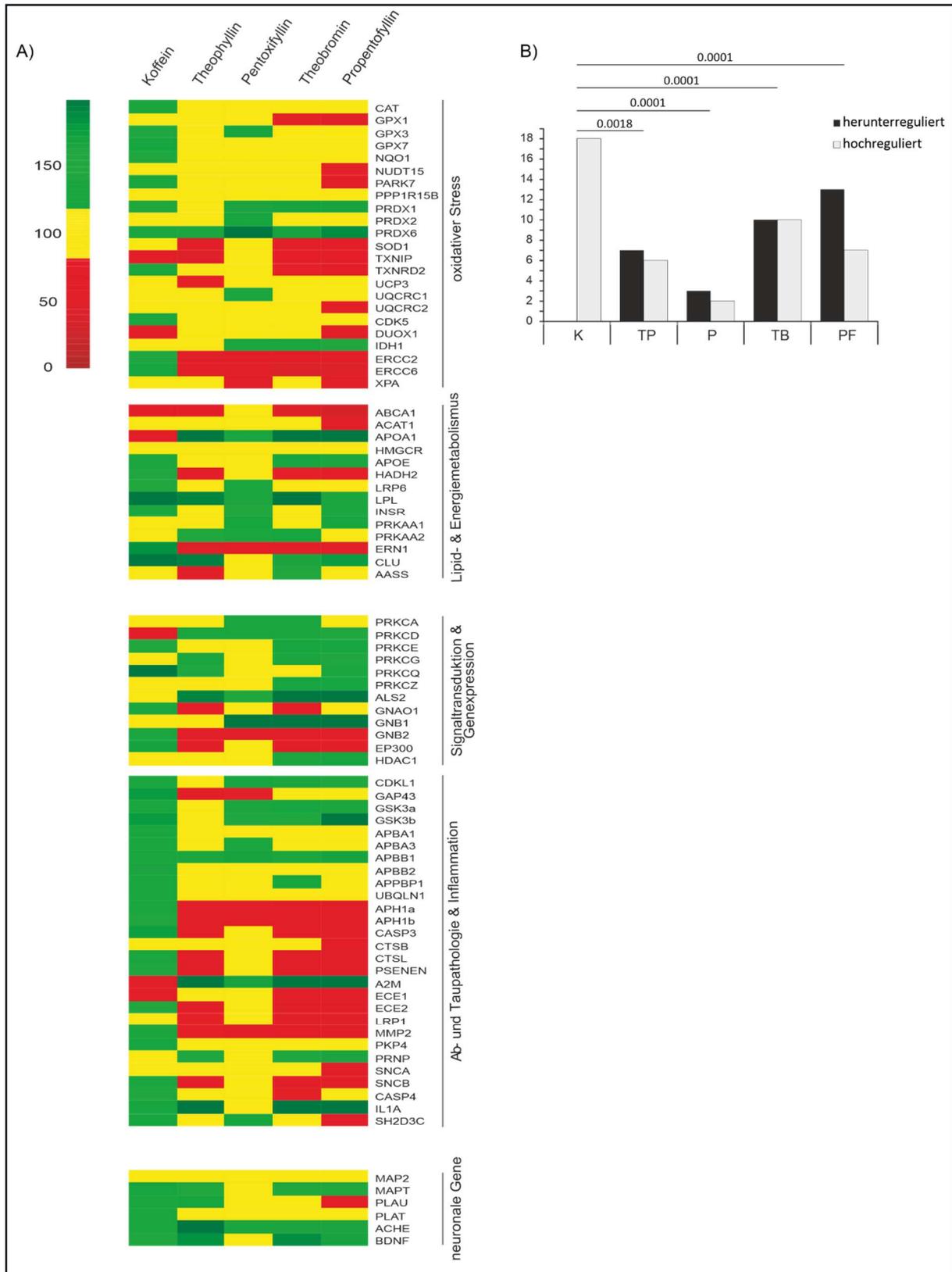


Abbildung 31: Transkriptioneller Einfluss von Koffein, Theophyllin, Pentoxifyllin, Theobromin und Propentofyllin in SH-SY5Y-Zellen. (A) In der *Heatmap* sind die transkriptionellen Veränderungen der Gene dargestellt, die mit den verschiedenen Stoffwechselwegen in Verbindung stehen. Dafür wurden Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für 24 Stunden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ der Xanthin-Derivate Koffein (K), Theophyllin (TP), Theobromin (TB), Propentofyllin (PF) und Pentoxifyllin (P) oder mit Lösungsmittel als Kontrollgruppe inkubiert und analysiert. Gelb: innerhalb der Standardabweichung, Grün: größer als die Standardabweichung hochreguliert und Rot: größer als die

Standardabweichung herunterreguliert. **(B)** das Säulendiagramm fasst die Anzahl der Gene, die durch ein Methylxanthin signifikant verändert wurden, zusammen. Für die Berechnung der Signifikanz wurde zunächst für jedes Gen eine ANOVA durchgeführt, um zu prüfen, ob es allgemeine Unterschiede gab. Im Anschluss wurden diese p-Werte mithilfe der *false discovery rate* (FDR) über alle 83 analysierten Gene hinweg angepasst. Um festzustellen, welches MTX die Expression eines Gens im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant beeinflusste, wurde der Dunnett-Test durchgeführt. Der Exakte Test nach Fisher wurde angewandt, um zu prüfen, ob es signifikante Unterschiede in den Verteilungsmustern der signifikanten herunter- oder hochregulierten Gene gab. Abb. abgeändert nach [125].

Koffein bedingte die signifikante Erhöhung von drei Genen, die an Signaltransduktions- und Genexpressionsprozessen beteiligt sind (*PRKCQ*, *GNB2* und *EP300*). Verglichen dazu führte die Behandlung von Theophyllin, Theobromin, Pentoxifyllin und Propentofyllin zu einer signifikanten Reduzierung der Expressionen von *GNB2* und *EP300*. *ALS2* wurde durch Theobromin, Theophyllin und Propentofyllin signifikant erhöht.

Bei Betrachtung der Gene, die in Zusammenhang mit der A β - und Taupathologie und der Neuroinflammation stehen, hatte Koffein die deutlichste hochregulierende Wirkung. Die Behandlung mit Koffein führte zu einem signifikanten Anstieg der Transkription von *GAP43*, *APBB2*, *UBQLN1*, *APH1b*, *CASP3*, *PSENNEN*, *ECE2* und *CASP4*. Theophyllin, Theobromin und Propentofyllin führten zu einer Erhöhung von *A2M*, *PRNP* und *IL1A*. Darüber hinaus hatte Propentofyllin den deutlichsten herunterregulierenden Effekt. Es beeinflusste die Genexpression von insgesamt fünf Genen, die in diesen Prozessen beteiligt sind, signifikant. So kam es zu einer Verringerung der Expressionen von *APH1a*, *APH1b*, *PSENNEN*, *ECE2* und *MMP2*. Allerdings besaßen Theobromin (*APH1a*, *APH1b*, *ECE2*, *LRP*), Theophyllin (*APH1a*, *APH1b*, *ECE2*) und Pentoxifyllin (*APH1a*, *MMP2*) ebenfalls herunterregulierende Wirkung bei Betrachtung der Gene, die an der A β - und Taupathologie und der Entstehung der Neuroinflammation beteiligt sind.

Mit Blick auf die neuronalen Gene, führte Koffein zu einer signifikanten Erhöhung von *PLAU*, Theophyllin von *ACHE* und Theobromin von *MAPT*.

4.3.4 Vergleich von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin bezüglich ihrer transkriptionellen Effekte in SH-SY5Y-Zellen

Interessanterweise konnte in den oben beschriebenen Ergebnissen kein einheitliches Expressionsmuster innerhalb der einzelnen Methylxanthine beobachtet werden, was anhand des größten Unterschiedes zwischen Koffein und den anderen Xanthin-Derivaten deutlich wurde. Die in den Abbildungen **31** bis **35** dargestellten Ergebnisse einer Hauptkomponentenanalyse für jeden Stoffwechselweg verdeutlichen, wie die einzelnen Methylxanthine in den jeweils untersuchten Stoffwechselwegen zueinanderstehen.

Anhand der Hauptkomponentenanalyse kann ein komplexer multivariater Datensatz vereinfacht und strukturiert veranschaulicht werden. Dazu wird dieser Datensatz in einen zweidimensionalen Datensatz mit zwei Hauptkomponenten umgewandelt. Dabei machen diese beiden Hauptkomponenten den größten Prozentsatz der Varianz des multivariaten Datensatzes aus. Es gilt, dass die Hauptkomponente eins (x-Achse) wichtiger als die Hauptkomponente zwei (y-Achse) ist [252].

Um herauszufinden, welche Gene für beide Hauptkomponenten des jeweiligen Stoffwechselweges in Frage kommen, wurden Ladungsplots aller Gene erstellt und diejenigen, die beide Hauptkomponenten erfüllten ausgewählt. Die ausgewählten Gene und ihre entsprechenden Ladungsplots sind in Abbildung **37** dargestellt.

Mit Blick auf die Hauptkomponentenanalyse der einzelnen Stoffwechselwege war für oxidativen Stress, den Lipid- und Energiestoffwechsel, die Signaltransduktion und Genexpression, A β - und Taupathologie und Inflammation eine klare Trennung zwischen Koffein und den anderen Xanthin-Derivaten zu verzeichnen, was das Alleinstellungsmerkmal von Koffein in der Expression Alzheimer-relevanter Gene in SH-SY5Y-Zellen verdeutlichte. Dabei ist jeweils die Komponente eins als ausschlaggebend anzusehen. Bei Betrachtung der neuronalen Gene war keine klare Trennung in Komponente eins zu sehen, wobei in Komponente zwei eine Trennung zwischen Pentoxifyllin und Theophyllin detektiert wurde.

Um im Folgenden der Frage nachgehen zu können, ob die Trennung zwischen Koffein und den weiteren untersuchten Methylxanthinen signifikant war, erfolgte eine Mehrfachvergleichsanalyse mittels Tukey HSD-Post-hoc-Test für jedes Gen. Dazu wurde die x-fache Veränderung der Expression des mit dem entsprechenden Methylxanthin-behandelten Gens mit dem der anderen verglichen und in Form einer Säule im Diagramm rechts neben jeder Hauptkomponentenanalyse aufgeführt.

Im Hinblick auf den oxidativen Stress regulierte Koffein die Expression von *ERCC2*, *ERCC6*, *PARK7* und *TXNRD2* signifikant umgekehrt im Vergleich zu Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin (siehe Abbildung **32** A und B).

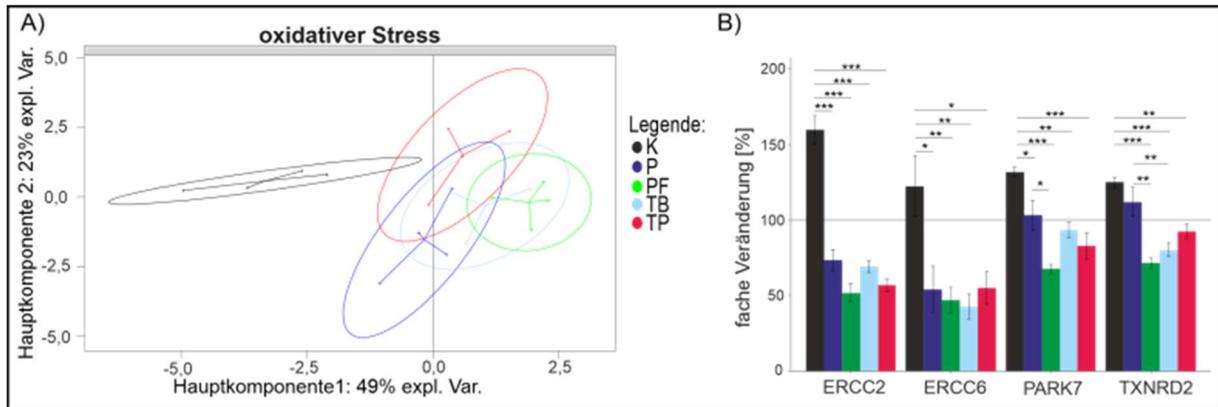


Abbildung 32: Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf oxidativen Stress von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen. (A) zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die Gene, die in oxidativen Stress involviert sind. (B) zeigt die x-fache Veränderung und Signifikanz für jedes Gen, das den in der Hauptkomponentenanalyse festgestellten Trend für oxidativen Stress vermittelt, in Form eines Säulendiagramms. Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler des Mittelwerts und die Signifikanz wurde durch den Tukey HSD Post-hoc-Test berechnet, wobei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Abb. abgeändert nach [125].

Ein ähnliches Bild war mit Blick auf den Lipid- und Energiehaushalt zu verzeichnen. Hier bestand eine exklusive, hochregulierende Wirkung von Koffein auf die Gene *ERN1* und *HADH2* (siehe Abbildung 33 A und B).

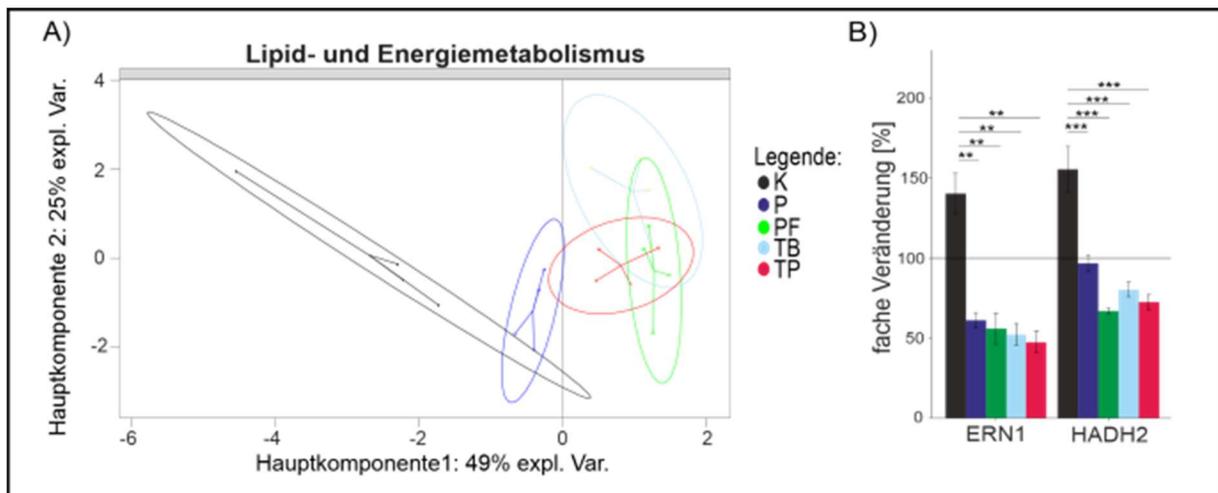


Abbildung 33: Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf Lipid- und Energiemetabolismus von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen. (A) zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die Gene, die in den Lipid- und Energiemetabolismus involviert sind. (B) zeigt die x-fache Veränderung und Signifikanz für jedes Gen, das den in der Hauptkomponentenanalyse festgestellten Trend für den Lipid- und Energiemetabolismus vermittelt, in Form eines Säulendiagramms. Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler des Mittelwerts und die Signifikanz wurde durch den Tukey HSD Post-hoc-Test berechnet, wobei ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Abb. abgeändert nach [125].

Auch im Bereich der Signaltransduktion und Genexpression konnte die Alleinstellung von Koffein im Vergleich zu den anderen Methylxanthinen beobachtet werden. Drei von vier signifikant veränderte Gene wurden von Koffein verglichen zu den anderen Methylxanthinen entgegengesetzt reguliert (*EP300*, *GNB2* und *ALS2*, siehe Abbildung 34 A und B).

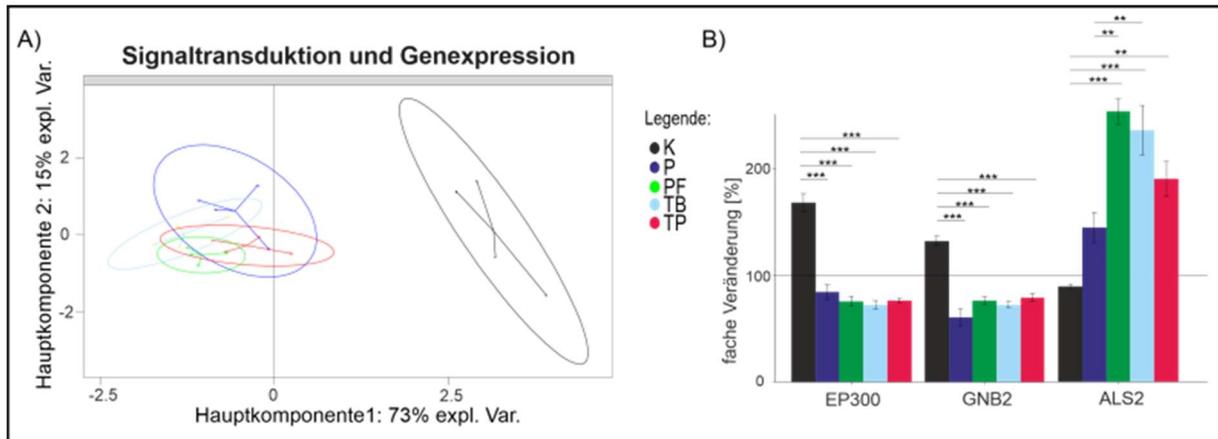


Abbildung 34: Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf Signaltransduktion und Genexpression von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen. (A) zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die Gene, die in die Signaltransduktion oder Genexpression involviert sind. (B) zeigt die x-fache Veränderung und Signifikanz für jedes Gen, das den in der Hauptkomponentenanalyse festgestellten Trend für die Signaltransduktion oder Genexpression vermittelt, in Form eines Säulendiagramms. Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler des Mittelwerts und die Signifikanz wurde durch den Tukey HSD Post-hoc-Test berechnet, wobei ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Abb. abgeändert nach [125].

Die exklusive Stellung von Koffein wurde auch bei der Untersuchung der Gene, die an der A β - und Taupathologie und der Neuroinflammation beteiligt sind, deutlich. Die Expression von zwölf von 14 Genen wurde durch Koffein verglichen zu den anderen untersuchten Xanthin-Derivaten in entgegengesetzter Weise verändert (siehe Abbildung 35 A und B). Dabei handelte es sich um folgende Gene: *APBB2*, *APH1a*, *APH1b*, *CASP3*, *CASP4*, *ECE2*, *GAP43*, *LRP1*, *MMP2*, *PSENEN* und *UBQLN1*.

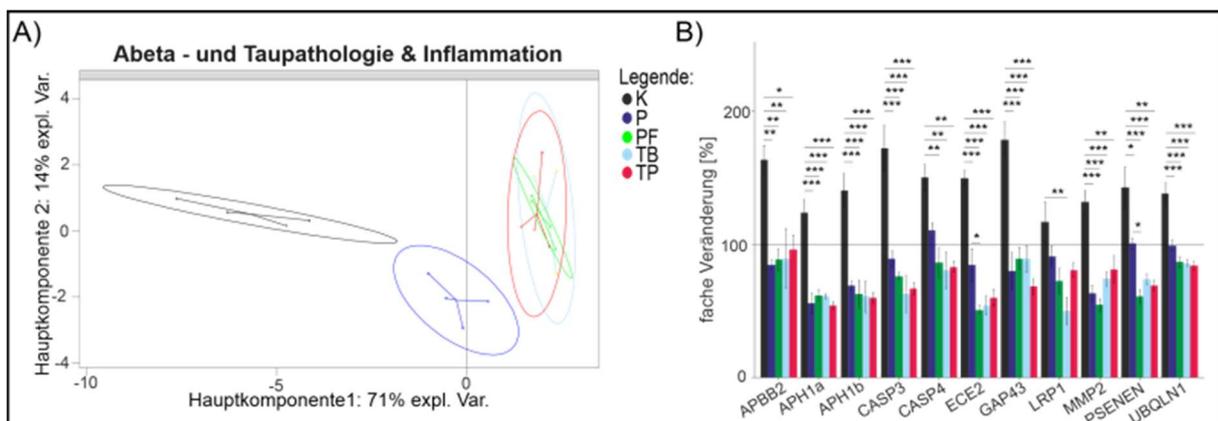


Abbildung 35: Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf A β - und Taupathologie und Inflammation von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen. (A) zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die Gene, die in die A β - und Taupathologie oder die Neuroinflammation involviert sind. (B) zeigt die x-fache Veränderung und Signifikanz für jedes Gen, das den in der Hauptkomponentenanalyse festgestellten Trend bezüglich der A β - und Taupathologie oder der Neuroinflammation vermittelt, in Form eines Säulendiagramms. Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler des Mittelwerts und die Signifikanz wurde durch den Tukey HSD Post-hoc-Test berechnet, wobei * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gilt. Abb. abgeändert nach [125].

Mit Blick auf die Verteilung der neuronalen Gene in Abbildung 36 konnte das Alleinstellungsmerkmal von Koffein aus den vorhergegangenen Stoffwechselwegen nicht bestätigt werden. Bei Betrachtung der Hauptkomponentenanalyse konnte anhand der Komponente eins keine Auffälligkeit beschrieben werden. Allerdings konnte unter Zuhilfenahme der Komponente zwei eine Trennung zwischen Pentoxifyllin und Theophyllin beschrieben werden.

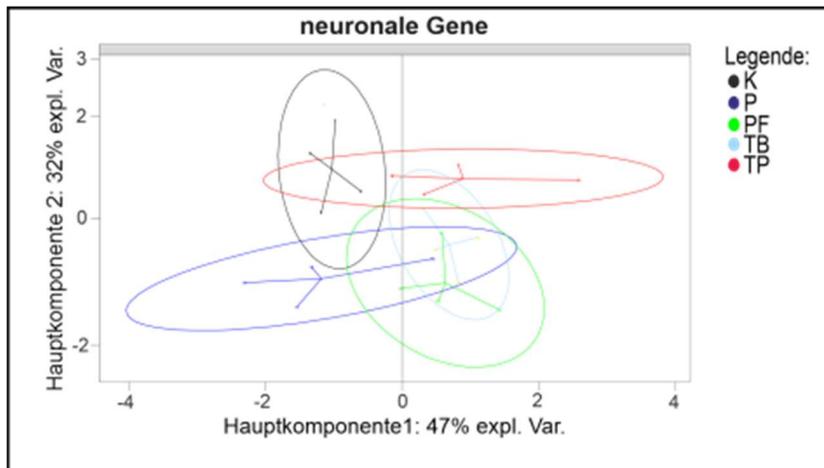


Abbildung 36: Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf neuronale Gene von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen. (A) zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die neuronale Gene stehen. Abb. abgeändert nach [125].

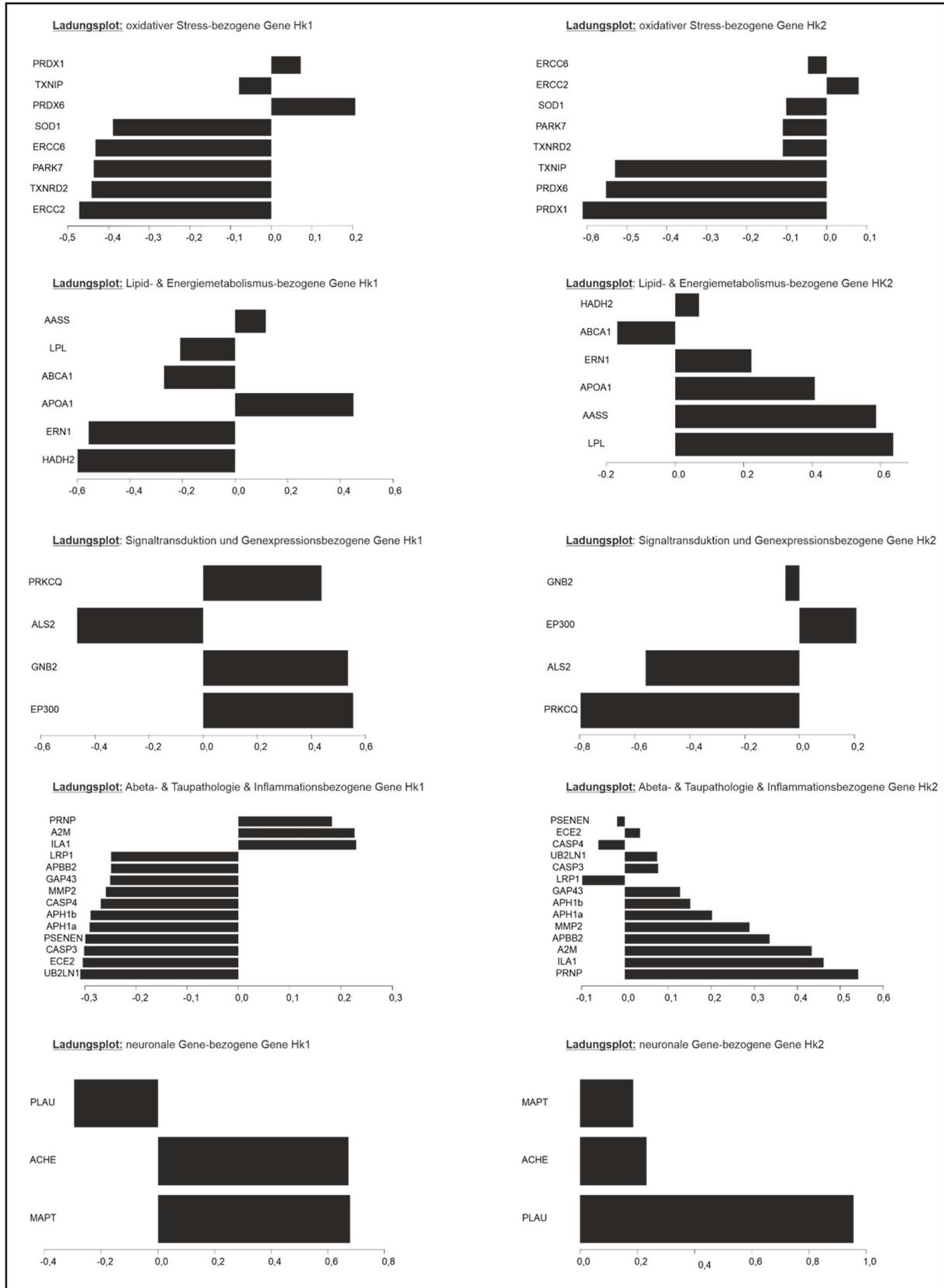


Abbildung 37: Ladungsplots der Gene, die für die Hauptkomponenten der jeweiligen Stoffwechsel in Frage kommen. Links: Darstellung der Gene die für die Hauptkomponente 1 stehen. **Rechts:** Darstellung der Gene, die für die Hauptkomponente 2 stehen. Abb. abgeändert nach [125].

4.3.5 Analyse der beobachteten Methylxanthin-vermittelten Effekte auf unterschiedliche Zelltypen

Da eine Vielzahl der untersuchten Gene keine exklusive Wirkung auf neurodegenerative Erkrankungen besitzen, sondern vielmehr in eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse involviert sind, die auch zu anderen Erkrankungen führen können [170,213,250], wurde in einem nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Effekte auch in anderen Zelllinien auftreten oder ob sie spezifisch für neuronale Zellen sind. Dementsprechend wurden Calu-3- und Hep-G2-Zellen, als Vertreter einer pulmonalen und einer hepatischen Zelllinie, analysiert, um genregulatorische Effekte zu identifizieren, die nicht nur auf SH-SY5Y-Zellen beschränkt sind. Calu-3 und Hep-G2-Zellen wurden unter identischen Bedingungen (100 $\mu\text{mol/l}$ Methylxanthin für 24 Stunden; 8+16h) behandelt und im Anschluss ihre Effekte der Genexpression auf Überlappungen, mit denen in SH-SY5Y-Zellen untersucht, die verglichen zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikante Ergebnisse zeigten. Das Venn-Diagramm in Abbildung 38 bildet all die Gene ab, die über alle drei untersuchten Zelllinien hinweg signifikante Wirkungen erzielten.

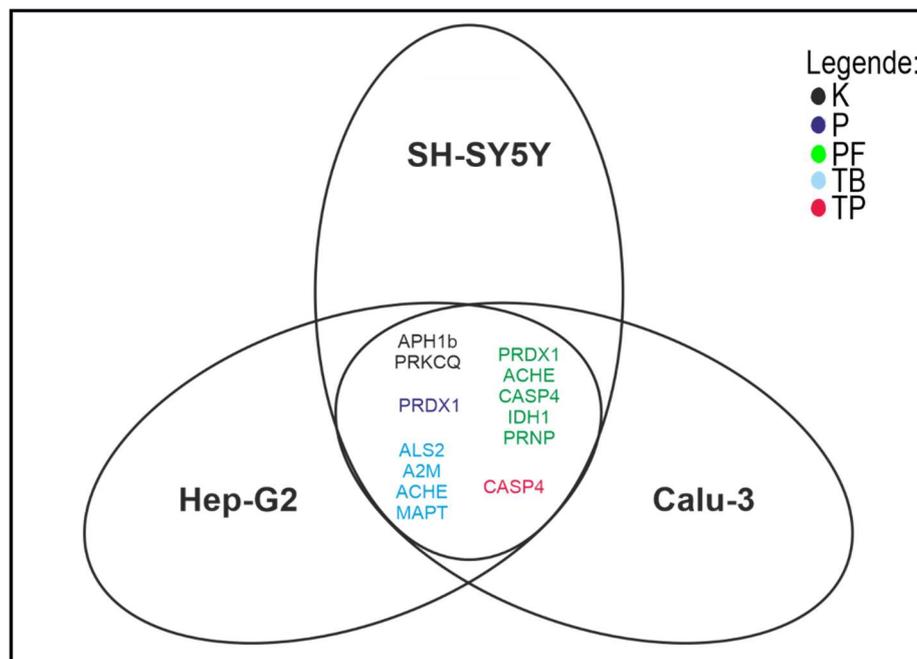


Abbildung 38: Analyse der Methylxanthin-vermittelten Transkriptionseffekte in SH-SY5Y, Hep-G2 und Calu-3-Zellen. Das Venn-Diagramm zeigt die Gene, die durch MTX in ihrem Expressionsverhalten verändert sind und über alle drei untersuchten Zelllinien gleich verändert sind. Jedes MTX ist in einer anderen Farbe dargestellt. K: Koffein, P: Pentoxifyllin, PF: Propentofyllin, TB: Theobromin, TP: Theophyllin. Abb. abgeändert nach [125].

Koffein erhöhte signifikant die Expression von *APH1b* ($125,0 \% \pm 9,4 \%$, $p \leq 0,05$) und *PRKCQ* ($166,5 \% \pm 52,6 \%$, $p \leq 0,05$), während Theobromin signifikant die Transkription von *ALS2* ($161,1 \% \pm 40,1 \%$, $p \leq 0,05$), *A2M* ($294,1 \% \pm 126,2 \%$, $p \leq 0,01$), *ACHE* ($175,0 \% \pm 31,1 \%$, $p \leq 0,01$) und *MAPT* ($153,7 \% \pm 14,5 \%$, $p \leq 0,05$) in allen drei analysierten Zelllinien signifikant erhöhte. Theophyllin senkte signifikant die Expression von *CASP4* ($74,9 \% \pm 5,0 \%$, $p \leq 0,01$)

und Pentoxifyllin steigerte die Expression von *PRDX1* ($141,9 \% \pm 16,7 \%$, $p \leq 0,05$) in signifikanter Weise, obwohl es in SH-SY5Y, Hep-G2 und Calu-3 Zellen konserviert ist. Das synthetische Xanthin-Derivat Propentofyllin erhöhte die Transkription von *PRDX1* ($148,6 \% \pm 24,9 \%$, $p \leq 0,01$), *ACHE* ($161,7 \% \pm 22,9 \%$, $p \leq 0,05$), *IDH1* ($141,7 \% \pm 22,6 \%$, $p \leq 0,05$) und *PRNP* ($133,6 \% \pm 17,8 \%$, $p \leq 0,05$) und reduzierte die Expression von *CASP4* ($78,1 \% \pm 9,1 \%$, $p \leq 0,05$) unabhängig vom Zelltyp.

4.3.6 Analyse der unterschiedlichen Methylxanthine auf dosisabhängige Effekte

Da die bis dato erhaltenen Daten aus einer Inkubation mit $100 \mu\text{mol/l}$ resultierten und diese Konzentration im supraphysiologischen Bereich liegt, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die Ergebnisse der unterschiedlichen Methylxanthine auf die Expression der analysierten Gene eine dosisabhängige Wirkung haben. Um Effekte in niedrigeren Konzentrationen zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen für 24 Stunden mit $12,5 \mu\text{mol/l}$, $25 \mu\text{mol/l}$ und $50 \mu\text{mol/l}$ mit Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin und Pentoxifyllin oder der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Dabei wurde sich bei der Analyse auf die Gene beschränkt, die in allen drei untersuchten Zellreihen ähnliche Effekte erzielten. Es konnte dabei durch die Berechnung der Korrelationen zwischen den normalisierten Cq-Werten der *housekeeping*-Gene und den vier verschiedenen Methylxanthin-Konzentrationen festgestellt werden, dass sechs Gene dosisabhängig reguliert wurden. Die Ergebnisse für diese Gene, nämlich *APH1b*, *CASP4*, *ALS2*, *A2M* und *ACHE*, sind in Abbildung 39 verdeutlicht. Die Expression der weiter untersuchten Gene korrelierte nicht signifikant mit den analysierten Methylxanthin-Konzentrationen (Koffein: *PRKCQ*: $r = 0,378$, $p = 0,622$; Pentoxifyllin: *PRDX1*: $r = 0,880$, $p = 0,120$; Theobromin: *ACHE*: $r = 0,943$, $p = 0,057$; *MAPT*: $r = 0,735$, $p = 0,256$; Propentofyllin: *PRDX1*: $r = 0,903$, $p = 0,097$; *IDH1*: $r = 0,856$, $p = 0,144$; *PRNP*: $r = 0,761$, $p = 0,239$).

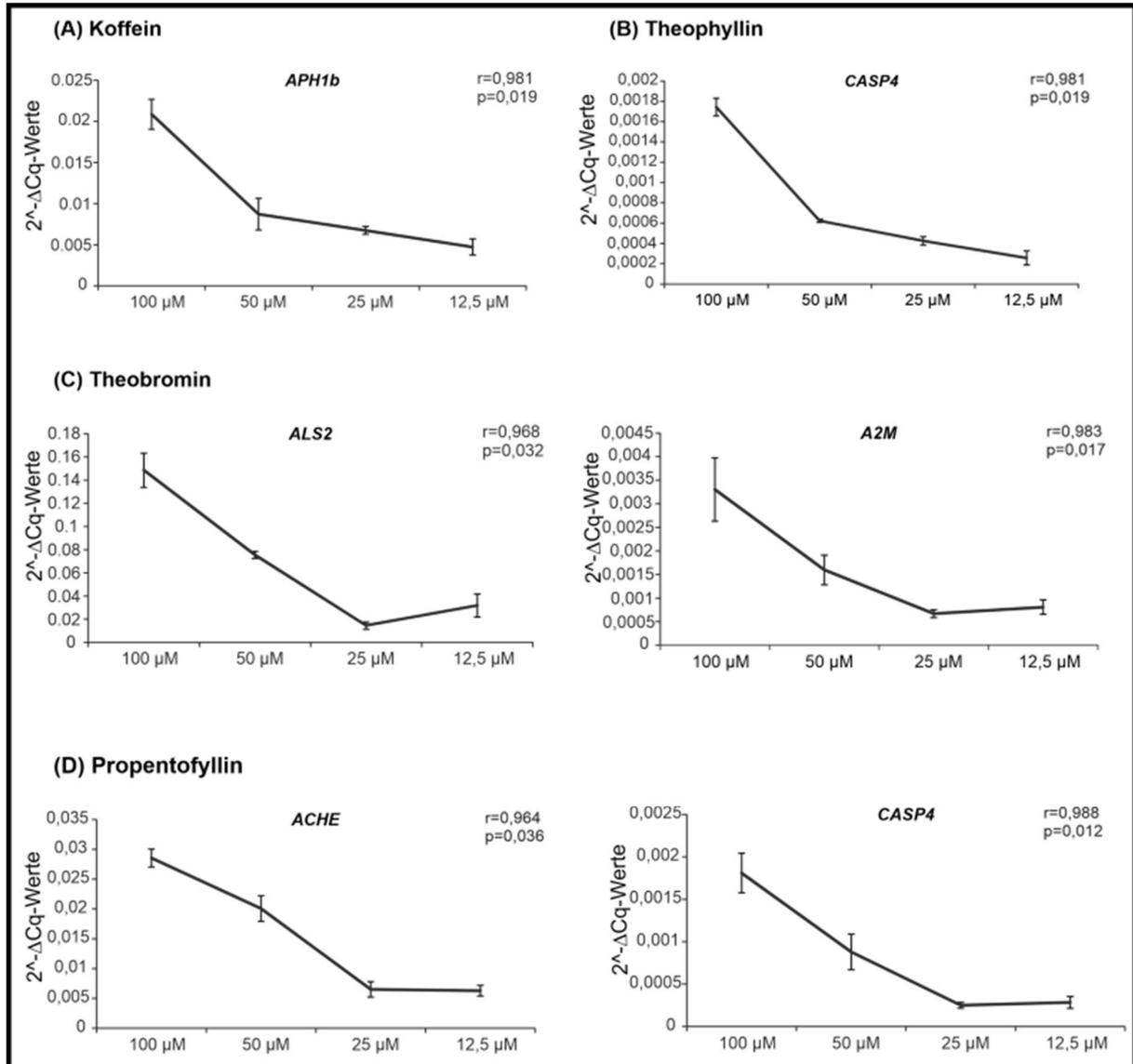


Abbildung 39: Analyse der dosisabhängigen Effekte einzelner Methylxanthine. Die Expression von APH1b, ALS2, A2M, CASP4, ACHE und CASP4 sind gegen die jeweilige Konzentration von Koffein (A), Theophyllin (B), Theobromin (C) und Propentofyllin (D) in den Diagrammen aufgetragen. Für jedes Gen wurde der Pearson Korrelationskoeffizient „r“ und der p-Wert „p“ angegeben. Abb. abgeändert nach [125].

5 Diskussion

5.1 Einfluss der *ADAM10*-Gendeletion auf die Lipidhomöostase von HEK-Zellen

5.1.1 Lipide und die Alzheimer-Erkrankung

Bezugnehmend auf die APP-Prozessierung, beschrieben in Kapitel **2.1.2.1**, liegt eine Beeinflussung der A β -Freisetzung durch die Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen nahe, da es sich sowohl bei APP als auch bei den APP-prozessierenden Proteinen, die α -, β - und γ -Sekretasen, um Transmembranproteine handelt [277,293,312]. Lipide, und die in die Membran integrierten Proteine bedingen den Hauptteil von Zellmembranen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Vielzahl an Lipiden die A β -Freisetzung in der Membran sowie die APP-Prozessierung beeinflussen können und spezifische Lipide einen Einfluss auf die Länge und die Menge an A β -Peptiden haben [92,98,100,110,139].

Generell ist in der Literatur mittlerweile einheitlich beschrieben, dass deutliche Veränderungen in der Lipidzusammensetzung zur Entstehung der Alzheimer-Pathologie beitragen, da sie vor allem auf die Entstehung der A β -Peptide unmittelbaren Einfluss nehmen. Darüber hinaus geht das Altern des Gehirns mit wesentlichen Veränderungen in der Lipidzusammensetzung einher [133]. Circa 50 % des Trockengewichts des Gehirns besteht aus Lipiden, weshalb das Gehirn, neben dem Fettgewebe, das fettreichste Organ des Menschen darstellt [268]. Von den im Gehirn vorkommenden Lipidklassen bilden Phospholipide mit circa 50 % die größte Lipidklasse, gefolgt von Glykolipiden (ca. 40 %) und Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceriden (< 10 %) [268]. Mit Blick auf die Fettsäuren stellen insbesondere die langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wozu unter anderen die Docosahexaensäure (DHA) oder auch die Arachidonsäure (AA) zählen, mit circa 25 – 30 % die häufigsten Vertreter der Fettsäuren im humanen zentralen Nervensystem dar [133,268].

Generell betrachtet, unterscheiden sich die beiden Schichten der Lipiddoppelschicht in ihrer Fettzusammensetzung. Während die äußere Schicht vor allem aus Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen besteht, bilden vor allem Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol die Hauptvertreter der inneren Schicht [236]. Eine Vielzahl an Proteinen, die mit der Alzheimer-Pathologie in Zusammenhang stehen, sind in sogenannten *lipid rafts* (Lipid-Flöße) lokalisiert. Diese Lipidflöße sind spezielle Bereiche innerhalb der Zellmembran, die durch einen hohen Anteil an Sphingomyelinen, Glykosphingolipiden, Cholesterin und gesättigten Fettsäuren gekennzeichnet sind [297]. In diesen *lipid rafts* kommt es zur Interaktion von A β mit ApoE und Tau und dadurch zur vermehrten Aggregation von A β -Oligomeren und hyperphosphoryliertem Tau. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass insbesondere die amyloidogene APP-Prozessierung in den *lipid rafts* abläuft [138].

Im Laufe des Lebens ändert sich mit zunehmendem Alter die zerebrale Lipidzusammensetzung. Es kommt zu einer Verschiebung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren hin zu einer vermehrten Ansammlung gesättigter Fettsäuren ab dem 50. Lebensjahr [210,228]. Zusätzlich dazu steigt mit zunehmendem Alter das Risiko für vermehrte chronische Inflammation, wobei Lipide als Mediatoren das Immunsystem maßgeblich beeinflussen [58].

Fettsäuren sind Bestandteile und Bausteine für komplexere Lipide und werden in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch die Anzahl ihrer Doppelbindungen unterschieden. Ihnen kommen unterschiedliche Bedeutungen für den menschlichen Organismus zu. Während mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*engl. polyunsaturated fatty acids*, kurz: PUFA) über die Signaltransduktion und Beeinflussung inflammatorischer Prozesse als gesundheitsfördernd eingeordnet werden können, gelten insbesondere gesättigte Fettsäuren (*engl.: saturated fatty acids*, kurz: SFA) als gesundheitsschädlich [206]. SFA können die Entstehung einer Atherosklerose, Insulinresistenz und Entzündungen beschleunigen [228]. Das Gehirn besteht zu einem hohen Anteil aus PUFA, die in Phospholipide eingebaut sind. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Membranfluidität, der Signaltransduktion und der Transkription wichtiger Gene. Außerdem können sie das Gehirn vor Apoptose und neuronaler Schädigung schützen [133,145]. Des Weiteren konnte in *in vitro* Studien herausgefunden werden, dass freie ungesättigte Fettsäuren mit mehr als vier Doppelbindungen die sAPP α -Sekretion erhöhen und damit einen positiven Einfluss auf den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg von APP nehmen können [333]. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls herausgefunden werden, dass das extrazellulär sezernierte sAPP α neuroprotektive Eigenschaften besitzt [116].

Interessanterweise konnte in hyperlipidämischen adipösen Patient*innen, die mit Gemfibrozil behandelt wurden, um den Triglyceridgehalt im Blutplasma zu senken, eine bessere zerebrale Perfusion und verbesserte kognitive Leistung festgestellt werden [255]. Anhand dessen können im Umkehrschluss Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistung durch einen erhöhten Anteil an TAG überlegt werden. TAG können in Lipidtröpfchen akkumulieren, die in erhöhtem Maß bei neurodegenerativen Erkrankungen festgestellt werden konnten [43].

Die im Gehirn vorkommenden Lipide besitzen eine Vielzahl an Funktionen zur Aufrechterhaltung der Struktur und des Metabolismus. Eine Dysbalance der unterschiedlichen Lipidklassen kann durch Beeinflussung der APP-Prozessierung Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung nehmen [110].

ADAM10, als einer der Hauptvertreter der α -Sekretasen im Gehirn, ist für den Ablauf der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung zuständig. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Knockout von *ADAM10* in HEK-Zellen und der daraus möglicherweise resultierenden

Veränderung in der Lipidzusammensetzung. Dabei wurde auf die Veränderung von Phosphatidylcholinen, Plasmalogenen, Lyso-Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen als Vertreter der Phospholipide und auf Veränderungen bezüglich der Triglyceride und Carnitine näher eingegangen.

5.1.2 ADAM10-Knockout bedingte Lyso-Phosphatidylcholin-Erhöhung in HEK-Zellen

Phospholipasen bilden eine heterogene Gruppe an Enzymen, deren Gemeinsamkeit darin besteht Phospholipide in freie Fettsäuren und weitere lipophile Substanzen zu spalten. Generell können Phospholipasen nach ihrem Spaltverhalten in vier Gruppen eingeteilt werden [5]. Die Phospholipase A1 (PLA1) katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden ausschließlich an der sn1-Position (1. Kohlenstoffatom) [343]. Daraus resultiert einerseits die Freisetzung einer freien Fettsäure und andererseits die Entstehung eines Lysophospholipids. Im Vergleich dazu kommt es bei Anwesenheit der Phospholipase A2 (PLA2) zu einer hydrolytischen Spaltung der Phospholipide an der sn2-Position (2. Kohlenstoffatom), woraus meistens die Freisetzung einer mehrfach ungesättigten Fettsäure und eines Lysophospholipids folgt [5]. Des Weiteren existieren neben der Phospholipase B, die für eine Spaltung der Phospholipide sowohl an der sn1- als auch an der sn2-Position zuständig ist, noch die Phospholipasen C und D. Diese unterscheiden sich in ihrer Spaltung vor dem Phosphat (PLA C) oder dahinter (PLA D) [5]. Das Spaltverhalten der unterschiedlichen Phospholipasen ist in der Abbildung **40** schematisch dargestellt.

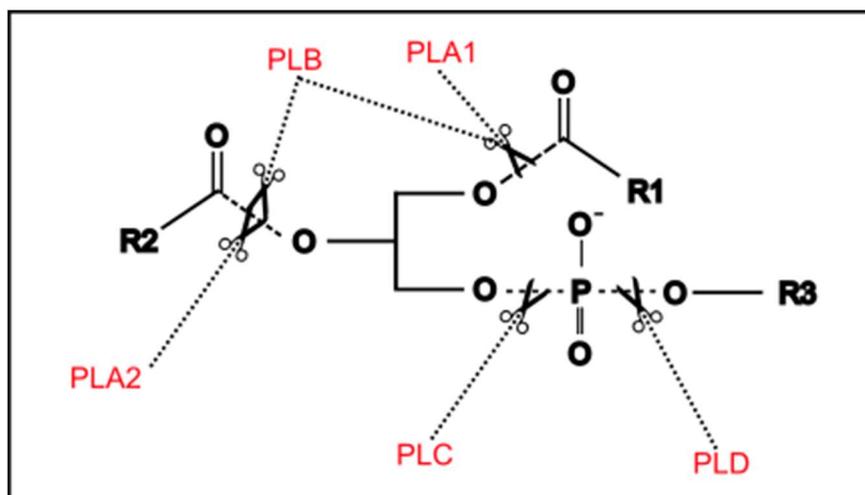


Abbildung 40: Schnittstellen der Phospholipasen. Grundgerüst eines Phospholipids mit unterschiedlichen Spaltstellen bei Trennung durch die einzelnen Phospholipasen. PLA1: Phospholipase A1, PLA2: Phospholipase A2, PLB: Phospholipase B, PLC: Phospholipase C, PLD: Phospholipase D, O: Sauerstoff, R1-R3: Restanhang, je nach Phospholipid unterschiedlich, Abb. abgeändert nach [5].

Sowohl Phosphatidylcholine (PCaa) und Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae) als auch Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC) sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und spielen sowohl in der Membranstruktur als auch der Signaltransduktion eine wichtige Rolle [268]. Durch die hydrolytische Spaltung von PCaa- und PCae-Spezies mittels Phospholipasen entstehen neben der Freisetzung von freien Fettsäuren auch Lyso-Phosphatidylcholine. Dabei entstehen durch die Spaltung von PCaa und PCae mittels PLA1 1-Lyso-PC-Spezies und vermehrt freie gesättigten Fettsäuren (SFA) und mittels PLA2 2-Lyso-PC-Spezies und vermehrt freie mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) [5,227]. Die Hauptfunktion der PLA1 und PLA2 besteht unter physiologischen Gesichtspunkten darin, oxidierte oder beschädigte Phospholipide aus der Plasmamembran zu entfernen und somit zur Aufrechterhaltung einer optimalen Membranzusammensetzung beizutragen [222]. Des Weiteren stellen sie die Integrität der Mitochondrien sicher und sind an der Signaltransduktion beteiligt [222]. Die aus der Spaltung resultierenden Fettsäuren können zur Energiegewinnung genutzt werden. Unter pathologisch erhöhten PLA-Aktivitäten kommt es zur vermehrten Ansammlung freier Fettsäuren einerseits und Lyso-Phosphatidylcholinen andererseits, welche in der Folge als Bausteine für Botenstoffe und deren Metaboliten umgewandelt werden können, die anschließend unter anderem zur Entstehung inflammatorischer Prozesse führen können [222]. Unter diesen Gesichtspunkten könnten Lyso-Phosphatidylcholine zu den proinflammatorischen Lipiden gezählt werden.

Bei der Auswertung der *shotgun lipidomics*-Analyse von HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen war ein signifikanter Anstieg der Gesamt-Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies auf insgesamt 169,2 % zu beobachten, während gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Phosphatidylcholin- und Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies besatnd (siehe Kapitel

4.1.2.1). Diese Ergebnisse könnten darauf schließen lassen, dass in HEK-Zellen mit *ADAM10*-Knockout eine vermehrte Umwandlung der PCaa- und PCae-Spezies zu Lyso-PC-Spezies vorliegt. Diese Beobachtung konnte anhand des Verhältnisses aus *Lyso-PC/PCaa*, welches in HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen auf 256,4 % angestiegen war, zusätzlich unterstrichen werden. Die erhaltene Umverteilung des Verhältnisses von Phosphatidylcholin-Spezies hin zu einem signifikanten Anstieg der Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies könnte durch eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase A begründet werden. Bei näherer Betrachtung der Verteilung innerhalb der Lyso-PC-Spezies bezüglich des Sättigungsgrades fielen deutliche Unterschiede auf, welche auf eine Differenzierung zwischen der Phospholipase A1 und der Phospholipase A2 hindeuten könnten. Während die Deletion von *ADAM10* in HEK-Zellen einen signifikanten Anstieg der gesättigten Fettsäuren innerhalb der Lyso-PC-Spezies auf 195,7 Mol% bedingte, kam es gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf 82,3 Mol% (siehe Kapitel **4.1.2.1.1**). Anhand dieser Ergebnisse, die eine deutliche Verschiebung des Sättigungsgrades hin zu den gesättigten Fettsäuren innerhalb der Lyso-PC-Spezies aufzeigten, könnte eine vermehrte Aktivität der Phospholipase A2, welche die Phospholipide an der sn2-Position schneidet, vermutet werden, da die Detektion der Lipidspezies durch die massenspektrometrische Analyse nach der hydrolytischen Spaltung durch die Phospholipasen erfolgt. Die signifikante Reduzierung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren könnte durch eine erhöhte Aktivität der Phospholipase A2 begründet werden, während eine vermehrte Ansammlung der Lyso-PC-Spezies mit gesättigten Fettsäuren mit einer verringerten Aktivität der Phospholipase A1 erklärt werden könnte. Bei der Auswertung dieser Lipiddaten und den daraus resultierenden Rückschlüssen auf die enzymatische Aktivität der verschiedenen Phospholipasen ist jedoch zu berücksichtigen, dass gezielte Aussagen zum Verhalten der Enzymaktivitäten durch weitere Untersuchungen unterstrichen werden müssen. Somit könnten ausblickend beispielsweise die Analyse der Phospholipasen mittels PLA1/PLA2-Enzym-Assay oder Genanalysen der Gene *PLA1* oder *PLA2* mittels qRT-PCR aus den HEK- *ADAM10*^{-/-}-Zellen weiterführende Aussagen ermöglichen.

Mit Blick auf das Verhalten der Fettsäuren der Lyso-PC-Spezies bezüglich ihrer Unterscheidung in verschiedene Kettenlängen waren ebenfalls interessante Ergebnisse zu verzeichnen. Bei den HEK-*ADAM10*-defizienten Zellen war ein signifikanter Anstieg der mittelkettigen Fettsäuren (C16:X bis C20:X) auf 170,0 Mol% zu beobachten (siehe Kapitel **4.1.2.1.1**). In diesem Intervall befinden sich vor allem Fettsäuren wie Palmitinsäure (C16:0) oder Stearinsäure (C18:0), welche zentrale Rollen im menschlichen Organismus übernehmen. Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass vermehrt mittelkettige gesättigte Fettsäuren bei HEK-Zellen mit *ADAM10*-Knockout detektiert wurden.

Generell betrachtet, kann ein Überangebot an Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies für den menschlichen Organismus mit erheblichen zusätzlichen Belastungen einhergehen. Lyso-PCs

stellen als Bausteine für Botenstoffe und Mediatoren ebenso eine wichtige Grundlage für die Entstehung proinflammatorischer Prozesse dar, wie auch eine generell erhöhte Aktivität der Phospholipasen A2 [68,158].

Unter pathologisch erhöhter PLA2-Aktivität kann es zur vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren und Lyso-Phospholipiden kommen. Die freien Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, können im Anschluss in *second messenger* oder deren Metabolite umgewandelt werden und somit Einfluss auf eine verstärkt ablaufende Neuroinflammation oder neuronale Schädigungen nehmen [222]. Arachidonsäure, eine häufig durch die PLA2 abgespaltene Fettsäure, kann durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen in Lipoxine, Thromboxane, Leukotriene und Prostaglandine, welche proinflammatorische Prozesse begünstigen, umgewandelt werden [234].

Es wurden erhöhte PLA2-Spiegel mit der Entstehung der koronaren Herzerkrankung oder der Atherosklerose in Verbindung gebracht. Insbesondere die Lipoprotein-assoziierte PLA2 (Lp-PLA2) induziert vermehrt eine vaskuläre Inflammation an deren Ende die Atherosklerose steht [181]. Eine im Mai 2010 veröffentlichte Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Risiko des Auftretens von koronaren Herzerkrankungen oder Schlaganfällen und erhöhten PLA2-Spiegeln. In dieser Studie wurden 79.036 Patient*innen eingeschlossen und resultierte das Ergebnis, dass erhöhte PLA2-Spiegel im Blut in die gleiche Risikofaktor-Kategorie wie der Cholesterin-Spiegel oder Bluthochdruck fallen [181].

Im neuronalen Gewebe kann ein vermehrtes Anfallen von erhöhten Lyso-Phosphatidylcholin-Spiegeln im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen, wie es beispielweise für die Entstehung von Morbus Parkinson beschrieben wurde [323]. Über die Induktion einer Astroglieose und der Neuroinflammation führen erhöhte Spiegel an Lyso-PC-Spezies auch zur Entstehung weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise der Alzheimer-Erkrankung [94]. Sanchez-Meija *et al.* konnten zeigen, dass sowohl spezifische Isoformen der PLA2 als auch die Arachidonsäure eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung spielen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass dadurch eine Störung des Gedächtnisses, des Lernens und des Verhaltens gefördert wurde [264].

Vor allem das Gehirn besitzt einen hohen Anteil an Phospholipiden, die für eine Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen, beispielsweise Neurotransmission, neuronale Plastizität und neuronale Interaktion, zuständig sind [268]. Dabei ist es besonders interessant, dass die neuronalen Phospholipide eine Vielzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), insbesondere Docosahexaensäure und Arachidonsäure, besitzen. Es wurde beschrieben, dass mit einer Zunahme an freien Radikalen im Gehirn der Anteil an PUFA abnimmt [278,282]. Durch die *ADAM10*-Gendeletion kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer Zunahme der Lyso-PC-Spezies im Gesamten mit einer deutlichen Abnahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (siehe Kapitel 4.1.2.1.1). In diesem Zusammenhang könnte die Deletion von

ADAM10 mit einer verringerten Möglichkeit freie Radikale zu bekämpfen und somit oxidativen Stress zu reduzieren, in Verbindung stehen. Es könnte sich anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern lassen, dass *ADAM10* für eine optimale Lipidzusammensetzung innerhalb der Plasmamembran insbesondere für ein optimales Verhältnis von PCaa-Spezies zu Lyso-PC-Spezies, von Nöten ist. Das Fehlen von *ADAM10* als Transmembranprotein könnte zu einer Verlagerung des Gleichgewichts und einer Imbalance zugunsten der Lyso-PC-Spezies führen. Diese bilden wiederum den Grundstein für proinflammatorische Prozesse und eine Zunahme an oxidativem Stress, welche die Grundlage für die Entstehung einer Vielzahl an Erkrankungen, z. B. der Entstehung von Atherosklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen, darstellen [40,185].

5.1.3 Einfluss des *ADAM10*-Knockouts auf weitere Phospholipide

5.1.3.1 Einfluss auf Phosphatidylcholine und Plasmalogene

In der vorliegenden Arbeit ging die Verschiebung des Verhältnisses von PCaa-Spezies zu Lyso-PC-Spezies andererseits mit einer signifikanten Verringerung der Phosphatidylcholinspezies in HEK *ADAM10*^{-/-}-Zellen einher.

Im Vergleich zu HEK-mock-Zellen war in HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen eine signifikante Reduzierung der Gesamt-PCaa-Spezies auf 67,00 % zu beobachten, was sich zusätzlich durch eine deutliche Linksverschiebung der meisten PCaa-Spezies im Volcano-Plot zeigte (siehe Kapitel 4.1.2.1.2). Phosphatidylcholine machen mit Phosphatidylethanolaminen circa 50 % der Membranlipide aus [83] und sind deshalb als strukturgebende Moleküle innerhalb der Membran unerlässlich. Sie kommen ubiquitär in allen Zellen vor und können darüber hinaus ebenfalls auf die Signaltransduktion Einfluss nehmen [118,132]. Interessanterweise besteht die Trockenmasse des menschlichen Gehirns zu 9 – 10 % aus Phosphatidylcholinen [268], was ihre Bedeutung für das zentrale Nervensystem zusätzlich unterstreicht. Darüber hinaus stellen sie als Monolayer die hydrophile Komponente der äußeren Hülle von Lipidtropfen dar [316]. Außerdem sind sie ein Hauptbestandteil des pulmonalen Surfactants [4], wobei sie einen essenziellen Faktor für die Herabsenkung der alveolären Oberflächenspannung darstellen. Ihre chemische Struktur besteht aus einem Glycerin, das einerseits mit zwei Fettsäuren und andererseits über eine Phosphatgruppe mit einem Cholin verbunden ist. Dabei ist in den meisten Fällen am 1. Kohlenstoffatom eine gesättigte Fettsäure und am 2. Kohlenstoffatom eine mehrfach ungesättigte Fettsäure gebunden [332]. Phosphatidylcholine nehmen auch im zentralen Nervensystem im Rahmen der Synaptogenese eine wichtige Rolle ein. Die Alzheimer-Erkrankung geht mit einem erhöhten Maß an Schäden in der synaptischen Membran und den Synapsen einher [325]. Die synaptischen Membranen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, welche aus DHA, Uridin und Cholin besteht [241]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung von Phosphatidylcholinen in frühen

Alzheimer-Stadien zur Verlangsamung der Erkrankung beitragen kann [33,260]. Ein Mangel an Phosphatidylcholinen in Neuronen könnte dementsprechend mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Alzheimer-Erkrankung einhergehen.

Fortasyn Connect, eine Trinknahrung zur Supplementierung von Nährstoffen, die die Synaptogenese fördern, enthält unter anderem ebenfalls DHA, Uridin und Cholin. In einer über mittlerweile 36 Monate andauernden Studie, in der die Supplementierung dieses Getränks bei Patient*innen mit milder kognitiver Einschränkung und milden Alzheimer-Symptomen durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass das Voranschreiten der kognitiven Beeinträchtigung durch diese Bestandteile verlangsamt werden konnte [283]. In diesem Zusammenhang konnte durch Wurtman *et al.* eine Förderung der Synaptogenese und der Produktion synaptischer Proteine durch die Supplementierung von Uridin, Colin und DHA oder EPA ebenfalls gezeigt werden [324,326].

Interessanterweise ist mit Blick auf die Phosphatidylcholin-Plasmalogene ein ähnliches Verhalten dieser Lipidklasse nach *ADAM10*-Gendeletion analog zu den PCaa-Spezies zu verzeichnen (siehe Kapitel 4.1.2.1.3). Auch hier kam es in den *ADAM10*-Knockout-Zellen zu einer signifikanten Reduktion aller untersuchten PCae-Spezies auf 80,6 %. PCae stellen neben den PCaa-Spezies mit bis zu 20 % einen Hauptbestandteil der Gesamt-Phospholipidmasse des Menschen dar und kommen in großen Mengen vor allem im Gehirn, dem Herzen, den Neutrophilen, der Niere und der Lunge vor [27,105,225]. Ihre chemische Struktur besteht aus einem Fettalkohol, der an der sn1-Position eine Vinyetherbindung und an der sn2-Position des Glycerin-Gerüsts mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren angereichert ist [27]. Neben ihrer Rolle als Strukturlipide in der Plasmamembran spielen Plasmalogene auch eine Rolle bei der Reduktion von oxidativem Stress und gelten als Reservoir für *second messenger* für beispielsweise Arachidonsäure (AA) oder Docosahexaensäure (DHA) [285]. Diese Verringerung der Plasmalogen-Spiegel in *ADAM10*-Knockout-Zellen geht ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen einher. Plasmalogene sind, verglichen zu den Phosphatidylcholinen, aufgrund ihrer Enoetherbindung an der sn1-Position des GlycerinGrundgerüsts anfälliger für Oxidation. Ihre Reduktion könnte somit ein Maß für vermehrt anfallenden oxidativen Stress darstellen. Reduzierte PCae-Spiegel sind auch *in vivo* im Blut und in humanen Gehirnen von AD-Patient*innen festgestellt worden [86,105,233,291]. Rothhaar *et al.* konnten zeigen, dass Plasmalogene direkten Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase nehmen. Anhand dessen konnte ihr protektiver Einfluss für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung weitergehend unterstrichen werden, indem sie direkten Einfluss auf die γ -Sekretase-Aktivität nehmen [259].

Mit Blick auf das Verhalten der unterschiedlichen PCaa- und PCae-Spezies in Bezug auf die Sättigung der Fettsäuren ist eine signifikante Reduzierung der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA und PUFA) in beiden Lipidklassen zu verzeichnen (siehe

Kapitel 4.1.2.1.2 und Kapitel 4.1.2.1.3). Insbesondere den PUFA werden eine Reihe gesundheitsfördernder Eigenschaften zugeschrieben [169,266]. Sie werden in Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren unterschieden und bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Schwanz. Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten sind sie für zahlreiche Prozesse im Organismus zuständig. Dazu zählen unter anderem antiinflammatorische Eigenschaften, Aufrechterhaltung der Membranfluidität, eine Verringerung der Sekretion entzündungsfördernder Zytokine durch Makrophagen, eine Verhinderung der Blutplättchen-Aggregation und eine Verringerung der Triglyceridsynthese in hepatischem Gewebe [315].

Da durch das Fehlen von ADAM10 in der Plasmamembran von HEK-Zellen in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduzierung der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowohl in den PCaa- als auch den PCae-Spezies zu verzeichnen war, könnte davon ausgegangen werden, dass beispielsweise deren antientzündliche Eigenschaften wegfallen und somit vermehrt Entzündungen auftreten könnten. In diesem Zusammenhang könnte das Fehlen von ADAM10 zu einem vermehrten Auftreten von inflammatorischen Prozessen in den entsprechenden Organen führen, wodurch beispielsweise im zentralen Nervensystem ein erhöhtes Risiko für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen besteht [17]. Zu den bekanntesten Vertretern der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zählen neben der Arachidonsäure (C20:4) auch die Docosahexaensäure (C22:6) und die Eicosapentaensäure (C20:5). Insbesondere die Arachidonsäure und die Docosahexaensäure kommen in großen Mengen in der Plasmamembran im zentralen Nervensystem vor [38]. Nach Freisetzung aus der Plasmamembran können sie in eine Reihe biologisch aktiver Derivate umgewandelt werden und somit Einfluss auf verschiedene Stoffwechsel- und Signalwege nehmen. Im menschlichen Gehirn kommt diesen beiden PUFA eine besondere Rolle bei der Regulation der Neuroinflammation, der Neurotransmission und dem Zellüberleben zu [145,273]. So sind beispielsweise bei Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung oder bei Depression die PUFA-Spiegel deutlich verringert [162,175]. Ein optimales Verhältnis an PUFA im zentralen Nervensystem ist somit insbesondere zur Prävention neurodegenerativer Erkrankungen von besonderer Wichtigkeit. Das Fehlen von ADAM10 in HEK-Zellen und die damit verbundene Reduktion an Phosphatidylcholinen könnte dementsprechend ein erhöhtes Risiko für die Entstehung dieser Erkrankungen bedeuten. Da damit verbunden auch weniger MUFA und PUFA in der Plasmamembran vorhanden sind, können diese in der Folge ihre antientzündlichen Eigenschaften nicht mehr in ausreichendem Maße erfüllen. Interessanterweise wurde herausgefunden, dass DHA in Kombination mit NPD1 (engl.: *neuroprotectin D1*) im Umkehrschluss eine Aktivierung von ADAM10 in neuronalem Gewebe unterstützt und somit die APP-Prozessierung auf dem nicht-amyloidogenen Wege beeinflusst [342].

Analog zum Sättigungsgrad fiel mit Blick auf die Kettenlänge in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine signifikante Reduktion der mittel- und langkettigen Fettsäuren in den untersuchten PCaa- und PCae-Spezies nach *ADAM10*-Gendeletion auf (siehe Kapitel 4.1.2.1.2 und Kapitel 4.1.2.1.3).

Interessanterweise fiel bei der Betrachtung der Hauptspezies auf, dass sowohl in den analysierten PCaa- als auch den PCae-Spezies nach *ADAM10*-Gendeletion die Lipidspezies mit der Zusammensetzung C34:1 am häufigsten vorkommt. In den PCaa-Spezies war ihre Effektstärke auf 70,7 % und in den PCae-Spezies auf 78,5 % reduziert.

Es hat sich herausgestellt, dass einzelne Lipide bei Patient*innen mit Diabetes Mellitus Typ II im Blutplasma erhöht waren und in enger Verbindung zur Entstehung einer autonomen Herzfunktionsstörung stehen. Eine identifizierte Lipidspezies war in diesem Zusammenhang die Phosphatidylcholinspezies PCaa C34:1 [346].

5.1.3.2 Einfluss der *ADAM10*-Gendeletion auf Sphingomyelin-Spezies

Sphingomyeline (SM), eine weitere Unterklasse der Phospholipide, sind ebenfalls ein Bestandteil in biologischen Membranen [99]. Insbesondere im Gehirn ist ihr Anteil von großer Bedeutung, da sie den Hauptbestandteil der Myelinscheiden ausmachen [41]. Außerdem spielen SM eine wichtige Rolle in der neuronalen Signaltransduktion. Ihre Interaktion mit Ceramiden spielt vor allem für die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung eine ausschlaggebende Rolle, da eine Dysregulierung der SM/Ceramid-Signalkaskade zu synaptischer Dysfunktion, Neuroinflammation und neuronaler Apoptose führt [196,321,322]. Die strukturelle Grundlage der SM bildet der langkettige Alkohol Sphingosin, im Gegensatz zu Glycerin, welches bei den anderen oben beschriebenen Phospholipiden die strukturelle Grundlage darstellt. Über das 2. Kohlenstoffatom ist eine Fettsäure über eine Amidbindung verknüpft und über eine Phosphoestergruppe ist an die C1-Hydroxygruppe eine Phosphatgruppe angebunden. Bei ihrer Synthese können Phosphatidylcholine als Substrat für die SM-Synthase dienen [108,173].

Bei Betrachtung der ungewichteten Effektstärke aller analysierten SM-Spezies in HEK-*ADAM10*-defizienten Zellen war eine signifikante Reduktion auf 76,0 % zu beobachten. Da in HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen auch eine signifikante Reduzierung der PCaa-Spezies zu sehen war und diese auch als Substrat für die Synthese der SM dienen können, könnte die Reduktion der Sphingomyeline dadurch erklärt werden. Durch die Berechnung des Verhältnisses von SM-Gesamt/PCaa-Gesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Gendeletion von *ADAM10* den Sphingomyelin-Anabolismus aus PCaa-Spezies verringern könnte.

Mit Blick sowohl auf den Sättigungsgrad als auch die Kettenlänge der analysierten SM-Spezies war in allen Unterkategorien eine signifikante Reduzierung in den HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen zu beobachten.

Eine Vielzahl von Studien hat den Zusammenhang zwischen reduzierten Sphingomyelin-Spiegeln und der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung gezeigt [49,290]. Eine vermehrte Ansammlung von A β 42 induziert auf direktem Wege eine Erhöhung der neutralen Sphingomyelinase-Aktivität, die zu einer Herabsenkung des SM-Spiegels im zentralen Nervensystem führt [91]. Diese SM-Reduktion begünstigt wiederum das Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung. Generell konnte herausgefunden werden, dass die SM-Konzentration in menschlichen Gehirnen von an AD-erkrankten Menschen und in AD-Tiermodellen deutlich verringert ist [112]. Das Fehlen von ADAM10 in HEK-Zellen kann durch die signifikante Reduktion der SM-Spiegel ebenfalls auf die potenzielle Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen hinweisen.

5.1.4 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

Triglyceride gehören zu den Neutralfetten und sind ein wichtiger Marker für den zellulären Energiestoffwechsel. Ihre chemische Struktur basiert auf dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, der mit drei Fettsäuremolekülen verestert ist (Matsushita, Nakagawa, und Koike 2021). Sie dienen als zelluläre Energiespeicher, indem sie Fettsäuren binden und in Form von Lipidtröpfchen im Zytosol auftreten [189]. Die aus den TAG gewonnenen Fettsäuren können in den Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt werden. Dazu wird jede Fettsäure einzeln abgespalten und an Carnitine gebunden. Klinisch gelten sie als kardiovaskulärer Risikofaktor [29,257] und werden in der täglichen medizinischen Praxis im Blut gemessen, wo sie als Indikator für Fettstoffwechselstörungen und/oder Adipositas gelten.

Mit Blick auf die ungewichtete Effektstärke aller TAG-Spezies in HEK-ADAM10^{-/-}-Zellen verglichen zu HEK-mock-Zellen war ein Anstieg auf 249,1 % (\pm 38,4 %) zu beobachten (siehe Abbildung 15). Bei der gruppenspezifischen Analyse im Volcano Plot war ein eindeutiger Trend der meisten TAG-Spezies mit einer Verschiebung nach rechts und einer damit zusammenhängenden Zunahme der TAG-Spezies zu verzeichnen. Das Fehlen von ADAM10 geht anhand der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit einer generellen Zunahme der intrazellulären Triglycerid-Spezies in HEK-Zellen einher (siehe Kapitel 4.1.2.2.1). Dabei ist mit Blick auf den Sättigungsgrad zu sehen, dass vor allem Fettsäuren mit keiner, einer oder zwei Doppelbindungen vermehrt auftreten, während Fettsäuren mit mehr als zwei Doppelbindungen deutlich weniger häufiger vorkommen. Die TAG gelten als intrazellulärer Speicherort für Fettsäuren. Sie sammeln sich im Kern von sogenannten Lipidtröpfchen an und können darüber einerseits die Fettsäuren zur Energiegewinnung bereitstellen und andererseits eine vermehrte Ansammlung freier Fettsäuren im Zytosol verhindern. Da sowohl in den PCaa- als auch in den analysierten PCae- und SM-Spezies eine signifikante Reduktion der einfach- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu sehen war, könnte dadurch auch ein Erklärungsmodell darstellen, dass weniger mehrfach ungesättigte Fettsäuren an den TAG

gebunden sind. Bei Betrachtung der Spezies, die am häufigsten vorkommen, war ein heterogenes Bild zu verzeichnen. Von den sieben aufgeführten Vertretern sind drei TAG-Spezies mit gesättigten und jeweils zwei Spezies mit einfach- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufgeführt.

Generell lässt sich aus den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten ablesen, dass ein Fehlen von ADAM10 in HEK-Zellen mit einer Zunahme der intrazellulären TAG-Spiegel einher geht. Diese Akkumulation von TAG-Spezies innerhalb der Zelle könnte mit einer Zunahme an intrazellulären Lipidtröpfchen in Zusammenhang gebracht werden.

Lipidtröpfchen besitzen, wie oben beschrieben, aufgrund ihrer Zusammensetzung zahlreiche wichtige Funktionen für die Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse. Allerdings hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass eine zunehmende Akkumulation an intrazellulären Lipidtröpfchen mit vermehrter Lipotoxizität einhergeht und mit einigen Erkrankungen in Verbindung steht: Zahlreiche Studien beschreiben, dass eine Akkumulation von Lipidtröpfchen im Gehirn Prozesse wie den der neuronalen Inflammation stimulieren und deshalb ursächlich für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Erkrankung sein können [67,171,330].

Liu *et al.* zeigten im Jahr 2015, dass die Ansammlung von Lipidtröpfchen in der Glia eine Folge von vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und neuronaler mitochondrialer Dysfunktion ist [178], welche wiederum die Neurodegeneration beschleunigen. In einem Parkinson-Mausmodell konnte eine verstärkte Anhäufung von Lipidtröpfchen gefunden werden [106]. Allerdings konnte ebenfalls herausgefunden werden, dass es mit zunehmendem Alter im Gehirn zu einer vermehrten Ansammlung von LD in der Mikroglia kommt. Durch die Ansammlung wird die Phagozytose reduziert und es kommt zur erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und proinflammatorischer Zytokine [187].

Eine vermehrte Akkumulation von LD konnte allerdings nicht nur bei neuronalen Erkrankungen, sondern bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen festgestellt werden.

In Nierenzellen steht eine zunehmende Akkumulation von Lipidtröpfchen mit der Entstehung der diabetischen Nephropathie in Verbindung [146]. Dabei scheint die intrarenale Ansammlung von TAG, vor allem in den Glomeruluszellen und in den Zellen des proximalen Tubulus, eine Ursache für den zunehmenden Verlust der Nierenfunktion darzustellen [23,199,299]. Sollte die fortschreitende Lipidanreicherung durch eine unzureichend kontrollierte diabetische Stoffwechsellage nicht aufgehalten werden, kann es zu einem Voranschreiten der Glomerulosklerose kommen, welche den Verlust der Nierenfunktion weiter fördert [114]. Interessanterweise beeinflussen vor allem gesättigte Fettsäuren bei einem Überangebot die Entstehung einer Insulinresistenz und können somit auch Ursache für die Entstehung von Diabetes Mellitus Typ II sein [71].

Carnitine nehmen beim Transport der Fettsäuren aus dem Zytosol über die innere Mitochondrienmembran ins Mitochondrium eine zentrale Rolle ein [230]. Im Mitochondrium wird der Abbau der Fettsäuren über die β -Oxidation geregelt und trägt darüber hinaus zur Energiegewinnung für die Zelle bei. Da in HEK-*ADAM10*^{-/-}-Zellen im Vergleich zu HEK-mock-Zellen ein deutlicher Anstieg der TAG-Spezies zu beobachten war, war die anschließende Betrachtung der Carnitine sinnvoll. Hierbei war sowohl mit Blick auf die gruppenspezifische Analyse im Volcano Plot als auch auf das Verhalten der einzelnen Spezies keine einheitliche Verteilung der Carnitin-Spezies erkennbar (siehe Abbildung 16). Interessanterweise war das Endprodukt der geradzahligen Fettsäure-Oxidation C02 auf 157,3 % signifikant erhöht, während das Endprodukt der ungeradzahligen Fettsäure-Oxidation C03 signifikant auf 78,0 % reduziert war. Das Verhältnis aus $(C16+C18)/C2$ stellt ein aussagekräftiges Maß für den Ablauf der geradzahligen Fettsäure-Oxidation dar. In den HEK-Zellen mit *ADAM10*-Knockout war eine signifikante Reduzierung dieses Verhältnisses zu beobachten, was auf eine unzureichend ablaufende β -Oxidation der geradzahligen Fettsäuren schließen lassen könnte. Anhand dieser Ergebnisse ist jedoch keine klare Aussage bezüglich des Verhaltens der Carnitin-Spezies auf das Überangebot an intrazellulären TAG-Spezies ableitbar.

5.1.5 Auswirkungen des *ADAM10*-Knockouts auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung

Anhand der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, zusammengefasst in Abbildung 41, konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *ADAM10* als Transmembranprotein zu einer deutlichen Verschiebung in der Zusammensetzung der Lipidkonstellation in HEK-Zellen führt. Durch den *ADAM10*-Knockout war eine signifikante Abnahme der PCaa- und PCae-Spezies zu sehen, während die Lyso-PC-Spezies signifikant erhöht waren. Diese Verschiebung könnte durch eine vermehrte Aktivität der Phospholipase A2 erklärt werden, die durch das Fehlen von *ADAM10* verstärkt aktiviert sein könnte. Gleichzeitig führte die *ADAM10*-Gendeletion in HEK-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Sphingomyelin-Spezies. Die signifikante Verringerung der PCaa-, PCae- und SM-Spezies könnte zu einer Abnahme für den zellulären Organismus wichtiger Prozesse wie Signaltransduktion, Membranfluidität oder auch Neurotransmission und neuronale Plastizität führen [27]. Im Gegensatz dazu bedingte die Deletion des Gens *ADAM10* in HEK-Zellen neben einer signifikanten Erhöhung der Lyso-Phosphatidylcholine auch eine deutliche Erhöhung der Triglycerid-Spiegel. Ein Überangebot an Lyso-PC- und TAG-Spezies könnte zu einem erhöhten oxidativen Stresslevel und vermehrter Inflammation führen, welche die Grundlage für zahlreiche Erkrankungen darstellen. Bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen sind ebenfalls Veränderungen in der Lipidzusammensetzung zu beobachten, die Einfluss auf die Pathogenese z.B. der Alzheimer-Erkrankung, Morbus Parkinson oder Multiple Sklerose nehmen können [99,330]. Generell

konnte in Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen deutliche Lipidveränderungen beobachtet werden. Somit waren beispielsweise neben weiteren Lipidveränderungen der Gesamt-Phospholipidgehalt, die Spiegel an Phosphatidylcholinen, Plasmalogenen oder auch an Sphingomyelinen verändert [96]. Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass sowohl die A β -Freisetzung als auch der A β -Abbau in direktem Zusammenhang mit spezifischen Lipiden stehen [95,194,259,331,338]. Die daraus resultierenden Veränderungen in der A β -Homöostase stehen in direktem Zusammenhang mit der A β -Gesamtmenge und der anschließenden senilen Plaque-Aggregation [88]. Eine deutliche Erhöhung der Triglyceridspiegel könnte mit einem vermehrten Auftreten von Lipidtröpfchen korrelieren. Eine Akkumulation von Lipidtröpfchen ist auch bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zu beobachten und trägt zum Voranschreiten dieser Erkrankung bei [205].

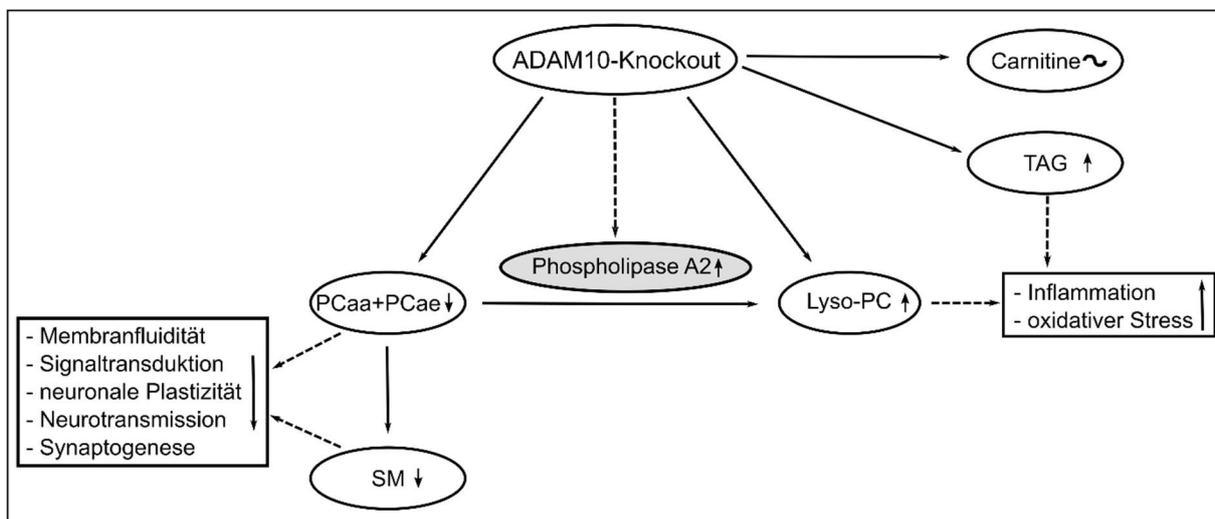


Abbildung 41: schematische Zusammenfassung des Einflusses des ADAM10-Knockouts auf die Lipidhomöostase in HEK-Zellen. PCaa: Phosphatidylcholine, PCae: Phosphatidylcholin-Plasmalogene, SM: Sphingomyeline, Lyso-PC: Lyso-Phosphatidylcholine, TAG: Triglyceride. Eigene Abbildung.

Das Fehlen von ADAM10 kann in der APP-Prozessierung zu einigen Veränderungen der proteolytischen Spaltung führen. Es kann durch das Fehlen zu einem vermehrten Ablauf der amyloiden Prozessierung mit vermehrter A β -Produktion kommen. Allerdings könnte das Fehlen der ADAM10-Protease auch zu einer vermehrten Expression oder verstärkter Proteinstabilität anderer α -Sekretasen, wie beispielsweise ADAM9 oder ADAM17, führen, die zur Aufrechterhaltung der A β -Homöostase beitragen könnten. Dies ist unter den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bedingungen nicht anzunehmen, da sonst das sAPP α -Level keine signifikante Reduktion zeigen würde.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich einer Deletion des Gens ADAM10 in HEK-Zellen sind vorsichtig zu interpretieren. Zum einen stellen die analysierten Daten *in vitro* Ergebnisse aus dem Zellkulturmodell dar und können diesbezüglich nicht analog auf den menschlichen Organismus übertragen werden. Zum anderen sind die erhaltenen

Daten Ergebnisse, die aus einem Einzelklon hervorgehen. Es gibt keine Vergleichbarkeit zu einem anderen erhaltenen Einzelklon, der auch mit einer *ADAM10*-Deletion besteht, um die Ergebnisse auf mehrere Modelle übertragen zu können. Unter diesem Aspekt besteht die Möglichkeit, dass die erhaltenen Daten auch auf zufällige Mutationen oder *off-targets*, die im Rahmen der CRISPR/Cas9-Gendeletion aufgetreten sein könnten, zurückführbar wären.

Es sind also weitere Studien *in vivo* oder unter anderen Bedingungen notwendig, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und weitere Interpretationen zuzulassen. Weiter könnten in dem in der vorliegenden Arbeit generierten Zellkulturmodell *in vitro* Folgeexperimente durchgeführt werden, die die mechanistischen Zusammenhänge der erhaltenen Veränderungen weiter analysieren. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse können als Grundlage zur weiterführenden Erforschung der Rolle von *ADAM10* im Lipidhaushalt der Zellen dienen. Außerdem können sie Aufschluss über potenzielle Effekte auf die Lipidzusammensetzung einzelner Zellen nach möglicher Behandlung mit einem *ADAM10*-Antikörper liefern. Dies ist insbesondere beim Einsatz von *ADAM10*-Inhibitoren in der Therapie verschiedener Tumor-Erkrankungen zu berücksichtigen.

5.2 Einfluss von ADAM10-Modulatoren auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen

5.2.1 Effekt von EGCG, Am80 und Gemfibrozil auf die sAPP α -Freisetzung

Sowohl Gemfibrozil, das als Lipidsenker medikamentös eingesetzt wird, als auch Tamibarotene, das in der Zweitlinientherapie bei der akuten Promyelozyten-Leukämie Verwendung findet, haben neben ihrer Hauptfunktion auch einen modulierenden Effekt auf die Genexpression von ADAM10 [314]. Ähnlich verhält sich dies auch bei der in grünem Tee vorkommenden Substanz Epigallocatechin-3-gallat. Primär wirksam als Antioxidans, konnte in Studien ein proteinstabilisierender Effekt auf ADAM10 nachgewiesen werden [70].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern diese drei Substanzen das Vorhandensein von ADAM10 in Nieren-, Lungen- und Nervenzellen modulieren. Anschließend wurde analysiert, inwiefern diese Substanzen Einfluss auf die Lipidkomposition der drei verschiedenen Zellreihen nehmen. Dazu wurde in einem ersten Schritt die sAPP α -Freisetzung aus dem Kulturmedium von HEK-, Calu-3- und SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden Substanzen bestimmt. sAPP α kann dabei als indirekter Nachweis für die ADAM10-Aktivität genutzt werden (detailliert beschrieben in Kapitel 4.2.2).

Mit Blick auf die Ergebnisse von sAPP α in den jeweiligen Kulturmedien nach entsprechender Inkubation zeigten sich heterogene Ergebnisse. Während sowohl im Medium nach EGCG- als auch nach Am80-Inkubation zelllinienübergreifend eine signifikante Erhöhung von sAPP α bestimmt werden konnte, zeigten sich nach der Inkubation mit Gemfibrozil unterschiedliche Ergebnisse in den drei untersuchten Zellreihen. In der Lungenkrebszelllinie Calu-3 führte die Inkubation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Gemfibrozil über 72 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der sAPP α -Expression auf 277,0 % (siehe Abbildung 18). Das war der stärkste Effekt aller Substanzen auf allen untersuchten Zelllinien. Interessanterweise bedingte jedoch die Inkubation von Gemfibrozil sowohl in HEK als auch in SH-SY5Y-Zellen eine Reduktion der sAPP α -Expression. Dieser Effekt war in der untersuchten Neuroblastom-Zelllinie statistisch signifikant. Anhand dieser Ergebnisse könnte geschlossen werden, dass Gemfibrozil gewebespezifische Effekte bezüglich der ADAM10-Genexpression bedingt.

Gerade die gegensätzlichen Ergebnisse von Gemfibrozil bezüglich der Aktivität von ADAM10 in unterschiedlichen Zelllinien könnte Aufschluss auf die Wirkung von Gemfibrozil als ADAM10-Modulator in verschiedenen Geweben geben.

5.2.2 Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren, und Lungenzellen

Da auch nach jahrelanger intensiver Forschung weiterhin kein Durchbruch in der Therapie der Alzheimer-Erkrankung zu verzeichnen ist, sind vor allem supportive und präventive

Maßnahmen weiterhin von hohem Interesse, um die Erkrankung entweder zu verhindern oder in ihrem Fortschreiten zu verlangsamen [50]. Durch den in Kapitel 4.2.2 nachgewiesenen positiven Effekt der Substanzen Epigallocatechin-3-gallat und Tamibarotene auf ADAM10, stellen diese ein interessantes Ziel für eine Intensivierung der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP dar. EGCG zählt als einer der Hauptbestandteile des Trockengewichts in grünem Tee zu einem hochfrequentierten Nahrungsmittel [32], weshalb seine Auswirkung auf die Lipidhomöostase in unterschiedlichen Organen unabhängig von der protektiven Wirkung auf neurodegenerative Erkrankungen von besonderem Interesse ist. Um diese Auswirkungen untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3-Wt-Zellen aus unterschiedlichen Geweben stellvertretend ausgewählt und mit EGCG für 72 Stunden inkubiert und anschließend semiquantitativ massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde eine Konzentration von 10 µmol/l gewählt.

In einer eingehenden Untersuchung der EFSA (engl.: *European Food Safety Authority*) von EGCG auf eine mögliche Hepatotoxizität wurde angegeben, dass die durchschnittliche tägliche EGCG-Aufnahme durch den Verzehr von grünem Tee zwischen 90 und 300 mg/Tag liegt [62]. In ihrer Untersuchung auf potenzielle hepatotoxische Effekte listete das Gremium der EFSA einige Überlegungen auf, die auch in der hier vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurden. Unter anderem wurde angemerkt, dass nach oraler Aufnahme von grünem Tee nur ein kleiner Teil des EGCGs absorbiert wird, da ein Großteil während des Aufgießens und Abkühlens ausfällt und EGCG somit in seiner Bioverfügbarkeit stark minimiert [62]. Aus diesen Gründen wurde eine vergleichsweise geringe Konzentration zur Inkubation genutzt, um möglichst physiologische Konzentrationen zu erreichen und anschließend daran die Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung der einzelnen Zelllinien zu analysieren.

5.2.2.1 Einfluss auf Phospholipide

Mit Blick auf den Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die Phospholipide konnten unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen generell keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Bei Betrachtung der Phosphatidylcholin-Spezies bedingte EGCG in SH-SY5Y Wt-Zellen einen minimalen Anstieg der Gesamt-PCaa-Spezies auf 103,3 % (siehe Abbildung 19). Durch diese Erhöhung der Phosphatidylcholin-Level in Nervenzellen könnte EGCG ein leicht protektiver Effekt bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, durch eine verstärkte Synaptogenese, zugesprochen werden [325].

Ähnliche Ergebnisse erzielte die Inkubation von EGCG mit Blick auf die Plasmalogen-Spiegel. Hierbei kam es zu einer Erhöhung der Gesamt-PCae-Spiegel in Nervenzellen auf 108,7 % (siehe Abbildung 19). Plasmalogene liefern einen besonderen Einfluss zur Verhinderung der Entstehung von oxidativem Stress. Durch die Erhöhung der PCae-Level in SH-SY5Y Wt-Zellen könnte EGCG somit bei Erkrankungen, die durch radikale Sauerstoffspezies ausgelöst

werden, wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung oder auch Krebserkrankungen, ein möglicher positiver Effekt zugeschrieben werden.

Interessanterweise bedingte EGCG einen Anstieg der Gesamt-Lyso-PC-Spiegel in humanen Nervenzellen auf 110,8 % (siehe Abbildung **19**). Erhöhte Lyso-PC-Spiegel deuten in der Regel auf eine vermehrte Aktivität der Phospholipasen A1 oder A2 hin. Vermehrte PLA2-Aktivität konnte in Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen und im AD-Mausmodell festgestellt werden [263,264]. Im Rahmen dieser Ergebnisse könnte EGCG somit einen negativen Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung haben.

Des Weiteren bedingte die Inkubation von EGCG in Nervenzellen ein Anstieg der Sphingomyeline auf 106,8 % (siehe Abbildung **19**). Erhöhte SM-Spiegel gehen mit einer Reduktion der A β -Spiegel einher und besitzen dadurch protektive Eigenschaften bezüglich der Entstehung einer Alzheimer-Erkrankung [91].

Durch eine tendenzielle Erhöhung der PCaa-, PCae- und SM-Spiegel in humanen Neuroblastomzellen könnte Epigallocatechin-3-gallat protektive Wirkungen auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung, auch unabhängig vom direkten Effekt auf ADAM10 haben. Auch wenn die Ergebnisse das Signifikanzniveau nicht erreichten, war ein positiver Trend durch EGCG zu erkennen und die in der Literatur beschriebenen Effekte von EGCG auf die Verhinderung neurodegenerativer Erkrankungen könnte auf eine positive Beeinflussung der Phospholipid-Zusammensetzung in Nervenzellen erweitert werden.

Im Folgenden stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, wie EGCG die Lipidzusammensetzung anderer Organsysteme beeinflusst. Diesbezüglich wurde der Einfluss von EGCG auf die Phospholipid-Zusammensetzung in HEK Wt- und Calu-3-Wt-Zellen untersucht, die stellvertretend für zwei metabolisch aktive Organe (Niere und Lunge) ausgewählt wurden.

Die Inkubation von EGCG auf HEK Wt-Zellen bedingte eine Reduktion der PCaa-, PCae-, Lyso-PC- und SM-Spiegel in minimalem Maße. Die stärkste Reduzierung bedingte EGCG verglichen zur Kontrollgruppe in HEK-Zellen in Bezug auf die SM-Spiegel auf insgesamt 94,0 %. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Auswertung der EGCG-Inkubation auf Calu-3-Wt-Zellen beobachtet werden. Auch hier bedingte EGCG in allen vier untersuchten Phospholipid-Klassen eine minimale Reduzierung, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (siehe Abbildung **19**).

Im Rahmen dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Epigallocatechin-3-gallat einen positiven Effekt auf die Phospholipid-Zusammensetzung in humanen Nervenzellen besitzt und diese unterstützend zu den bisher beschriebenen Effekten zur Protektion von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen könnten. Des Weiteren konnte anhand dieser Ergebnisse gezeigt werden, dass die Inkubation von 10 μ mol/l EGCG in HEK Wt- und Calu-3

Wt-Zellen keine signifikanten Lipidveränderungen bedingt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Konsum von EGCG durch grünen Tee keine negativen Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung in Nieren-, Nerven- und Lungenzellen hat und gleichzeitig die positiven Eigenschaften von EGCG als starkes Antioxidans zur Protektion von neurodegenerativen Erkrankungen unterstützen kann.

5.2.2.2 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EGCG nur minimale Veränderungen auf die Phospholipide in Nieren- und Lungenzellen bedingte und gleichzeitig in Nervenzellen ein positiver Trend zu verzeichnen war, war im Anschluss die Betrachtung der Neutrallipide und Carnitine nach EGCG-Behandlung auf den drei Zelllinien sinnvoll.

Interessanterweise war der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat unter den gewählten experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit sowohl in Nerven- als auch in Nierenzellen nur minimal. EGCG schien die Triglyceridspiegel in den untersuchten Zelllinien weder positiv noch negativ zu beeinflussen. Interessanterweise führte es in Lungenzellen sogar zu einer Reduktion der TAG-Spiegel auf 80,8 % (siehe Abbildung 20).

Ähnlich führte die Behandlung von EGCG auf Nerven-, Nieren und Lungenzellen nur zu minimalen Veränderungen der Carnitin-Zusammensetzung. Zusammenfassend kann aus den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten abgeleitet werden, dass die Behandlung mit 10 µmol/l Epigallocatechin-3-gallat keine starken Auswirkungen auf den Carnitin- und Triglycerid-Stoffwechsel in den untersuchten Zellreihen aufweist.

5.2.3 Einfluss von Tamibarotene auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen

Retinoide gelten in der aktuellen Forschung als ein Ansatzpunkt zur Weiterentwicklung der Alzheimer-Therapie [18,166]. Aktuell finden in der klinischen Medizin verschiedene Retinoide Anwendung. So wird beispielsweise Acitretin, ein synthetisches Retinoid, in der Dermatologie zur Behandlung der schwer verlaufenden Psoriasis vulgaris eingesetzt [246]. Das natürlich vorkommende all-trans-Retinoat (ATRA) wird zur Behandlung der akuten Promyelozyten-Leukämie eingesetzt [334] und in Japan wird bei Patient*innen mit einem Rezidiv das synthetische Retinoid Tamibarotene zur Behandlung eingesetzt [200].

Aufgrund der Vielzahl an modulierenden Eigenschaften wird ihr Einsatz als Therapeutikum zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Über den RAR- und RXR-Rezeptor sind sie an zellulären Regulierungsprozessen wie dem Wachstum von Neuriten, an der Zelldifferenzierung und am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt [163,166]. Außerdem können Retinoide auch die Verarbeitung von Aβ im Gehirn beeinflussen, indem transkriptionell über die RAR- und RXR-Rezeptoren eine Hochregulierung des Gens *ADAM10* erfolgt [166].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Tamibarotene, was als synthetisches Retinoid nachweislich positive Effekte auf die Transkription von *ADAM10* hat (siehe Kapitel 4.2.2), und inwiefern es zu einem Einfluss auf die Lipidzusammensetzung in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen kommt. Analog zur Untersuchung von Epigallocatechin-3-gallat wurde der Einfluss von Tamibarotene ebenfalls in SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Wt-Zellen untersucht.

5.2.3.1 Einfluss auf Phospholipide

Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Inkubation mit EGCG führte die Behandlung von Tamibarotene zu heterogenen Ergebnissen in den untersuchten Zelllinien. Somit war beispielsweise eine Reduktion der Phosphatidylcholinspezies in Nerven- und Nierenzellen nach Am80-Behandlung zu verzeichnen (siehe Abbildung 19). In Nierenzellen wurde eine signifikante Reduktion erreicht. Im Volcano Plot der PCaa-Spezies in HEK-Zellen nach Tamibarotene-Behandlung war eine eindeutige Links-Verschiebung ausnahmslos aller analysierten Spezies zu verzeichnen (siehe Abbildung 19). Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass das systemisch wirksame Medikament Tamibarotene die PCaa-Spiegel in HEK-Zellen negativ beeinflusst. In Lungenzellen kam es durch die Behandlung von Am80 zu keinem aussagekräftigen Effekt der PCaa-Spezies. Auch bei der Betrachtung der weiteren analysierten Phospholipid-Klassen sind teilweise leicht entgegengesetzte Effekte von Tamibarotene in den untersuchten Zelllinien zu verzeichnen. Allerdings wurden weder bei Betrachtung der Plasmalogen- noch der Lysophosphatidylcholin- oder Sphingomyelin-Spezies signifikante Ergebnisse erreicht (siehe Abbildung 19).

5.2.3.2 Einfluss auf Neutrallipide und Carnitine

Mit Blick auf den Effekt von Tamibarotene auf die Beeinflussung der Triglycerid- und Carnitinspiegel in Nerven-, Nieren- oder Lungenzellen waren ebenfalls unterschiedliche und teilweise auch entgegengesetzte Ergebnisse zwischen den Zelllinien zu beobachten (siehe Abbildung 20).

Die Behandlung von Tamibarotene führte in Nervenzellen zu einem signifikanten Anstieg der Triglyceridspiegel auf 175,0 % (siehe Abbildung 20). Diese signifikante Erhöhung könnte zu einer schädlichen Beeinflussung der Nervenzellen nach Am80-Behandlung führen, weshalb Am80 als Ziel für die Beeinflussung der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung kritisch betrachtet werden sollte. In Anbetracht der Tatsache, dass es mit Blick auf den Carnitinspiegel in Nervenzellen nach Am80-Behandlung zu keiner einheitlichen Veränderung der untersuchten Spezies kam, kann nicht davon ausgegangen werden, dass das Überangebot an Fettsäuren, die in den TAG gespeichert werden, zur Energiegewinnung über die β -Oxidation genutzt wird. Die Ergebnisse könnten eher dahingehend interpretiert werden, dass die Behandlung mit Tamibarotene zu einem Mehrangebot von Fettsäuren in Nervenzellen führt, die in Triglyceriden gespeichert werden und bei massivem Überangebot einen

lipidtoxischen Effekt auslösen können [176]. Interessanterweise konnte in einer Studie von Melis *et al.* aus dem Jahr 2019 gezeigt werden, dass mit Am80 behandelte Mäuse ebenfalls eine Erhöhung der Triglyceridspiegel in der Leber aufwiesen [191].

Die Triglyceridspiegel in Nieren- und Lungenzellen wurden durch die Behandlung von Tamibarotene nicht signifikant beeinflusst. Jedoch schien weder die leichte Reduzierung der Triglyceride in Nierenzellen noch die leichte Erhöhung in Lungenzellen erheblichen Einfluss auf die Gesamtlipidkomposition in diesen Zelllinien zu haben.

5.2.4 Bedeutung der Lipidveränderungen durch EGCG und Tamibarotene und deren möglicher Einsatz zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung

Da sowohl die Behandlung mit EGCG als auch die Behandlung mit Am80 in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Erhöhung der sAPP α -Spiegel im Kulturmedium der behandelten Zellen führte, könnte davon ausgegangen werden, dass beide Substanzen einen positiven Effekt auf die A β -Homöostase haben. Eine erhöhte sAPP α -Expression im Zellkulturmedium kann als indirekter Nachweis für eine vermehrte Aktivität der α -Sekretasen gewertet werden. Als Hauptvertreter der α -Sekretasefamilie ist ADAM10 mittlerweile hinlänglich bekannt [174,307], weshalb die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse auf eine vermehrte Aktivität von ADAM10 nach Behandlung mit EGCG oder Am80 schließen lassen könnten. Dabei scheint Am80 durch die Interaktion mit den RAR- und RXR-Rezeptoren transkriptionell Einfluss auf die Regulation des *ADAM10*-Gens zu nehmen, was in allen drei untersuchten Zelllinien zu einem Anstieg von ADAM10 führte. Insbesondere in Nervenzellen könnte die vermehrte Expression von *ADAM10* zu einer positiven Beeinflussung der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung und somit zu einer reduzierten Produktion von A β führen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse könnte Tamibarotene als potenzielles Medikament zur Prävention der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung in Betracht gezogen werden, was einige Studien ebenfalls beschreiben [78,137]. Neben der Erhöhung der *ADAM10*-Expression konnte von Qiao *et al.* gezeigt werden, dass über die Interaktion des NF- κ B-Signalweges Am80 eine entzündungshemmende Wirkung auf BACE1 besitzt [243]. Allerdings scheint gerade die Behandlung von Tamibarotene in Nervenzellen auch zu einer signifikanten Erhöhung der Triglyceridspiegel und Ansammlung von Fettsäuren zu führen, welche nicht durch eine vermehrte Aktivität der β -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte die Behandlung von Tamibarotene zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung mit Vorsicht betrachtet werden und in weiteren Folgestudien *in vitro* und *in vivo* überprüft werden. Des Weiteren scheint die Behandlung mit Am80 auch einen negativen Effekt auf die Lipidzusammensetzung in Nierenzellen zu haben, da es die Phosphatidylcholinpiegel in HEK-Zellen signifikant reduziert (siehe Abbildung 19).

Der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die Prävention neurodegenerativer Erkrankungen bezieht sich in aller Regel auf die Reduktion von oxidativem Stress als starkes Antioxidans [329]. Außerdem konnte in einigen Mausmodellstudien eine signifikante Reduzierung der A β -Spiegel und eine Unterdrückung der Tau-Aggregation durch EGCG demonstriert werden [249,309]. In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass EGCG die pathogene Bildung von A β durch eine vermehrt ablaufende nicht-amyloidogene Prozessierung verhindert. Dabei wurde herausgefunden, dass EGCG im AD-Tiermodell den sAPP α -Gehalt erhöht [232]. Interessanterweise konnte in einer Studie von Giunta *et al.* beschrieben werden, dass die gleichzeitige Einnahme von EGCG und Fischöl die Bioverfügbarkeit von EGCG erhöht [87]. Bei einer Untersuchung, inwiefern EGCG die nicht-amyloidogene Prozessierung adressiert, konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit EGCG insbesondere die ADAM10-Reifung und damit einhergehend ein Anstieg des reifen ADAM10-Proteins induziert wurde [217]. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch EGCG nicht nur die nicht-amyloidogene Prozessierung gefördert wird, sondern es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass EGCG auch die A β -Expression signifikant reduziert [111].

In Verbindung zu diesen Ergebnissen stehen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten, dass EGCG analog zu Tamibarotene eine signifikante Erhöhung des sAPP α -Gehalts in den untersuchten Zelllinien bedingte (siehe Kapitel 4.2.2). Anhand dessen könnte EGCG in Nervenzellen ebenfalls zu einer vermehrten α -Sekretaseaktivität führen, was in einer vermehrt ablaufenden nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung resultiert und eine Ablagerung des pathologischen A β -Proteins verhindern könnte. Diese Ergebnisse lassen auf Basis der Zellkulturexperimente einen positiven Einfluss von EGCG auf die Verhinderung der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zu. Interessanterweise führt allerdings die Behandlung mit EGCG nicht nur selektiv in Nervenzellen zu einer Erhöhung der α -Sekretasen, sondern ebenfalls in Nieren- und Lungenzellen, was auf einen ubiquitären Effekt von EGCG auf die Proteinstabilität von ADAM10 schließen lassen könnte. Anhand dieser Ergebnisse könnte grüner Tee eine potenzielle Substanz zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung darstellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich aus diesem Grund mit der Frage, inwiefern die Einnahme von EGCG das Lipidprofil verschiedener Zellen beeinflusst. Unter den in der vorliegenden Arbeit genutzten Bedingungen (EGCG-Inkubation mit einer Konzentration von 10 μ mol/l) waren keinerlei signifikante Veränderungen in der Lipidzusammensetzung sowohl in Nerven- als auch in Nieren- und Lungenzellen zu verzeichnen. Interessanterweise konnte in Nervenzellen ein positiver Trend in der Veränderung der Phospholipid-Zusammensetzung beobachtet werden, welcher neben der beschriebenen Eigenschaften von EGCG als starkes Antioxidans und Förderung der ADAM10-Proteinstabilität, zusätzlich als protektive Eigenschaft zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung beitragen könnte.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse könnte geschlossen werden, dass der Konsum von grünem Tee in geringen Mengen keinen negativen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung in SH-SY5Y-, HEK- oder Calu-3-Zellen hat und darüber hinaus einen positiven Trend in der Lipidzusammensetzung der untersuchten Nervenzellen aufweist. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit Tamibarotene in Nieren- und Nervenzellen eine signifikante Beeinflussung der Lipidzusammensetzung, weshalb das synthetische Retinoid Am80 nicht uneingeschränkt zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung empfohlen werden sollte. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten beschränken sich dabei ausschließlich auf Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten. Diese Ergebnisse sollten in diesem Zusammenhang in weiteren *in vivo* Studien überprüft werden.

5.2.5 Einfluss von Gemfibrozil auf die Lipidhomöostase in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen

Gemfibrozil ist ein seit 40 Jahren bewährtes Medikament zur Senkung erhöhter Triglycerid-, VLDL- und LDL-Spiegel [327]. Darüber hinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass mittels Gemfibrozil-Behandlung die HDL-Konzentration erhöht werden kann und somit diesem Medikament ein legitimer Platz in der Lipidsenkungstherapie zugeschrieben wird [77]. Der Wirkmechanismus zur Senkung erhöhter Triglyceridwerte im Blutplasma ist, auch wenn er noch nicht vollständig geklärt ist, mittlerweile gut verstanden. Es ist jedoch noch nicht bekannt, wie die im Blutplasma abgebauten Triglyceride weiter verstoffwechselt werden. Werden sie nach ihrem Abbau über das hepatobiliäre- oder das renale System metabolisiert und ausgeschieden oder kommt es zu einer intrazellulären Aufnahme der Triglyceride in anderen Organen?

Um diese Frage zu adressieren, wurde sich in der vorliegenden Arbeit darauf konzentriert, wie einzelne Zellen verschiedener Organe mit der Zufuhr von Gemfibrozil umgehen und wie sich dabei das Lipidprofil der einzelnen Zellen verändert. Häufig handelt es sich bei den Patient*Innen, die Gemfibrozil verschrieben bekommen, um Patient*Innen mit einem breiten Spektrum an Vorerkrankungen, weshalb sich die Frage stellt, wie könnte sich Gemfibrozil auf die durch eventuelle Vorerkrankungen geschädigten Organe auswirken?

Stellvertretend für drei Organe wurde sich in der vorliegenden Arbeit, analog zur Untersuchung von Epigallocatechin-3-gallat und Tamibarotene, auf eine neuronale Zelllinie (SH-SY5Y), eine Nierenzelllinie (HEK) und eine Lungenzelllinie (Calu-3) konzentriert.

5.2.5.1 Gemfibrozil induziert zelllinienübergreifenden, intrazellulären Triglycerid-Anstieg

Anhand des in der vorliegenden Arbeit schon in vorangegangenen Kapiteln intensiv beschriebenen *shotgun lipidomics* Ansatzes sollten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien nach Gemfibrozil-Behandlung ermittelt

werden, die darüber hinaus auch teilweise Rückschlüsse auf die verschiedenen Gewebe geben können.

Generell konnte bei der Betrachtung der neutralen Lipide ein über alle Zelllinien hinweg signifikanter Anstieg der Triglyceride festgestellt werden (siehe Abbildung **21**). Im Gegensatz dazu bestanden mit Blick auf das Verhalten der verschiedenen Carnitin-Spezies deutliche Unterschiede zwischen den Nervenzellen einerseits und den Nieren- und Lungenzellen andererseits.

Gemfibrozil induzierte in den behandelten Calu-3-Zellen den stärksten TAG-Anstieg auf insgesamt 448,1 %. Allerdings kam es sowohl in den Nieren- als auch den Nervenzellen ebenfalls zu stark signifikanten Anstiegen der intrazellulären Triglyceridspiegel. Analog zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte von Baldo *et al.* ebenfalls ein durch Gemfibrozil induzierter intrazellulärer Triglyceridanstieg in humanen Fibroblastenzellen nachgewiesen werden [13]. Bezüglich der Untersuchung der Carnitin-Spezies konnten in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede zwischen den Zellreihen festgestellt werden. Sowohl in den Nieren- als auch in den Lungenzellen waren reduzierte Carnitinspiegel zu verzeichnen. Bei den Nierenzellen kam es zu einer signifikanten Reduktion von C03 als Endprodukt der ungeradzahigen β -Oxidation im Mitochondrium (siehe Abbildung **22**). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der nach 72-stündiger Inkubation mit Gemfibrozil induzierte intrazelluläre Triglycerid-Überschuss und die damit zusammenhängende Akkumulation von Fettsäuren in Nieren- und Lungenzellen nicht durch die β -Oxidation verstoffwechselt werden. Gegensätzlich dazu war in der Neuroblastomzelllinie ein genereller Anstieg aller analysierten Carnitin-Spezies zu beobachten. Dies wurde vor allem durch den signifikanten Anstieg von C03 und des Verhältnisses von $(C16+C18)/C2$ hervorgehoben. Anhand dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass die in Nervenzellen verstärkt ablaufende β -Oxidation in den Mitochondrien versucht, das Überangebot an TAG zu kompensieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Tatsache, dass Fettsäuren in Form von TAG im Gehirn häufiger zur zellulären Energiegewinnung verstoffwechselt werden [159].

Wie in vorausgegangenen Kapiteln beschrieben, sind Phospholipide für den Membranaufbau unerlässlich. Aus diesem Grund werden sie auch für die Membran der Lipidtröpfchen benötigt. Als Hauptbestandteil der einschichtigen Membran der Lipidtröpfchen wurden Phosphatidylcholine identifiziert [316]. In den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen zeigte sich ein genereller Anstieg der PCaa-Spezies in allen drei untersuchten Zelllinien. Dabei war das Ausmaß des Anstiegs analog zum TAG-Anstieg innerhalb jeder Zelllinie (Calu-3 > HEK > SH-SY5Y). Dieser Anstieg könnte dahingehend erklärt werden, dass die Phosphatidylcholin-Spezies in Form einer Einzelschicht die TAG verpacken und es somit zu einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Lipidtröpfchen in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen nach Gemfibrozil-Behandlung kommen könnte. Der relativ geringe Anstieg der

PCaa-Spezies verglichen zum massiven Anstieg der TAG-Spezies könnte darin begründet werden, dass die Einzelschicht der Lipidtröpfchen eine außerordentlich dünne Membran darstellt, während der Kern bestehend aus TAG und Cholesterin stark an Größe zunehmen kann [123].

5.2.5.2 Einfluss von Lipidtröpfchen auf verschiedene Pathologien in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen

Die Indikation von Gemfibrozil für den Einsatz in der klinischen Praxis ist heutzutage genau definiert [184]. Dabei kommen vor allem Patient*innen in Betracht, die aufgrund oder neben ihrer erhöhten Triglycerid- und VLDL-Spiegel im Blut noch weitere Komorbiditäten aufweisen und somit meistens weitere Vorerkrankungen anderer Organe bestehen können. Unter diesem Gesichtspunkt müssen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate bezüglich der massiven Erhöhung der intrazellulären TAG-Spiegel, die wahrscheinlich zu einer Erhöhung der LD in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen führen können, in einen besonderen Kontext gestellt werden. Schon bestehende Erkrankungen innerhalb dieser Organsysteme könnten durch die langfristige Einnahme von Gemfibrozil weiter verstärkt werden.

In den letzten Jahren sind Lipide immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. Dazu zählt seit einigen Jahren auch die Erforschung und Ergründung der Lipidtröpfchen und deren physiologische und pathophysiologische Einflüsse auf den Organismus. Diese Lipidtröpfchen spielen eine zentrale Rolle im zellulären Energie- und Lipidhaushalt [219]. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern und einer Phospholipid-Monoschicht, in die eine Vielzahl verschiedener Proteine eingelagert sind. Zu diesen membrangebundenen Proteinen zählt beispielsweise Perilipin, welches für die Regulation der hormonsensitiven Lipase als wichtige Komponente der Lipolyse fungiert und für die Biogenese der Lipidtröpfchen unerlässlich ist [123,219]. Ein weiteres Beispiel ist das membranassoziierte Protein CGI-58 (engl.: co-activator comparative gene identification 58), das einen starken Aktivator der adipösen Triglyceridlipase (ATGL) darstellt [335].

Die Biogenese der Lipidtröpfchen findet in und am endoplasmatischen Retikulum statt, wo kleinere Lipidaggregate gebildet werden, die dann in Form von Säckchen sequestriert und an das Zytosol abgegeben werden [123]. Durch ihre Funktion der Speicherung von Fettsäuren in Form von Triglyceriden und der permanent vorhandenen Möglichkeit diese für den Energiehaushalt der Zellen bereitzustellen, stellen Lipidtröpfchen hochdynamische Zellorganellen dar [219]. Fettsäuren können bei einer Dysregulierung toxischen Einfluss auf die jeweiligen Zellen und dadurch auch auf den gesamten Organismus nehmen, weshalb den Lipidtröpfchen eine zusätzliche Schlüsselfunktion zukommt [219]. Sie kommen ubiquitär vor und können je nach Angebot oder Bedarf wachsen oder an Größe abnehmen. Bei einem

Überangebot an Fettsäuren dienen sie als Pufferort potenziell toxischer Lipide und können somit eine protektive Rolle für den Organismus einnehmen [126].

Lipidtröpfchen spielen auch aus pathophysiologischer Sicht eine wichtige Rolle. Eine Anhäufung von intrazellulären Lipidtröpfchen wird bei einer Vielzahl verschiedener Krankheiten beschrieben. So sind sie durch ihren Einfluss auf die Kontrolle der Synthese und Sekretion von Entzündungsmediatoren eine Komponente bei der Entstehung von Entzündungen [26]. Enzyme, die an der Bildung von Eicosanoiden in Zellen beteiligt sind, sind in Lipidtröpfchen lokalisiert. Durch ihren Einfluss auf den Energiestoffwechsel einer Zelle stehen sie außerdem in direktem Zusammenhang mit Krebs [26]. Krankheiten, die durch chronische Entzündungen oder einen erhöhten intrazellulären Energiebedarf verursacht werden, scheinen also auch direkt mit Lipidtröpfchen zusammenzuhängen.

Auch wenn Alois Alzheimer schon im Jahre 1907 über mikroskopisch auffällige Lipidakkumulationen in Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen berichtete [6], ist erst vor Kurzem die aktive Rolle von Lipidtröpfchen bei der Regulierung von zellulärem Stress im Gehirn und deren Einfluss auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen erkannt worden [26]. Lipidtröpfchen scheinen neben der Bildung von extrazellulärer Ablagerungen von A β -Plaques und der Bildung von intrazellulären Tau-Bündeln einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zu haben [67,300]. Inzwischen deutet eine Vielzahl an Studien darauf hin, dass die Ansammlung von Lipidtröpfchen im Gehirn den Prozess der chronischen neuronalen Entzündung stimuliert und somit eine Ursache für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung oder Morbus Parkinson darstellt [67,171,330]. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnte nachgewiesen werden, dass durch aggregierte Lipidtröpfchen in Gliazellen die Neurodegeneration voranschreitet [178]. Auch in einem Parkinson-Mausmodell konnte eine verstärkte Ansammlung von Lipidtröpfchen bestätigt werden [106]. Im voranschreitenden Alterungsprozess kommt es neben einer generellen Veränderung der Lipidzusammensetzung im Gehirn auch zu einer zunehmenden Akkumulation von Lipidtröpfchen in Mikrogliazellen. Diese Anhäufung kann zu einer gestörten Phagozytose und einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie vermehrter Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führen [187].

Darüber hinaus konnten in den Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen und in Alzheimer-Tiermodellen umfangreiche Lipidveränderungen festgestellt werden. Dazu gehören Veränderungen des Gesamtlipidgehalts einschließlich Veränderungen in der Zusammensetzung von Phosphatidylcholinen, Plasmalogenen, Sphingomyelinen oder auch neutraler Lipide wie Cholesterin und weitere [96,99,338]. Des Weiteren wird diskutiert, dass Lipide sowohl die Freisetzung von A β aus APP als auch den Abbau von A β beeinflussen und somit direkten Einfluss auf die APP-Prozessierung und den A β -Haushalt nehmen [95,331].

Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen geht neben einem massiven intrazellulären TAG-Anstieg in Nieren- und Lungenzellen nach Gemfibrozil-Behandlung auch ein TAG-Anstieg in Nervenzellen hervor (siehe Abbildung 21), was hier ebenfalls zu einer vermehrten intrazellulären Lipidtröpfchen-Akkumulation führen könnte. Da allerdings in den Nervenzellen, die für den mitochondrialen Shuttle der Fettsäuren verantwortlichen Carnitine ebenfalls signifikant erhöht waren, könnte davon ausgegangen werden, dass die β -Oxidation in Nervenzellen unter Gemfibrozil-Behandlung vermehrt abläuft. Durch eine verstärkt ablaufende β -Oxidation stünden mehr Fettsäuren zur Energiegewinnung zur Verfügung. Da insbesondere bei der Alzheimer-Erkrankung ein Energiedefizit im Gehirn besteht [140], könnte Gemfibrozil unter diesem Gesichtspunkt eine protektive Wirkung bei neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben werden. Dieser positive Effekt von Gemfibrozil bei neurodegenerativen Erkrankungen konnte schon in einigen Studien gezeigt werden [37,77,245].

Neben der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen scheinen Lipidtröpfchen auch bei der Entwicklung von Nierenerkrankungen eine Rolle zu spielen. Beispielsweise wurde die Entstehung der diabetischen Nephropathie mit einer zunehmenden intrarenalen Akkumulation von Lipidtröpfchen in Verbindung gebracht [146]. Dieser Anstieg der intrarenalen Triglyceride, insbesondere im Bereich des proximalen Tubulus und im Bereich der Glomeruluszellen, scheint eine Ursache für den zunehmenden Verlust der Nierenfunktion zu sein [23,199,299]. Ebendiese fortschreitende Akkumulation der Lipide kann unter unzureichend kontrollierten diabetischen Stoffwechselbedingungen zu einer zunehmenden Glomerulosklerose führen, die die Nierenfunktion weiterhin stören könnte [114]. Obwohl anhand der aktuellen Forschungsergebnisse noch nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die erhöhte intrarenale Lipidakkumulation eine Ursache oder eher eine Folge der diabetischen Nephropathie ist, kann angenommen werden, dass sie mit einem erhöhten Nierenfunktionsverlust einhergeht.

Auch in der Pulmologie ist in den letzten Jahren die vermehrte Ansammlung von Lipidtröpfchen mit einem Voranschreiten oder dem Ausbruch einiger Lungenerkrankungen in vermehrten Zusammenhang gebracht worden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Ansammlung von Lipidtröpfchen in der Lunge auch bei der aktuellen SARS-CoV-2-Infektion eine Rolle spielt. Im Jahr 2020 wurde beschrieben, dass Viren generell, und in diesem Zusammenhang auch SARS-CoV-2, auf Lipidtröpfchen als Assemblierungsform angewiesen sind [56]. Die Lipidtröpfchen stellen dabei als Montageplattform eine zentrale Rolle für die virale Replikation und die damit verbundene Infektion dar. Allerdings scheinen LD nicht nur bei akuten pulmonalen Infektionen eine Rolle zu spielen, sondern auch bei chronischen Entzündungen. Die Fettsäuren der TAG in den Lipidtröpfchen sind nicht nur die Plattform zur viralen Replikation, sondern stellen auch die einzige Energiequelle für *Mycobacterium tuberculosis* dar [16]. Darüber hinaus werden Tuberkulosepatienten mit einem hohen Gehalt

an Lipidtröpfchen mit einer höheren Rate schlechter Behandlungsergebnisse in Verbindung gebracht [190]. Auch bei Patient*innen, die an zystischer Fibrose erkrankt sind, konnte eine Dysregulation und Akkumulation von Lipidtröpfchen mit einer Verschlimmerung der Erkrankung in Verbindung gebracht werden [275]. Zusätzlich zu diesen entzündlichen pulmonologischen Erkrankungsbildern scheinen Lipidtröpfchen auch einen Einfluss auf die Entwicklung und Aggravation von Lungenkrebs zu haben. Dass der Lipidstoffwechsel in direktem Zusammenhang mit dem Tumorstoffwechsel steht, ist mittlerweile hinlänglich bekannt und beschrieben worden. Erhöhte Lipidtröpfchen-Spiegel werden dabei mit der Tumorentwicklung und dem Fortschreiten von Lungenkrebs in Verbindung gebracht, wobei die Anhäufung von Lipidtröpfchen die Aggressivität des Tumors erhöhen und eine zunehmende Resistenz gegen Chemotherapeutika fördern kann. In drüsenreichem Gewebe, wie dem der Lunge, spielt Prostaglandin E2 (PGE-2) als Entzündungsmediator eine wichtige Rolle bei der Förderung des Tumorwachstums. Innerhalb der Lunge dienen die Lipidtröpfchen als Syntheseort für PGE-2, da in den Lipidtröpfchen die Cyclooxygenase-2 rekrutiert wird, welche zur Synthese von PGE-2 verwendet wird [26,127].

PPAR α ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der für die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene im Fett- und Energiestoffwechsel verantwortlich ist. In der Leber ist PPAR α unter anderem an der mikrosomalen, peroxisomalen und mitochondrialen Fettsäureoxidation, dem Lipoproteinstoffwechsel (z.B. Lipoproteinlipase), der Gluconeogenese, der Fettsäurebindung- und Aktivierung und dem Abbau der Triglyceride und Lipidtröpfchen beteiligt [141]. Diese Funktionen des PPAR α , der in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird, sind allerdings nicht auf die Leber beschränkt, sondern werden auch in anderen Organen erfüllt. Somit führt eine Gemfibrozil-induzierte Aktivierung von PPAR α in den entsprechenden Geweben unter anderem auch zu einer erhöhten Fettsäureaufnahme [202]. Diese vermehrte Aufnahme freier Fettsäuren könnte durch die Speicherung in intrazellulären TAG zu einer vermehrten Akkumulation von Lipidtröpfchen in den jeweiligen Organen führen. Anhand dieser Erkenntnisse könnte demnach Gemfibrozil als Ligand für PPAR α in schon vorgeschädigtem Gewebe zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führen. Gemfibrozil wird nach oraler Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt in das Blut aufgenommen, zu 97 % an Serumalbumin gebunden und erreicht so seine Zielorgane. Da es, wie bereits beschrieben, die Blut-Hirn-Schranke passieren kann [45], kann es in allen Geweben des Körpers, in denen PPAR α als Rezeptor exprimiert wird, wirken. Diesbezüglich könnte davon ausgegangen werden, dass Gemfibrozil über seine lipidsenkende Wirkung im Blutplasma hinaus zusätzliche Effekte und Veränderungen auf den menschlichen Organismus hat.

Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass Patient*innen, die mit Gemfibrozil behandelt werden sollen, in der Regel weitere Komorbiditäten aufweisen, sollte anhand der in der

vorliegenden Arbeit gewonnen Ergebnisse das Medikament mit besonderer Vorsicht verschrieben werden. Anhand der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien sollte bei Patient*innen mit bekanntem Diabetes Mellitus Typ II und Gemfibrozil als Komedikation auf eine zunehmende Nierenfunktionsstörung bei diabetischer Nephropathie geachtet werden. Patient*innen mit vorbestehenden Lungenerkrankungen wie beispielsweise Tuberkulose, Mukoviszidose oder Lungenkrebs könnten durch eine Behandlung mit Gemfibrozil eher Schaden als Nutzen erleiden. Im Gegensatz dazu könnte Gemfibrozil als Komedikation eine protektive Wirkung auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. AD, haben. Da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten ausschließlich um *in vitro* Ergebnisse in Form von Zellkulturexperimenten handelt, sind die Ergebnisse mit besonderer Vorsicht zu interpretieren. Dennoch scheinen sie eine neue Eigenschaft des Medikaments aufzuweisen, die in weiteren Studien und Tiermodellen untersucht und nachgewiesen werden muss, um die erhaltene Aussage zu untermauern.

5.2.5.3 Einfluss von Gemfibrozil auf weitere Phospholipide

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben unter den beschriebenen Bedingungen einen erheblichen Einfluss von Gemfibrozil auf das Lipidprofil in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen gezeigt. Interessanterweise schien die Behandlung mit Gemfibrozil neben der Beeinflussung der intrazellulären Triglycerid-, Carnitin und Phosphatidylcholin-Spezies auch Effekte auf die weiteren Phospholipide zu haben.

Vor der Betrachtung der Beeinflussung Gemfibrozils auf die Phospholipidzusammensetzung in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen war es sinnvoll, den Effekt von Gemfibrozil auf die Freisetzung von sAPP α im Kulturmedium der jeweils untersuchten Zellen zu analysieren. Dabei sind, wie in Kapitel 4.2.2 detailliert beschrieben, unterschiedliche Effekte in Nerven- und Nierenzellen einerseits und Lungenzellen andererseits zu verzeichnen. Während Gemfibrozil in Lungenzellen einen signifikanten Anstieg des sAPP α -Gehalts bedingte, führte die gleichzeitige Behandlung in Nieren- und Nervenzellen zu teilweise signifikanten Verringerungen der sAPP α -Freisetzung. Diese Ergebnisse könnten einen gewebespezifischen Effekt von Gemfibrozil vermuten lassen.

Die Behandlung mit Gemfibrozil bewirkte in Nervenzellen einen Anstieg der Plasmalogenspezies auf 129,9 % (siehe Abbildung 23). Dies könnte, neben der Bereitstellung von Energie über die Fettsäuren der Triglyceride ein weiterer Grund für den positiven Effekt von Gemfibrozil bei Alzheimer-Patient*innen darstellen. Plasmalogene können anhand ihrer Bindung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren am Glycerin-Grundgerüst als Radikalfänger für freie Sauerstoffspezies dienen und somit das Level an oxidativem Stress für die Zelle reduzieren. Da oxidativer Stress eine signifikante Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung spielt [40,120,303], könnte durch die deutliche Erhöhung der Plasmalogenspiegel

mittels Gemfibrozil das Risiko für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung weiterhin gesenkt werden.

Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit Gemfibrozil in Lungenzellen zu einer signifikanten Reduzierung der Plasmalogenpiegel. Dieses Ergebnis könnte im Umkehrschluss ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Gemfibrozil neben seiner Wirkung als lipidsenkendes Medikament im Blutplasma auch weitere Effekte im Organismus erzielt. Neben der signifikanten Erhöhung der Triglyceride und der damit zusammenhängenden möglichen Akkumulation von Lipidtröpfchen in den Lungenzellen, die bei der Entstehung einer Vielzahl von pulmologischen Erkrankungen involviert sind, könnte die Reduzierung der Plasmalogenlevel ebenfalls die Entstehung weiterer pulmologischer Krankheitsbilder fördern. Durch den Mangel an Plasmalogenen fehlt die Möglichkeit freie Sauerstoffspezies binden zu können, weshalb somit die Anfälligkeit für oxidativen Stress weiter zunehmen könnte. Ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress in der Lunge kann zur Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beitragen, wie beispielsweise der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), dem Lungenemphysem, der zystischen Fibrose, dem Asthma oder der pulmonalen arteriellen Hypertonie [30,182,223,254,337].

Diese erhaltenen Daten bezüglich der Plasmalogen-Zusammensetzung in Nerven- und Lungenzellen bilden inverse Ergebnisse zur jeweiligen sAPP α -Freisetzung im untersuchten Gewebe. Während die Behandlung mit Gemfibrozil eine reduzierte Freisetzung von sAPP α und somit auch eine verringerte ADAM10-Freisetzung vermuten lässt, bedingte es andererseits eine Erhöhung der Plasmalogen-Spiegel. Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass Gemfibrozil über andere Mechanismen als die ADAM10-Beeinflussung, auf die Lipidzusammensetzung in Nervenzellen wirkt.

Bei Betrachtung der Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen nach Behandlung mit Gemfibrozil war eine zelllinienübergreifende Erhöhung der Lyso-PC-Level zu verzeichnen (siehe Abbildung **25**). Dabei war die Erhöhung sowohl in Nieren- als auch in Lungenzellen signifikant. Dieser Anstieg in den Lungenzellen könnte mit der Abnahme der Plasmalogenpiegel zusammenhängen, indem durch die PLA2 vermehrt freie Fettsäuren abgebaut werden und Lyso-Phosphatidylcholine entstehen.

Ein ebenfalls zelllinienübergreifender Effekt war bei Betrachtung der Sphingomyelin-Spezies in Nerven-, Nieren- und Lungenzellen nach der Behandlung mit Gemfibrozil zu beobachten. In diesem Fall induzierte Gemfibrozil eine Erhöhung der SM-Spezies in allen drei untersuchten Zellreihen, wobei es in HEK-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung kam. Insbesondere in Nervenzellen zeigte das Verhalten der SM-Spezies nach Behandlung mit Gemfibrozil einen klaren Trend an. Im dargestellten Volcano Plot kam es zu einer ausschließlichen Verlagerung aller 15 analysierten Spezies nach rechts (siehe Abbildung **26**). Vor allem in Nervenzellen kam

den Sphingomyelinen als Hauptbestandteil der Myelinscheiden, eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionen zu [276].

Insbesondere in Nervenzellen schien die Behandlung mit Gemfibrozil einen positiven Effekt auf die Lipidzusammensetzung zu haben. Durch die positive Beeinflussung der Plasmalogen- und Sphingomyelinlevel und die Verwertung zusätzlicher Energie aus den Fettsäuren der intrazellulär angesammelten Triglyceriden könnte dem Fibrat neben seiner lipidsenkenden Wirkung im Blutplasma auch protektive Wirkungen in Nervenzellen in Bezug auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zugesagt werden

5.3 Einfluss von Methylxanthinen auf Alzheimer-relevante Gene in SH-SY5Y-Zellen

Der Konsum von Kaffee ist für zahlreiche Menschen eine Alltagsbeschäftigung wie Schuhe anziehen oder Zähne putzen. Noch vor einigen Jahrzehnten wurde der Hauptkomponente in Kaffee, dem Koffein, eine Vielzahl an schlechten Eigenschaften nachgesagt. Neben der Auslösung von tachykarden Herzrhythmusstörungen, Blutdruckspitzen, Schlafstörungen, Zittern oder auch Kopfschmerzen war Koffein auch dafür bekannt, bei vielen Menschen Nervosität hervorzurufen [15]. Dieses negative Bild hat sich seit einigen Jahren deutlich gewandelt und Koffein, als Xanthin-Derivat, ist immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Wie bereits detailliert in Kapitel 2.3.3 erläutert, sind aktuell eine Vielzahl an positiven Wirkungen der natürlich vorkommenden und der synthetisch hergestellten Methylxanthine beschrieben. Darüber hinaus sind zahlreiche der Wirkweisen auf molekularer Ebene bekannt. Somit ist unter anderem bekannt, dass Methylxanthine über mehrere Mechanismen auf die Transkription verschiedener Gene Einfluss nehmen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher unter anderem mit der Frage, ob und in welcher Form die methylierten Xanthinderivate Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin und Pentoxifyllin Einfluss auf die Expression ausgewählter Gene in Nervenzellen nehmen und versuchte darüber hinaus potenzielle Unterschiede zwischen den einzelnen Methylxanthinen zu identifizieren. Um diese Frage zu adressieren, wurden Gene ermittelt, die an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, welche Einfluss auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen haben. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Methylxanthine über ihre transkriptionsregulatorische Wirkung in hohem Maße an der Entstehung von oxidativem Stress, dem Lipid- und Energiehaushalt, der Genexpression und Signaltransduktion sowie in Stoffwechselwege, die an neuronalen Funktionen beteiligt sind, involviert sind. Die Expression mehrerer Gene, die in die beschriebenen Stoffwechselprozesse eingreifen, wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen durch die Inkubation verschiedener Xanthin-Derivate verändert.

Interessanterweise variierte das Ausmaß der Wirkung auf die Zielgene innerhalb der untersuchten Methylxanthine und es kristallisierte sich ein Alleinstellungsmerkmal von Koffein gegenüber den anderen Xanthin-Derivaten heraus. Es bestanden signifikante Unterschiede in der Verteilung signifikant veränderter Gene zwischen Koffein auf der einen Seite und den Methylxanthinen Propentofyllin, Pentoxifyllin, Theophyllin und Theobromin andererseits (siehe Abbildung 31). Zusätzlich dazu unterstrich Koffein seine einzigartige Funktion als Methylxanthin auf die Expression relevanter Gene in Nervenzellen, indem es als einziges Xanthin-Derivat verglichen zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe eine ausschließlich steigende Wirkung auf transkriptionelle Effekte aufwies. Die weiteren

untersuchten Methylxanthine hatten ebenfalls signifikante Effekte auf die Genexpression verschiedener Gene, welche allerdings sehr heterogen zum einen Gene signifikant reduzierten oder zum anderen erhöhten. Um diesen Trend von Koffein weiterhin zu unterstreichen wurde eine Hauptkomponentenanalyse kombiniert mit einer Mehrfachvergleichsanalyse durchgeführt, damit signifikante Unterschiede innerhalb der Methylxanthine auf die unterschiedlichen Gene ermittelt werden konnten. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten, dass es neben der gemeinsamen Transkriptionsregulation aller Methylxanthine auch spezifische genregulatorische Effekte gab, die von speziellen Xanthin-Derivaten, in dem hier vorliegenden Fall vor allem Koffein, abhängen (siehe Abbildung 32 bis Abbildung 36).

5.3.1 Ursachen für die exklusive Funktion von Koffein auf genregulatorische Effekte in SH-SY5Y-Zellen

Die Ursachen, weshalb Koffein diese alleinige Stellung verglichen zu den weiteren Xanthin-Derivaten einnimmt, könnten unterschiedlich interpretiert werden. Generell sind die verschiedenen Wirkmechanismen der Methylxanthine mittlerweile hinlänglich beschrieben worden. Somit ist belegt worden, dass Methylxanthine das Enzym Phosphodiesterase (mit den Isoenzymentypen III und IV) kompetitiv hemmen. Durch diese nicht-kompetitive Inhibition wird ein intrazellulärer Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP)- und Guanosinmonophosphat-Spiegels (cGMP) bedingt. Hierüber wird eine Entspannung der glatten Muskulatur erreicht, was zu einer Erweiterung der Bronchien und einer Vasodilatation der Lungengefäße führt [47]. Des Weiteren kommt es durch den intrazellulären cAMP- und cGMP-Anstieg zu einer Diurese, zu einer ZNS-Stimulation und einer Stimulation am Herzen [188]. Außerdem ist ihre Wirkung als Aktivatoren der Histon-Deacetylasen bekannt [47]. Die Histon-Deacetylase gilt als ein wichtiger Faktor bei der Regulation von Entzündungsmediatoren. Im Falle einer Entzündung führt die vermehrte Rekrutierung von Histon-Deacetylasen zum entsprechenden Entzündungsherd zu einer reduzierten Transkription von Entzündungsmediatoren, was schließlich in einer Entzündungshemmung resultiert. Methylxanthine nehmen unter anderem einen inhibitorischen Einfluss auf das Enzym Phosphoinositid-3-Kinase-Delta, welches wiederum eine hemmende Wirkung auf die Histon-Deacetylase hat. Somit fördern Methylxanthine durch die Protektion der Acetylase den entzündungshemmenden Effekt [301].

Zusätzlich dazu ist die Wirkung von Methylxanthinen als nichtselektive Antagonisten von Adenosinrezeptoren (vor allem der Subtypen A1, A2 und A3) beschrieben worden [188]. Adenosin wird unter anderem als Neuromodulator im Gehirn eine wichtige Rolle zugeschrieben. Es blockiert die Ausschüttung von allen belebenden und stimulierenden Neurotransmittern, z.B. Dopamin, Acetylcholin oder Noradrenalin [51]. Außerdem wirkt es schlafinduzierend, indem es den Nucleus praeopticus ventrolateralis im Hippocampus triggert

und somit das Weck- und Wachzentrum im Gehirn durch den Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) hemmt [130]. Adenosin fällt als Bestandteil des Energieträgers Adenosintriphosphats als Abbauprodukt in den Zellen des Körpers an. Bei vermehrtem zellulärem Energieverbrauch steigt also auch der Adenosinspiegel, was zu einem erhöhten intrinsischen Schlafdruck führt [25]. Dementsprechend spielen vor allem die Adenosinrezeptoren im basalen Vorderhirn eine zentrale Rolle als Indikator für geistige Ermüdung, da das anfallende Adenosin vermehrt Rezeptoren bindet, je länger sich der Körper im Wachzustand befindet. Interessanterweise binden Methylxanthine mit nahezu der gleichen Affinität an diese Rezeptoren und verhindern somit die schlafinduzierende Wirkung von Adenosin. Hierüber wird die psychostimulierende Wirkung der Methylxanthine auf das zentrale Nervensystem erklärt [238].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Alleinstellung von Koffein im Vergleich zu den anderen Methylxanthinen könnte eine stärkere Bindung von Koffein an die Adenosinrezeptoren sein. Allerdings fällt bei näherer Betrachtung der Hemmungskonstante (K_i -Wert) oder des IC_{50} -Werts (Wert für die halbmaximale Hemmung eines Inhibitors) auf, dass diese Werte beispielsweise für Theophyllin geringer sind als für Koffein (K_i : $6,7 \mu\text{M}$ für Theophyllin und $9,5 \mu\text{M}$ für Koffein [207] und IC_{50} : $45 \mu\text{M}$ für Theophyllin und $98 \mu\text{M}$ für Koffein [74]). Dadurch können die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht ausreichend erklärt werden. Vielmehr deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass weitere Adenosinrezeptor-unabhängige Mechanismen existieren, worüber Koffein die Genexpression beeinflusst. So wurde beispielsweise berichtet, dass Koffein selbst eine positive Wirkung hat oder in niedrigeren Konzentrationen direkt Einfluss auf spezifische Enzyme nehmen kann, während in höheren Konzentrationen die Adenosinrezeptor-vermittelte Wirkung aktiviert wird [180]. Diese Beobachtung könnte erklären, weshalb Koffein auch in einem Konzentrationsbereich unterhalb der IC_{50} dosisabhängige genregulatorische Effekte erzielt.

Ein weiterer Grund für die Erklärung der exklusiven Stellung von Koffein gegenüber den anderen Methylxanthinen könnte in den unterschiedlichen strukturellen Substitutionen der Xanthin-Moleküle liegen. Koffein, auch 1,3,7-Trimethylxanthin, ist durch drei zusätzliche Methylgruppen am Xanthingerüst gekennzeichnet (siehe Abbildung 42).

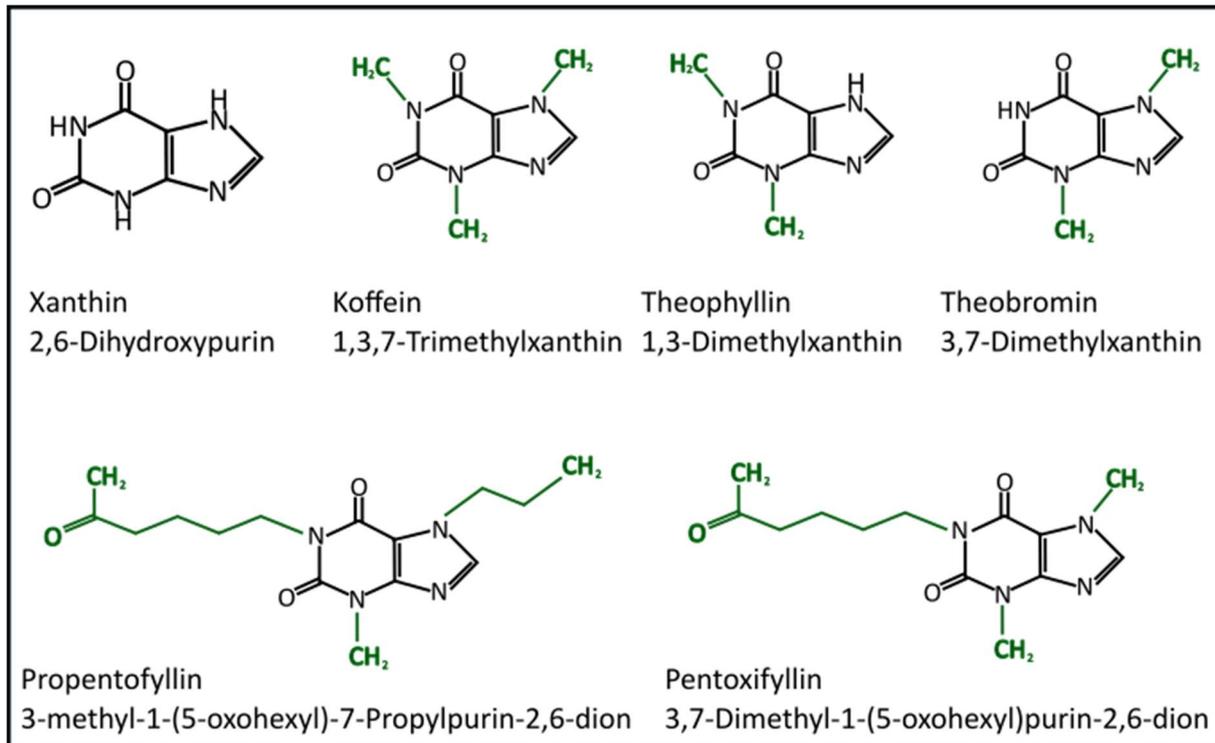


Abbildung 42: Darstellung der chemischen Strukturen der in der vorliegenden Arbeit analysierten Methylxanthine. Xanthin (2,6-Dihydroxypurin), Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin), Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin), Theobromin (3,7-Dimethylxanthin), Propentofyllin (3-methyl-1-(5-oxohexyl)-7-Propylpurin-2,6-dion) und Pentoxifyllin (3,7-Dimethyl-1-(5-oxohexyl)purin-2,6-dion). Grün markiert sind die strukturellen, chemischen Unterschiede zwischen den in der vorliegenden Arbeit analysierten Methylxanthine. Abb. abgeändert nach [124].

In einer Studie von Monteiro et al. aus dem Jahre 2016 wurden die natürlich vorkommenden Xanthinderivate Koffein, Theobromin und Theophyllin hinsichtlich ihrer physiologischen Wirkungen in verschiedenen pharmakologischen Potenzen untersucht. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass Koffein bei Stimulation des zentralen Nervensystems wirksamer als Theobromin oder Theophyllin ist, während Theophyllin beispielsweise bei der Koronardilatation wirksamer war. Außerdem wurden in dieser Studie die Substitutionen in verschiedenen Positionen des Xanthinmoleküls der Affinität und Selektivität gegenüber den Adenosinrezeptoren und verschiedenen physiologischen Wirkungen zugeordnet [203]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen werden in der Literatur einige Signalwege beschrieben, in denen Koffein verglichen zu den anderen Methylxanthinen entgegengesetzte Wirkungen zeigt. So zeigte in präklinischen Studien Koffein verglichen zu Theobromin und Theophyllin eine ausgeprägtere Wirkung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in ventrikulären Myozyten [57]. Zusätzlich dazu werden Säuglinge in der Neonatologie bei Verdacht auf bronchopulmonale Dysplasie neben Vitamin A und Surfactant unter anderem aufgrund der antioxidativen Wirkung auch mit Koffein substituiert [53,64].

5.3.2 Methylxanthin-vermittelte Effekte auf AD-relevante Gene

Bei der Untersuchung der globalen Transkriptionseffekte von Methylxanthinen wurde die Expression von Genen analysiert, deren Veränderungen sich signifikant zwischen den inkubierten Methylxanthinen in der Lungenkrebszelllinie Calu-3 und der Leberkrebszelllinie Hep-G2 unterschieden.

Bei der Untersuchung der Effekte, die unabhängig vom inkubierten Zelltyp sind, konnte konstatiert werden, dass Methylxanthine zahlreiche Gene beeinflussen, die mit neuronalen Störungen in Verbindung stehen. Beispielsweise spaltet das Enzym Acetylcholinesterase, das vom Gen *ACHE* kodiert wird, den Neurotransmitter Acetylcholin in Cholin und Acetat und beendet somit die Neurotransmission [237]. In Bezug auf Methylxanthine konnte gezeigt werden, dass Koffein die Aktivität der Acetylcholinesterase hemmen kann und somit einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise auch der Alzheimer-Erkrankung, nehmen kann [134].

Der anteriore Pharynxdefekt 1 (*Aph1*) bildet eine Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes. Das Gen *APH1b* kodiert für diese Untereinheit. Die γ -Sekretase ist an der Spaltung zahlreicher Substrate beteiligt, beispielsweise auch dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) oder ist involviert in den Notch-Signalweg. In der Studie von Janitschke *et al.* aus dem Jahr 2019 konnte der Einfluss der Methylxanthine auf die γ -Sekretase gezeigt werden [124]. Über die Transkription des Gens *A2M*, das für das Protein Alpha-2-Makroglobulin kodiert und an der A β -Homöostase beteiligt ist, indem es als Serum-Panprotease-Inhibitor die Clearance und den Abbau von A β vermittelt, können Methylxanthine ebenfalls positiv wirken. Die Deletion des *A2M*-Gens scheint mit einem erhöhten Risiko für Alzheimer zu korrelieren. Über die Beeinflussung dieses Gens können Methylxanthine zusätzlich transkriptionellen Einfluss auf die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung nehmen [20]. Des Weiteren scheint die Inkubation von Methylxanthinen zu einer veränderten Expression des Gens *MAPT*, welches für das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau kodiert, zu führen. Soliman *et al.* berichteten, dass Koffein das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau positiv beeinflusst [284]. In einer weiteren Studie wurde interessanterweise davon berichtet, dass Koffein in der Lage sei, menschliche Nervenzellen vor Prion-vermittelter Neurotoxizität, welche unter anderem mit dem Gen *PRNP* (kodiert ein membranständiges Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein – das Prionprotein) in Verbindung steht, durch das Aussenden von Autophagie-Signalen schützen kann [151,204]. Die Autophagie, auch Autophagozytose, stellt einen zellulären Mechanismus zur Beseitigung funktionsbeeinträchtigter Organellen, wie beispielsweise alternde Mitochondrien, dar. Es bildet ein intrazelluläres Abbausystem, bei dem zytoplasmatisches Abbaumaterial ins Lysosom gelangt um dort abgebaut zu werden [201].

Bei Betrachtung der Methylxanthin-vermittelten Effekte auf die Transkription von Genen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind, konnten einige Interaktionen festgestellt werden.

Das Enzym Caspase 4, das durch das Gen *CASP4* kodiert wird, fördert gemeinsam mit der Caspase 1 und der Caspase 5 die proteolytische Spaltung bestimmter Moleküle und wirkt somit proinflammatorisch. Es spielt eine zentrale Rolle in der Ausführungsphase der Zellapoptose und stellt, wenn es überexprimiert wird, einen Auslöser für die Apoptose dar. In der Literatur besteht ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Koffein und der Caspase 4 [31].

Gene, wie beispielsweise *ALS2*, das für den Guanin-Austauschfaktor ALS2 kodiert oder *PRKCQ*, das für die Proteinkinase C theta kodiert, sind an der Signaltransduktion beteiligt und es ist bekannt, dass sowohl Koffein als auch andere Methylxanthine Einfluss auf diese Prozesse nehmen können [72,305].

Mit Blick auf die Wirkung von Koffein auf Gene, die in die Entwicklung oder Verhinderung der Entstehung von oxidativem Stress involviert sind, wurde berichtet, dass Methylxanthine allgemein antioxidative Eigenschaften besitzen, wodurch sie den Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) selbständig reduzieren können. In einer Studie von Liu *et al.* aus dem Jahr 2019 konnte eine Wechselwirkung zwischen Koffein und dem Enzym Superoxiddismutase (SOD) gezeigt werden. Dabei wurde deutlich, dass sich die antioxidativen Eigenschaften beider überlagern und daraus geschlossen werden kann, dass SOD einen wirksamen Carrier für Koffein darstellt [180].

Das Enzym NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1), welches im Zytoplasma wirkt, spielt eine zentrale Rolle bei der NADPH-Produktion und ist unabdingbar für die Wiederherstellung von reduziertem Glutathion. Die Aktivität dieser Dehydrogenase korreliert mit dem zellulären Redox-Zustand und nimmt somit eine Schlüsselfunktion bei der zellulären Abwehr von oxidativem Stress ein [165].

Bei genauerer Betrachtung der in den oxidativen Stress involvierten Gene, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, zeigte sich, dass Koffein eine signifikante Erhöhung der Gene *ERCC2*, *ERCC6*, *PARK7* und *TXNRD2* bedingt, während die Behandlung mit den weiteren Methylxanthinen einen entgegengesetzten Effekt in der Expression dieser Gene zeigte.

Sowohl *ERCC2* als auch *ERCC6* werden bei AD-Patient*innen deutlich vermehrt exprimiert. Ihre Funktion besteht in der transkriptionsgekoppelten Reparatur, worüber sie Läsionen, die durch oxidativen Stress entstanden sind, reduzieren [115,167]. In einer Studie von Elko *et al.*, wurde gezeigt, dass die mRNA-Level von *TXNRD2* negativ mit dem Alter in Lungenzellen korrelieren [63].

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass Koffein einen positiven Effekt auf die Reduzierung oxidativer Stresslevel hat.

Interessanterweise führt die Behandlung mit Koffein zu einer erhöhten Expression der beiden in den Energiemetabolismus der Zellen involvierten Gene *ERN1* und *HADH2*. Das Gen

HADH2, welches für das Protein Hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase Typ 2 kodiert, welches an der mitochondrialen Dysfunktion beteiligt ist, ist auch bei der Alzheimer-Erkrankung nachweisbar [186,317]. In der Abbildung 43 sind alle durch Methylxanthine signifikant veränderten Gene aufgelistet. Zusätzlich soll der gegensätzliche Effekt von Koffein verglichen zu den anderen vier untersuchten Xanthin-Derivaten verdeutlicht werden.

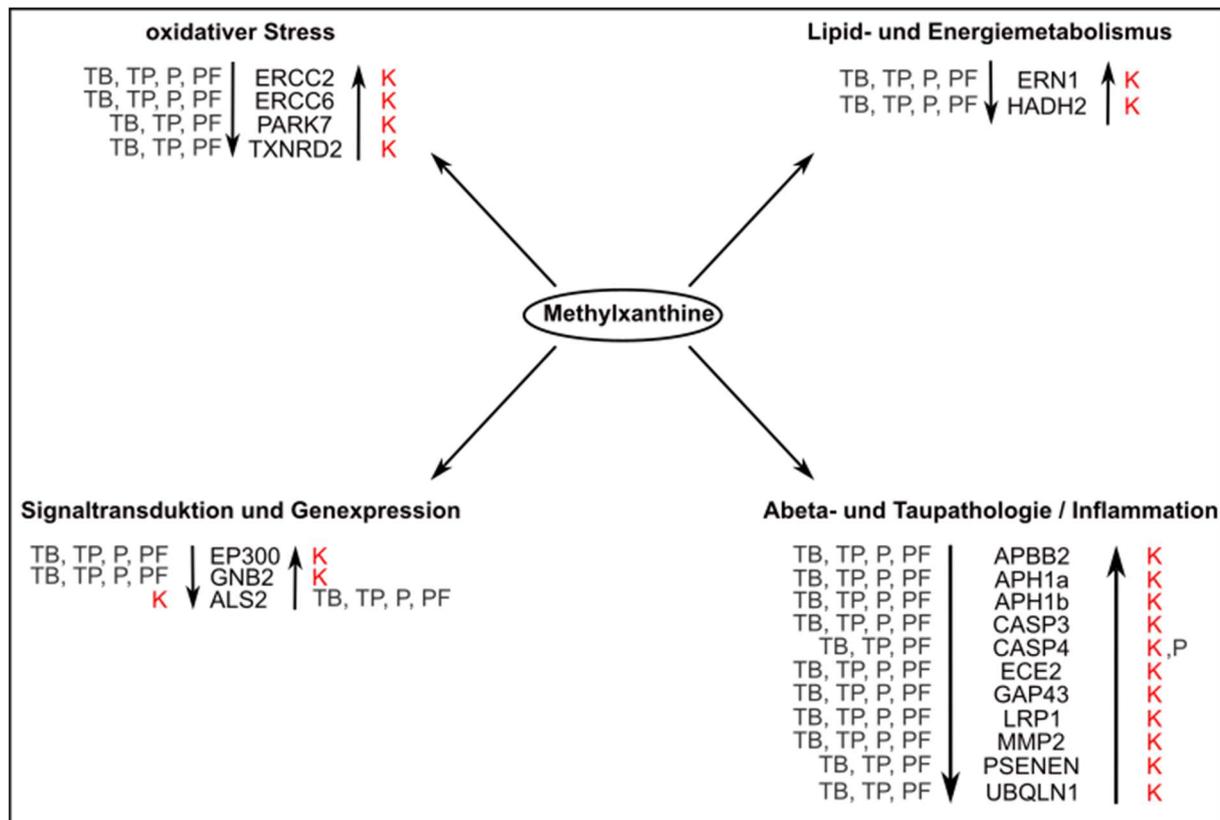


Abbildung 43: schematische Zusammenfassung der signifikant veränderten AD-relevanten Gene durch Methylxanthine. Gegenüberstellung aller signifikant veränderter Gene durch Methylxanthine. K: Koffein, TB: Theobromin, TP: Theophyllin, P: Pentoxifyllin, PF: Propentofyllin. Abbildung abgeändert nach [125].

5.3.3 Auswirkungen von Methylxanthinen auf die AD-Prävention

Die hier untersuchten Stoffwechselwege spielen nicht nur bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, sondern auch bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen, wie beispielsweise Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, eine zentrale Rolle. Aus diesem Grund lassen sich den Methylxanthinen, da sie nachgewiesenermaßen einen positiven Effekt auf diese Prozesse haben, breit gefächerte Eigenschaften zusagen.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen auf einen günstigen Einfluss von Methylxanthinen auf die Entwicklung neuronaler Erkrankungen hin und sind vereinbar mit Studien, wonach häufiger Kaffeekonsum mit geringerem Alzheimer- oder Parkinsonauftreten in Verbindung gebracht werden kann [9,239]. In einer Studie, die den Zusammenhang zwischen Koffein und der cholesterininduzierten sporadischen Alzheimer-Pathologie

untersuchte, konnte belegt werden, dass regelmäßiger Koffeinkonsum vor dem Auftreten einer sporadischen Alzheimer-ähnlichen Pathologie schützt [240].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Methylxanthine haben teilweise globale Transkriptionseffekte auf Gene, die in Stoffwechselprozesse, wie Schutz vor oxidativem Stress, Entzündungen oder Prozessen der APP-Verarbeitung, involviert sind. Über diese Prozesse kann der positive Einfluss der Xanthin-Derivate auf die Alzheimer-Pathologie erklärt werden. Gleichzeitig kann durch diese Ergebnisse ihre Verwendung zur Prävention und Therapie der Alzheimer-Erkrankung begründet werden. Da jedes einzelne Methylxanthin auch individuelle Wirkungen auf bestimmte Gene hat, die bei der Behandlung spezifischer Patienten*innen-Konstellationen von Interesse und hilfreich sein könnten, sind diese besonders interessant in der Anwendung individualisierter medizinischer Ansätze.

Mit Blick auf die dosisabhängigen Transkriptionseffekte lässt sich konstatieren, dass es wichtig ist, zwischen den unterschiedlichen Methylxanthin-Konzentrationen zu unterscheiden. Konzentrationen, die durch die Nahrungsaufnahme erreicht werden können, sind deutlich niedriger als diejenigen, die pharmazeutische Supplementierungen bedingen können.

Auf Basis der hier erhaltenen Informationen kann Koffein als potenzieller Ansatzpunkt bei verschiedenen Erkrankungen, die mit den hier untersuchten Stoffwechsel- und Signalwegen einhergehen und mit den untersuchten Genen in Verbindung stehen, in Betracht gezogen werden. Speziell bei Betrachtung der Alzheimer-Erkrankung kann die Einnahme von Koffein von Vorteil sein, da Koffein hier zahlreiche exklusive transkriptionelle Effekte aufweist (siehe Abbildung 31).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings zu beachten, dass die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten stammen und dementsprechend *in vivo* wiederholt und verifiziert werden müssen. Eine weitere Beeinflussung bei der Interpretation der Daten besteht darin, dass in der vorliegenden Arbeit SHSY5Y-Zellen als Vertreter einer Neuroblastomzelllinie verwendet wurden. In dieser Zelllinie sind Gene verändert, die bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Erkrankung, pathologisch verändert sind. Da es sich allerdings bei der Inkubation mit Methylxanthinen um Wild-Typ-Zellen handelte, sind die Aussagen bezüglich der positiven Beeinflussung durch Methylxanthine bei schon bestehender Alzheimer-Erkrankung mit Vorsicht zu betrachten. Dementsprechend müssen weitere Experimente in Alzheimer-Modellen folgen, um zu bestätigen, ob Methylxanthine die durch neurodegenerative Erkrankungen verursachten Veränderungen in der Genexpression revidieren oder aufhalten können. Dies könnte beispielsweise durch Untersuchungen der Auswirkung von Methylxanthinen in Alzheimer-Tiermodellen oder in Form von klinischen Studien erfolgen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass abgesehen von diesem Vorbehalt, für die

meisten robust veränderten Gene eine zelltypunabhängige Regulierung bestätigt werden konnte, die auch eine dosisabhängige Regulierung zeigte.

6 Publikationen

6.1 Publierte Artikel (peer-reviewed)

1. **Bachmann CM***, Janitschke D*, Lauer A, Ehrhardt T, Hartmann T, Grimm MOW*, Grimm HS*. *Gemfibrozil-induced intracellular Triglyceride increase in SH-SY5Y-, HEK and Calu-3 cells.* Int J Mol Sci. 2023 Feb 3;24(3):2972. doi: 10.3390/ijms24032972. PMID: 36769295
2. Lauer AA*, Thuy Nguyen VT*, Janitschke D, Dos Santos Guilherme M, **Bachmann CM**, Grimm HS, Hartmann T, Endres K, Grimm MOW. *The Influence of Acitretin on Brain Lipidomics in Adolescent Mice – Implications for Pediatric and Adolescent Dermatological Therapy.* Int J Mol Sci. 2022 Dec 8, PMID: 36555176 PMCID: PMC9778912 DOI: 10.3390/ijms232415535
3. Janitschke D*, Lauer AA*, **Bachmann CM**, Winkler J, Griebisch LV, Pilz SM, Theiss EL, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Methylxanthines Induce a Change in the AD/Neurodegeneration-Linked Lipid Profile in Neuroblastoma Cells.* Int J Mol Sci. 2022 Feb 18;23(4):2295. doi: 10.3390/ijms23042295. PMID:35216410, PMCID: PMC8875332
4. Lauer AA*, Janitschke D*, Dos Santos Guilherme M*, Thuy Nguyen VT, **Bachmann CM**, Qiao S, Schrul B, Boehm U, Grimm HS, Hartmann T, Endres K, Grimm MOW. *Shotgun lipidomics of liver and brain tissue of Alzheimer's disease model mice treated with acitretin.* Sci Rep. 2021 Jul 27;11(1):15301. doi: 10.1038/s41598-021-94706-3. PMID: 34315969 PMCID: PMC8316403
5. Janitschke D*, Lauer AA*, **Bachmann CM**, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Methylxanthines and Neurodegenerative Diseases: An Update.* Nutrients. 2021 Feb 28;13(3):803. doi: 10.3390/nu13030803. PMID: 33671099 PMCID: PMC8000915
6. **Bachmann CM***, Janitschke D*, Lauer AA*, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Unique Role of Caffeine compared to other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD relevant genes in Neuroblastoma SH-SY5Y wild type cells.* Int J Mol Sci. 2020 Nov 27; 21(23):9015. Doi:10.3390/ijms21239015. PMID: 33260941 PMCID: PMC7730563.

7. Lauer AA*, Mett J*, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann C, **Bachmann CM**, Ritzmann F, Schrul B, Müller U, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease.* *Aging Cell.* 2020 Nov 19; (11):e13264. Doi:10.1111/accel.13264 Epub 2020 Oct 31. PMID: 33128835, PMCID: PMC7681056

* Equally contributed

6.2 Poster

1. Janitschke D, Lauer AA, **Bachmann CM**, Thiel A, Winkler J, Regner L, Nelke C, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Impact of Caffeine and other Methylxanthines on A β -Homeostasis in Alzheimer's Disease.* Ausgestellt digital auf dem CONy-Kongress 2020

7 Literaturverzeichnis

1. A M-S, S R-P, J B, J A (2001) Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J Biol Chem* 276:
2. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615–616
3. Adeva-Andany MM, Calvo-Castro I, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pedre-Piñeiro AM (2017) Significance of L-carnitine for human health. *IUBMB Life* 69:578–594
4. Agassandian M, Mallampalli RK (2013) Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1831:612–625
5. Aloulou A, Rahier R, Arhab Y, Noiriél A, Abousalham A (2018) Phospholipases: An Overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1835:69–105
6. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“. *Clin Anat N Y N* 8:429–431
7. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250
8. Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M (2016) Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med* 89:5–21
9. Arendash GW, Cao C (2010) Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 20 Suppl 1:S117-126
10. Aronsen L, Orvoll E, Lysaa R, Ravna AW, Sager G (2014) Modulation of high affinity ATP-dependent cyclic nucleotide transporters by specific and non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 745:249–253
11. Bachmann CM, Janitschke D, Lauer AA, Erhardt T, Hartmann T, Grimm MOW, Grimm HS (2023) Gemfibrozil-Induced Intracellular Triglyceride Increase in SH-SY5Y, HEK and Calu-3 Cells. *Int J Mol Sci* 24:2972
12. Baker JHE, Kyle AH, Reinsberg SA, Moosvi F, Patrick HM, Cran J, Saatchi K, Häfeli U, Minchinton AI (2018) Heterogeneous distribution of trastuzumab in HER2-positive xenografts and metastases: role of the tumor microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 35:691–705
13. Baldo A, Sniderman AD, Cianflone K (1994) Increase in intracellular triglyceride synthesis induced by gemfibrozil. *Metabolism* 43:257–262
14. Bao H, Peng A (2016) The Green Tea Polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate and its beneficial roles in chronic kidney disease. *J Transl Intern Med* 4:99–103

15. Barcelos RP, Lima FD, Carvalho NR, Bresciani G, Royes LF (2020) Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutr Res N Y N* 80:1–17
16. Barisch C, Soldati T (2017) Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets. *Biochimie* 141:54–61
17. Bazinet RP, Layé S (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:771–785
18. Behl T, Kaur D, Sehgal A, Singla RK, Makeen HA, Albratty M, Alhazmi HA, Meraya AM, Bungau S (2022) Therapeutic insights elaborating the potential of retinoids in Alzheimer’s disease. *Front Pharmacol* 13:976799
19. Berger M (2014) *Psychische Erkrankungen*. Urban&Fischer
20. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19:357–360
21. Blobel CP (2000) Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 12:606–612
22. Blotenberg I, Thyrian JR (2022) Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. *Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. - Selbsthilfe Demenz*
23. Bobulescu IA (2010) Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19:393–402
24. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the „metzincins“. *FEBS Lett* 331:134–140
25. Borbély AA, Daan S, Wirz-Justice A, Deboer T (2016) The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *J Sleep Res* 25:131–143
26. Bozza PT, Viola JPB (2010) Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82:243–250
27. Braverman NE, Moser AB (2012) Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:1442–1452
28. Breijyeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive Review on Alzheimer’s Disease: Causes and Treatment. *Mol Basel Switz* 25:5789
29. Budoff M (2016) Triglycerides and Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Causal Pathway of Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol* 118:138–145
30. Bullone M, Lavoie J-P (2017) The Contribution of Oxidative Stress and Inflamm-Aging in Human and Equine Asthma. *Int J Mol Sci* 18:2612
31. Byrne EM, Johnson J, McRae AF, Nyholt DR, Medland SE, Gehrman PR, Heath AC, Madden PAF, Montgomery GW, Chenevix-Trench G, Martin NG (2012) A genome-

- wide association study of caffeine-related sleep disturbance: confirmation of a role for a common variant in the adenosine receptor. *Sleep* 35:967–975
32. Cabrera C, Artacho R, Giménez R (2006) Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr* 25:79–99
 33. Cansev M, Marzloff G, Sakamoto T, Ulus IH, Wurtman RJ (2009) Giving uridine and/or docosahexaenoic acid orally to rat dams during gestation and nursing increases synaptic elements in brains of weanling pups. *Dev Neurosci* 31:181–192
 34. Cao X, Südhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115–120
 35. Cappelletti S, Piacentino D, Sani G, Aromatario M (2015) Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol* 13:71–88
 36. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen M-R, Tokgozoglu L, Monique Verschuren WM, Vlachopoulos C, Wood DA, Luis Zamorano J, Additional Contributor, Cooney M-T (2017) 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed* 70:115
 37. Chandra S, Pahan K (2019) Gemfibrozil, a Lipid-Lowering Drug, Lowers Amyloid Plaque Pathology and Enhances Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *J Alzheimers Dis Rep* 3:149–168
 38. Chen CT, Green JT, Orr SK, Bazinet RP (2008) Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:85–91
 39. Chen G-F, Xu T-H, Yan Y, Zhou Y-R, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38:1205–1235
 40. Chen Z, Zhong C (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 30:271–281
 41. Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MHG (2011) Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res* 52:419–434
 42. Chung W-G, Miranda CL, Maier CS (2007) Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* 1176:133–142
 43. Claes C, Danhash EP, Hasselmann J, Chadarevian JP, Shabestari SK, England WE, Lim TE, Hidalgo JLS, Spitale RC, Davtyan H, Blurton-Jones M (2021) Plaque-associated human microglia accumulate lipid droplets in a chimeric model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 16:50
 44. Claverys J-P, Prudhomme M, Martin B (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:451–475
 45. Corbett GT, Roy A, Pahan K (2012) Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, upregulates IL-1 receptor antagonist in mouse cortical neurons: implications for neuronal self-defense. *J Immunol Baltim Md* 1950 189:1002–1013

46. Corbett GT, Gonzalez FJ, Pahan K (2015) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8445–8450
47. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ (2004) Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med* 200:689–695
48. Crawford HC, Dempsey PJ, Brown G, Adam L, Moss ML (2009) ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr Pharm Des* 15:2288–2299
49. Crivelli SM, Giovagnoni C, Visseren L, Scheithauer A-L, de Wit N, den Hoedt S, Losen M, Mulder MT, Walter J, de Vries HE, Bieberich E, Martinez-Martinez P (2020) Sphingolipids in Alzheimer's disease, how can we target them? *Adv Drug Deliv Rev* 159:214–231
50. Cummings JL, Tong G, Ballard C (2019) Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis JAD* 67:779–794
51. Cunha RA (2016) How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J Neurochem* 139:1019–1055
52. Danna K, Nathans D (1971) Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2913–2917
53. Davis JM, Bhutani VK, Stefano JL, Fox WW, Spitzer AR (1989) Changes in pulmonary mechanics following caffeine administration in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 6:49–52
54. Desjardins P, Conklin D (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp JoVE* 2565
55. DeTure MA, Dickson DW (2019) The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14:32
56. Dias SSG, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, Teixeira L, Nunes da Silva MA, Barreto E, Mattos M, de Freitas CS, Azevedo-Quintanilha IG, Manso PPA, Miranda MD, Siqueira MM, Hottz ED, Pão CRR, Bou-Habib DC, Barreto-Vieira DF, Bozza FA, Souza TML, Bozza PT (2020) Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* 16:e1009127
57. Donoso P, O'Neill SC, Dilly KW, Negretti N, Eisner DA (1994) Comparison of the effects of caffeine and other methylxanthines on $[Ca^{2+}]_i$ in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 111:455–458
58. Doyle R, Sadlier DM, Godson C (2018) Pro-resolving lipid mediators: Agents of anti-ageing? *Semin Immunol* 40:36–48
59. Du G-J, Zhang Z, Wen X-D, Yu C, Calway T, Yuan C-S, Wang C-Z (2012) Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* 4:1679–1691

60. Dufouil C, Richard F, Fiévet N, Dartigues JF, Ritchie K, Tzourio C, Amouyel P, Alpérovitch A (2005) APOE genotype, cholesterol level, lipid-lowering treatment, and dementia: the Three-City Study. *Neurology* 64:1531–1538
61. Dussoix D, Arber W (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J Mol Biol* 5:37–49
62. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, Filipič M, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U, Lambré C, Leblanc J-C, Lillegaard IT, Moldeus P, Mortensen A, Oskarsson A, Stankovic I, Waalkens-Berendsen I, Woutersen RA, Andrade RJ, Fortes C, Mosesso P, Restani P, Arcella D, Pizzo F, Smeraldi C, Wright M (2018) Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA J Eur Food Saf Auth* 16:e05239
63. Elko EA, Mahoney JM, Vacek P, van der Vliet A, Anathy V, van der Velden JLJL, Janssen-Heininger YMW, Seward DJ (2019) Age-dependent dysregulation of redox genes may contribute to fibrotic pulmonary disease susceptibility. *Free Radic Biol Med* 141:438–446
64. Endesfelder S, Strauß E, Scheuer T, Schmitz T, Bühner C (2019) Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res* 20:88
65. Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S (2018) Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol* 210:296–310
66. Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC (2018) Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australas Psychiatry Bull R Aust N Z Coll Psychiatr* 26:347–357
67. Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC, Johnson LA (2020) Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 14:742
68. Farooqui AA, Ong W-Y, Horrocks LA (2006) Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 58:591–620
69. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413–7417
70. Fernandez JW, Rezai-Zadeh K, Obregon D, Tan J (2010) EGCG functions through estrogen receptor-mediated activation of ADAM10 in the promotion of non-amyloidogenic processing of APP. *FEBS Lett* 584:4259–4267
71. Fernández-Real J-M, Broch M, Vendrell J, Ricart W (2003) Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 26:1362–1368
72. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci CMLS* 61:857–872
73. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59:221–226

74. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E (2013) Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients* 5:4159–4173
75. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133
76. Freshney RI (2015) *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6. edition. John Wiley & Sons
77. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V (1987) Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317:1237–1245
78. Fukasawa H, Nakagomi M, Yamagata N, Katsuki H, Kawahara K, Kitaoka K, Miki T, Shudo K (2012) Tamibarotene: a candidate retinoid drug for Alzheimer's disease. *Biol Pharm Bull* 35:1206–1212
79. Gan R-Y, Li H-B, Sui Z-Q, Corke H (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:924–941
80. García-Viñuales S, Sciacca MFM, Lanza V, Santoro AM, Grasso G, Tundo GR, Sbardella D, Coletta M, Grasso G, La Rosa C, Milardi D (2021) The interplay between lipid and A β amyloid homeostasis in Alzheimer's Disease: risk factors and therapeutic opportunities. *Chem Phys Lipids* 236:105072
81. Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, Sainson R, Jovanovic J, Tigue NJ, Bannister D, Bamber L, Valge-Archer V, Wilkinson RW (2017) MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer* 116:1208–1217
82. Ghosh A, Pahan K (2012) Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, induces suppressor of cytokine signaling 3 in glial cells: implications for neurodegenerative disorders. *J Biol Chem* 287:27189–27203
83. Gibellini F, Smith TK (2010) The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62:414–428
84. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995–1001
85. Gilbert EF (1985) Carnitine deficiency. *Pathology (Phila)* 17:161–171
86. Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL (1995) Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 698:223–226
87. Giunta B, Hou H, Zhu Y, Salemi J, Ruscin A, Shytle RD, Tan J (2010) Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice. *Neurosci Lett* 471:134–138

88. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890
89. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59–74
90. Greer S, Honeywell R, Geletu M, Arulanandam R, Raptis L (2010) Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J Immunol Methods* 355:76–79
91. Grimm MOW, 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
92. Grimm MOW, Grimm HS, Hartmann T (2007) Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med* 13:337–344
93. Grimm MOW, Grösgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Müller U, Fassbender K, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T (2011) Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:695413
94. Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T (2011) From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:7713–7722
95. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B, Péter M, Vigh L, Grimm HS, Hartmann T (2011) Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286:14028–14039
96. Grimm MOW, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013) The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *BioMed Res Int* 2013:814390
97. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T (2013) Nephilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5:98
98. Grimm MOW, Hauptenthal VJ, Mett J, Stahlmann CP, Blümel T, Mylonas NT, Endres K, Grimm HS, Hartmann T (2016) Oxidized Docosahexaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegener Dis* 16:44–54
99. Grimm MOW, Mett J, Grimm HS, Hartmann T (2017) APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* 10:63
100. Grösgen S, Grimm MOW, Friess P, Hartmann T (2010) Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1801:966–974
101. Grösgen S (2013) Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheiten. Universität des Saarlandes

102. Grygiel-Górniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 13:17
103. Guschin DY, Waite AJ, Katibah GE, Miller JC, Holmes MC, Rebar EJ (2010) A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 649:247–256
104. Güssow D, Clackson T (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17:4000
105. Han X, Holtzman DM, McKeel DW (2001) Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* 77:1168–1180
106. Han X, Zhu J, Zhang X, Song Q, Ding J, Lu M, Sun S, Hu G (2018) Plin4-Dependent Lipid Droplets Hamper Neuronal Mitophagy in the MPTP/p-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 12:397
107. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580
108. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40:4893–4903
109. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lübke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615–2624
110. Hartmann T, Kuchenbecker J, Grimm MOW (2007) Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem* 103 Suppl 1:159–170
111. He M, Liu M-Y, Wang S, Tang Q-S, Yao W-F, Zhao H-S, Wei M-J (2012) [Research on EGCG improving the degenerative changes of the brain in AD model mice induced with chemical drugs]. *Zhong Yao Cai Zhongyao Cai J Chin Med Mater* 35:1641–1644
112. He X, Huang Y, Li B, Gong C-X, Schuchman EH (2010) Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:398–408
113. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA (2013) Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80:1778–1783
114. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U (2014) Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *J Lipid Res* 55:561–572
115. Hermon M, Cairns N, Egly JM, Fery A, Labudova O, Lubec G (1998) Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 251:45–48
116. Hooper NM, Turner AJ (2002) The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 9:1107–1119
117. Hounkpe BW, Chenou F, de Lima F, De Paula EV (2021) HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res* 49:D947–D955

118. Huang C, Freter C (2015) Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci* 16:924–949
119. 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
120. Ionescu-Tucker A, Cotman CW (2021) Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 107:86–95
121. Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8921–8926
122. Jack CR, Petersen RC, Xu YC, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Waring SC, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology* 52:1397–1403
123. Jackson CL (2019) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 59:88–96
124. Janitschke D, Nelke C, Lauer AA, Regner L, Winkler J, Thiel A, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2019) Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on A β -Homeostasis in SH-SY5Y Cells. *Biomolecules* 9:689
125. Janitschke D, Lauer AA, Bachmann CM, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2020) Unique Role of Caffeine Compared to Other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD Relevant Genes in Neuroblastoma SH-SY5Y Wild Type Cells. *Int J Mol Sci* 21:9015
126. Jarc E, Petan T (2019) Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J Biol Med* 92:435–452
127. Jin C, Yuan P (2020) Implications of lipid droplets in lung cancer: Associations with drug resistance. *Oncol Lett* 20:2091–2104
128. Johnson IM, Prakash H, Prathiba J, Raghunathan R, Malathi R (2012) Spectral analysis of naturally occurring methylxanthines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. *PloS One* 7:e50019
129. Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Tesseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, De Strooper B, Saftig P (2010) The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:4833–4844
130. Kabisch H, Lippa H (1968) [Histochemical studies of hydrolytic enzymes in the preoptic nucleus of the carp with regard to neurosecretion]. *Acta Histochem* 30:137–191
131. Kagechika H, Kawachi E, Hashimoto Y, Himi T, Shudo K (1988) Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J Med Chem* 31:2182–2192

132. Kanno K, Wu MK, Agate DS, Fanelli BJ, Wagle N, Scapa EF, Ukomadu C, Cohen DE (2007) Interacting proteins dictate function of the minimal START domain phosphatidylcholine transfer protein/StarD2. *J Biol Chem* 282:30728–30736
133. Kao Y-C, Ho P-C, Tu Y-K, Jou I-M, Tsai K-J (2020) Lipids and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21:1505
134. Karadsheh N, Kussie P, Linthicum DS (1991) Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. *Toxicol Lett* 55:335–342
135. Kato T, Hagiyaama M, Ito A (2018) Renal ADAM10 and 17: Their Physiological and Medical Meanings. *Front Cell Dev Biol* 6:153
136. Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, Prinz M, Haass C, Meyer-Luehmann M (2020) A β oligomers trigger and accelerate A β seeding. *Brain Pathol Zurich Switz* 30:36–45
137. Kawahara K, Nishi K, Suenobu M, Ohtsuka H, Maeda A, Nagatomo K, Kuniyasu A, Staufenbiel M, Nakagomi M, Shudo K, Nakayama H (2009) Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain beta-amyloid peptides in APP23 mice. *Biol Pharm Bull* 32:1307–1309
138. Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:3801–3809
139. Keelan M, Clandinin MT, Thomson AB (1997) Dietary lipids influence the activity of delta 5-desaturase and phospholipid fatty acids in rat enterocyte microsomal membranes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1009–1014
140. Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, Fang EF (2017) Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci* 40:151–166
141. Kersten S, Stienstra R (2017) The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 136:75–84
142. Kessler C, Manta V (1990) Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3). *Gene* 92:1–248
143. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 66:2500–2505
144. Khan N, Mukhtar H (2018) Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients* 11:39
145. Kim HY, Akbar M, Lau A, Edsall L (2000) Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J Biol Chem* 275:35215–35223
146. Kiss E, Kränzlin B, Wagenblaß K, Bonrouhi M, Thiery J, Gröne E, Nordström V, Teupser D, Gretz N, Malle E, Gröne H-J (2013) Lipid droplet accumulation is

- associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage: prevention by liver X receptors. *Am J Pathol* 182:727–741
147. Kitaoka K, Shimizu N, Ono K, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Ishimura K, Séi H, Yoshizaki K (2013) The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice. *Neuropharmacology* 72:58–65
 148. Köfeler HC, Fauland A, Rechberger GN, Trötz Müller M (2012) Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms. *Metabolites* 2:19–38
 149. Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM (2009) ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C- α dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:4605–4615
 150. Kotowski G (1943) Lösungen der inhomogenen Mathieuschen Differentialgleichung mit periodischer Störfunktion beliebiger Frequenz (mit besonderer Berücksichtigung der Resonanzlösungen). *ZAMM - J Appl Math Mech Z Für Angew Math Mech* 23:213–229
 151. Kretschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA Mary Ann Liebert Inc* 5:315–324
 152. Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020–3032
 153. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018:
 154. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922–3927
 155. Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018) Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25:59–70
 156. Larner AJ (2013) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease: an update on genotype-phenotype relationships. *J Alzheimers Dis JAD* 37:653–659
 157. Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD (2008) Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod Oxf Engl* 23:2308–2318
 158. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717–730
 159. Lauer AA, Janitschke D, Dos Santos Guilherme M, Nguyen VTT, Bachmann CM, Qiao S, Schrul B, Boehm U, Grimm HS, Hartmann T, Endres K, Grimm MOW (2021) Shotgun lipidomics of liver and brain tissue of Alzheimer's disease model mice treated with acitretin. *Sci Rep* 11:15301

160. Lauer AA (unveröffentlichte Dissertation) Der Einfluss bioaktiver Substanzen auf die molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung. Universität des Saarlandes
161. Law S-H, Chan M-L, Marathe GK, Parveen F, Chen C-H, Ke L-Y (2019) An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 20:1149
162. Layé S (2010) Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82:295–303
163. Lee H-P, Casadesus G, Zhu X, Lee H, Perry G, Smith MA, Gustaw-Rothenberg K, Lerner A (2009) All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9:1615–1621
164. Lee KW, Lee HJ (2006) The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors Oxf Engl* 26:105–121
165. Lee SM, Koh H-J, Park D-C, Song BJ, Huh T-L, Park J-W (2002) Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med* 32:1185–1196
166. Lerner AJ, Gustaw-Rothenberg K, Smyth S, Casadesus G (2012) Retinoids for treatment of Alzheimer's disease. *BioFactors Oxf Engl* 38:84–89
167. Lerner LK, Moreno NC, Rocha CRR, Munford V, Santos V, Soltys DT, Garcia CCM, Sarasin A, Menck CFM (2019) XPD/ERCC2 mutations interfere in cellular responses to oxidative stress. *Mutagenesis* 34:341–354
168. Lewis FI, Torgerson PR (2017) The current and future burden of late-onset dementia in the United Kingdom: Estimates and interventions. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 13:38–44
169. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ (2019) Advances in n-3 polyunsaturated fatty acid nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 28:1–5
170. Li T, Liu N, Zhang G, Chen M (2022) CASP4 and CASP8 as newly defined autophagy-pyroptosis-related genes associated with clinical and prognostic features of renal cell carcinoma. *J Cancer Res Ther* 18:1952–1960
171. Li W, He P, Huang Y, Li Y-F, Lu J, Li M, Kurihara H, Luo Z, Meng T, Onishi M, Ma C, Jiang L, Hu Y, Gong Q, Zhu D, Xu Y, Liu R, Liu L, Yi C, Zhu Y, Ma N, Okamoto K, Xie Z, Liu J, He R-R, Feng D (2021) Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics* 11:222–256
172. Li X, Fang P, Li Y, Kuo Y-M, Andrews AJ, Nanayakkara G, Johnson C, Fu H, Shan H, Du F, Hoffman NE, Yu D, Eguchi S, Madesh M, Koch WJ, Sun J, Jiang X, Wang H, Yang X (2016) Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Lysophosphatidylcholine-Induced Endothelial Cell Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:1090–1100
173. Li Z, Vance DE (2008) Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res* 49:1187–1194
174. Lichtenthaler SF (2011) α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116:10–21

175. Lin P-Y, Huang S-Y, Su K-P (2010) A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry* 68:140–147
176. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3077–3082
177. Liu J, Pan C, Guo L, Wu M, Guo J, Peng S, Wu Q, Zuo Q (2016) A new mechanism of trastuzumab resistance in gastric cancer: MACC1 promotes the Warburg effect via activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *J Hematol Oncol* 9:76
178. Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, Li Z, Hui J, Graham BH, Quintana A, Bellen HJ (2015) Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* 160:177–190
179. Liu R, Qin X-P, Zhuang Y, Zhang Y, Liao H-B, Tang J-C, Pan M-X, Zeng F-F, Lei Y, Lei R-X, Wang S, Liu A-C, Chen J, Zhang Z-F, Zhao D, Wu S-L, Liu R-Z, Wang Z-F, Wan Q (2018) Glioblastoma recurrence correlates with NLGN3 levels. *Cancer Med* 7:2848–2859
180. Liu R, Gang L, Shen X, Xu H, Wu F, Sheng L (2019) Binding Characteristics and Superimposed Antioxidant Properties of Caffeine Combined with Superoxide Dismutase. *ACS Omega* 4:17417–17424
181. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon CP, Criqui M, Cushman M, Hofman A, Packard C, Thompson SG, Collins R, Danesh J (2010) Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet Lond Engl* 375:1536–1544
182. Luciani A, Vilella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, Gavina M, Pulze L, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, D’Apolito M, Guido S, Masliah E, Spencer B, Quaratino S, Raia V, Ballabio A, Maiuri L (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12:863–875
183. Luo R, Su L-Y, Li G, Yang J, Liu Q, Yang L-X, Zhang D-F, Zhou H, Xu M, Fan Y, Li J, Yao Y-G (2020) Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model. *Autophagy* 16:52–69
184. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen M-R, Tokgozoglu L, Wiklund O, ESC Scientific Document Group (2020) 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 41:111–188
185. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD (2019) Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019:8563845
186. Marques AT, Antunes A, Fernandes PA, Ramos MJ (2006) Comparative evolutionary genomics of the HADH2 gene encoding Abeta-binding alcohol dehydrogenase/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (ABAD/HSD10). *BMC Genomics* 7:202

187. Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, Pluvinage JV, Mathur V, Hahn O, Morgens DW, Kim J, Tevini J, Felder TK, Wolinski H, Bertozzi CR, Bassik MC, Aigner L, Wyss-Coray T (2020) Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci* 23:194–208
188. Marx B, Scuvée É, Scuvée-Moreau J, Seutin V, Jouret F (2016) [Mechanisms of caffeine-induced diuresis]. *Med Sci MS* 32:485–490
189. Matsushita Y, Nakagawa H, Koike K (2021) Lipid Metabolism in Oncology: Why It Matters, How to Research, and How to Treat. *Cancers* 13:474
190. Mekonnen D, Derby A, Mihret A, Yimer SA, Tønjum T, Gelaw B, Nibret E, Munshae A, Waddell SJ, Aseffa A (2021) Lipid droplets and the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* from direct sputa: a literature review. *Lipids Health Dis* 20:129
191. Melis M, Tang X-H, Trasino SE, Patel VM, Stummer DJ, Jessurun J, Gudas LJ (2019) Effects of AM80 compared to AC261066 in a high fat diet mouse model of liver disease. *PLoS One* 14:e0211071
192. Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110–1114
193. Mett J (2017) Die Regulation Abeta-degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase. Universität des Saarlandes#
194. Mett J, Lauer AA, Janitschke D, Griebisch LV, Theiss EL, Grimm HS, Koivisto H, Tanila H, Hartmann T, Grimm MOW (2021) Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance A β Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme. *Cells* 10:2941
195. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O’Rahilly S, Palmer CNA, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58:726–741
196. Mielke MM, Lyketsos CG (2010) Alterations of the sphingolipid pathway in Alzheimer’s disease: new biomarkers and treatment targets? *Neuromolecular Med* 12:331–340
197. Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S (2008) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer’s disease. *Brain Pathol Zurich Switz* 18:240–252
198. Mitani T, Watanabe S, Yoshioka Y, Katayama S, Nakamura S, Ashida H (2017) Theobromine suppresses adipogenesis through enhancement of CCAAT-enhancer-binding protein β degradation by adenosine receptor A1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864:2438–2448
199. Mitrofanova A, Burke G, Merscher S, Fornoni A (2021) New insights into renal lipid dysmetabolism in diabetic kidney disease. *World J Diabetes* 12:524–540
200. Miwako I, Kagechika H (2007) Tamibarotene. *Drugs Today Barc Spain* 1998 43:563–568
201. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741

202. Montaigne D, Butruille L, Staels B (2021) PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol* 18:809–823
203. Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM (2016) Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Mol Basel Switz* 21:974
204. Moon J-H, Lee J-H, Park J-Y, Kim S-W, Lee Y-J, Kang S-J, Seol J-W, Ahn D-C, Park S-Y (2014) Caffeine prevents human prion protein-mediated neurotoxicity through the induction of autophagy. *Int J Mol Med* 34:553–558
205. Moulton MJ, Barish S, Ralhan I, Chang J, Goodman LD, Harland JG, Marcogliese PC, Johansson JO, Ioannou MS, Bellen HJ (2021) Neuronal ROS-induced glial lipid droplet formation is altered by loss of Alzheimer's disease-associated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2112095118
206. Mozaffarian D, Aro A, Willett WC (2009) Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr* 63 Suppl 2:S5-21
207. Müller CE, Jacobson KA (2011) Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol* 151–199
208. Mullooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ (2016) The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biol Ther* 17:870–880
209. Mumford GK, Evans SM, Kaminski BJ, Preston KL, Sannerud CA, Silverman K, Griffiths RR (1994) Discriminative stimulus and subjective effects of theobromine and caffeine in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 115:1–8
210. Naudí A, Cabré R, Jové M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R (2015) Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int Rev Neurobiol* 122:133–189
211. Neldeborg S, Lin L, Stougaard M, Luo Y (2019) Rapid and Efficient Gene Deletion by CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1961:233–247
212. Neufingerl N, Zebregs YEMP, Schuring EAH, Trautwein EA (2013) Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 97:1201–1209
213. Ni Y, Shen P, Wang X, Liu H, Luo H, Han X (2022) The roles of IDH1 in tumor metabolism and immunity. *Future Oncol Lond Engl* 18:3941–3953
214. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559–1582
215. Nunnari G, Argyris E, Fang J, Mehlman KE, Pomerantz RJ, Daniel R (2005) Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines. *Virology* 335:177–184
216. Nunomura A, Perry G (2020) RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs. *Oxid Med Cell Longev* 2020:2638130
217. Obregon DF, Rezai-Zadeh K, Bai Y, Sun N, Hou H, Ehrhart J, Zeng J, Mori T, Arendash GW, Shytle D, Town T, Tan J (2006) ADAM10 activation is required for

- green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281:16419–16427
218. O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204
219. Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:137–155
220. Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E, Franco R (2016) The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. *Respir Med* 112:1–9
221. Oñatibia-Astibia A, Franco R, Martínez-Pinilla E (2017) Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. *Mol Nutr Food Res* 61:
222. Ong W-Y, Farooqui T, Kokotos G, Farooqui AA (2015) Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. *ACS Chem Neurosci* 6:814–831
223. Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, Garcia AE, Zemskov EA, Maltepe E, Fineman JR, Wang T, Black SM (2020) Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biol* 36:101679
224. Paluch M (2000) Electrical properties of free surface of water and aqueous solutions. *Adv Colloid Interface Sci* 84:27–45
225. Panganamala RV, Horrocks LA, Geer JC, Cornwell DG (1971) Positions of double bonds in the monounsaturated alk-1-enyl groups from the plasmalogens of human heart and brain. *Chem Phys Lipids* 6:97–102
226. Panuwet P, Hunter RE, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, Marder ME, Kartavenka K, Ryan PB, Barr DB (2016) Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem* 46:93–105
227. Papangelis A, Ulven T (2022) Synthesis of Lysophosphatidylcholine and Mixed Phosphatidylcholine. *J Org Chem* 87:8194–8197
228. Pararasa C, Bailey CJ, Griffiths HR (2015) Ageing, adipose tissue, fatty acids and inflammation. *Biogerontology* 16:235–248
229. Patrick RP (2019) Role of phosphatidylcholine-DHA in preventing APOE4-associated Alzheimer's disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 33:1554–1564
230. Pekala J, Patkowska-Sokoła B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochyński S, Librowski T (2011) L-carnitine--metabolic functions and meaning in humans life. *Curr Drug Metab* 12:667–678
231. Penna I, Vella S, Gigoni A, Russo C, Cancedda R, Pagano A (2011) Selection of candidate housekeeping genes for normalization in human postmortem brain samples. *Int J Mol Sci* 12:5461–5470
232. Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y (2018) Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Mol Basel Switz* 23:1297

233. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ (2001) Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 26:771–782
234. Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 52:201–243
235. Piguet O, Double KL, Kril JJ, Harasty J, Macdonald V, McRitchie DA, Halliday GM (2009) White matter loss in healthy ageing: a postmortem analysis. *Neurobiol Aging* 30:1288–1295
236. Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* 8:743–754
237. Pohanka M (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov* 155:219–229
238. Polosa R, Blackburn MR (2009) Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci* 30:528–535
239. Postuma RB, Lang AE, Munhoz RP, Charland K, Pelletier A, Moscovich M, Filla L, Zanatta D, Rios Romanets S, Altman R, Chuang R, Shah B (2012) Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 79:651–658
240. Prasanthi JRP, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger JD, Ghribi O (2010) Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic Biol Med* 49:1212–1220
241. Puchkov D, Haucke V (2013) Greasing the synaptic vesicle cycle by membrane lipids. *Trends Cell Biol* 23:493–503
242. Qiang W, Akinlolu RD, Nam M, Shu N (2014) Structural evolution and membrane interaction of the 40-residue β amyloid peptides: differences in the initial proximity between peptides and the membrane bilayer studied by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 53:7503–7514
243. Qiao A, Li J, Hu Y, Wang J, Zhao Z (2021) Reduction BACE1 expression via suppressing NF- κ B mediated signaling by Tamibarotene in a mouse model of Alzheimer's disease. *IBRO Neurosci Rep* 10:153–160
244. Quintanilla Rodriguez BS, Correa R (2023) Gemfibrozil. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545266/>
245. Raha S, Ghosh A, Dutta D, Patel DR, Pahan K (2021) Activation of PPAR α enhances astroglial uptake and degradation of β -amyloid. *Sci Signal* 14:eabg4747
246. Raharja A, Mahil SK, Barker JN (2021) Psoriasis: a brief overview. *Clin Med Lond Engl* 21:170–173
247. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281–2308
248. Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88:640–651

249. Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, Shytle RD, Tan J (2008) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* 1214:177–187
250. Richbart SD, Merritt JC, Nolan NA, Dasgupta P (2021) Acetylcholinesterase and human cancers. *Adv Cancer Res* 152:1–66
251. Riksen NP, Smits P, Rongen GA (2011) The cardiovascular effects of methylxanthines. *Handb Exp Pharmacol* 413–437
252. Ringnér M (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 26:303–304
253. Robinson DS (1973) Plasma triglyceride metabolism. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 5:5–10
254. Rodriguez-Roisin R, Rabe KF, Vestbo J, Vogelmeier C, Agustí A, all previous and current members of the Science Committee and the Board of Directors of GOLD (goldcopd.org/committees/) (2017) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 20th Anniversary: a brief history of time. *Eur Respir J* 50:1700671
255. Rogers RL, Meyer JS, McClintic K, Mortel KF (1989) Reducing hypertriglyceridemia in elderly patients with cerebrovascular disease stabilizes or improves cognition and cerebral perfusion. *Angiology* 40:260–269
256. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao K-A (2017) mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol* 13:e1005752
257. Romanens M, Adams A, Warmuth W (2022) PROCAM based myocardial infarction risk in relation to global vascular disease risk: observations from the ARCO cohort study. *Swiss Med Wkly* 152:w30111
258. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741–747
259. Rothhaar TL, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012:141240
260. Sakamoto T, Cansev M, Wurtman RJ (2007) Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res* 1182:50–59
261. Salimi S, Fotouhi A, Ghoreishi A, Derakhshan M-K, Khodaie-Ardakani M-R, Mohammadi M-R, Noorbala A-A, Ahmadi-Abhari S-A, Hajiazim M, Abbasi S-H, Akhondzadeh S (2008) A placebo controlled study of the propentofylline added to risperidone in chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:726–732
262. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
263. Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu G-Q, Zhou Y, Halabisky B, Cissé M, Searce-Levie K, Cheng IH, Gan L, Palop JJ, Bonventre JV, Mucke L (2008)

- Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 11:1311–1318
264. Sanchez-Mejia RO, Mucke L (2010) Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:784–790
265. Sanda T, Kuwano T, Nakao S, Iida S, Ishida T, Komatsu H, Shudo K, Kuwano M, Ono M, Ueda R (2005) Antimyeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia* 19:901–909
266. Sanders TAB (2014) Protective effects of dietary PUFA against chronic disease: evidence from epidemiological studies and intervention trials. *Proc Nutr Soc* 73:73–79
267. Saraceno C, Marcello E, Di Marino D, Borroni B, Claeysen S, Perroy J, Padovani A, Tramontano A, Gardoni F, Di Luca M (2014) SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation. *Cell Death Dis* 5:e1547
268. Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69–176
269. Saura CA, Valero J (2011) The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci* 22:153–169
270. Schienkiewitz A, Haftenberger M, Mensink GBM (2020) Time trends of non-alcoholic beverage consumption among adults in Germany, 1990-2011. *Nutr J* 19:28
271. Schuster J, Mitchell ES (2019) More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 89:263–274
272. Serge Gauthier, Claire Webster, Stijn Servaes, José A. Morais, Pedro Rosa-Neto (2022) World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. URL: <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2022.pdf>
273. Serhan CN (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510:92–101
274. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12:3055–3063
275. Signorelli P, Pivari F, Barcella M, Merelli I, Zulueta A, Dei Cas M, Rosso L, Ghidoni R, Caretti A, Paroni R, Mingione A (2021) Myriocin modulates the altered lipid metabolism and storage in cystic fibrosis. *Cell Signal* 81:109928
276. Signorelli P, Conte C, Albi E (2021) The Multiple Roles of Sphingomyelin in Parkinson's Disease. *Biomolecules* 11:1311
277. Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6075–6079
278. Skoumalová A, Hort J (2012) Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 16:2291–2300
279. Smith HO, Wilcox KW (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51:379–391

280. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
281. Smith TM, Tharakan A, Martin RK (2020) Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol* 11:499
282. 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
283. Soininen H, Solomon A, Visser PJ, Hendrix SB, Blennow K, Kivipelto M, Hartmann T, LipiDiDiet clinical study group (2021) 36-month LipiDiDiet multinutrient clinical trial in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 17:29–40
284. Soliman ML, Geiger JD, Chen X (2017) Caffeine Blocks HIV-1 Tat-Induced Amyloid Beta Production and Tau Phosphorylation. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 12:163–170
285. Stables MJ, Gilroy DW (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50:35–51
286. Stahlmann C (2018) Der Einfluss der intrazellulären Domäne von APP auf die Lipidhomöostase und der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung. Universität des Saarlandes
287. Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Alder L (2012) Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal Chem* 84:1474–1482
288. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E (2013) Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br J Pharmacol* 168:1059–1073
289. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL (2007) New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* 581:431–444
290. Su H, Rustam YH, Masters CL, Makalic E, McLean CA, Hill AF, Barnham KJ, Reid GE, Vella LJ (2021) Characterization of brain-derived extracellular vesicle lipids in Alzheimer's disease. *J Extracell Vesicles* 10:e12089
291. Su XQ, Wang J, Sinclair AJ (2019) Plasmalogens and Alzheimer's disease: a review. *Lipids Health Dis* 18:100
292. Sumikawu O, Hall S, Wittig M, Tison R (2022) World Green Tea Conference 2022. Shizuoka-City
293. Sun X, Bromley-Brits K, Song W (2012) Regulation of β -site APP-cleaving enzyme 1 gene expression and its role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:62–70
294. Sung P-S, Lin P-Y, Liu C-H, Su H-C, Tsai K-J (2020) Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21:701
295. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Te Pas A, Plavka R, Roehr CC, Saugstad OD, Simeoni U, Speer CP, Vento M, Visser GHA, Halliday HL (2019)

- European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2019 Update. *Neonatology* 115:432–450
296. Tang G, Xu Y, Zhang C, Wang N, Li H, Feng Y (2021) Green Tea and Epigallocatechin Gallate (EGCG) for the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD): Insights into the Role of Oxidative Stress and Antioxidant Mechanism. *Antioxid Basel Switz* 10:1076
297. Thomas S, Kumar RS, Brumeanu T-D (2004) Role of lipid rafts in T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52:215–224
298. Thompson TW, Kim AB, Li PJ, Wang J, Jackson BT, Huang KTH, Zhang L, Raulet DH (2017) Endothelial cells express NKG2D ligands and desensitize antitumor NK responses. *eLife* 6:e30881
299. Thongnak L, Pongchaidecha A, Lungkaphin A (2020) Renal Lipid Metabolism and Lipotoxicity in Diabetes. *Am J Med Sci* 359:84–99
300. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M (2019) Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* 14:5541–5554
301. To Y, Ito K, Kizawa Y, Failla M, Ito M, Kusama T, Elliott WM, Hogg JC, Adcock IM, Barnes PJ (2010) Targeting phosphoinositide-3-kinase-delta with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 182:897–904
302. Todd PA, Ward A (1988) Gemfibrozil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs* 36:314–339
303. Tönnies E, Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD* 57:1105–1121
304. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
305. Vaugeois J-M (2002) Signal transduction: positive feedback from coffee. *Nature* 418:734–736
306. Venkatesh HS, Tam LT, Woo PJ, Lennon J, Nagaraja S, Gillespie SM, Ni J, Duveau DY, Morris PJ, Zhao JJ, Thomas CJ, Monje M (2017) Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* 549:533–537
307. Vingtdoux V, Marambaud P (2012) Identification and biology of α -secretase. *J Neurochem* 120 Suppl 1:34–45
308. Walker JM (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 32:5–8
309. Walker JM, Klakotskaia D, Ajit D, Weisman GA, Wood WG, Sun GY, Serfozo P, Simonyi A, Schachtman TR (2015) Beneficial effects of dietary EGCG and voluntary exercise on behavior in an Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis JAD* 44:561–572
310. Walther TC, Chung J, Farese RV (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:491–510

311. Wang J-N, Cao X-J (2022) Targeting ADAM10 in Renal Diseases. *Curr Mol Med*
312. Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W (2017) Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 10:294
313. Weber S, Saftig P (2012) Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Dev Camb Engl* 139:3693–3709
314. Wetzel S, Seipold L, Saftig P (2017) The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864:2071–2081
315. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ* 24:931–941
316. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng J-X, Graham M, Christiano R, Fröhlich F, Liu X, Buhman KK, Coleman RA, Bewersdorf J, Farese RV, Walther TC (2013) Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell* 24:384–399
317. Wiwanitkit V (2013) Physiological genomics analysis for Alzheimer's disease. *Ann Indian Acad Neurol* 16:72–74
318. Wójtowicz S, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB (2020) The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res* 45:972–988
319. Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 131:275–278
320. Wong E, Maretzky T, Peleg Y, Blobel CP, Sagi I (2015) The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J Biol Chem* 290:12135–12146
321. Wong MW, Braidly 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 J Alzheimers Assoc* 13:810–827
322. Wood PL (2012) Lipidomics of Alzheimer's disease: current status. *Alzheimers Res Ther* 4:5
323. Wu Z, Wu S, Liang T, Wang L (2021) Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Is a Risk Factor for Patients With Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 15:633022
324. Wurtman RJ, Cansev M, Sakamoto T, Ulus I (2010) Nutritional modifiers of aging brain function: use of uridine and other phosphatide precursors to increase formation of brain synapses. *Nutr Rev* 68 Suppl 2:S88-101
325. Wurtman RJ (2014) A nutrient combination that can affect synapse formation. *Nutrients* 6:1701–1710
326. Wurtman RJ (2017) Synapse formation in the brain can be enhanced by co-administering three specific nutrients. *Eur J Pharmacol* 817:20–21

327. Wysowski DK, Kennedy DL, Gross TP (1990) Prescribed use of cholesterol-lowering drugs in the United States, 1978 through 1988. *JAMA* 263:2185–2188
328. Wyss-Coray T (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* 539:180–186
329. Xicota L, Rodriguez-Morato J, Dierssen M, de la Torre R (2017) Potential Role of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in the Secondary Prevention of Alzheimer Disease. *Curr Drug Targets* 18:174–195
330. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM (2019) The Role of Lipids in Parkinson's Disease. *Cells* 8:27
331. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008) Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29:422–437
332. Yabuuchi H, O'Brien JS (1968) Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *J Lipid Res* 9:65–67
333. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC-M (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58:321–329
334. Yilmaz M, Kantarjian H, Ravandi F (2021) Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer J* 11:123
335. Yu L, Li Y, Gris e A, Wang H (2020) CGI-58: Versatile Regulator of Intracellular Lipid Droplet Homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 1276:197–222
336. Yuan X-Z, Sun S, Tan C-C, Yu J-T, Tan L (2017) The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD* 58:303–322
337. Zemskov EA, Lu Q, Ornatowski W, Klinger CN, Desai AA, Maltepe E, Yuan JX-J, Wang T, Fineman JR, Black SM (2019) Biomechanical Forces and Oxidative Stress: Implications for Pulmonary Vascular Disease. *Antioxid Redox Signal* 31:819–842
338. 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
339. Zhang T, Chen D, Lee TH (2019) Phosphorylation Signaling in APP Processing in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21:209
340. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3
341. Zhang Z, Zhang X, Bi K, He Y, Yan W, Yang CS, Zhang J (2021) Potential protective mechanisms of green tea polyphenol EGCG against COVID-19. *Trends Food Sci Technol* 114:11–24
342. Zhao Y, Calon F, Julien C, Winkler JW, Petasis NA, Lukiw WJ, Bazan NG (2011) Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR γ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One* 6:e15816

343. Zhao Y, Hasse S, Bourgoin SG (2021) Phosphatidylserine-specific phospholipase A1: A friend or the devil in disguise. *Prog Lipid Res* 83:101112
344. Zheng H, Zhong A, Xie S, Wang Y, Sun J, Zhang J, Tong Y, Chen M, Zhang G, Ma Q, Kai J, Guo L, Lu R (2019) Elevated serum HER-2 predicts poor prognosis in breast cancer and is correlated to ADAM10 expression. *Cancer Med* 8:679–685
345. Zhu D, Ganji SH, Kamanna VS, Kashyap ML (2002) Effect of gemfibrozil on apolipoprotein B secretion and diacylglycerol acyltransferase activity in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Atherosclerosis* 164:221–228
346. Ziegler D, Strom A, Straßburger K, Knebel B, Bönhof GJ, Kotzka J, Szendroedi J, Roden M, German Diabetes Study group (2021) Association of cardiac autonomic dysfunction with higher levels of plasma lipid metabolites in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* 64:458–468
347. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103
348. (2012) *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
349. (2021) 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 17:327–406
350. (2021) Correction to: Kinetic and Dynamic Description of Caffeine by Alsabri et al. *J Caffeine Adenosine Res* 2018;8(1): 3-9; DOI: 10.1089/caff.2017.0011. *J Caffeine Adenosine Res* 11:107

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α-CTF	engl.: <i>α C-terminal fragment</i> , α-C-terminales Fragment
β-CTF	engl.: <i>β C-terminal fragment</i> , β-C-terminales Fragment
μ	mikro
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Aβ	Amyloid β
ADAM	engl.: <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AD	engl.: <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimer-Erkrankung
AICD	engl.: <i>APP intracellular domain</i> , APP intrazelluläre Domäne
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
ANOVA	engl.: <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APOE	Apolipoprotein E
APP	engl.: <i>amyloid precursor protein</i> , Amyloid-Vorläuferprotein
Aβ	Amyloid-β
ATGL	adipöse Triglyceridlipase
ATRA	all-trans-Retinoat
BACE1	engl.: <i>β-site APP cleaving enzyme</i> , APP-spaltendes Enzym an der β-Seite
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i>
C	Zenti
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
Cq-Wert	engl.: <i>quantitation cycle</i>
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cas	engl.: <i>CRISPR associated</i>
CE	engl.: <i>collision energy</i> , Kollisionsenergie
CH ₃ COOK	Calciumacetat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CRISPR	engl.: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cu	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfat
C-Terminus	Carboxyl-Terminus (COOH-Gruppe)
d	Tag
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DHA	Docosahexaensäure
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
engl.	Englisch
EOAD	engl.: <i>early onset Alzheimer's disease</i> , früh einsetzende Alzheimer-Erkrankung
EPA	Eicosapentaensäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alii (m), et aliae (f) et alia (n), und andere

eV	Elektronenvolt
FAD	engl.: <i>familial Alzheimer's disease</i> , familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDL	engl.: <i>high density lipoprotein</i>
HEK	engl.: <i>human embryonic kidney</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKG	engl.: <i>housekeeping gene</i> , Haushaltsgen
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	engl.: <i>horse-radish peroxidase</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IU	engl.: <i>international unit</i> , internationale Einheit
K	Koffein
K _i	Inhibitorkonstante
KCl	Kaliumchlorid
KO	engl.: <i>Knockout</i>
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> , Medium zur Bakteriumkultur
LD	engl.: <i>lipid droplet</i> , Lipidtröpfchen
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	engl.: <i>low-density lipoprotein</i>
LOAD	engl.: <i>late onset Alzheimer's disease</i> , spät einsetzende Alzheimer-Erkrankung
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholine
m	milli
M	molar
MEM	engl.: <i>minimum essential medium</i>
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methylxanthine
MUFA	engl.: <i>monounsaturated fatty acid</i>
MW	Mittelwert
n	nano
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus (NH ₂ -Gruppe)
OD	optische Dichte
P	Pentoxifyllin
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PAM	engl.: <i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PC aa	diacyl-Phosphatidylcholin
PC ae	Phosphatidylcholin-Plasmalogene
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PF	Propentofyllin

pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PITC	Phenylisothiocyanat
PLA1	Phospholipase A1
PLA2	Phospholipase A2
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor
PUFA	engl.: <i>polyunsaturated fatty acid</i>
qRT-PCR	engl.: <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl.: <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RbCl	Rubidiumchlorid
s	Sekunde
<i>S.pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
sAPP α	engl.: <i>soluble α-secreted APP</i>
sAPP β	engl.: <i>soluble β-secreted APP</i>
SD	engl.: <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SFA	engl.: <i>saturated fatty acid</i>
sgRNS	engl.: <i>single guide RNS</i>
SM	Sphingomyeline
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triglyceride
TB	Theobromin
TBS	engl.: <i>tris buffered saline</i>
TP	Theophyllin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	engl.: <i>very low-density lipoprotein</i>
v/v	engl.: <i>volume per volume</i> , Volumen/Volumen
w/v	engl.: <i>weight per volume</i> , Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
x g	x-fache Fallbeschleunigung

Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	schematischer Aufbau von ADAM10 im inaktiven Zustand.....	6
Abbildung 2:	APP-Prozessierung.....	11
Abbildung 3:	Strukturformel von Epigallocatechin-3-gallat.....	14
Abbildung 4:	Gesundheitsfördernde Effekte von Epigallocatechin-3-gallat auf den menschlichen Organismus.....	16
Abbildung 5:	Strukturformel von Tamibarotene.....	17
Abbildung 6:	Strukturformel von Gemfibrozil.....	18
Abbildung 7:	schematischer Wirkmechanismus von Gemfibrozil.....	19
Abbildung 8:	chemische Grundstruktur des Xanthins.....	21
Abbildung 9:	Sanger-Sequenzierungsergebnisse der sgRNS im DNS-Insert.....	41
Abbildung 10:	Verifizierung und Nachweis der Gendeletion von <i>ADAM10</i> in HEK-Zellen mittels sAPP α -Blot.....	65
Abbildung 11:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Lyso-Phosphatidylcholin-Spezies.....	69
Abbildung 12:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Phosphatidylcholin-Spezies.....	71
Abbildung 13:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Phosphatidylcholin-Plasmalogen-Spezies.....	73
Abbildung 14:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Sphingomyelin-Spezies.....	75
Abbildung 15:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Triglycerid-Spezies.....	77
Abbildung 16:	Effekte der <i>ADAM10</i> -Gendeletion in HEK-Zellen auf Carnitin-Spezies.....	79
Abbildung 17:	Einfluss der Adam10-Modulatoren auf die Zell-Viabilität von SH-SY5Y-, HEK- und Calu-3-Zellen.....	81
Abbildung 18:	Nachweis der sAPP α -Freisetzung in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen nach Inkubation von Am80, EGCG und Gemfibrozil mittels Western-Blot-Analyse.....	83
Abbildung 19:	Effekte von Am80 und EGCG auf Phospholipide in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	86
Abbildung 20:	Effekte von Am80 und EGCG auf Triglycerid- und Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	87
Abbildung 21:	Effekte von Gemfibrozil auf Triglycerid-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	91
Abbildung 22:	Effekte von Gemfibrozil auf Carnitin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	93
Abbildung 23:	Effekte von Gemfibrozil auf Phosphatidylcholin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	95
Abbildung 24:	Effekte von Gemfibrozil auf Phosphatidylcholin-Plasmalogenspezies in SH-SY5Y WT-, HEK WT- und Calu-3 WT-Zellen.....	96
Abbildung 25:	Effekte von Gemfibrozil auf Lyso-Phosphatidylcholinspezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	97
Abbildung 26:	Effekte von Gemfibrozil auf Sphingomyelin-Spezies in SH-SY5Y Wt-, HEK Wt- und Calu-3 Wt-Zellen.....	98
Abbildung 27:	Schematischer Ablauf zur Untersuchung des transkriptionellen Effektes von Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf SH-SY5Y-, Hep-G2- und Calu-3-Zellen. MTX: Methylxanthin. Abbildung abgeändert nach [125].	101

Abbildung 28:	Auswahl der <i>housekeeping</i> -Gene zur Normalisierung in SH-SY5Y-Zellen.	105
Abbildung 29:	Auswahl der <i>housekeeping</i> -Gene zur Normalisierung in Calu-3-Zellen.	107
Abbildung 30:	Auswahl der <i>housekeeping</i> -Gene zur Normalisierung in Hep-G2-Zellen.	108
Abbildung 31:	Transkriptioneller Einfluss von Koffein, Theophyllin, Pentoxifyllin, Theobromin und Propentofyllin in SH-SY5Y-Zellen.	111
Abbildung 32:	Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf oxidativen Stress von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen.	114
Abbildung 33:	Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf Lipid- und Energiemetabolismus von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen.	114
Abbildung 34:	Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf Signaltransduktion und Genexpression von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen.	115
Abbildung 35:	Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf A β - und Taupathologie und Inflammation von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen.	115
Abbildung 36:	Vergleich der transkriptionellen Effekte in Bezug auf neuronale Gene von Koffein (K), Pentoxifyllin (P), Propentofyllin (PF), Theobromin (TB) und Theophyllin (TP) in SH-SY5Y-Zellen.	116
Abbildung 37:	Ladungsplots der Gene, die für die Hauptkomponenten der jeweiligen Stoffwechsel in Frage kommen.	117
Abbildung 38:	Analyse der Methylxanthin-vermittelten Transkriptionseffekte in SH-SY5Y, Hep-G2 und Calu-3-Zellen.	118
Abbildung 39:	Analyse der dosisabhängigen Effekte einzelner Methylxanthine.	120
Abbildung 40:	Schnittstellen der Phospholipasen.	124
Abbildung 41:	schematische Zusammenfassung des Einflusses des <i>ADAM10</i> -Knockouts auf die Lipidhomöostase in HEK-Zellen.	134
Abbildung 42:	Darstellung der chemischen Strukturen der in der vorliegenden Arbeit analysierten Methylxanthine.	155
Abbildung 43:	schematische Zusammenfassung der signifikant veränderten AD-relevanten Gene durch Methylxanthine.	158

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.	26
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.....	27
Tabelle 3:	Geräte und Zubehör, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.	28
Tabelle 4:	Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Zelllinien.....	29
Tabelle 5:	Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Substanzen.....	30
Tabelle 6:	Übersicht, über die in dieser Arbeit genutzten Antikörper.	30
Tabelle 7:	Übersicht, über die in dieser Arbeit zur Verwendung gekommenen kommerziellen Kits.	30
Tabelle 8:	Übersicht, über das in dieser Arbeit genutzte Plasmid.	31
Tabelle 9:	Verwendete Oligonukleotide zur Deletion von ADAM10 mittels CRISPR/Cas9-Methode.	31
Tabelle 10:	LB-Agarplatten für Bakterien.....	33
Tabelle 11:	LB-Medium für DH5 α -Zellen.	33
Tabelle 12:	Zusammensetzung des TFB1-Puffers.	33
Tabelle 13:	Zusammensetzung des TFB2-Puffers.	33
Tabelle 14:	Ansatz für die cDNS-Synthese.	36
Tabelle 15:	Zykler-Programm für die cDNS-Synthese.....	36
Tabelle 16:	PCR-Reaktionsansatz für Kolonie-PCR.....	37
Tabelle 17:	PCR-Programm für Kolonie-PCR.	37
Tabelle 18:	Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.	37
Tabelle 19:	Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme.....	37
Tabelle 20:	Ligationsansatz mit Fast-Link DNA Ligation Kit, Epicentre.....	38
Tabelle 21:	Zusammensetzung des TAE-Puffers (50-fach konzentriert) für die Agarose-Gelelektrophorese.....	39
Tabelle 22:	Guide-Sequenz zur Deletion von humanem <i>ADAM10</i>	40
Tabelle 23:	Reaktionsansatz für Annealing und Phosphorylierung des gRNS-Inserts.	40
Tabelle 24:	Temperaturprogramm für Annealing und Phosphorylierung des gRNS-Inserts.....	41
Tabelle 25:	Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Primer.	42
Tabelle 26:	Bestandteile der jeweiligen Zellkulturmedien.....	45
Tabelle 27:	Bestandteile des Einfriermediums.	46
Tabelle 28:	Volumina und DNS-Mengen für die Transfektion.	47
Tabelle 29:	Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit genutzten Substanzen, ihre finalen Konzentrationen und ihre entsprechenden Lösungsmittel.	49
Tabelle 30:	Bestandteile von 1xPBS.....	49
Tabelle 31:	Inhalt des Standard-Lysepuffers.	50
Tabelle 32:	Bestandteile des 3x Protein-Probenpuffers.	51
Tabelle 33:	Bestandteile des Laufpuffers für SDS-PAGE.	51
Tabelle 34:	Bestandteile des Transferpuffers.	52
Tabelle 35:	Übersicht über Blockier- und Inkubationsbedingungen zum Nachweis von sAPP α	53

Tabelle 36:	In der vorliegenden Arbeit genutzte Lipidstandards.	57
Tabelle 37:	spezifische Parameter, die im Rahmen der MRM-Analyse verwendet wurden.....	58
Tabelle 38:	Auflistung aller 83 analysierten Gene und ihre Zugehörigkeit zum entsprechenden Stoffwechselweg.	102

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich zur Fertigstellung dieser langwierigen Promotion unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm für die Überlassung dieses Themas und die allzeit freundliche und aufgeschlossene Unterstützung bedanken. Deine offene Tür und die permanente Anregung zur Diskussion und zum kritischen Hinterfragen haben die Erstellung dieser Arbeit vorangetrieben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Heike Grimm für die Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich hiermit bei Anna A. Lauer für alles bedanken. Ohne deine Unterstützung, experimentelle Hilfe und dein offenes Ohr über laborspezifische Fragen hinausgehend, wäre die Fertigstellung dieser Arbeit undenkbar gewesen. Vielen Dank für die geduldige Einarbeitung im Labor und die Erkenntnis, dass man als Team Vieles erreichen kann. Es tut gut, darüber hinaus in dir eine gute Freundin gefunden zu haben.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Daniel Janitschke. Deine Geduld und Ruhe bei meinen regelmäßigen Fragen, deine Hilfe bei der statistischen Auswertung jeglicher Daten zu jeder Tages- und Nachtzeit und die guten Gespräche und Anregungen haben mir in der gesamten Zeit enorm geholfen. Ich konnte durch dich sehr viel dazu lernen!

In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei Frau Britta Krauß, Apothekerin der Kronen-Apotheke, in Limbach-Oberfrohna, für die freundliche Bereitstellung von Gevilon 600 mg bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen guten Freund*innen bedanken, die mich nicht nur während der Zeit im Labor, sondern auch in allen anderen Lebenslagen unterstützen. Ein besonderes Dankeschön geht an Joschi für dieses unvergessliche Doktorarbeits-Camp und das Teilen des gemeinsamen Leidens. Das hat alles deutlich erträglicher gemacht. Max Cierpka möchte ich hierbei auch meinen Dank für das sorgfältige Korrekturlesen aussprechen! Dafür ein dickes, saarländisches Mersi!

Bei meiner Freundin Anna möchte ich mich für die permanente und uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Es tut gut mit dir zusammen zu sein!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Sowohl eure uneingeschränkte Unterstützung als auch die intensiven Gespräche zu jeder Zeit und eure positive Einstellung durchs Leben zu gehen beeindruckt mich sehr.

Vielen Dank!

12 Lebenslauf

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