

Aus dem Bereich der Experimentellen Neurologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
Homburg (Saar)

**Der Einfluss von Aspartam und Aspartam-Metaboliten auf
zellulären oxidativen Stress, Mitochondrien und die Lipidhomöostase
von SH-SY5Y-Zellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2024

vorgelegt von Lea Victoria Griebisch
geboren am 31. August 1998 in Böblingen

Tag der Promotion: 03. Juli 2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig
Berichterstatter: Prof. Dr. Marcus Grimm
Prof. Dr. Letizia Prates Roma
Prof. Dr. Christine von Arnim

In Liebe und Dankbarkeit.
Für Maren, Jürgen und Ben.

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

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

Die im Ergebnis-Teil aufgeführten Kooperationstabellen geben alle in die jeweiligen Experimente involvierte Personen an. Die Kooperation erfolgte unentgeltlich.

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

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

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

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Homburg,

Lea V. Griebisch

1. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	1
1.1. EINFLUSS VON ASPARTAM UND ASPARTAM-METABOLITEN AUF ZELLULÄREN OXIDATIVEN STRESS, MITOCHONDRIEN UND DIE LIPIDHOMÖOSTASE VON SH-SY5Y-ZELLEN.....	1
1.2. INFLUENCE OF ASPARTAME AND ASPARTAME METABOLITES ON CELLULAR OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIA AND LIPID HOMEOSTASIS OF SH-SY5Y CELLS	3
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. DIE ALZHEIMER-KRANKHEIT	5
2.1.1. KLINISCHE ASPEKTE DER ALZHEIMER-KRANKHEIT	6
2.1.2. EINTEILUNG DER ALZHEIMER-KRANKHEIT.....	7
2.1.3. MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER ALZHEIMER-KRANKHEIT	9
2.1.3.1. Akkumulation von $A\beta$	9
2.1.3.2. Tau-Pathologie.....	11
2.2. REAKTIVE OXIDATIVE SPEZIES	12
2.3. ZUCKER UND SÜBSTOFFE.....	14
2.4. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	17
3. MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1. MATERIALIEN.....	18
3.1.1. MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	18
3.1.2. GERÄTE.....	21
3.1.3. ZELLLINIE	22
3.2. METHODEN	23
3.2.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	23
3.2.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	23
3.2.1.2. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	24
3.2.1.3. Auftauen eukaryotischer Zellen.....	24
3.2.1.4. Inkubation eukaryotischer Zellen	25
3.2.1.4.1. Inkubation von Zellen mit Aspartam und Aspartam-Metaboliten.....	25
3.2.1.5. Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH-Assay	26
3.2.1.6. Bestimmung der Intaktheit von Zellmembranen mittels PI-Assay.....	27
3.2.1.7. Messung zellulären oxidativen Stress mittels APF-Assay	28
3.2.2. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	30
3.2.2.1. Verarbeitung der inkubierten Zellen und des Nährmediums.....	30
3.2.2.2. Herstellung von Zelllysaten.....	30
3.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	30
3.2.3. LIPIDANALYTISCHE METHODEN.....	32
3.2.3.1. Messung des Cardiolipin-Gehalts mittels Cardiolipin-Assay.....	32
3.2.3.2. Lipidextraktion aus Zelllysaten	32
3.2.3.3. Massenspektrometrische Messungen.....	34
3.2.3.3.1. Detektion von Phosphatidylcholin-Spezies	38
3.2.3.3.2. Detektion von Phosphatidylethanolamin-Spezies	39
3.2.3.3.3. Detektion von Carnitin Spezies	40
3.2.3.3.4. Detektion von Triacylglycerid Spezies.....	41
3.2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	42
3.2.4.1. Isolation von RNA.....	42
3.2.4.2. Messung von RNA-Konzentrationen	43
3.2.4.3. Synthese von cDNA	43

3.2.4.4.	Polymerase Kettenreaktion.....	44
3.2.5.	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE METHODEN.....	46
3.2.5.1.	<i>Lipid Droplet</i> -Mikroskopie.....	46
3.2.5.2.	Ausmessung von <i>Lipid Droplets</i> und Mitochondrien.....	46
3.2.6.	STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	48
3.2.6.1.	Auswertung der lipidanalytischen Daten der Massenspektrometrie	48
3.2.6.2.	Darstellung der Daten.....	49
4.	<u>ERGEBNISSE.....</u>	50
4.1.	EINFLUSS VON ASPARTAM UND SEINEN METABOLITEN AUF ZELLORGANELLEN.....	52
4.1.1.	UNTERSUCHUNG DER <i>LIPID DROPLETS</i>	52
4.1.2.	UNTERSUCHUNG DER MITOCHONDRIEN.....	54
4.2.	EINFLUSS VON ASPARTAM UND SEINEN METABOLITEN AUF DIE MITOCHONDRIALE INTEGRITÄT	56
4.2.1.	UNTERSUCHUNG DES CARDIOLIPIN-LEVELS	59
4.2.2.	UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION VON MITOCHONDRIEN-ASSOZIIERTEN PROTEINEN ...	60
4.3.	EINFLUSS VON ASPARTAM UND SEINEN METABOLITEN AUF OXIDATIVEN STRESS.....	61
4.3.1.	UNTERSUCHUNG DER APF-FLUORESZENZ.....	61
4.3.2.	UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION ROS-ASSOZIIERTER ENZYME	62
4.4.	EINFLUSS VON ASPARTAM UND SEINEN METABOLITEN AUF DIE LIPIDHOMÖOSTASE	64
4.4.1.	UNTERSUCHUNG DER TRIACYLGLYCERID-SPEZIES	64
4.4.2.	UNTERSUCHUNG DER PHOSPHOLIPID-SPEZIES	68
4.4.2.1.	Phosphatidylcholin diacyl (acylacyl).....	70
4.4.2.2.	Phosphatidylethanolamin diacyl (acylacyl).....	73
4.4.3.	UNTERSUCHUNG DER CARNITIN-SPEZIES	76
4.4.4.	VERGLEICH DER LIPID-SUBSPEZIES.....	80
5.	<u>DISKUSSION.....</u>	81
5.1.	ASPARTAM IM AKTUELLEN KONTEXT	81
5.2.	KANZEROGENITÄT UND ZYTOTOXIZITÄT VON ASPARTAM.....	82
5.3.	METABOLISCHE UND (NEURO)ENDOKRINE EFFEKTE VON ASPARTAM.....	83
5.4.	EFFEKTE VON ASPARTAM AUF DAS GEHIRN	85
5.4.1.	ERZEUGUNG OXIDATIVEN STRESSES	86
5.4.2.	MITOCHONDRIALER INTEGRITÄTSVERLUST.....	88
5.4.3.	MITOPHAGIE UND <i>MITOCHONDRIAL FISSION</i>	89
5.4.4.	LIPIDHOMÖOSTASE	90
5.4.4.1.	<i>Lipid Droplets</i> , Triacylglyceride und Phospholipide.....	90
5.4.4.2.	Carnitin-Spezies.....	92
5.5.	EINORDNUNG	93
5.5.1.	ASPARTAM-KONSUM <i>IN VIVO</i> : RELEVANZ DER <i>GUT</i> - UND <i>BLOOD-BRAIN-BARRIER</i>	93
5.5.2.	EINORDNUNG DER STUDIE ANHAND DES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN DER ALZHEIMER-KRANKHEIT UND DIABETES MELLITUS	95
5.5.3.	FAZIT.....	99
6.	<u>PUBLIKATIONSLISTE.....</u>	100
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101
8.	<u>DANKSAGUNG</u>	124
9.	<u>LEBENS LAUF.....</u>	125

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
%	Prozent
‰	Promille
α CTF	Engl.: <i>α-cleaved C-terminal Fragment</i> = α -gespaltenes C-terminales Fragment
Abb.	Abbildung
ACE	Engl.: <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> = Angiotensin-konvertierendes Enzym
AD	Engl.: <i>Alzheimer's Disease</i> = Alzheimer-Krankheit
ADAM	Engl.: <i>A Disintegrin and Metalloprotease</i> = Eine Disintegrin und Metalloprotease
AG	Arbeitsgruppe
AICD	Engl.: <i>APP Intracellular Domain</i> = Intrazelluläre APP-Domäne
ANOVA	Engl.: <i>Analysis of Variance</i> = Varianzanalyse
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Engl.: <i>Amyloid Precursor Protein</i> = Amyloid-Vorläuferprotein
APF	Engl.: <i>Aminophenylfluorescein</i> = Aminophenylfluoreszein
ARE	Engl.: <i>Antioxidant Responsive Element</i> = Antioxidativ wirksames Element
AS	Aminosäure
A β	Amyloid- β
BACE1	Engl.: <i>β-site APP Cleaving Enzyme 1</i> = β -Sekretase 1
BCA	Engl.: <i>Bicinchoninic Acid</i> = Bicinchoninsäure
BSA	Engl.: <i>Bovine Serum Albumin</i> = Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAA	Engl.: <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i> = Zerebrale Amyloid-Angiopathie
cDNA	Engl.: <i>Complementary DNA</i> = Komplementäre DNS
CE	Engl.: <i>Collision Energy</i> = Kollisionsenergie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cps	Engl.: <i>counts per second</i> = Zählungen pro Sekunde
Ctrl.	Engl.: <i>Control</i> = Kontrolle
CUR	Engl.: <i>Curtain Gas</i> = Vorhanggasstrom
CuSO ₄	Kupfersulfat

CXP	Engl.: <i>Collision Cell Exit Potential</i> = Kollisionszellenausgangspotential
Da	Dalton
DALYs	Engl.: <i>Disability Adjusted Life Years</i> = "behinderungsbereinigte" Lebensjahre
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
DMEM®	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl.: <i>Deoxyribonucleid Acid</i> = Desoxyribonukleinsäure, DNS
dNTP	Engl.: <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> = Desoxynukleotidtriphosphat
DP	Engl.: <i>Declustering Potential</i> = Entladungspotenzial
EFSA	Engl.: <i>European Food Safety Authority</i> = Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELISA	Engl.: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Engl.	Englisch
EOAD	Engl.: <i>Early Onset Alzheimer's Disease</i> = Früh einsetzende Alzheimer-Krankheit
EP	Engl.: <i>Entrance Potential</i> = Eintrittspotential
ESI	Engl.: <i>Electrospray Ionization</i> = Elektrospray-Ionisation
Et al.	Lat.: <i>Et alia</i> = Und andere
FAD	Engl.: <i>Familial Alzheimer's Disease</i> = Familiäre Alzheimer-Erkrankung
FCS	Engl.: <i>Fetal Calf Serum</i> = Fetales Kälberserum
FDA	Engl.: <i>U.S. Food and Drug Administration</i> = US-amerikanische Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln
FIS	Engl.: <i>Mitochondrial Fission 1 Protein</i>
GIP	Engl.: <i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i> = Gastroinhibitorisches Peptid
GLP-1	Engl.: <i>Glucagon-like Peptide 1</i> = Glucagon-ähnliches Peptid 1
GLUT	Engl.: <i>Glucose Transporter</i> = Glucosetransporter
GPCR	Engl.: <i>G-Protein Coupled Receptor</i> = G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GS1	Engl.: <i>Ion Source Gas 1</i> = Ionenquellen-Gas 1
GS2	Engl.: <i>Ion Source Gas 2</i> = Ionenquellen-Gas 2
h	Engl.: <i>Hours</i> = Stunden

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	Engl.: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> = Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HRP	Engl.: <i>Horseradish Peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IDE	Engl.: <i>Insulin Degrading Enzyme</i> = Insulindegradierendes Enzym
IGF	Engl.: <i>Insulin-like Growth Factor</i> = Insulinartiger Wachstumsfaktor
IHE	Engl.: <i>Interface Heater</i> = Schnittstellenheizer
IMM	Engl.: <i>Inner Mitochondrial Membrane</i> = Innere Mitochondrienmembran
IMS	Engl.: <i>Intermembrane Space</i> = Intermembranraum
Inh.	Inhibitor
Insb.	Insbesondere
IS	Engl.: <i>Ion Spray</i> = Ionensprüngerät
KCl	Kaliumchlorid
KD	Engl.: <i>Knockdown</i> = Ausschaltung
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Kontr.	Kontrolle
LCFAs	Engl.: <i>Long Chain Fatty Acids</i> = Langkettige Fettsäuren
LCIS	Engl.: <i>Life Cell Imaging Solution</i> = Lösung für die Bildgebung lebender Zellen
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Engl.: <i>Low Density Lipoprotein</i> = Lipoprotein niedriger Dichte
LOAD	Engl.: <i>Late Onset Alzheimer's Disease</i> = Spät einsetzende Alzheimer-Krankheit
LTD	Engl.: <i>Long Time Depression</i> = Langzeitdepression
Lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholin
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampère
Männl.	Männlich
MAP	Engl.: <i>Microtubule Associated Protein</i> = Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MCFAs	Engl.: <i>Medium Chain Fatty Acids</i> = Mittelkettige Fettsäuren
MCI	Engl.: <i>Mild Cognitive Impairment</i> = Leichte kognitive Störung

MEM	Engl.: <i>Minimum Essential Medium</i> = Mindestessenzmedium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mM	Millimolar
MMP	Engl.: <i>Matrix Metalloproteinase</i> = Matrix-Metalloproteinase
MRM	Engl.: <i>Multireaction Monitoring</i> = Mehrreaktionsüberwachung
mRNA	Engl.: <i>Messenger RNA</i> = Boten-Ribonukleinsäure
n.s.	Engl.: <i>not significant</i> = Nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Engl.: <i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i> = Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NaOH	Natriumhydroxid
NCDs	Engl.: <i>Non-communicable Diseases</i> = Nichtübertragbare Erkrankungen
NEP	Neprilysin
NFTs	Engl.: <i>Neurofibrillary Tangles</i> = Neurofibrilläre Tangles
NIA-AA	Engl.: <i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i> = Nationales Institut für Altersfragen und Alzheimer-Vereinigung
NICD	Engl.: <i>Notch Intracellular Domain</i> = Notch intrazelluläre Domäne
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nM	Nanomolar
NNS	Engl.: <i>Non-nutritive Sweeteners</i> = Süßstoffe
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OMM	Engl.: <i>Outer Mitochondrial Membrane</i> = Äußere Mitochondrienmembran
OXPHOS	Engl.: <i>Oxidative Phosphorylation</i> = Oxidative Phosphorylierung
PBS	Engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung

PC	Phosphatidylcholin
PC aa	Diacyl-Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE aa	Diacyl-Phosphatidylethanolamin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Lat.: <i>Pondus Hydrogenii</i> = Potential des Wasserstoffs
PHFs	Engl.: <i>Paired Helical Filaments</i> = Gepaarte, schraubenförmige Filamente
PINK1	Engl.: <i>PTEN-induced Putative Kinase</i>
PITC	Phenylisothiocyanat
PLA ₂	Phospholipase A2
PPARs	Engl.: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i> = Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PSEN	Presenilin
psi	Engl.: <i>pound-force per square inch</i> = Pfund pro Quadratzoll
PUFAs	Engl.: <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> = Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
qRT-PCR	Engl.: <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> = Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RCT	Engl.: <i>Randomized Controlled Trial</i> = Randomisiert-kontrollierte Studie
RNA	Engl.: <i>Ribonucleic Acid</i> = Ribonukleinsäure, RNS
ROB	Engl.: <i>Risk of Bias</i> = Risiko der Voreingenommenheit
ROS	Engl.: <i>Reactive Oxygen Species</i> = Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Engl.: <i>Revolutions per Minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sAPP α	Engl.: <i>Soluble α-secreted APP</i> = lösliches α -sezerniertes APP
sAPP β	Engl.: <i>Soluble β-secreted APP</i> = lösliches β -sezerniertes APP
sec	Engl.: <i>Second</i> = Sekunde
Sek	Sekunde
SNP	Engl.: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> = Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOD1	Engl.: <i>Superoxide Dismutase 1</i> = Superoxiddismutase 1
SOD2	Engl.: <i>Superoxide Dismutase 2</i> = Superoxiddismutase 2
SPT	Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase
Stabw	Standardabweichung
Std	Stunde
Tab	Tabelle
Temp	Temperatur
u.a.	unter anderem

V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Engl.: <i>Volume to Volume</i> Volumen-zu-Volumen
W	Watt
w/v	Engl.: <i>Weight to Volume</i> Gewicht-zu-Volumen
Weibl.	Weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien.....	18
Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	21
Tabelle 3: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums.....	24
Tabelle 4: Übersicht über inkubierte Substanzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit.....	26
Tabelle 5: Eingesetzte Lipidstandards für massenspektrometrische Lipiddetektion.....	33
Tabelle 6: Einstellung von Parametern des Agilent 1200 <i>Autosamplers</i>	36
Tabelle 7: Einstellung von Parametern des 4000 QTRAP-Massenspektrometers bei der Detektion von Diacyl-Phosphatidylcholin -, Carnitin- und Triacylglycerid-Spezies.....	36
Tabelle 8: Einstellung von Parametern des 4000 QTRAP-Massenspektrometers bei der Detektion von Phosphatidylethanolamin-Spezies.....	37
Tabelle 9: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Diacyl-Phosphatidylcholin-Spezies im Rahmen des MRM.....	38
Tabelle 10: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Diacyl-Phosphatidylethanolamin-Spezies im Rahmen des MRM.....	39
Tabelle 11: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Carnitin-Spezies im Rahmen des MRM.....	40
Tabelle 12: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Triacylglycerid-Spezies im Rahmen des MRM.....	41
Tabelle 13: Bestandteile und eingesetzte Volumina des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Thermo Fisher Scientific.....	44
Tabelle 14: Durchlaufene Temperaturstufen des <i>Thermocycler</i> -Programms.....	44
Tabelle 15: Amplifikationszyklus einer Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	45
Tabelle 16: Primer-Sequenzen der in der RT-qPCR analysierten Gene.....	45
Tabelle 17: Kooperationen im Rahmen der Elektronenmikroskopie-Bilder.....	52
Tabelle 18: Kooperationen im Rahmen der Untersuchung der mitochondrialen Integrität.....	59
Tabelle 19: Kooperationen im Rahmen der Untersuchung der Lipidhomöostase.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenfassende graphische Darstellung der in der Forschungsarbeit gewonnenen Ergebnisse.	2
Abbildung 2: Summarizing graphical presentation of results obtained in the research work.	4
Abbildung 3: Strukturformel von Aspartam.	16
Abbildung 4: Durch das Enzym <i>Laktatdehydrogenase</i> (LDH) katalysierte Reaktionen.	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des APF-Assays.	28
Abbildung 6: Lambert-Beersches Gesetz.	43
Abbildung 7: Schematische und vereinfachte graphische Darstellung des Aspartam-Metabolismus... ..	50
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus eines <i>Lipid Droplets</i>	53
Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von <i>Lipid Droplets</i> in Kontroll- und Aspartam-Proben.	53
Abbildung 10: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von <i>Lipid Droplets</i> in Kontroll- und Metabolite-Proben.....	54
Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von Mitochondrien in Kontroll- und Aspartam-Proben.....	55
Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von Mitochondrien in Kontroll- und Metabolite-Proben.	55
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus von Cardiolipin.....	56
Abbildung 14: Fluoreszenzbasierte Bestimmung des zellulären Cardiolipin-Levels nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.	59
Abbildung 15: Mittels rtPCR gemessene Genexpression von PINK1 nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.	60
Abbildung 16: Mittels rtPCR gemessene Genexpression von FIS1 nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.	60
Abbildung 17: Fluoreszenzbasierte Bestimmung der zellulären APF-Levels nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.....	61
Abbildung 18: Schematische Darstellung der durch die <i>Superoxiddismutasen</i> katalysierte Reaktion. Angelehnt an (HEINRICH et al., 2022g).....	62
Abbildung 19: Mittels rtPCR gemessene Genexpression der Enzyme <i>Superoxiddismutase 1</i> (SOD1) und <i>Superoxiddismutase 2</i> (SOD2) nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.....	62
Abbildung 20: Mittels rtPCR gemessene Genexpression des Enzyms <i>Superoxiddismutase 1</i> (SOD1) nach Inkubation mit Aspartam in verschiedenen Konzentrationen.	63
Abbildung 21: Schematischer Aufbau eines Triacylglycerids.....	65
Abbildung 22: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Subspezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.....	65
Abbildung 23: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	66
Abbildung 24: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	67
Abbildung 25: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	68
Abbildung 26: Schematischer Aufbau eines Phospholipids. Exemplarisch dargestellt anhand eines Phosphoglycerids.	69
Abbildung 27: Schematischer Aufbau einer Lipiddoppelschicht.	69

Abbildung 28: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	70
Abbildung 29: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	71
Abbildung 30: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	72
Abbildung 31: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	72
Abbildung 32: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Subspezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	73
Abbildung 33: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	74
Abbildung 34: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	74
Abbildung 35: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	75
Abbildung 36: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	77
Abbildung 37: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	78
Abbildung 38: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	78
Abbildung 39: Massenspektrometrische <i>Lipidomics</i> -Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.	79
Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Lipid-Subspezies nach Inkubation mit Aspartam-Metaboliten bzw. mit Aspartam.	80
Abbildung 41: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Lipid-Subspezies nach Inkubation mit Aspartam-Metaboliten bzw. mit Aspartam.	80
Abbildung 42: Zusammenfassende Darstellung pathophysiologischer Gemeinsamkeiten bei Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus.	99

1. Zusammenfassung/ Summary

1.1. Einfluss von Aspartam und Aspartam-Metaboliten auf zellulären oxidativen Stress, Mitochondrien und die Lipidhomöostase von SH-SY5Y-Zellen

In den vergangenen Jahrzehnten ließ sich ein weltweiter Anstieg von Übergewicht sowie metabolischen Erkrankungen wie Adipositas (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021; INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2019; ARROYO-JOHNSON, MINCEY, 2016) und Diabetes mellitus Typ 2 (REED et al., 2021; GUARIGUATA et al., 2014) verzeichnen. Diese sogenannten Wohlstandserkrankungen werden insbesondere mit den veränderten Lebensbedingungen in Verbindung gebracht, welche neben zu wenig körperlicher Bewegung durch den Konsum einer hochkalorischen und kohlenhydratreichen Nahrung inklusive vieler kurzkettiger Zucker gekennzeichnet ist (CLEMENTE-SUAREZ et al., 2023; KOPP, 2019).

Seit einigen Jahren entwickelt sich ein zunehmendes Interesse an „alternativen“, kalorienarmen Nahrungszusätzen, mit welchen der Einsatz hochkalorische Zucker reduziert werden kann – Tendenz steigend (WALBOLT, KOH, 2020; MALEK et al., 2018; SYLVETSKY, ROTHER, 2016; SYLVETSKY et al., 2012). Hierzu zählt unter anderem auch der Süßstoff Aspartam, der mit seiner hohen Süßkraft in zahlreichen Lebensmitteln verwendet wird (SCHORB et al., 2023). Bis heute wird sein Einsatz aufgrund einer uneindeutigen Studienlagen bezüglich potentieller gesundheitlicher Auswirkungen kontrovers diskutiert (CZARNECKA et al., 2021). Von der *Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit* (EFSA) wird für die Allgemeinbevölkerung eine tägliche Aufnahme von maximal 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht empfohlen (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2013). Es existieren Studien, welche Aspartam mit einem potentiell erhöhten Krebsrisiko assoziieren (SHAHER et al., 2023) oder – insbesondere in murinen Modellen – mit dem Auslösen von oxidativem Stress in Verbindung bringen (ASHOK et al., 2015; IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012).

Bezüglich der Fragestellung, wie sich Aspartam auf die zelluläre Lipidhomöostase im Gehirn auswirkt, liegen zum aktuellen Zeitpunkt unzureichende Daten vor. Lipide spielen eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Pathogenese verschiedenster Krankheiten (HEEREN, SCHEJA, 2021; MICHOS et al., 2019) so auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz (KAO et al., 2020). Die vorliegende Arbeit wird die Auswirkungen von Aspartam auf die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y *WT* unter Betrachtung von Parametern des oxidativen Stresses und der Lipidhomöostase thematisieren. Aspartam wird nach seiner oralen Aufnahme im Gastrointestinaltrakt in seine drei Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol gespalten (SHAHER et al., 2023; RANNEY et al., 1976).

In verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Analysen ließ sich zeigen, dass sowohl die Behandlung der Zellen mit dem Molekül Aspartam als auch die gemeinsame Behandlung mit seinen drei Metaboliten zu signifikant vermehrtem oxidativem Stress im Vergleich zu den Kontroll-Zellen führte. Dies ließ sich an erhöhten Levels von APF-Fluoreszenz und hochregulierter Expression der antioxidativ wirkenden *Superoxiddismutasen* SOD1 und SOD2 erkennen. Zudem ließ sich in der

Elektronenmikroskopie ein Integritätsverlust der Mitochondrien feststellen. Dieser wurde von in Zellysaten erniedrigtem Cardiolipin-Level, sowie einer gestiegenen Expression der pro-mitophagischen und Fissions-induzierenden Proteine PINK1 und FIS1 begleitet. Die massenspektrometrische Analyse verschiedener Lipid-Spezies ergab eine signifikante Erhöhung der Triacylglycerid-, sowie von Phosphatidylcholin- und -ethanolamin-Spezies. Letztere gelten als die in mamillären Membranen anteilig am meisten vorkommenden Phospholipide. In der elektronenmikroskopischen Analyse ließ sich in den mit Aspartam oder Metaboliten inkubierten Präparaten zudem eine Akkumulation vergrößerter sogenannter *Lipid Droplets* (Lipidtröpfchen) erfassen.

Diese in der Zellkultur erhobenen Daten verdeutlichen die Relevanz der Durchführung weiterer Studien, die die Auswirkungen von Aspartam und seinen Metaboliten auf die zerebrale Lipidhomöostase *in vivo* erforschen.

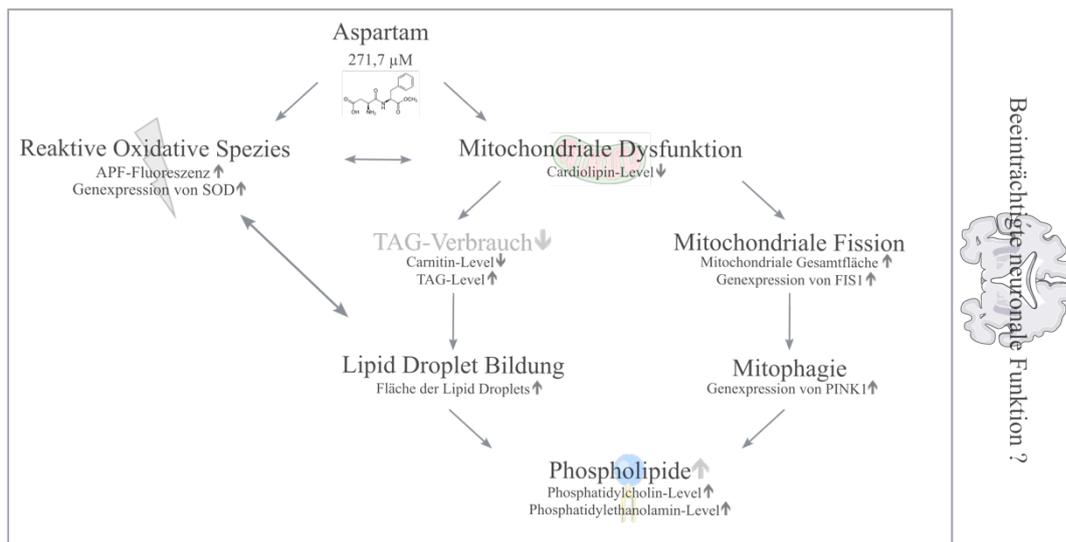


Abbildung 1: Zusammenfassende graphische Darstellung der in der Forschungsarbeit gewonnenen Ergebnisse.

Die Inkubation von SH-SY5Y Wildtyp-Zellen mit Aspartam in einer Molarität von 271,7 µM zeigte den Effekt einer Erhöhung reaktiver oxidativer Spezies (ROS). Dies ließ sich aus einer Verstärkung der APF-Fluoreszenz, sowie einer hochregulierten Genexpression der *Superoxiddismutasen* schlussfolgern. Des Weiteren ließ sich aus einem erniedrigten Cardiolipin-Level eine mitochondriale Dysfunktion ableiten. Diese lässt sich in Konsequenz mit einem einerseits erniedrigten TAG-Verbrauch mit vermehrter *Lipid Droplets*-Bildung und andererseits dem Prozess der Mitochondrialen Fission und Mitophagie in Einklang bringen. Diese Effekte ließen sich letztendlich als Grundlage für die Erhöhung der Phospholipid-Levels verstehen, die sich in der massenspektrometrischen Bestimmung von Phosphatidylcholin und -ethanolaminspezies zeigte.

1.2. Influence of aspartame and aspartame metabolites on cellular oxidative stress, mitochondria and lipid homeostasis of SH-SY5Y cells

Within the last decades there was observed a worldwide increase in overweight and metabolic diseases such as obesity (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021; INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2019; ARROYO-JOHNSON, MINCEY, 2016) and type 2 diabetes (REED et al., 2021; GUARIGUATA et al., 2014). These so called “lifestyle diseases” are particularly associated with a change in living conditions, being characterized by too little physical activity as well as a diet which is rich in calories, especially in carbohydrates including short-chain sugars (CLEMENTE-SUAREZ et al., 2023; KOPP, 2019).

Since some years, there has been an increasing interest in “alternative” low-calorie food additives in order to replace the high-caloric table sugar (WALBOLT, KOH, 2020; MALEK et al., 2018; SYLVETSKY, ROTHER, 2016; SYLVETSKY et al., 2012). Amongst those can be found the synthetic sweetener aspartame which has a high sweetening power and is used in numerous foods (SCHORB et al., 2023).

To the present day, its use is discussed controversially due to inconclusive studies regarding the potential health risks (CZARNECKA et al., 2021). The *European Food Safety Authority* (EFSA) recommends a maximum daily intake of 40 mg per kilogram of body weight for the general population (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2013). There exist several studies linking aspartame to a possibly increased risk of cancer (SHAHHER et al., 2023) or with triggering intracerebral oxidative stress in rodents (ASHOK et al., 2015; IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012). However, only little is known regarding the question how aspartame affects cellular lipid homeostasis in the brain. Lipids play a non-negligible role in the pathogenesis of different diseases (MICHOS et al., 2019; HEEREN, SCHEJA, 2021), including neurodegenerative diseases such as Alzheimer's dementia (KAO et al., 2020).

The present research work will address the effects of aspartame on the neuroblastoma cell line SH-SY5Y *WT* focusing at parameters of cellular oxidative stress and lipid homeostasis. Aspartame is cleaved into its three metabolites aspartic acid, phenylalanine and methanol in the gastrointestinal tract after its oral intake (SHAHHER et al., 2023; RANNEY et al., 1976).

Experimental analyses carried out in this research work showed that both, the treatment of cells with the aspartame molecule as well as the joint treatment with its three metabolites led to a significant increase in oxidative stress compared to control cells. This was evident from increased levels of APF fluorescence and upregulated expression of the antioxidative acting enzymes *superoxide dismutase* SOD1 and SOD2. In addition, electron microscopy revealed a loss of mitochondrial integrity. This was accompanied by a reduced cardiolipin level in cell lysates, as well as increased expression of the pro-mitophagic and fission-inducing proteins PINK1 and FIS1. Mass spectrometric analysis of various lipid species showed a significant increase in triacylglycerides and phosphatidylcholine- and ethanolamine. The latter are considered to be the most abundant phospholipids in mammalian cell membranes. The electron

microscopic analysis also revealed an accumulation of so-called lipid droplets in the preparations incubated with aspartame or its metabolites.

These obtained *in vitro* data highlight the relevance of conducting further studies *in vivo* in order to explore the effects of aspartame and its metabolites on cerebral lipid homeostasis.

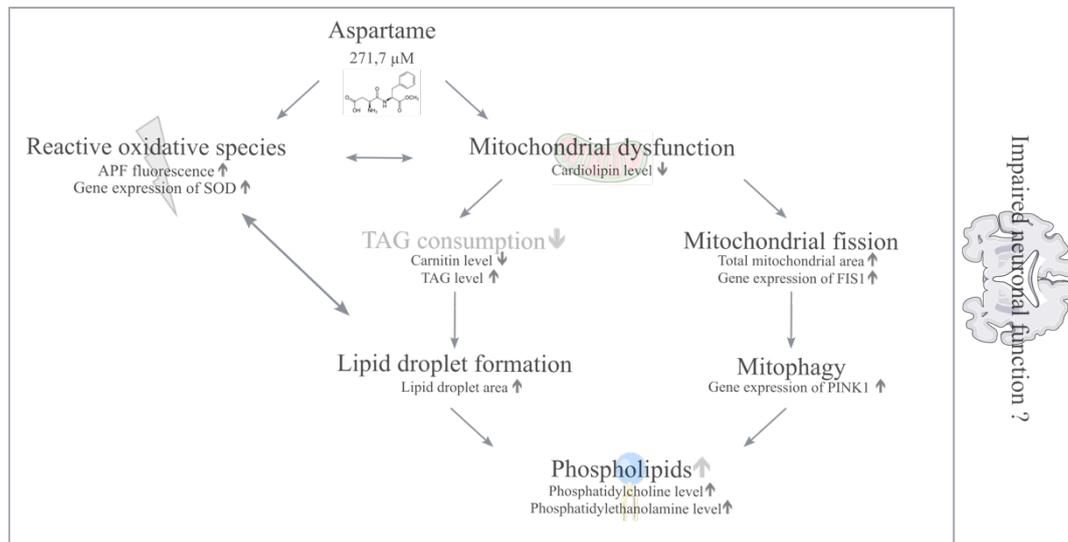


Abbildung 2: Summarizing graphical presentation of results obtained in the research work.

The incubation of SH-SY5Y wildtype cells with aspartame at a molarity of 271.7 μM resulted in elevated reactive oxidative species (ROS) which was concluded in increased APF fluorescence as well as an upregulated gene expression of *superoxidismutases*. Furthermore, mitochondrial dysfunction could be deduced from a decreased cardiolipin level. This can be reconciled with a reduced TAG consumption with increased *lipid droplet* formation on the one hand and the process of mitochondrial fission and mitophagy on the other hand. These effects could ultimately be understood as the basis for the increase in phospholipid levels, being shown in the mass spectrometric determination of phosphatidylcholine and -ethanolamine species.

2. Einleitung

2.1. Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (Engl.: *Alzheimer's Disease*, AD) gilt als die häufigste Form der Demenz und wird durch einen fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten gekennzeichnet (BREIJYEH, KARAMAN, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017).

Von den weltweit für das Jahr 2030 prognostizierten 75 Millionen Demenzkranken machen die von der Alzheimer-Krankheit betroffenen Patienten circa 65 Prozent aus (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017; RIZZI et al., 2014; VAN DER FLIER, SCHELTENS, 2005). Hieraus ergibt sich die sowohl medizinische als auch gesellschaftliche und ökonomische Relevanz der Erkrankung: Modellierungen schätzen die globalen Gesundheitsausgaben, welche auf Demenzerkrankungen zurückzuführen sind, für das Jahr 2019 auf 263 Milliarden US-Dollar; bis zum Jahr 2050 sollen diese bei 1,6 Billionen US-Dollar jährlich liegen (VELANDIA et al., 2022).

Erstmals beschrieben wurde die Alzheimer Demenz im Jahre 1906 durch den deutschen Neurologen und Psychiater Alois Alzheimer (CIPRIANI et al., 2011; ALZHEIMER, 1907). Dieser hatte über einen Zeitraum von viereinhalb Jahren den Fall seiner Patientin Auguste Deter verfolgt, die an einem zunehmenden Verlust der Gedächtnisleistung sowie ihrer kognitiven Fähigkeit litt und schließlich im Alter von 56 Jahren an den Folgen ihrer Erkrankung verstarb. In den *post mortem* durchgeführten Biopsien des Hirngewebes von Auguste Deter fielen dem Neuropathologen Alzheimer insbesondere im zerebralen Kortex eine makroskopisch erkennbare Atrophie sowie mikroskopisch sichtbare „Ablagerungen“ auf, die einige Jahrzehnte später als die β -Amyloidplaques bezeichnet werden sollten. Darüber hinaus beschrieb Alzheimer, dass „viele Gliazellen große Fettsäcke“ (ALZHEIMER, 1907) zeigen würden. Im Jahre 1910 wurde das durch Alzheimer beschriebene Krankheitsbild dann durch Emil Kraepelin als „Alzheimersche Krankheit“ bezeichnet (KRAEPELIN, 1913) und in den darauffolgenden Jahrzehnten weiter erforscht.

Heute ist die Pathophysiologie der Erkrankung weiter verstanden und es werden wesentliche Pathomechanismen beschrieben, die zur Manifestation der AD beitragen. Die zum aktuellen Zeitpunkt führenden Theorien sind zum einen die extrazelluläre Akkumulation von sogenannten β -Amyloidplaques ($A\beta$) und zum anderen die intrazelluläre Bildung von hyperphosphorylierten Zytoskelett-Aggregaten, sogenannten Neurofibrillären Tangles (Engl.: *Neurofibrillary Tangles*, NFTs) (BREIJYEH, KARAMAN, 2020; KHAN et al., 2020). Beide sollen in folgenden Kapiteln auch auf molekularer Ebene beschrieben werden.

Darüber hinaus werden weitere potentielle – zum Teil in Verbindung mit $A\beta$ und den NFTs stehende – Mechanismen benannt: Zu diesen zählen eine durch $A\beta$ und NFTs getriggerte Neuroinflammation inklusive der Aktivierung von Mikroglia (ONYANGO et al., 2021), mitochondrialer Dysfunktion und oxidativer Stress (WANG et al., 2014), als auch fehlerhafte Autophagie-Mechanismen (LEE et al., 2022; FUNDERBURK et al., 2010).

Auch eine Störung des Darmmikrobioms – insbesondere im Sinne einer reduzierten Diversität – wird diskutiert. Diese geht mit einer vermehrten Synthese proinflammatorischer Zytokine einher, welche über

die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen und dort die Pathogenese der AD begünstigen könnten (CHANDRA et al., 2023; CATTANEO et al., 2017). In letzlicher Konsequenz führen die beschriebenen pathomechanistischen Charakteristika mitunter zum Verlust von Synapsen und der Apoptose neuronaler Zellen. Dies zeigt sich insbesondere in Form einer Atrophie des, mit dem Lernen assoziierten Hippocampus, sowie der Kortexe von Temporal- und Frontallappen in Form von vergrößerten und atrophischen Gyri (SERRANO-POZO et al., 2011; GOMEZ-ISLA et al., 1996; SCHEFF, PRICE, 1993). Diagnostisch lässt sich dieser Effekt auch bildmorphologisch in CT- und MRT-Bildgebungen darstellen. Zudem lässt sich in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Fluor-18-Desoxyglucose in den Regionen des Temporal- und Parietallappens ein verminderter Glucose-Metabolismus erkennen (MARQUEZ, YASSA, 2019; CHETELAT, 2018).

2.1.1. Klinische Aspekte der Alzheimer-Krankheit

Klinisch präsentiert sich die Alzheimer-Krankheit als chronisch fortschreitende Erkrankung, die als Hauptcharakteristikum den Verlust kognitiver Fähigkeiten aufzeigt. Es lassen sich eine Früh- und Spätphase unterscheiden, welche insbesondere dadurch differenziert werden können, dass es bei ersterer zunächst zu Störungen des Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnisses kommt, während es in der Spätphase dann auch zum Verlust älterer Gedächtnisinhalte kommen kann.

In der Frühphase ist meist noch eine normale Bewältigung des Alltages möglich. Es entstehen Schwierigkeiten des Erinnerns kürzlich vergangener Ereignisse und gegebenenfalls ein sich veränderndes Sprachmuster im Sinne eines verallgemeinernden Wortschatzes. Darüber hinaus können sich beispielsweise auch Depressions- oder Angst-Symptome manifestieren.

Mit weiterem Fortschreiten – hin zur Spätphase der Erkrankung – zeigen die Patienten dann Schwierigkeiten, sich an Ereignisse aus der längeren Vergangenheit zu erinnern. Kognitiv zeigt sich zudem eine zunehmende Desorientiertheit zum Ort als auch zur Person, sowie im Sprachgebrauch auftretende Wortverwechslungen. An nicht-kognitiven Symptomen existiert ein breites Spektrum, zu welchem unter anderem ein gestörter Tag-/Nacht-Rhythmus mit Schlaflosigkeit oder Inkontinenz gehören. Auch können Wahnsymptome oder Halluzinationen auftreten (JUEBIN HUANG, 2023).

Für die klinische Diagnosestellung einer Demenz im Allgemeinen, und einer Alzheimer Demenz im Spezifischen, werden verschiedene Klassifikationssysteme verwendet. Im Folgenden soll dies anhand von Originalzitaten der Arbeitsgruppe des *National Institute on Aging und der Alzheimer's Association* (NIA-AA) geschehen, welche in der gemeinsamen S3-Leitlinie „Demenzen“ der *Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde* (DGPPN) in Kooperation mit der *Deutschen Gesellschaft für Neurologie* (DGN) aus dem Jahr 2016 verwendet wurden. Grundlage der klinischen Alzheimer-Diagnose bildet die Tatsache, dass bei dem jeweiligen Patienten die allgemeinen Demenzkriterien erfüllt werden. Diese umfassen „kognitive oder verhaltensbezogene Symptome, welche 1. das Funktionieren bei Alltagsaktivitäten beeinträchtigen [,] 2. eine Verschlechterung im Vergleich zu einem vorherigen Zustand darstellen [,] 3. nicht durch ein Delir oder eine psychische Erkrankung erklärbar sind [... und 4. ...] durch die Kombination aus Eigen-

und einer Fremdanamnese und objektiver Bewertung der kognitiven Leistung durch eine kognitive Testung oder eine klinisch- kognitive Untersuchung [...]“ festgestellt werden können. Zudem müssen mindestens zwei der fünf Bereiche „a. Gedächtnisfunktionen [,] b. Verstehen und Durchführung komplexer Aufgaben [oder] Urteilsfähigkeit [,] c. räumlich-visuelle Funktionen [,] d. Sprachfunktionen [oder] e. Veränderungen im Verhalten („Persönlichkeitsveränderungen“)“ vorliegen (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE (DGN), 2016). Sind diese Kriterien erfüllt, ist eine Demenz vom Alzheimer-Typ wahrscheinlich, wenn der „Symptombeginn über Monate bis Jahre [stattfind], [eine] eindeutige anamnestische oder beobachtete kognitive Verschlechterung [vorliegt und] erste und deutliche Symptome [...] sich entweder durch] Defizit[e] der episodischen Gedächtnisfunktion[en... oder ...] sprachbezogen[...], visuell-räumlich [...] oder] exekutiv[...] bestehen.“ (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE (DGN), 2016).

2.1.2. Einteilung der Alzheimer-Krankheit

Im Zuge der Diagnosestellung lässt sich die Alzheimer-Krankheit anhand ihres Manifestationsalters in eine frühe und späte Form unterteilen. Die frühe „*Early Onset Alzheimer's Disease*“ (EOAD) ist durch einen Erkrankungsbeginn vor dem 65. Lebensjahr gekennzeichnet und liegt je nach Quelle bei 5 – 10 % aller Alzheimer-Erkrankten vor (AYODELE et al., 2021; ZHU et al., 2015). Der verbleibende Anteil von circa 95 % der Erkrankten wird durch die späte „*Late Onset Alzheimer's Disease*“ (LOAD) gebildet, welche durch den Erkrankungsbeginn nach dem 65. Lebensjahr charakterisiert ist (BALIN, HUDSON, 2014).

Darüber hinaus kann anhand zugrundeliegender genetischer Ursachen definitorisch die seltenere, familiäre Alzheimer-Erkrankung (Engl.: *Familiar Alzheimer's Disease*, FAD) von der häufigeren, sporadischen Form (Engl.: *Sporadic Alzheimer's Disease*, SAD) differenziert werden (DORSZEWSKA et al., 2016, PIACERI et al., 2013). Die familiäre Form der AD macht je nach Quelle zwischen 1 – 25 % aller Alzheimer-Erkrankungen aus und ist durch einen frühen Erkrankungsbeginn vor dem 60. Lebensjahr gekennzeichnet (BIRD, 1993); es existieren also Überschneidungen mit der EOAD. Als ursächlich gelten bei der FAD Mutationen verschiedener Gene von welchen jene des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) (CHARTIER-HARLIN et al., 1991), *Presenilin 1* (PSEN1) (JANSSEN et al., 2001) und *Presenilin 2* (PSEN2) (EZQUERRA et al., 2003), die unter den zum aktuellen Zeitpunkt bekannten Mutationen, die am häufigsten vorkommenden sind. Ihre Transkriptions-Produkte sind in den molekularen Pathomechanismus der Erkrankung involviert (WU et al., 2012). Die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung ist durch ein späteres Manifestationsalter gekennzeichnet und lässt sich dementsprechend zu einem großen Teil der LOAD zuordnen.

In genomweiten Assoziationsstudien konnten bei dieser Form der AD als Risikofaktor eine bestimmte Genvariante des Apolipoproteins E (ApoE), das $\epsilon 4$ -Allel, ausgemacht werden (YANG et al., 2023; CORDER et al., 1993; KUUSISTO et al., 1994). Bei ApoE handelt es sich um das am häufigsten im Gehirn vorkommende Apolipoprotein, wo es für elementare Prozesse im Rahmen der Lipidhomöostase verantwortlich ist, indem es unter anderem den in Form von Lipoproteinen stattfindenden Transport von

Lipiden zwischen verschiedenen Geweben oder Zellen vermittelt (LIU et al., 2013; MAHLEY, RALL, 2000). Im Zentralen Nervensystem (ZNS) wird das Apolipoprotein E unter physiologischen Bedingungen in erster Linie durch Astrozyten sezerniert (CHEN et al., 2021; PITAS et al., 1987). Das ApoE-Gen befindet sich auf Chromosom 19, wo aufgrund eines dort bestehenden Polymorphismus eines von drei potentiellen Allelen schließlich für das ApoE codiert (BLOM et al., 2008; KEHOE et al., 1999). Die möglichen Allel-Varianten sind ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 oder ApoE- ϵ 4, woraus sich durch die Kombination der Allele beider elterlichen Chromosomen für jedes Individuum ein homozygoter (ApoE- ϵ 2/ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3/ApoE- ϵ 3, ApoE- ϵ 4/ApoE- ϵ 4) oder heterozygoter (ApoE- ϵ 2/ApoE- ϵ 3, ApoE- ϵ 2/ApoE- ϵ 4, ApoE- ϵ 3/ApoE- ϵ 4) Genotyp ergibt. Die hiervon ausgehend synthetisierten Proteine ApoE2, ApoE3 oder ApoE4 unterscheiden sich untereinander darin, welche Aminosäuren sich an den Stellen 122 und 158 befinden. Diese Unterschiede beeinflussen maßgeblich die Tertiärstruktur des Proteins und dementsprechend auch dessen Bindungsfähigkeit für verschiedene Lipide oder auch des Amyloids β (LIU et al., 2013; FRIEDEN, GARAI, 2012; CHEN et al., 2011). So wurden in einer großen Metaanalyse, welche Autopsie-Studien von noch nicht an Demenz erkrankten Probanden inkludierte, bei ApoE- ϵ 4-Trägern eine signifikant höhere Last an Amyloid β als bei ApoE- ϵ 2 -oder ApoE- ϵ 3-Trägern festgestellt (JANSEN et al., 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Apolipoprotein E4 im Vergleich zu den Isoformen ApoE2 und ApoE3 mit einer durchschnittlich 2,5-fach erhöhten Anfälligkeit sowie mit einer früheren klinischen Manifestation der AD assoziiert ist (LIU et al., 2013; FARRER et al., 1997; CORDER et al., 1993).

In epidemiologischen Untersuchungen wurden über das ApoE hinausgehende weitere nicht-genetische Risikofaktoren an einer Alzheimer Demenz zu erkranken, ausgemacht. Zu diesen zählt unter anderem auch eine Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 (Engl.: *Type 2 Diabetes*, T2D). In verschiedenen Erhebungen, inklusive daraus hervorgehender Metanalysen, konnte eine signifikante Korrelation zwischen einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 im mittleren Lebensalter und der späteren Manifestation einer Alzheimer Demenz festgestellt werden (HAMZE et al., 2022; MALIK et al., 2021; OTT et al., 1999). Dies soll in Kapitel 5.5.2 ausführlicher diskutiert werden. Seit circa zwei Jahrzehnten wird zudem eine solche, neben der peripher existierenden, explizit zerebral vorkommende Insulinresistenz im Zusammenhang mit AD diskutiert (NGUYEN et al., 2020). Im Jahr 2005 wurde diese durch Steen *et al.* als Diabetes mellitus Typ 3 bezeichnet, nachdem sie in postmortalen AD-Gehirnen eine verminderte Expression der Gene, die für den Insulin-Rezeptor (IR) und *Insulin-Like Growth-Factor*-Rezeptor (IGF1-R) kodieren, nachweisen konnten (STEEN et al., 2005).

2.1.3. Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit

Molekulare Grundlage der Alzheimer-bedingten Neurodegeneration bilden nach heutigem Verständnis insbesondere die extrazelluläre Akkumulation des Amyloid- β -Peptids sowie die intrazellulären Konglomerate von hyperphosphoryliertem Tau. Diese Pathologien wurden in neuronalen Gehirnzellen von AD-Patienten als ko-existierend gefunden (GRUNDKE-IQBAL et al., 1989).

2.1.3.1. Akkumulation von $A\beta$

Als einer der maßgeblichen Charakteristika der Alzheimer Demenz gilt die extrazelluläre Akkumulation des Peptids Amyloid β zu sogenannten β -Amyloid-Plaques (CHEN et al., 2017; O'BRIEN, WONG, 2011; HAASS, SELKOE, 1993), welche auch Alois Alzheimer im zerebralen Kortex seiner Patientin Auguste Deter als pathologisch erkannte (ALZHEIMER, 1907).

Mittlerweile ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Entstehung dieser Pathologie grundlegend verstanden. Bei $A\beta$ handelt es sich um, je nach Anzahl an enthaltenen Aminosäuren, circa 4 kDa schweres Peptid (GLENNER, WONG, 1984), welches im Rahmen des physiologischen zellulären Metabolismus durch eine proteolytische Spaltung, einer sogenannten Prozessierung, aus seinem Vorläuferprotein (Engl.: *Amyloid Precursor Protein*, APP) freigesetzt wird.

Kommt es, so wie bei der Alzheimer Demenz, zu einer Dysbalance aus der Bildung und dem Abbau von $A\beta$, so bilden sich fibrilläre Aggregate, welche sich schließlich in Form der β -Amyloid-Plaques zusammenlagern (HARDY, HIGGINS, 1992) und eine zytotoxische Wirkung auf Zellen ausüben (CHEN et al., 2017; LAMBERT et al., 1998).

Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) ist ein Typ-I-Transmembranprotein (LI et al., 1999; KANG et al., 1987) und wird beim Menschen auf Chromosom 21 codiert (YOSHIKAI et al., 1990). Aufgrund von alternativen Splicing-Prozessen im Rahmen der Transkription entstehen meist eines der drei, von insgesamt zehn existierenden, APP-Isoformen APP770, APP751 oder APP695 mit ihrer entsprechenden Anzahl an 770, 751 oder 695 Aminosäuren. APP wird in verschiedenen Geweben und Zellen, wie Keratinozyten der Epidermis, Adipozyten des Fettgewebes und zerebralen Neuronen – hier vor allem in Form des APP695 – exprimiert (PUIG, COMBS, 2013; LEE et al., 2008; HOFFMANN et al., 2000; LI et al., 1999). In seiner Funktion als Oberflächenrezeptor ist es an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt (MULLER, ZHENG, 2012): So ist es unter anderem im murinen Modell in die Differenzierung von Neuronen (HUNG et al., 1992) als auch in die Zelladhäsion sowie damit einhergehende Synaptogenese involviert (BAUMKOTTER et al., 2012; WANG et al., 2005).

Im Rahmen der APP-Prozessierung kommt es zur proteolytischen Abspaltung von Peptid-Fragmenten durch verschiedene Sekretasen: Es lassen sich, je nachdem, durch welche Sekretasen dies durchgeführt wird, der anteilig seltenere „amyloidogene“, also $A\beta$ -erzeugende und durch die β - und γ -Sekretase durchgeführte Prozessierungsweg von dem nicht-amyloidogenen, durch die α - und γ -Sekretase ausgeführten Prozessierungsweg unterscheiden (ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Bei der amyloidogenen Prozessierung erfolgt der primäre Schnitt des APP über das membranständige Enzym β -Sekretase (Engl.: *β -site APP cleaving enzyme*, BACE) am extrazellulären N-terminalen Teil des APP (SINHA et al., 1999; VASSAR et al., 1999). Hierdurch wird das lösliche APP-Fragment

sAPP β (Engl.: *soluble β -secreted APP*) in den Extrazellulärraum freigesetzt. In der Zellmembran verbleibt das sogenannte β CTF (Engl.: *β -cleaved C-terminal fragment*), welches daraufhin durch die aus mehreren Proteinen bestehende γ -Sekretase geschnitten wird. Bei dieser handelt es sich um ein membranständiges Enzym, das als heterotetramerer Proteinkomplex aus erstens der Aspartatprotease *Presenilin* (*Presenilin 1*, PSEN1 oder *Presenilin 2*, PSEN2), zweitens dem *Presenilin*-Verstärker (Engl.: *Presenilin Enhancer 2*, PEN-2), drittens *Nicastrin* und viertens dem *anterioren Pharynxdefekt* (Engl.: *Anterior Pharynx-Defective 1*, APH-1) besteht (CARROLL, LI, 2016; ZHANG et al., 2014; KIMBERLY et al., 2003). Durch den γ -Sekretase-Schnitt entstehen das nach extrazellulär abgespaltene A β -Peptid und das intrazellulär verbleibende AICD (Engl.: *APP intracellular domain*) (PARDOSSI-PIQUARD, CHECLER, 2012, PASSER et al., 2000). Dieses wird im Zytosol durch die Bildung eines Komplexes mit den Kofaktoren Fe65 und TIP60 vor seinem Abbau geschützt (FIORE et al., 1995) und kann in den Zellkern gelangen, wo es unter anderem seine eigene Transkription als auch jene des A β -degradierenden Enzyms *Neprilysin* reguliert (GRIMM et al., 2015; MINOPOLI et al., 2012; CAO, SUDHOF, 2001).

Das nach dem Schnitt der γ -Sekretase nach extrazellulär abgespaltene A β kann eine Länge von 37 bis 43 Aminosäuren haben, wobei die aus 40 oder 42 Aminosäuren bestehende Peptide (A β 40 oder A β 42) am häufigsten gebildet werden (HAASS et al., 2012). Insbesondere A β 42 ist mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiert, da es aufgrund seiner Existenz zweier zusätzlicher hydrophober Aminosäuren die höhere Tendenz zur Aggregation zeigt (BARTOLINI et al., 2011; FINDEIS, 2007). Die A β -Peptide lagern sich zunächst zu Oligomeren und schließlich zu den AD-typischen β -Amyloidplaques zusammen, welche eine zytotoxische Wirkung zeigen (HUANG, LIU, 2020; MICHAELS et al., 2020). Hierfür werden verschiedene Gründe, wie die Zerstörung der Zellmembran-Integrität und ein damit einhergehender Calcium-Influx (BODE et al., 2019; YASUMOTO et al., 2019) sowie die Aktivierung pro-apoptischer Signalwege (KUMARI et al., 2023; SATOU et al., 1995) angeführt.

Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird der erste Schnitt des APP durch die α -Sekretase ausgeführt (POSTINA et al., 2004; LAMMICH et al., 1999). Es existieren verschiedene α -Sekretasen, wobei im neuronalen Gewebe insbesondere ADAM10 eine entscheidende Rolle bei der APP-Prozessierung spielt (HSIA et al., 2019; KUHN et al., 2010). Es kommt zur Freisetzung des löslichen α -sezernierten APP (Engl.: *Soluble APP α* , sAPP α) nach extrazellulär, für welches *in vitro* und *in vivo* eine Involvierung in neuronale Proliferation und unter anderem auch protektive, antioxidative Eigenschaften gegenüber A β nachgewiesen werden konnten (CHASSEIGNEAUX, ALLINQUANT, 2012). Das in der Zellmembran verbleibende α CTF (Engl.: *α -cleaved C-terminal Fragment*) wird durch die γ -Sekretase geschnitten, was zu einer Bildung des intrazellulären AICD sowie einer Freisetzung von p3 nach extrazellulär führt (SIEGEL et al., 2017; DULIN et al., 2008).

In Kontext der APP-Prozessierung, welche maßgeblich in der Zellmembran stattfindet, aber auch unter Berücksichtigung des in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Risikofaktors Träger des ApoE ϵ 4-Allels zu sein, wird die Relevanz von Lipiden ersichtlich. Die an der APP-Prozessierung beteiligten Enzyme, inklusive des APPs selbst, sind in der aus einer Lipiddoppelschicht bestehenden Zellmembran lokalisiert.

Insbesondere die β - und γ -Sekretase konnten in spezifischen Regionen der Zellmembran, sogenannter *Lipid Rafts*, nachgewiesen werden (KAO et al., 2020, MOLL et al., 2021). Diese *Lipid Rafts* sind Strukturen der Zellmembran, welche sich durch ihre spezifische Zusammensetzung aus Cholesterin und Sphingolipiden sowie einem erniedrigten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (Engl.: *Unsaturated Fatty Acids*) von der restlichen Zellmembran unterscheiden (LAUDE, PRIOR, 2004; SIMONS, IKONEN, 1997). *Lipid Rafts* sind an Prozessen der Zelladhäsion oder Signaltransduktion beteiligt, indem sie den daran beteiligten Proteinen ermöglichen, sich zu gruppieren (SIMONS, TOOMRE, 2000). Im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen konnte ein veränderter Lipidmetabolismus, mit in Konsequenz auch veränderter Organisation der in neuronalen Zellen existierenden *Lipid Rafts*, festgesellt werden (GRASSI et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die APP-Prozessierung durch Veränderungen der *Lipid Raft*-Zusammensetzung moduliert werden kann (LEMKUL, BEVAN, 2011). Ein erhöhter Cholesterin-Gehalt konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo*-Studien mit einer vermehrten $A\beta$ -Akkumulation in Zusammenhang gebracht werden (CORDY et al., 2006; FASSBENDER et al., 2001).

2.1.3.2. Tau-Pathologie

Eine weitere maßgebliche, mit der Alzheimer Demenz im Zusammenhang stehende, Pathologie zeigt sich in Form sogenannter *Neurofibrillary Tangles* („Neurofibrilläre Tangles“), welche hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem Tau bestehen (NASERI et al., 2019; AVILA, 2006; GRUNDKE-IQBAL et al., 1986; IHARA et al., 1986; BRION J, 1985).

Bei Tau handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, welches von verschiedenen neuronalen Zellen exprimiert wird und dort mit Mikrotubuli assoziiert ist (Engl.: *Microtubule Associated Protein*, MAPT), indem es deren Zusammenbau und Stabilität fördert. Es wird durch das gleichnamige Gen MAPT codiert, das auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21) lokalisiert ist, über 16 Exons verfügt und nach seiner Transkription verschiedenen *Splicing*-Prozessen unterliegt (RAWAT et al., 2022; WEI, ANDREADIS, 1998; WEINGARTEN et al., 1975). In Gehirnen von AD-Patienten konnten *post mortem* intrazelluläre Anreicherungen von abnormal hyperphosphoryliertem Tau gefunden werden (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986), was seine Bindung an Mikrotubuli beeinträchtigt (BRAMBLETT et al., 1993). Es polymerisiert bevorzugt zu als „Tangles“ gepaarten, schraubenförmigen Filamenten (Engl.: *Paired Helical Filaments*, PHFs) (ALONSO et al., 2001), welche sich als der Hauptbestandteil der NFTs präsentieren. Die Tau-Oligomere können intrazellulär akkumulieren und in murinen Modellen unter anderem die ribosomale Proteinbiosynthese (KOREN et al., 2019), die mitochondriale Funktion (LASAGNA-REEVES et al., 2011) und den axonalen Transport (CUCHILLO-IBANEZ et al., 2008) beeinträchtigen, was neurotoxische Wirkungen haben kann (FARIAS et al., 2011).

Braak *et al.* konstatierten 1991, dass die „Neurofibrillären Tangles“ bei der Alzheimer Demenz einem typischen, mit dem klinischen Krankheitsstadium korrelierbaren, Verteilungsmuster folgten und teilten die Erkrankungen so in sechs Verlaufsstadien ein, die bis heute ihre Anwendung finden (BRAAK, BRAAK, 1991).

2.2. Reaktive Oxidative Spezies

Der Begriff „Oxidativer Stress“ beschreibt eine Dysbalance zwischen der Bildung reaktiver oxidativer Sauerstoffspezies (Engl.: *Reactive Oxidative Species*, ROS) und den gegenregulierenden Mechanismen (SNEZHINA et al., 2019; SALIM, 2017). ROS sind ein Nebenprodukt des physiologischen Zellmetabolismus und werden innerhalb der Zelle überwiegend in den Mitochondrien nachgewiesen (BALABAN et al., 2005).

Diese Organellen sind der Ort der stark sauerstoffbedürftigen Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung (Engl.: *Oxidative Phosphorylation*, OXPHOS), bei welcher das Prinzip der bei Redoxreaktionen stattfindende Elektronenübertragung zur Energiegenerierung genutzt wird (GREEN, ODA, 1961). Die Atmungskette sitzt in der inneren Mitochondrienmembran (Engl.: *Inner Mitochondrial Membrane*, IMM) und besteht aus vier hintereinander geschalteten Proteinkomplexen (Komplex I – IV). Hier werden Elektronen aus den in vorherigen Stoffwechselprozessen generierten Reduktionsäquivalenten $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 entlang der vier Komplexe von einem höheren auf ein niedrigeres Energieniveau transportiert, um schließlich im Komplex IV mit Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) zu reagieren. Während dieses Prozesses wird an jedem der vier Proteinkomplexe Energie frei, welche verwendet wird, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix über die IMM in den Intermembranraum (Engl.: *Intermembrane Space*, IMS) zu pumpen – also einen Protonengradienten aufzubauen. Dieser Protonengradient kann schließlich durch die ebenfalls in der IMM sitzende *ATP-Synthase* genutzt werden, um aus Adenosindiphosphat (ADP) plus anorganischem Phosphat den universellen Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren (VERCELLINO, SAZANOV, 2022; KUHLEBRANDT, 2019; BIANCHI et al., 2004; KAGAWA, RACKER, 1966; TISDALE et al., 1963).

Als Nebenprodukt des gesamten Prozesses werden an den Proteinkomplexen freie Elektronen (e^-) generiert, welche in dem „sauerstoffreichen“ Milieu Radikalbindungen mit Sauerstoff-Molekülen eingehen und so das Superoxidradikal ($\text{O}^{\cdot-}$) erzeugen. Dieses zeigt sich aufgrund des zusätzlichen freien Außenelektrons als hochreaktiv und instabil und wird durch verschiedene körpereigene, antioxidativ wirkende Enzyme abgebaut. So wandeln die *Superoxiddismutasen* (SOD1, SOD2, SOD3) es enzymatisch in das reaktive Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um, welches wiederum durch weitere Enzyme wie *Katalase* (Engl.: *Catalase*, CAT) und *Glutathion-Peroxidasen* (GPXs) zu Wasser abgebaut wird und so die Mitochondrien als auch die Zelle vor durch die Radikale verursachten Schäden schützt (JENA et al., 2023; HEINRICH et al., 2022h).

Nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch in den Peroxisomen – kleinen Organellen mit max. $1 \mu\text{M}$ Durchmesser – werden im Rahmen der dort stattfindenden β -Oxidation der verzweigt oder langkettigen Fettsäuren ROS in Form von Wasserstoffperoxid generiert (HEINRICH et al., 2022b; FRANSEN et al., 2012; BOVERIS et al., 1972). Im Rahmen der Immunabwehr machen sich Makrophagen oder neutrophile Granulozyten beim sogenannten *Oxidative Burst* explizit reaktive Sauerstoffspezies zur Eliminierung pathogener Keime zunutze: Verschiedene Enzyme, wie die *NADPH-Oxidase*, *Superoxiddismutase*, *Myeloperoxidase* oder *Katalase* generieren aus Sauerstoff zunächst durch

Reduktion Superoxidanionen ($O^{\cdot-}$) und schließlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) sowie Hypochloritionen (OCl^{\cdot}) (HEINRICH et al., 2022h; HEINRICH et al., 2022j).

Bei fehlender Kompensation erzeugen die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle über das normale Maß hinausgehende Schäden an mitochondrialer DNA, Aminosäuren und Proteinen sowie Lipiden (JUAN et al., 2021; SU et al., 2019; NISSANKA, MORAES, 2018; NYSTROM, 2005). So generieren Hydroxyperoxyradikale Lipidperoxidationen, indem sie Kohlenstoff-Doppelbindungen angreifen, welche sich insbesondere in mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Engl.: *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFAs) finden. Als Folge kann es bei einer Peroxidation von Membranlipiden zu Veränderungen der Fluidität und Permeabilität der Zellmembran, Porenbildung als auch Verringerung der Membrandicke kommen (YADAV et al., 2019; CWIKLIK, JUNGWIRTH, 2010; WONG-EKKABUT et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Produkte der Lipidperoxidation an verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Sie konnten in *in vitro*-Studien den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg induzieren und die Autophagie regulieren (SU et al., 2019; GASCHLER, STOCKWELL, 2017; DODSON et al., 2017).

Das Gehirn zeigt sich besonders prädisponiert für oxidativen Stress und die daraus folgenden Konsequenzen. Dies ergibt sich zum einen aus seinem hohen Energie- und Sauerstoffbedarf, als auch der Tatsache, dass Lipide circa die Hälfte seines Trockengewichts ausmachen (COBLEY et al., 2018; SALIM, 2017). *Lipidomics*-Analysen zeigten, dass die Zellmembranen neuronaler Zellen zu circa 50 % aus Phospholipiden, zu 40 % aus Glykolipiden sowie zu 10 % aus Cholesterin bestehen (KAO et al., 2020). Die darin enthaltenen Fettsäuren, sind je nach Spezies, zu 25 – 30 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Engl.: *Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFAs), deren Fluidität und Integrität durch eine Lipidperoxidation beeinträchtigt werden kann (YADAV et al., 2019; WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al., 2015). Ein Überschuss an ROS konnte in verschiedenen Untersuchungen mit dem Alterungsprozess und verschiedenen Erkrankungen assoziiert werden: So konnte in Studien ein Zusammenhang zu neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes mellitus oder Krebs gefunden werden, für die oxidativer Stress einerseits als beschleunigender Pathomechanismus als auch als potentiell kausale Ursache diskutiert wird (ARDANAZ et al., 2022; JELIC et al., 2021; COLLIN, 2019; LUC et al., 2019; ANGELOVA, ABRAMOV, 2018; KUDRYAVTSEVA et al., 2016).

2.3. Zucker und Süßstoffe

Der in den vergangenen Jahrzehnten verzeichnete Anstieg von Übergewicht, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 (REED et al., 2021; ARROYO-JOHNSON, MINCEY, 2016; INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2019; GUARIGUATA et al., 2014) lässt sich mit veränderten Lebensbedingungen inklusive verminderter körperlicher Aktivität und des Konsums einer hochkalorischen, fett- und zuckerreichen Nahrung in Zusammenhang bringen (CLEMENTE-SUAREZ et al., 2023; KOPP, 2019). Der üblicherweise zum Süßen verwendete „Haushaltszucker“ Saccharose (Engl.: *Sucrose*) ist ein Disaccharid aus den zwei Monosacchariden Fructose und Glucose. Sie wird durch das Enzym *Saccharase* der intestinalen Mukosa in die beiden Monosaccharide aufgespalten und verfügt über einen Energiegehalt von circa 4 kcal pro Gramm. Auf metabolischer Ebene löst eine langfristig übermäßige Aufnahme von Kohlenhydraten eine vermehrte Insulinsekretion mit folglich erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz aus, welche das pathologische Charakteristikum bei der Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2 darstellt (HEINRICH et al., 2022a). Diese soll in Kapitel 5.5.2. nochmal genauer beschrieben werden.

Seit den 1970er-Jahren hat sich darüber hinaus die Zusammensetzung der hinzugefügten Zucker in industriell hergestellter Nahrung verändert: Im Jahre 2011 wurden laut Schätzungen unter den für die US-Bevölkerung zur Verfügung stehenden süßen kalorischen Lebensmittel bereits mehr als 30 % durch sogenannten *High Fructose Corn Syrup* (HFCS) repräsentiert. Dieser wird in Deutschland auch als Fructose-Glucose-Sirup oder Isoglucose bezeichnet und zeigt sich in der Herstellung kostengünstiger (HALEY, 2012). HFCS wird aus Maisstärke gewonnen, indem sie enzymatisch in ihren Baustein – das Monosaccharid Glucose – abgebaut wird. Die Glucose wird anteilig in Fructose umgewandelt, sodass schließlich ein aus Glucose- und Fructose-Monosacchariden bestehender HFCS mit anteilig mehr Fructose vorliegt.

Auf chemischer Ebene ist Fructose mit sechs Kohlenstoff-, sechs Sauerstoff- und zwölf Wasserstoffatomen ($C_6H_{12}O_6$) der Glucose ähnlich, unterscheidet sich aber aufgrund seiner am C2-Atom lokalisierten Ketogruppe. Die initiale Absorption erfolgt zunächst über den Glucosetransporter GLUT5 an den apikalen Enterozyten in den Blutstrom; in den Hepatozyten wird Fructose dann über GLUT2 aufgenommen, wo seine hauptsächliche Metabolisierung stattfindet. Der enzymatisch initiale Schritt des Fructose-Abbaus besteht in Phosphorylierung durch die *Hexokinase* und kann zu einem intrazellulären ATP-Mangel führen. Das im weiteren Abbau entstehende Acetyl-CoA kann über den Citratzyklus direkt in die *De Novo* Lipogenese münden und somit auf lange Sicht eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (Engl.: *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) begünstigen. Zudem wird Fructose auf genetischer Ebene mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Carbohydrate Response Element* (ChREBP) diskutiert, welcher die Transkription von Genen für Proteine, die an der Gluco- und Lipogenese beteiligt sind, aktiviert (HEINRICH et al., 2022a; JUNG et al., 2022; TASKINEN et al., 2019).

So wird eine mögliche Kausalität zwischen der seit den 1970er-Jahren zunehmenden Verwendung von HFCS in Nahrungsmitteln und dem seitdem verzeichneten Anstieg von Adipositas diskutiert. Auf

Grundlage verschiedener Interventionsstudien, welche keine Unterschiede zwischen der Aufnahme von HFCS und Saccharose bezüglich verschiedener metabolischer Parameter feststellten, wird diese jedoch kritisch bewertet (MAX-RUBNER-INSTITUT, 2017).

Der weltweite Anstieg an metabolischen Erkrankungen führt neben einer individuellen Einschränkung der Lebensqualität auch zu einer immensen gesamtgesellschaftlichen und ökonomischen Belastung in Form von sowohl kurz- als auch langfristigen Kosten (APOVIAN, 2016).

In den vergangenen Jahren erfuhr der Markt von Nahrungszusätzen, welchen den hochkalorischen Zucker ersetzen, einen starken Aufschwung (WALBOLT, KOH, 2020; MALEK et al., 2018; SYLVETSKY et al., 2017a; SYLVETSKY, ROTHER, 2016; SYLVETSKY et al., 2012). Die als zuckerfrei deklarierten Produkte werden mit Zuckeralternativen gesüßt, die sich insgesamt unter dem Begriff „Süßungsmittel“ zusammenfassen lassen und in kalorische und nicht-kalorische Substanzen unterschieden werden können. Bei ersteren handelt es sich um sogenannte chemische Polyole (Zuckeralkohole), wie beispielsweise Mannitol (E 421), Xylit (E 967) oder Sorbitol (E 420), welche pro Gramm eine nur 0,4-fache (im Falle von Mannitol) bis 0,65-fache (im Falle von Sorbitol) Energiedichte im Vergleich zu Saccharose haben (MASCHKOWSKI et al., 2022; GUPTA, 2018). Die nicht-kalorischen Süßungsmittel werden auch als Süßstoffe bezeichnet (Engl.: *Non-nutritive Sweetener*, NNS), umfassen beispielsweise Acesulfam-K (E 950) oder Aspartam (E 951) und verfügen über eine 30-fach (im Falle von Cyclamat) bis 8000-fach (im Falle von Neonatam) höhere Süßkraft als Saccharose. So können sie bereits in kleinsten Mengen zum Süßen verwendet werden, sodass die Nahrung, in welcher sie enthalten sind, einen dementsprechend geringeren Kaloriengehalt hat (WALBOLT, KOH, 2020; CHATTOPADHYAY et al., 2014).

Bei dem Süßstoff Aspartam (IUPAC-Name: *Methyl L- α -aspartyl-L-phenylalaninat*) handelt es sich chemisch um den Methylester eines Dipeptids aus Phenylalanin und Asparaginsäure mit der Summenformel $C_{14}H_{18}N_2O_5$ (siehe Abbildung 3) (CHOUDHARY, PRETORIUS, 2017). Die Herstellung erfolgt durch die chemische Kopplung des L-Phenylalanin-Methylesters an L-Asparaginsäure, wobei Aspartam in seiner süßenden α -Form sowie der nicht-süßenden β -Form entsteht. Letzteres wird enzymatisch abgetrennt, sodass nur noch α -Aspartam übrig bleibt (RAYMOND C. ROWE et al., 2006). Darauf folgende Herstellungsschritte umfassen die Kristallisierung, Entfärbung, Filtration, Sterilisation bei 105 °C sowie die Trocknung (CHOUDHARY, PRETORIUS, 2017). Das finale Produkt erscheint makroskopisch als weißes, kristallines Puder und verfügt über eine 200-fach stärkere Süßkraft als Saccharose. Mit einer Energiedichte von circa vier Kilokalorien pro Gramm ist die von Aspartam mit jener von Saccharose vergleichbar, kann jedoch in 200-mal geringeren Mengen eingesetzt werden und geht somit mit einer deutlich niedrigeren Kalorienbilanz einher. Der Einsatz von Aspartam ist weitestgehend auf jenen als Süßstoff begrenzt, dort aber in einer Vielzahl an Produkten, wie Softdrinks, Sirups, Kaugummis, Puddings, Proteinriegeln oder Nahrungsergänzungsmitteln enthalten (SCHORB et al., 2023; MAGNUSON et al., 2007).

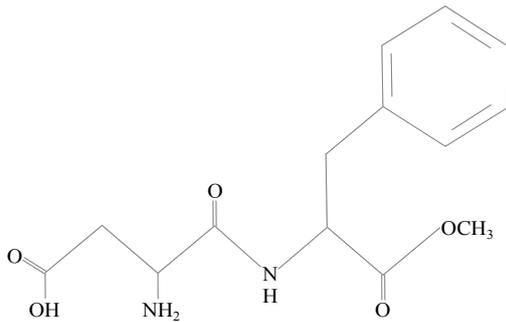


Abbildung 3: Strukturformel von Aspartam.

Bei dem Molekül Aspartam handelt es sich um einen Methylester des Dipeptids aus Asparaginsäure und Phenylalanin.

Aufgrund zahlreicher, teilweise widersprüchlicher Studiendaten bezüglich der gesundheitlichen Sicherheit von Aspartam, wurde ein Einsatz in Nahrungsmitteln viele Jahre kontrovers diskutiert (CZARNECKA et al., 2021). Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (Engl.: *European Food Safety Authority*, EFSA) stufte in einer Empfehlung im Jahr 2013 eine täglich maximale Aufnahmemenge von 40 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht als unbedenklich ein. Ausgeschlossen von dieser Empfehlung wurden Patienten, welche an der sogenannten Phenylketonurie erkrankt sind, da diese kein bzw. nur in geringsten Mengen Phenylalanin-enthaltenden Lebensmittel zu sich nehmen dürfen (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2013). Seit 2017 erfolgten durch die EFSA mehrmals Aufrufe zur Einreichung neuer Daten anhand derer verschiedene Süßungsmittel, hierunter auch Aspartam, neu bewertet werden sollen. Aspekte der Neubewertung sollen unter anderem die Partikelgröße als auch der Einsatz verschiedener Konzentrationen darstellen (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2021). Die US-amerikanische Bundesbehörde zur Lebens- und Arzneimittel-Überwachung (Engl.: *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) empfiehlt eine tägliche Maximaldosis von 50 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2023).

2.4. Fragestellung der Arbeit

Der Süßstoff Aspartam hat mittlerweile als Zuckerersatz in den verschiedensten Nahrungsmitteln fast auf der ganzen Welt Einzug in die alltägliche Ernährung erhalten und wird von vielen Menschen bewusst konsumiert. Andere nehmen den Süßstoff, in Unwissenheit über die Tatsache, dass sich dieser in der Zutatenliste eines Nahrungsmittels befindet, unbewusst zu sich (SYLVETSKY et al., 2017b).

Gleichzeitig wird Aspartam in der Wissenschaft aufgrund uneindeutiger Studienergebnisse bezüglich potentiell gesundheitsgefährdender Eigenschaften immer noch kontrovers diskutiert. In verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Studien, konnte gezeigt werden, dass Aspartam zu erhöhten Markern für oxidativen Stress führt. Insbesondere im murinen Gehirn ließen sich Hinweise auf zerebralen oxidativen Stress und Auffälligkeiten im Verhalten sehen (ASHOK et al., 2015; ASHOK et al., 2014; IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012).

Oxidativer Stress wird mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten, wie Diabetes mellitus, Karzinomen oder auch neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Demenz, assoziiert (ASMAT et al., 2016; KAO et al., 2020). Auf molekularer Ebene zeigen sich hier Sauerstoffradikale, welche zur Peroxidation verschiedener intrazellulärer Moleküle, wie DNA oder Lipiden führen und so deren Funktion modifizieren (JUAN et al., 2021; NISSANKA, MORAES, 2018). Lipide spielen zudem eine elementare Rolle in der zellulären Physiologie aber auch Pathophysiologie von Erkrankungen. Sie können durch reaktive oxidative Sauerstoffspezies beeinträchtigt werden (SU et al., 2019) und werden im Rahmen der Alzheimer Demenz innerhalb der *Lipid Rafts* von Zellmembranen mit einer veränderten APP-Prozessierung in Verbindung gebracht (GRASSI et al., 2020).

Zum aktuellen Zeitpunkt existieren keine Studien, welche die Auswirkung des Süßstoffs Aspartams auf die zelluläre Lipidhomöostase vor dem Hintergrund entstehenden oxidativen Stresses untersuchen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde die in der hier vorliegenden Forschungsarbeit präsentierte Studie konzipiert: Eine in der neurologischen Grundlagenforschung häufig verwendete Neuroblastom-Zelllinie (SH-SY5Y *WT*) wurde mit einem Aspartam enthaltenden Nährmedium inkubiert und im Vergleich zu Zellen, welche ein Kontrollmedium erhielten, in verschiedenen Versuchen ausgewertet. Da Aspartam nach seiner oralen Aufnahme potentiell in seine drei Metabolite gespalten wird, wurden dieselben experimentellen Erhebungen auch für die drei Aspartam-Metabolite in Kombination durchgeführt, um zu vergleichen, inwiefern Aspartam und die Aspartam-Metabolite vergleichbare oder sich unterscheidende Effekte aufzeigen. Hierfür erfolgte zunächst eine zellmorphologische Begutachtung der Zellpräparate mittels Elektronenmikroskopie. Weitere Versuche umfassten eine massenspektrometrische Untersuchung verschiedener Lipidklassen, die Messung oxidativen Stresses mit APF-Assays und auch die Genexpression verschiedener antioxidativ wirkender Enzyme.

Anhand der hierdurch gewonnenen *in vitro*-Daten sollen Schlussfolgerungen bezüglich einer potentiellen Wirkung des Süßstoffes insbesondere hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen gezogen werden, bei welchen oxidativer Stress und die Lipidhomöostase eine maßgebliche Relevanz spielen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Materialien und Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien.

Material	Hersteller/ Lieferant
6-Well-Platte (Zellkultur)	Corning Incorporated, Corning (USA)
96-Well-Filterplatte	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
96-Well Mikrotitrierplatte, Rundboden, durchsichtig	Corning Incorporated, Corning (USA)
96-Well Mikrotitrierplatte, Flachboden, schwarz	Corning Incorporated, Corning (USA)
96-Well Deepwell Platte	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
96-Well Piko PCR Platte	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Agar-Agar	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
Aminophenylfluoreszein	
Ammonium-Acetat	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
Aspartam (L- α -Aspartyl-L-phenylalanin-methylester)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Cardiolipin Assay Kit (ab241036)	Abcam, Berlin (Deutschland)
Carnitin Standard (Octanoyl-L-carnitine d3)	Supelco® Analytical via Merck, Darmstadt (Deutschland) (Bestell-Nr. 53230)
Carnitin (Palmitoyl-L-carnitine d3)	Supelco® Analytical via Merck, Darmstadt (Deutschland) (Bestell-Nr. 55107)
Chloroform, HPLC-Grad	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Cytotoxicity Detection Kit (für "LDH-Assay")	Roche, Mannheim (Deutschland)
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose Medium	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) No Glucose Medium	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) No Phenol Red	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Diacyl-Phosphatidylcholin (PC aa) Standard (06:0 PC (DHPC))	Avanti Polar Lipids®, Acton (USA) (Bestell-Nr. 850305P)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
dNTPs	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Vilnius (Litauen)
DNA-Polymerase	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Vilnius (Litauen)
D-Fructose	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
D-Galactose	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
D-Glucose	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
ECL-Hyperfilm	Amersham by Cytivia Life Sciences, Marlborough (USA)
Einmalspritze Injekt® (10 ml)	B. Braun, Melsungen (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol, HPLC-Grad	Fisher Chemical, Loughborough (UK)

Ethidiumbromid	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
Fast SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Fetales Calf Serum (FCS)	GE Healthcare Life Science, Utah (USA)
Glasfläschchen (1,5 ml), braun	Wheaton®, Millville (USA)
Glasspitzen	neoLab®, Heidelberg (Deutschland)
Glutaraldehyd-Lösung	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Glycidether	Serva, Heidelberg (Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Isopropanol, HPLC-Grad	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kupfer(II)-sulfat Pehnhidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
Kryoröhrchen, 1,6 ml (CryoPure)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
L-Asparaginsäure	Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific, Kandel (Deutschland)
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
L-Phenylalanin	Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific, Kandel (Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth®, Karlsruhe (Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
MEM Nicht-essenzielle Aminosäure-Lösung (NEAA)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
Methanal, HPLC-Grad	Electron Microscopy Science, Hatfield (USA)
Methanol, HPLC-Grad	Fisher Chemical, Loughborough (UK)
Methylnadinsäureanhydrid	Serva, Heidelberg (Deutschland)
MicroFine Einmalspritze, 1 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Natriumcacodylat-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Ismaning (Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)
Osmiumtetroxid (OsO_4)	Polyscience Inc., Warrington (USA)
Paraformaldehyd 32 % Aqueous Solution	Electron Miscropy Sciences, Hatfield (USA)
Pasteur-Pipetten aus Plastik (1 ml)	VWR, Ismaning (Deutschland)
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoCell, Heidelberg (Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäß (200 µl)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Penicillin-Streptomycin Lösung (10.000 U/ml)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific
Petrischale (92x16 mm), transparent („10 cm-Schale“)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Phenylisothiocyanat (PITC)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Phosphatidylethanolamin Standard (08:0 PE)	Avanti Polar Lipids®, Acton (USA) (Bestell-Nr. 999994P)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Pipettenspitzen, Plastik	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Propylenoxid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Pyridin, HPLC-Grad	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit Klapp-Deckel („1,5-ml-Eppendorfgefäß“)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Reaktionsgefäß (2 ml) mit Klapp-Deckel („2-ml-Eppendorfgefäß“)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Reaktionsgefäß (2ml) mit Schraub-Deckel („Minilys-Gefäße“)	neoLab®, Heidelberg (Deutschland)
Retinsäure (Vitamin A)	Sigma Aldrich®, St. Louis (USA)

Silikonmatte für 96-Well Deepwell-Platte	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnberg (Deutschland)
Triacylglycerid (TAG)-Standard (15:0-18:1(d7)-15:0 TG von Splash [®] II Lipidomix [®] Mass Spec Internal Standard)	Avanti Polar Lipids [®] , Acton (USA) (Bestell-Nr. 330709)
Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Triton X-100	Merck, Darmstadt (Deutschland)
TRIzol Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Uranylacetat	Polyscience Europe, Heidelberg (Deutschland)
Verschlussfolie für 96-Well RT-PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Wasser, HPLC-Grade	Fisher Chemical, Loughborough (UK)
Wasser, nuklease-frei	Qiagen, Venlo (Niederlande)
<i>Whatman</i> Chromatographiepapier	GE Healthcare Life Science, Utah (USA)
Wolframatophosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning (USA)
Zentrifugenröhrchen 15ml	Corning Incorporated, Corning (USA)
Zentrifugenröhrchen 50ml	Corning Incorporated, Corning (USA)
Zirconium Oxid Kügelchen 1,4 mm (Precellys [®])	Peqlab, Erlangen (Deutschland)

3.1.2. Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometer	AB Sciex, Darmstadt (Deutschland)
Agilent 1200 Autosampler	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Analysewaage ABS 80-4	Kern & Sohn, Balingen (Deutschland)
Autoklav, V-Serie	Systec, Linden (Deutschland)
Brutschrank HERAcCell 150 CO2 incubator	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Biologische Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Diamantmesser DiATOME histo	Diatome AG, Nidau (Schweiz)
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Fluorometer/ Luminometer Infinite M1000 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Gefrierschrank – 20 °C Premium (GN 4375)	Liebherr, Ochsenhausen (Deutschland)
Gefrierschrank – 80 °C Hera Freeze	Thermo Electron, Langenselbold (Deutschland)
Heizblock Thermo-Shaker	Universal Labortechnik, Leipzig (Deutschland)
Lagerbehälter für Stickstoff	Air Liquide, Paris (Frankreich)
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon, Tokio (Japan)
Magnetischer Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland)
Mikrowelle	Continent
Minilys Homogenisator	Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux (Frankreich)
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
PCR Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab, Erlangen (Deutschland)
PikoReal Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Pipette, Einkanal (0,1 – 2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal (0,5 – 10 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal (1 – 20 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal (5 – 100 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal (20 – 200 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal (100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Einkanal Multistep	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipette, Mehrkanal (8 Kanäle)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipetteboy Comfort	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Präzisionswaage EW-N	Kern & Sohn, Balingen-Frommern (Deutschland)
Stickstoff-Abdampf-Vorrichtung EVA-EC	VLM, Bielefeld (Deutschland)
Stickstoff Behälter	AirLiquide, Paris (Frankreich)
Transmissionselektronenmikroskop Zeiss LEO 910	Carl Zeiss IQS GmbH, Oberkochen (Deutschland)
Ultracut E Reichert-Jung	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin (Deutschland)
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter, Krefeld (Deutschland)
Zentrifuge Biofuge Primo R	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Zentrifuge Fresco21	Thermo Fisher Scientific, St. Louis (USA)

3.1.3. Zelllinie

Für die Durchführung der verschiedenen Experimente wurde in der hier vorliegenden Forschungsarbeit die Neuroblastom- Zelllinie SH-SY5Y *WT* verwendet. Bei dieser handelt es sich um eine humane Subklon-Zelllinie aus der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, welche im Jahre 1979 aus dem Knochenmark einer vierjährigen Patientin gewonnen wurde, die an einem ossär metastasierten Neuroblastom litt (LOPEZ-SUAREZ et al., 2022). SH-SY5Y-Zellen gelten als in der Neurowissenschaft bewährtes Zellmodell, um *in vitro*-Analysen bezüglich Fragestellungen zu Neurotoxizität, der Erzeugung von oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion und Veränderung der Neurotransmitter-Homöostase (LOPEZ-SUAREZ et al., 2022), aber auch Analysen von Neuroinflammation (PENG et al., 2021) oder Neurodegeneration (SLANZI et al., 2020) durchzuführen.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

(Nach (FRESHNEY, 2011))

Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und mit einem atmosphärischen Anteil von 5 % CO₂. Alle Arbeiten an den sich in Kultur befindlichen Zellen erfolgten an der biologischen Sicherheitswerkbank HERAsafe[®], welche als Sicherheitswerkbank der Klasse II über eine Ausstattung verfügt, in der ein steriles Arbeiten ermöglicht wird: der Arbeitsbereich der Werkbank wird über eine laminare Verdrängungsströmung (Engl.: *Laminar flow*) mit Raumluft belüftet, die zuvor durch einen Filter von Partikeln bereinigt wurde. Als Kulturgefäß für die Zellen wurden 10 cm durchmessende Petrischalen aus Polystyrol gewählt, welche durch eine spezielle Oberflächenbehandlung mit beispielsweise Sauerstoff-Stickstoff-Plasma, und daraus resultierender positiver Nettoladung, eine Anhaftung der Zellen erleichtern. Das Nährmedium zur Anzucht aller verwendeten Zelllinien bestand als Grundkomponente aus *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM), welches als Basalmedium über Zusätzen von anorganischen Salzen, (essentiellen) Aminosäuren, Vitaminen, Glucose (4 g/L) und Phenolrot als pH-Indikator verfügt. Des Weiteren wurde dem DMEM Fetales Kälberserum (Engl.: *Fetal Calf Serum*, FCS) hinzugefügt, das unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie Bindungs- und Transportproteine für das Zellwachstum bereitstellt. Je nach Zelllinie wurden zu diesen Grundkomponenten noch weitere Zusätze, wie z.B. nicht-essentielle Aminosäuren (Engl.: *Non-Essential Amino Acids*, NEAA) hinzugefügt und die Zellen dann in einem Volumen von 10 ml ihres spezifischen Nährmediums kultiviert (siehe Tabelle 3). Sobald die adhärenen Zellen in der mikroskopischen Überprüfung eine Konfluenz von circa 90 % erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Hierfür wurde das Nährmedium zunächst abgesaugt, um die Zellen dann mit 4 ml DMEM High Glucose (ohne FCS oder weitere Zusätze) zu waschen. Dies diente dazu, auch die letzten Reste des Proteaseinhibitoren enthaltenden Nährmediums zu entfernen, sodass sich die Wirkung der darauffolgend hinzugegebenen Protease *Trypsin* ungestört entwickeln kann. Nach der Zugabe der 1,5 ml *Trypsin* erfolgte eine zweiminütige Inkubation im Brutschrank. Durch die Inkubation mit jener Protease konnte eine Verdauung der Adhäsionsproteine der Zellen und somit ihr Ablösen vom Boden der Petrischale erreicht werden. Mit der Zugabe von 8,5 ml frischem Nährmedium erfolgte das Abstoppen des Trypsinisierungs-Prozesses. Noch am Boden adhärenen Zellen wurden unter Verwendung der durch eine 10 ml-Stabpipette generierten Scherkräfte vorsichtig vom Boden gelöst, um sie dann anschließend durch wiederholtes Aufziehen der Zell-Nährmedium-Suspension mit der Stabpipette zu vereinzeln. Die gewonnene Zellsuspension wurde nun auf neue 10 cm-Schalen verteilt oder für Inkubationen in 6-Well-Schalen ausgesät. Durch das vorsichtige Kreisen der Kultivierungsschalen wurden die Zellen gleichmäßig auf dem Boden der neuen Kultivierungsschale verteilt. Schließlich wurden die Zellen für die weitere Kultivierung in den Brutschrank gegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums.

Zelllinie	Nährmedium	FCS	Zusätze
SH-SY5Y <i>WT</i>	DMEM High Glucose (4,5 g/L Glucose)	10 % FCS	1 % NEAA

3.2.1.2. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

(Nach (FRESHNEY, 2011))

Für das Erzeugen von Kryokulturen wurden die Zellen bis zu einer 80 %-igen Konfluenz in ihrer 10 cm-Schale kultiviert. Nach Absaugen des Nährmediums, Waschen mit 4 ml DMEM High Glucose (ohne FCS oder weitere Zusätze) und zweiminütiger Inkubation mit 1,5 ml *Trypsin* im Brutschrank wurden 4,5 ml frischen Nährmediums hinzugegeben. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit der Stabpipette in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, um dann für fünf Minuten bei 355 x g zentrifugiert zu werden. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig vom entstandenen Zellpellet abgesaugt und dieses in 4,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand im Verhältnis 8:1:1 aus Nährmedium, FCS und DMSO. Nach Vereinzeln der Zellen mittels einer Glaspipette konnte die gewonnene Zellsuspension auf drei Kryoröhrchen mit einem Volumen von je 1,5 ml aufgeteilt werden. Die Kryoröhrchen wurden im Gefrierschrank bei – 80° C in einer Styropor-Box eingefroren und bis zu ihrer Verwendung in Stickstoff bei – 196 °C gelagert.

3.2.1.3. Auftauen eukaryotischer Zellen

(Nach (FRESHNEY, 2011))

Bei Bedarf an neuen, unpassagierten Zellen erfolgte die Rekultivierung der im Stickstoff kryokonservierten und gelagerten Zellen. Hierfür wurden die Kryoröhrchen zunächst für drei Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die flüssige Kryokultur wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 355 x g zentrifugiert. Der hierdurch gewonnene Überstand des Einfriermediums wurde vorsichtig von dem entstandenen Zellpellet abgesaugt. Anschließend wurde dieses in 5 ml frischen Nährmediums resuspendiert und die Zellen mit einer Glaspipette/Stabpipette vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde in eine 5 ml frischen Nährmediums enthaltende 10 cm-Petrischale überführt. Durch das vorsichtige Kreisen der Petrischale erfolgte die gleichmäßige Verteilung der Zellen. Anschließend wurden die Zellen der Passage 0 im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.4. Inkubation eukaryotischer Zellen

(Modifiziert nach (METT, 2017))

Die Inkubation von Zellen mit den verschiedenen Substanzen erfolgte, nachdem diese gesplittet und in 6-Well-Schalen ausgesät wurden (siehe Kapitel 3.2.1.1). Sobald die ausgesäten Zellen eine Konfluenz von circa 80 % erreicht hatten, wurde ihr Kultivierungsmedium mit einem Anteil von 10 % FCS je nach Protokoll auf 2,5 % FCS oder 1 % FCS „reduziert“. In diesem FCS-reduzierten Nährmedium wurden sie für einen Zeitraum von 16 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der jeweiligen Substanz im FCS-reduzierten Nährmedium über einen Zeitraum von 48 Stunden (24 + 24 Stunden). Hierbei wurde nach Ablauf der ersten 24 Stunden das Inkubationsmedium durch frisches ersetzt. Nach dem 48-stündigen Inkubationszeitraums wurden die Zellen bei Raumtemperatur auf Eis geerntet.

3.2.1.4.1. Inkubation von Zellen mit Aspartam und Aspartam-Metaboliten

Die 48-stündige Inkubation der Zellen erfolgte in einem Nährmedium, welches über eine niedrigere Glucose-Konzentration als das standardmäßig in der Zellkultivierung verwendete Nährmedium (4 g/L), verfügte. Hierzu wurde DMEM No Glucose mit sterilfiltrierter D-Glucose so versetzt, dass sich eine Glucose-Konzentration von 1 g/L ergab. Die hierdurch generierte Glucose-Konzentration des Nährmediums von 1 g/L bzw. 5 mmol/l entspricht etwa dem menschlichen Nüchternblutzucker. Dieser liegt nach einer circa achtstündigen Nahrungskarenz physiologisch unter 5,6 mmol/L (100 mg/dL).

Für den Konsum des Süßstoffs Aspartam wurde durch verschiedene Aufsichtsbehörden ein täglicher Grenzwert empfohlen. Laut FAO (Engl.: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) soll der Konsum von Aspartam eine Menge von 50 mg/kg Körpergewicht nicht überschreiten. Bei Annahme eines Durchschnittsgewichtes von 80 Kilogramm (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2020) ergibt sich hieraus eine tägliche Maximalmenge von circa vier Gramm. In einem Blutverteilungsvolumen von circa fünf Litern und unter Annahme eines zehnstündigen Zeitraums der Nahrungsaufnahme ergibt sich eine Konzentration von 0,08 g/L (271,7 $\mu\text{mol/L}$). Diese wurde für die Inkubation der Zellen angewandt.

Bei der Inkubation der Zellen mit den Metaboliten von Aspartam wurde mit 271,7 $\mu\text{mol/L}$ dieselbe Molarität, wie bei der Inkubation mit dem gesamten Aspartam-Molekül verwendet. Entsprechend des jeweiligen Molekulargewichts des Metabolits ergab sich so für Asparaginsäure eine Konzentration von 0,036 g/L, für Methanol von 0,009 g/L und für Phenylalanin von 0,045 g/L (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über inkubierte Substanzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Substanz	Molekulargewicht	Verwendete Molarität bzw. Konzentration	Nährmedium
Aspartam	294,31 g/mol	271,7 μM = 0,080 g/L	DMEM No Glucose (0 g/L Glucose) + 1 g/L Glucose + 2,5 % FCS
Asparaginsäure	133,10 g/mol	271,7 μM = 0,036 g/L	
Methanol	32,04 g/mol	271,7 μM = 0,009 g/L	
Phenylalanin	165,19 g/mol	217,7 μM = 0,045 g/L	

3.2.1.5. Bestimmung der Zytotoxizität mittels LDH-Assay

(Nach Herstellerprotokoll des *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche)

Zur Detektion potenzieller, durch die Inkubationsbedingungen generierter, zytotoxischer Effekte wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche verwendet. Das zytoplasmatische Enzym *Laktatdehydrogenase* (LDH) wird von Zellen bei einer Schädigung freigesetzt und unter *in vitro*-Bedingungen in das Nährmedium der Zellen sezerniert. In diesem sorgt LDH unter Anwesenheit des Cofaktors NAD^+ für die Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat + $\text{NADH} + \text{H}^+$ (siehe Abbildung 4). Auf das im Kit enthaltene Iodnitrotetrazoliumsalz (INT) werden durch das Enzym *Diaphorase* vom zuvor entstandenen $\text{NADH} + \text{H}^+$ zwei Protonen übertragen, sodass Formazan entsteht. Dieses hat einen rötlichen Farbton, welches bei Licht mit der Wellenlänge von 491 nm sein Absorptionsmaximum hat und im Photometer gemessen werden kann. Die photometrisch bestimmte Absorption steht hierbei in direkter Proportionalität zur LDH-Aktivität im Nährmedium und somit zur stattgefundenen Zellschädigung.

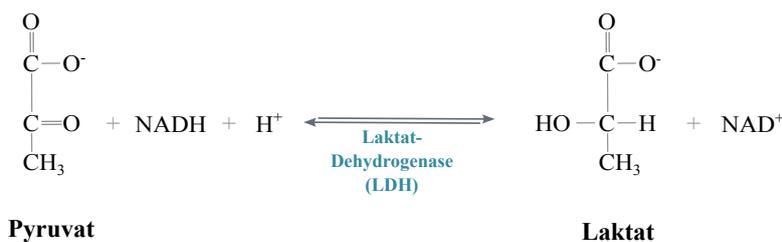


Abbildung 4: Durch das Enzym *Laktatdehydrogenase* (LDH) katalysierte Reaktionen.

Das Enzym *Laktatdehydrogenase* kann unter Anwesenheit des Cofaktors NAD^+ das entstandene Laktat zu Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidieren.

Für die konkrete Durchführung des LDH-Assays musste zum Zeitpunkt der Ernte zunächst eine sogenannte Totkontrolle generiert werden. Hierfür erfolgte die Einleitung der Zell-Apoptose durch Zugabe von 150 μl 10 % Triton X100 zu den 1,5 ml Nährmedium und einer Inkubation im Brutschrank für 15 Minuten. Anschließend wurde das Nährmedium der Totkontrolle sowie jenes der anderen Proben aus der 6-Well-Schale in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt, um bei 13.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde vorsichtig mittels Pipette in ein frisches Eppendorf-Gefäß

überführt, ohne das am Boden verbliebende Zellpellet mitzunehmen. Eine Standardreihe wurde erzeugt, indem die Totkontrolle mit prozentualen Anteilen von 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % und 20 % zu frischem Nährmedium gegeben wurde. Auf eine transparente 96-Well-Platte wurden von der Standardreihe oder dem abzentrifugierten Nährmedium der jeweiligen inkubierten Proben je 50 μ l pro Well aufgetragen. Nach Zugabe von 50 μ l frischen Nährmediums und 100 μ l Dye Solution + Catalyst erfolgte eine 15-minütige Inkubation unter dem Lichtschutzdeckel. Die Messung der Absorption erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 491 nm.

3.2.1.6. Bestimmung der Intaktheit von Zellmembranen mittels PI-Assay

(Nach (METT et al., 2021))

Das Propidiumiodid-Assay dient dem Nachweis der Intaktheit von Zellmembranen. Bei Propidiumiodid (PI) handelt es sich um ein fluoreszierendes Farbstoff-Molekül mit einem Molekulargewicht von 664,8 g/mol. Das Maximum seiner Fluoreszenz-Emission liegt in wässriger Lösung bei circa 636 nm. Propidiumiodid kann eine Zellmembran nur überwinden, wenn diese kleine Schäden aufweist. Intrazellulär interkaliert es dann spezifisch in DNA, was zu einer Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzemission auf circa 610 nm führt. Dies kann in einem Fluorometer detektiert werden.

Das PI-Assay wurde durchgeführt, nachdem die Zellen zuvor unter den in der Versuchsreihe angewandten Bedingungen inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte hierbei in schwarzen 96-Well-Schalen in einem Phenolrot-freien Nährmedium. Abgesehen davon verfügte das Nährmedium aber über die gleichen Zusätze, wie das sonst bei den Inkubationen verwendete Nährmedium. Zunächst wurde Propidiumiodid (10 μ M) in das phenolrot-freie Inkubationsmedium gegeben und für einen Zeitraum von zehn Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ auf den bereits konditionierten Zellen inkubiert. Die anschließende Detektion der Fluoreszenz-Emission wurde im Fluorometer durchgeführt. Hierbei erfolgte die Exzitation bei einer Wellenlänge von 510 nm (\pm 20 nm) und die Messung der Emission bei 617 nm (\pm 20 nm). Um die detektierten Emissions-Werte in Relation zur Gesamtzellzahl eines jeweiligen Wells setzen zu können, erfolgte nun die Lyse der Zellen. Nach Zugabe des zytotoxischen Triton X-100, in einer finalen Konzentration von 0,5 %, zum Inkubationsmedium erfolgte die Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut die Fluoreszenz-Emission bei 617 nm (\pm 20 nm) gemessen. Die Emission-Werte des jeweiligen Wells konnten nun durch die Bildung eines *Ratios* aus „Vor Triton Zugabe“ zu „Nach Triton Zugabe“ ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt werden.

3.2.1.7. Messung zellulären oxidativen Stress mittels APF-Assay

(Nach Herstellerprotokoll des *APF* von Thermo Fisher Scientific)

Zur Quantifizierung von intrazellulärem oxidativem Stress wurde ein sogenanntes APF-Assay durchgeführt. Bei Aminophenylfluoreszein (Engl.: *Aminophenylfluorescein*, APF) handelt es sich um ein Molekül, welches durch den Kontakt zu verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies, wie Hydroxyradikalen und Peroxidradikalen, seinen Aminophenylring abspaltet und in einen fluoreszierenden Status mit hellgrüner Fluoreszenz übergeht, welche als Signal detektiert werden kann (siehe Abbildung 5).

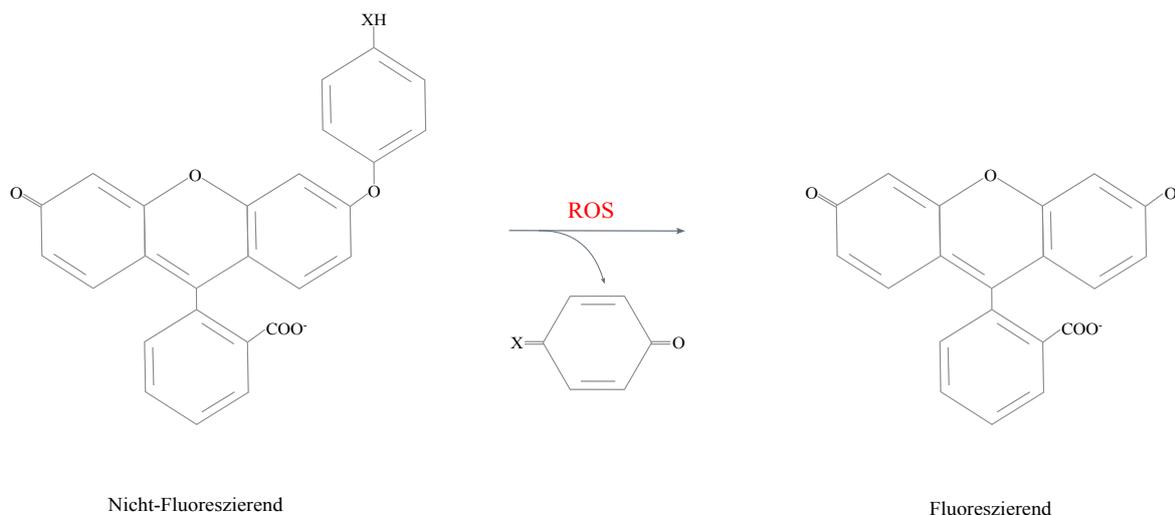


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des APF-Assays.

Das nicht-fluoreszierende *Aminophenylfluorescein* geht nach Kontakt mit ROS in einen fluoreszierenden Zustand über. Adaptiert nach (ENZO LIFE SCIENCES, 2023).

Für die Durchführung des Assays wurden die Zellen zunächst in eine transparente 96-Well-Schale mit Flachboden ausgesät. Sobald die Zellen konfluent waren, erfolgte die Inkubation analog zu dem üblichen Schema über einen Zeitraum von 48 Stunden. Nach dem Inkubationszeitraum wurde zuerst ein Waschschritt durchgeführt. Hierfür musste bereits im Vorhinein die sogenannte *Life Cell Imaging Solution* (LCIS) aus Natriumchlorid (140 mM), Kaliumchlorid (2,5 mM) und Calciumchlorid (1,8 mM) hergestellt und auf 37 °C erwärmt werden. Nachdem das Inkubationsmedium vorsichtig abgesaugt wurde, konnten je Well 100 µl der LCIS pipettiert und erneut abgesaugt werden. Anschließend wurde die sogenannte APF-Lösung unter Schutz von Licht auf die Zellen pipettiert. Diese wurde ebenso bereits im Vorhinein hergestellt, indem das Aminophenylfluoreszein in einer 10 µM Endkonzentration in *Life Cell Imaging Solution* gelöst wurde. Zusätzlich zu den Zellen enthaltenden Wells wurden auch vier *Blank*-Kontrollen ohne Zellen und nur mit APF-Solution generiert. Schließlich erfolgte in dem auf 37° C vorgewärmten Gerät die Fluoreszenz-Messung bei einer Exzitations-Wellenlänge von 490 nm sowie einer Emissions-Wellenlänge von 515 nm. Die Z-Position wurde für alle Messzeitpunkte (nach 0, 30 und 60 Minuten) beibehalten, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewähren. Nach Beendigung der letzten Messungen musste individuell für jedes Well die Proteinbestimmung der Zellen erfolgen, um

eine Normalisierung des Fluoreszenzsignals auf die jeweilige Proteinkonzentration durchführen zu können. Hierfür erfolgte eine chemische Zellyse, indem Lysepuffer auf die adhärenen Zellen pipettiert und die 96-Well-Schale anschließend für 30 Minuten auf Eis stengelassen wurde. Nach Inkubation der Platte auf dem Plattenschüttler bei 450 rpm für zwei Minuten konnte das Zelllysate abgenommen werden. Hieraus konnte dann die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay erfolgen.

3.2.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1. Verarbeitung der inkubierten Zellen und des Nährmediums

(Nach (METT, 2017))

Nach dem 48-stündigen Inkubationszeitraum erfolgte die Ernte der Zellen unter nicht-sterilen Bedingungen auf Eis. Zunächst wurden die 1,5 ml des Nährmedium der jeweiligen Wells mit einer Pipette in Eppendorf-Gefäße überführt. Dieses wurden für fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, sodass sich im Medium befindliche Zellüberstände auf dem Boden als Pellet absetzen konnten. Das überstehende Medium wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt und für weitere Versuche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die auf dem Boden der 6-Wells adhärenen Zellen wurden vorsichtig mit $500\text{ }\mu\text{l}$ HPLC-Wasser je Well gewaschen. Anschließend konnten die Zellen in $50\text{ }\mu\text{l}$ HPLC-Wasser mit einem Zellschaber gründlich vom Boden der 6-Well-Platte abgetragen werden. Die Zellsuspension wurde in Minilys-Gefäße mit 5 – 10 enthaltenden Zirkoniumoxid-Kügelchen überführt.

3.2.2.2. Herstellung von Zelllysaten

Nach der Ernte wurde die Zellsuspension in Minilys-Gefäße überführt, welche zuvor mit 5 – 10 Zirkoniumoxid-Kügelchen befüllt wurden. Die Gefäße wurden im Minilys-Homogenisator für 30 Sekunden auf maximaler Stufe mit 5000/min geschüttelt. Hierdurch konnte ein Aufschließen der Zellmembranen erreicht werden, was als Grundlage für die weiteren protein- und lipidanalytischen Methoden von elementarer Wichtigkeit war. Die Lagerung der Zellhomogenate erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

(Nach (SMITH et al., 1985))

Unmittelbar nach der Ernte der Zellen erfolgte die die Proteinbestimmung der Homogenate in Anlehnung an das Protokoll von Smith et al. (SMITH et al., 1985). Dieses basiert auf der Zugabe von Bicinchoninsäure (Engl.: *Bicinchoninic Acid*, BCA) und Kupfer-II-Sulfat ($\text{Cu}^{2+}\text{SO}_4$) zu den Zellhomogenaten. Die Cu^{2+} -Ionen lagern sich an die Peptidbindungen der in den Zellhomogenaten enthaltenen Proteine an und werden unter alkalischen Bedingungen zu Cu^+ reduziert. Hierbei steht die Menge des Kupfers, welches von Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird, in direkter Proportionalität zu der Proteinmenge, die in den Zellen enthalten ist. Das entstandene Cu^+ geht anschließend eine Chelatbindung mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure ein und bildet einen lilafarbenen Komplex (sogenannte Biuret Reaktion). Dieser Chelatkomplex hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm und kann bei dieser photometrisch detektiert werden.

Für die Durchführung des BCA-Assays wurden die Zellhomogenate zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Hierfür wurden $2\text{ }\mu\text{l}$ des jeweiligen Zellhomogenats in $18\text{ }\mu\text{l}$ HPLC-Wasser in einem Eppendorf-Gefäß suspendiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden aus Proben mit bekannter Proteinkonzentration

in aufsteigender Höhe je 20 μl auf eine durchsichtige 96-Well-Platte aufgetragen. Von den verdünnten Zellhomogenaten wurde je Probe 5 μl auf drei separate Wells aufgetragen, um bei der späteren Messung technische Triplikate generieren zu können. Für die Herstellung des Biuret-Reagenzes wurde Kupfersulfat-Lösung im Verhältnis 1:50 in einem BCA-enthaltenden Carbonat-Puffer suspendiert. Von der so generierten Lösung wurden 100 μl je Well zu den Proben der Zellhomogenate bzw. der Standardreihe gegeben. Die 96-Well-Platte wurde dann für je 15 Minuten zuerst im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) und anschließend bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Dann folgte die Absorptionsmessung im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.2.3. Lipidanalytische Methoden

3.2.3.1. Messung des Cardiolipin-Gehalts mittels Cardiolipin-Assay

(Nach Herstellerprotokoll des *Cardiolipin Assay Kit* von abcam)

Zur Bestimmung des Cardiolipin-Gehaltes der Zelllysate wurde das Cardiolipin-Assay von abcam verwendet. Hierbei handelt es sich um ein fluoreszenzbasiertes Verfahren, bei dem ein Fluoreszenzsignal generiert wird, wenn der Farbstoff der im Assay-Kit mitgelieferten *Cardiolipin Probe* eine Bindung mit dem im Zelllysate befindlichen Cardiolipin eingeht. Andere Phospholipide generieren kein Fluoreszenz-Signal.

Im Vorhinein an das Assay wurden die jeweiligen Zellen analog des Standardprotokolls für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss an die Ernte mechanisch aufgeschlossen. Von den gewonnenen Zelllysaten wurde je Probe 8 μl in eine sterile Flat-Bottom 96-Well-White-Plate pipettiert. Dies wurde mit 42 μl Puffer je Well aufgefüllt. Von einem zuvor hergestellten *Master Mix*, welcher aus Puffer und der *Cardiolipin Probe* aus dem Assay-Kit im Verhältnis von 50:1 bestand, wurden je Well 50 μl pipettiert. Die Platte wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Emission von 480 nm sowie einer Extinktion von 340 nm. Von den bei der Messung generierten Werten wurde der *Background* subtrahiert und anschließend der Fluoreszenzwert jeder Probe auf ihren jeweiligen Proteingehalt normiert. Diese wurde zuvor direkt nach der mechanischen Zelllyse mittels BCA-Assay bestimmt.

3.2.3.2. Lipidextraktion aus Zelllysaten

(Nach (GRIMM et al., 2011))

Aus den behandelten und nicht-behandelten Zellhomogenaten mussten für weitere massenspektrometrische Lipidanalysen zunächst Lipidextrakte mittels einer Fest-Flüssig-Extraktion erstellt werden. Da die verschiedenen Proben über unterschiedliche Protein-Konzentrationen verfügten (siehe Kapitel 3.2.2.3), wurden diese für eine Vergleichbarkeit zunächst auf eine einheitliche Protein-Konzentration eingestellt. Danach wurden eine 96-Well-Sterilfilterplatte auf einer 96-Deepwell-Platte mittels Klebestreifen befestigt. In die Wells der Sterilfilterplatte wurde je ein rundes, im Durchmesser 6 mm messendes *Whatman*-Filterpapier gelegt. Für die sich später anschließende massenspektrometrischen Messungen wurden Lipid-Standards benötigt, welche über eine festgelegte Zusammensetzung aus einer jeweiligen Referenzsubstanz für die verschiedenen Lipidklassen sowie Lösungsmittel bestanden. Auf jedes der Filterpapiere wurde je 1 μl des in HPLC-Ethanol gelösten Standardgemisches zur Detektion von Diacyl-Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, sowie 5 μl des in HPLC-Methanol gelösten Lipidomix[®]-Standards zur Detektion von Triacylglyceriden und Carnitin gegeben. Die einzelnen Komponenten der Standards sind in Tabelle 5 aufgeführt. Anschließend erfolgte das Auftragen von 25 μl jeder eingestellten Probe auf ein jeweiliges Filterpapier, wodurch der Einsatz von je 100 μg Proteinmenge erreicht wurde. Die Trocknung der Proben erfolgte unter kontinuierlichem Stickstoff-Fluss für 45 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde ein

Gemisch aus anteilig $31 \frac{2}{3} \%$ HPLC-Ethanol, $31 \frac{2}{3} \%$ / HPLC-Wasser, $31 \frac{2}{3} \%$ Pyridin und 5% Phenylisothiocyanat (PITC) unter dem Abzug hergestellt. Hierfür wurden zuerst je $950 \mu\text{l}$ des Ethanols, des Wassers und des Pyridins in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben und vermengt. Durch die darauffolgende Zugabe von $150 \mu\text{l}$ PITC wurde eine Trübung der Lösung sichtbar, welche durch 20 Sekunden andauerndes Vortexen in eine durchsichtige Lösung überging. Nach erfolgreichem Trocknen der Proben konnten von dieser Lösung nun $20 \mu\text{l}$ in jedes Well pipettiert werden. Anschließend mussten die Proben zuerst für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Deckel unter dem Abzug inkubieren, um danach erneut für 45 Minuten unter Stickstoff-Fluss getrocknet zu werden.

Währenddessen wurden ein Ammoniumacetat-Methanol-Gemisch hergestellt, indem 10 mg Ammoniumacetat in 50 ml HPLC-Methanol gelöst wurden. Von diesem wurden nach erfolgter Trocknung $300 \mu\text{l}$ je Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten mit 450 rpm auf dem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert und dann für zwei Minuten bei $500 \times g$ zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Extrakte von der Sterilfilter-Platte in die Deepwell-Platte transferiert, sodass die aufgeklebte Sterilfilter-Platte nun entfernt werden konnte.

Die Herstellung des sogenannten *Running Buffers* erfolgte aus 9 ml Ammoniumacetat (161,5 mM) in 281 ml HPLC-Methanol. Von diesem konnten nun $600 \mu\text{l}$ je Deepwell pipettiert werden, woraufhin die Deepwell-Platte mit einer Silikonmatte verschlossen wurde. Als letzter Schritt wurde die Platte für zwei Minuten bei 450 rpm auf den Plattenschüttler gestellt. Nun konnten mit den generierten Lipidextrakten weitere Analysen erfolgen.

Tabelle 5: Eingesetzte Lipidstandards für massenspektrometrische Lipiddetektion.

Detektierte Lipid-Spezies	Standard (gelöst in Ethanol)	Hersteller
Phosphatidylcholine	Diacyl-Phosphatidylcholin (PC aa) (06:0 PC (DHPC))	Avanti Polar Lipids (850305P)
Phosphatidylethanolamine	Phosphatidylethanolamin (08:0 PE)	Avanti Polar Lipids (850699)
Carnitine	Carnitin (Octanoyl-L-carnitine d3)	Supelco Analytical (53230)
	Carnitin (Palmitoyl-L-carnitine d3)	Supelco Analytical (55107)
Triacylglyceride	Triacylglyceride (15:0-18:1(d7)-15:0 TG)	Avanti Polar Lipids (330709)

3.2.3.3. Massenspektrometrische Messungen

(Nach (GRIMM et al., 2011))

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Molekülen oder Atomen. Ein Massenspektrometer besteht meist aus drei hintereinander geschalteten Elementen: der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der verschiedenen Lipid-Spezies aus den erstellten Lipidextrakten in einem Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisations-Quelle und Tripel-Quadrupol-Analysator (QTRAP). Diesem liegt das Prinzip zugrunde, dass in der Elektronenspray-Ionisation (ESI) zunächst geladene Teilchen erzeugt werden, welche dann in Abhängigkeit ihres Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) in einem elektrischen Feld zweier hintereinander geschalteter Quadrupol-Analysatoren aufgetrennt und schließlich anhand ihrer Massespektren gemessen werden können. Im Massenspektrometer wird die Menge der auftreffenden Ionen in einem sogenannten Massenspektrum dargestellt, welches für ein jeweiliges Masse/Ladungs-Verhältnis (x -Achse) die jeweilige Ionenintensität (y -Achse) aufträgt. In sogenannten *Peaks* werden die gemessenen Signale zusammengefasst.

Konkret wurden zunächst mittels des *Agilent-Autosamplers* 20 μl des in Lösung gebrachten Lipidextraktes einer jeweiligen Probe für die Elektronenspray-Ionisation (ESI) injiziert. Die ESI wird als „weiches“ Ionisationsverfahren bezeichnet, da hier weniger Energie zur Ionisierung aufgewendet wird und die zu analysierende Probe während des Ionisierungsprozesses nicht fragmentiert. Es ist ideal für Proben mit großer Molekülmasse, Polarität und (de)protonierbaren Atomen bzw. bereits in Lösung gebrachten Ionen. Die Probe wird unter kontinuierlichem Fluss (30 – 200 $\mu\text{l}/\text{min}$) über eine Kapillare in die Ionisationskammer, in welcher ein atmosphärischer Druck von circa einem Bar herrscht, eingeführt. Zwischen der Spitze der Kapillare und einer Gegenelektrode wird, durch Anlegen einer Spannung von ca. 5500 V an der Kapillarspitze, ein elektrisches Feld erzeugt. So kommt es zunächst zur Zerstäubung, also Tröpfchenbildung, und Ionisierung des Probenmaterials, welches sich nun auf die Gegenelektrode zu bewegt. Durch das zusätzliche Anlegen eines erwärmten Stickstoffstromes (N_2) können an den erzeugten Tröpfchen die Moleküle des Lösungsmittels kontinuierlich von den ionisierten Lipiden abdampfen. Dies führt allmählich zu einer Schrumpfung der Tröpfchenoberfläche und damit einhergehender Konzentration der Ionenladung auf kleinem Raum. Nach dem Unterschreiten eines bestimmten Radius (sogenanntes Rayleigh-Limit) beginnen sich die gleichartigen Ladungen innerhalb der Tröpfchen abzustößeln, sodass diese in kleinere Tröpfchen zerfallen (sogenannte Coulomb-Explosionen). Dieser Prozess geschieht so oft, bis nur noch einzelne Ionen da sind. Ob es sich bei diesen um positive oder negativ geladene Ionen handelt, wird durch die an der Kapillare angelegte Spannung bestimmt: negative Spannung führt zur Erzeugung negativer Ionen (meist einfach negativ geladen, im Folgenden dargestellt als $[\text{M}-\text{H}]^-$); positive Spannung führt zur Erzeugung positiver Ionen (meist einfach positiv geladen, im Folgenden dargestellt mit $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Im weiteren Verlauf erfolgt die Analyse der Ionen anhand ihrer Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) in den Quadrupol-Analysatoren: Die mittels ESI erzeugten Ionen werden auf zwei hintereinander geschaltete Quadrupol-Analysatoren (Q1, Q3) zu beschleunigt. Ein Analysator besteht aus vier

zylinderförmigen Quadrupol-Stäben, von welchen immer die beiden gegenüberliegenden Stäbe über dieselbe Polarität verfügen. An den Stäben ist sowohl eine Gleichspannung (ca. 0,5 kV) als auch Wechselspannung (ca. 6 kV mit einer Frequenz von 1,2 MHz) angelegt. Durch Anlage der Spannung entsteht zwischen den Stäbe-Paaren ein elektrisches Feld und ein Magnetfeld, in denen ein bewegtes, elektrisches Teilchen demnach sowohl der elektrischen Kraft als auch der Lorentzkraft ausgesetzt ist, die genau entgegengerichtet auf das Teilchen einwirken. Eine geradlinige Laufbahn erhält ein Teilchen unter Anlage der Gleichspannung demnach also nur, wenn es über ein stabiles Masse-Ladungs-Verhältnis verfügt. Durch Überlagerung der Gleichspannung mit Wechselspannung kann das Teilchen zusätzlich zu Oszillationen angeregt werden. Diese sind zum einen von der Teilchen-Masse und zum anderen von der angelegten Spannung abhängig. Eine Selektion der Teilchen kann in Q1 erfolgen, indem Gleich- und Wechselspannung in einem solchen Verhältnis angelegt werden, dass nur Teilchen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis auf Bahnen verlaufen, die die Lochblende hinter dem Quadrupol-Analysator durchlaufen können; alle anderen Ionen prallen auf die Metallstäbe. Nach Passieren des ersten Quadrupol-Analysators (Q1), erfolgt in der sogenannten Kollisionszelle (Q2) die Fragmentierung der Teilchen durch Kollision mit durch den Stickstoffstrom emittierten N₂-Molekülen. Die Fragmentierung erfolgt aus dem Mutter- in ein Tochter-Ion, für welche die jeweilige spezifische Masse bei jedem Lipid bekannt sind. Bei dem Mutter-Ion (auch: Vorläufer-Ion) handelt es sich um das gesamte Lipid mit seiner spezifischen in Q1 selektierten Q1-Masse. Die Fragmentierung in Q2 führt zur Abspaltung des Tochter-Ions (auch: Produkt-Ion), was im Falle der Lipide die polare Kopfgruppe ist. Diese kann dann im sich anschließenden Q3-Analysator – wie im ersten Analysator auch schon – durch gezielte Anlage von Spannung hinsichtlich ihres spezifischen Masse/Ladungs-Verhältnis selektiert werden. Bei dem in dieser Forschungsarbeit angewandten sogenannten *Multireaction Monitoring* (MRM) werden – im Gegensatz zum *Single Reaction Monitoring* (SRM) – die gleichzeitige Überwachung mehrerer Reaktionen in einer Messung ermöglicht, indem mehrere spezifisch zueinander gehörige Mutter- und Tochter-Ionen detektiert werden können.

Nach Durchlaufen des Q3-Analysators treffen die Teilchen auf den Detektor, wo sie durch die Lorentzkraft im Magnetfeld halbkreisförmig abgelenkt werden und auf die Oberfläche der Dynode treffen. Dort schlagen sie Elektronen heraus, was als Signal eine kaskadenförmige Verstärkung von 10⁶ erfährt. Der hierbei entstehende Strom wird in Spannung umgewandelt und kann als Signalstärke (Engl.: *counts per second*, cps) im Rahmen des oben beschriebenen Massenspektrogramms dargestellt und analysiert werden.

Eine Lipid-Subspezies soll im Folgenden definiert werden durch das jeweilige Kürzel der Lipid-Spezies (z.B. PC aa für Diacyl-Phosphatidylcholin), sowie die Summe aller in den Fettsäure-Resten befindlichen Kohlenstoff-Atomen (Ziffern vor dem Doppelpunkt) inklusive der Anzahl der darin enthaltenen Doppelbindungen (Ziffern hinter dem Doppelpunkt). Beispielhaft definiert die Bezeichnung PC aa C40:0 also ein Diacyl-Phosphatidylcholin mit insgesamt 40 Kohlenstoff-Atomen und keinen Doppelbindungen.

Als Schwäche der gesamten Methode des *Multireaction Monitorings* ist die Tatsache zu nennen, dass für die detektierten Lipide keine absolut spezifischen Aussagen bezüglich der jeweiligen Verteilung der Länge der an der Kopfgruppe anhängenden Fettsäure-Reste getroffen werden kann. Dies liegt darin begründet, dass bei der Detektion der Masse eines Mutter-Ions in Q1 nur ein Summensignal aller Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatome gemessen wird. Exemplarisch kann es also bei dem Diacyl-Phosphatidylcholin PC aa C40:0 sein, dass die zwei Fettsäure-Reste, welche an der Kopfgruppe anhängen, variable Längen haben. Diese können variieren von zwei Fettsäuren mit der Länge von 20 Kohlenstoff-Atomen (PC aa C(20:0/20:0)) über je eine Fettsäure mit 18 bzw. 22 Kohlenstoff-Atomen (PC aa C(18:0/22:0)) bis hin zu je einer Fettsäure mit 16 bzw. 24 Kohlenstoff-Atomen (PC aa C(16:0/24:0)). Die gesamten im Rahmen der massenspektrometrischen Messung eingesetzten Parameter sind im Folgenden in Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 6: Einstellung von Parametern des Agilent 1200 Autosamplers.

Parameter	Einstellung
<i>Injection Volume</i>	20 µl
<i>Draw Speed</i>	200 µl/min
<i>Eject Speed</i>	200 µl/min
<i>Flush Part</i>	10 s

Tabelle 7: Einstellung von Parametern des 4000 QTRAP-Massenspektrometers bei der Detektion von Diacyl-Phosphatidylcholin -, Carnitin- und Triacylglycerid-Spezies.

Parameter	Einstellung
Scan-Typ	MRM (<i>Multireaction Monitoring</i>)
Messdauer	3 min
<i>Injection Volume</i>	20 µl
<i>Draw Speed</i>	200 µl/min
<i>Eject Speed</i>	200 µl/min
<i>Flush Part</i>	10 s
Auflösung Q1	Unit
Auflösung Q3	Unit
<i>Step Size</i>	0,1 Da
<i>Curtain Gas (CUR)</i>	20 psi
Kollisionsinduzierte Dissoziation (CAD)	Medium
Temperatur (TEM)	200 °C
<i>Interface Heater</i>	ein
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	40 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	50 psi
Ionenspray Spannung (IS)	5500 V
Eingangspotential (EP)	10 V
Kollisionszellenausgangspotential (CXP)	14 V

Tabelle 8: Einstellung von Parametern des 4000 QTRAP-Massenspektrometers bei der Detektion von Phosphatidylethanolamin-Spezies

Parameter	Einstellung
Scan-Typ	MRM (<i>Multireaction Monitoring</i>)
Messdauer	3 min
<i>Injection Volume</i>	20 µl
<i>Draw Speed</i>	200 µl/min
<i>Eject Speed</i>	200 µl/min
<i>Flush Part</i>	10 s
Auflösung Q1	Unit
Auflösung Q3	Unit
<i>Step Size</i>	0,1 Da
<i>Curtain Gas (CUR)</i>	10 psi
Kollisionsinduzierte Dissoziation (CAD)	Medium
Temperatur (TEM)	200 °C
<i>Interface Heater</i>	ein
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	40 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	50 psi
Ionenspray Spannung (IS)	4500 V
Eingangspotential (EP)	10 V
Kollisionszellenausgangspotential (CXP)	14 V

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden in massenspektrometrischen Messungen verschiedene Struktur- und Neutrallipide analysiert. Zu den Strukturlipiden zählen Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Spezies. Diese sind maßgebliche Bestandteile der zellulären Lipid-Doppelmembran. Die gemessenen Carnitine und Triacylglyceride zählen zu den Neutrallipiden und sind insbesondere in den zellulären Energiestoffwechsel involviert. Die Unterscheidung der verschiedenen Lipidklassen ist anhand ihrer spezifischen Kopfgruppe, also ihrem Tochter-Ion möglich, welches im Q3-Analysator selektiert wurde (DENKBAR, 2018; AGILENT TECHNOLOGIES, 2016; BÄCHER, 2014; GROSS, 2013; VATANSEVER, 2007; MÜLLER, 2004; UNIVERSITÄT ZU KÖLN, o.D.; KARLSRUHE INSTITUTE OF TECHNOLOGY (KIT), o.D.; HOCHSCHULE MÜNCHEN, o.D.; PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG, o.D.; FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR VERFAHRENSTECHNIK UND VERPACKUNG IVV, o.D.)

Im Folgenden sind die gemessenen Lipid-Spezies mit ihrer jeweiligen Fettsäure (mit Anzahl der C-Atome und Doppelbindungen), der Q1- und Q3 Masse sowie dem jeweiligen *Declustering Potential* in Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführt.

3.2.3.3.1. Detektion von Phosphatidylcholin-Spezies

Tabelle 9: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Diacyl-Phosphatidylcholin-Spezies im Rahmen des MRM.

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

3.2.3.3.2. Detektion von Phosphatidylethanolamin-Spezies

Tabelle 10: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Diacyl-Phosphatidylethanolamin-Spezies im Rahmen des MRM.

Lipid-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	Declustering Potential [V]	Collision Energy [eV]
PE aa C32:0	692,5	551,5	64	29
PE aa C32:1	690,5	549,5	64	29
PE aa C32:2	688,5	547,5	64	29
PE aa C34:0	720,5	579,5	67	30
PE aa C34:1	718,5	577,5	66	30
PE aa C34:2	716,5	575,5	66	30
PE aa C34:3	714,5	573,5	66	30
PE aa C34:4	712,5	571,5	66	30
PE aa C36:0	748,6	607,6	69	31
PE aa C36:1	746,6	605,6	69	31
PE aa C36:2	744,6	603,6	68	31
PE aa C36:3	742,6	601,6	68	31
PE aa C36:4	740,6	599,6	68	31
PE aa C36:5	738,6	597,6	68	31
PE aa C36:6	736,6	595,6	68	31
PE aa C38:0	776,7	635,6	71	32
PE aa C38:1	774,7	633,6	71	32
PE aa C38:2	772,6	631,6	71	32
PE aa C38:3	770,6	629,6	71	32
PE aa C38:4	768,6	627,6	70	32
PE aa C38:5	766,6	625,6	70	32
PE aa C38:6	764,6	623,6	70	32
PE aa C40:0	804,6	663,6	74	33
PE aa C40:1	802,7	661,7	73	33
PE aa C40:2	800,7	659,7	73	33
PE aa C40:3	798,6	657,6	73	33
PE aa C40:4	796,7	655,6	73	33
PE aa C40:5	794,6	653,6	73	33
PE aa C40:6	792,6	651,6	73	32
PE aa C42:0	832,7	691,6	76	34
PE aa C42:1	830,7	689,6	76	34
PE aa C42:2	828,7	687,6	76	34
PE aa C42:4	824,7	683,6	75	34
PE aa C42:5	822,7	681,6	75	34
PE aa C42:6	820,7	679,6	75	33

3.2.3.3.3. Detektion von Carnitin Spezies

Tabelle 11: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Carnitin-Spezies im Rahmen des MRM.

Lipid-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	Declustering Potential [V]	Collision Energy [eV]
Carnitin C00	162,1	85,1	61	27
Carnitin C02	204,1	85,1	41	27
Carnitin C03	218,1	85,1	46	29
Carnitin C03 OH	234,1	85,1	53	30
Carnitin C03:1	216,1	85,1	49	27
Carnitin C04	232,2	85,1	46	29
Carnitin C04 OH	248,1	85,1	55	32
Carnitin C04:1	230,1	85,1	52	29
Carnitin C05	246,2	85,1	46	29
Carnitin C05 M DC	290,2	85,1	63	37
Carnitin C05 OH	262,2	85,1	58	33
Carnitin C05:1	244,2	85,1	55	31
Carnitin C05:1 DC	274,1	85,1	60	35
Carnitin C06	260,2	85,1	56	27
Carnitin C06 OH	276,2	85,1	61	35
Carnitin C06:1	258,2	85,1	57	33
Carnitin C07 DC	304,2	85,1	66	39
Carnitin C08	288,2	85,1	66	33
Carnitin C08:1	286,2	85,1	63	37
Carnitin C09	302,2	85,1	66	39
Carnitin C10	316,2	85,1	56	37
Carnitin C10:1	314,2	85,1	68	40
Carnitin C10:2	312,2	85,1	67	40
Carnitin C12	344,3	85,1	73	44
Carnitin C12 DC	374,3	85,1	86	45
Carnitin C12:1	342,3	85,1	73	44
Carnitin C14	372,3	85,1	86	45
Carnitin C14:1	370,3	85,1	78	47
Carnitin C14:1 OH	386,3	85,1	81	50
Carnitin C14:2	368,3	85,1	78	47
Carnitin C14:2 OH	384,3	85,1	81	49
Carnitin C16	400,3	85,1	84	51
Carnitin C16 OH	416,3	85,1	87	53
Carnitin C16:1	398,3	85,1	84	51
Carnitin C16:1 OH	414,3	85,1	87	53
Carnitin C16:2	396,3	85,1	83	51
Carnitin C16:2 OH	412,3	85,1	86	53
Carnitin C18:0	428,4	85,1	96	63
Carnitin C18:1	426,4	85,1	89	55
Carnitin C18:1 OH	442,4	85,1	92	57
Carnitin C18:2	424,3	85,1	89	54

3.2.3.3.4. Detektion von Triacylglycerid Spezies

Tabelle 12: Übersicht über die angewandten Parameter für die Analyse der Triacylglycerid-Spezies im Rahmen des MRM.

Lipid-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	Declustering Potential [V]	Collision Energy [eV]
TAG C48:0	824,8	551,8	100	25
TAG C50:0	852,8	579,8	100	25
TAG C50:1	850,8	577,8	100	25
TAG C50:2	848,8	575,8	100	25
TAG C50:3	846,8	573,8	100	25
TAG C52:0	880,8	607,8	100	25
TAG C52:1	878,8	605,8	100	25
TAG C52:2	876,8	603,8	100	25
TAG C52:3	874,8	601,8	100	25
TAG C52:4	872,8	599,8	100	25
TAG C52:5	870,8	597,8	100	25
TAG C52:6	868,7	595,7	100	25
TAG C54:2	904,8	631,8	100	25
TAG C54:3	902,8	629,8	100	25
TAG C54:4	900,8	627,8	100	25
TAG C54:5	898,8	625,8	100	25
TAG C54:8	892,7	597,8	100	25
TAG C58:3	958,9	663,9	100	25

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

Der Einfluss der verschiedenen inkubierten Substanzen wurde auch auf molekularbiologischer Ebene durch Analyse von Veränderungen in der Genexpression überprüft. Hierfür wurden die Zellen wie auch für die lipidanalytischen Methoden für einen 48-stündigen Zeitraum mit der jeweiligen Substanz in den 6-Well-Schalen inkubiert.

3.2.4.1. Isolation von RNA

(Nach Herstellerprotokoll des TRIzol™ Reagenz von Thermo Fisher Scientific)

Nach der 48-stündigen Inkubation erfolgte die Ernte bei Raumtemperatur. Hierfür wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt. Die weiteren Schritte erfolgten unter dem Abzug: Nach Zugabe von 1000 μ l TRIzol-Reagenz je Well wurde eine Inkubationszeit von fünf Minuten abgewartet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Silikon-Rührspatel im TRIzol-Reagenz geerntet, um dann in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße überführt zu werden. Nach Zugabe von 200 μ l HPLC-Chloroform wurden die Proben für 15 Sekunden vorsichtig invertiert und für eine Dauer von drei Minuten unter dem Abzug inkubiert. Nun erfolgte in der Kühlzentrifuge bei 4 °C eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 15 Minuten. Nach dieser ließ sich in den Eppendorf-Gefäßen die Ausbildung von drei verschiedenen Phasen erkennen. Die unterste, organische Phase mit Phenol-Chloroform-Bestandteil, die mittlere Interphase und die obere, wässrige Phase mit der Ribonukleinsäure (RNS) (Engl.: *Ribonucleic Acid*, RNA). Vorsichtig wurde die RNA-enhaltende wässrige Phase mit einer Pipette in ein neues 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt, ohne dabei Teile der Interphase oder organischen Phase mitzunehmen. Zu der überführten wässrigen Phasen wurden 500 μ l HPLC-Isopropanol hinzugegeben und das Gemisch für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C für eine Dauer von zehn Minuten. Nach dieser ließ sich am Boden des Eppendorf-Gefäßes die präzipitierte RNA in Form eines Pellets erkennen. Für den darauffolgenden „Wasch-Schritt“ musste der Überstand des Pellets vorsichtig abgenommen werden, um es dann durch die Zugabe von 1000 μ l 70 %-igen HPLC-Ethanol zu waschen. Durch Vortexen löste sich das Pellet vom Boden des Gefäßes und wurde daraufhin mit 12.000 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Von dem am Boden abgesetzten RNA-Pellet wurde der Überstand abgenommen und der „Wasch-Schritt“ inklusive fünfminütiger Zentrifugation nochmals durchlaufen. Nach Abnahme des Ethanol-Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur über eine Dauer von zwei Minuten getrocknet. Anschließend wurde es durch Zugabe von 100 μ l RNase-freien Wassers und mehrmaligem Durchziehen durch die Pipetten-Spitze gelöst. Als letzter Schritt erfolgte eine zehnminütige Inkubation im Heizblock bei 55 – 60 °C. Anschließend wurden die RNA-Isolate bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

3.2.4.2. Messung von RNA-Konzentrationen

(Nach (DESJARDINS, CONKLIN, 2010))

Die RNA-Isolate mussten für ihre weitere Verwendung zunächst in ihrer Reinheit und Konzentration überprüft werden. Dies ist insbesondere wichtig, da im Rahmen des Prozesses der RNA-Isolation Verunreinigungen durch Proteine, Salze oder andere organische Verbindungen auftreten können. Diese Verunreinigungen lassen sich gut bei spektralphotometrischen Messungen in einem Wellenlängen-Bereich von 230 nm bis 320 nm detektieren. Innerhalb dieses Spektrums haben Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei circa 260 nm, Proteine bei 280 nm und Salze oder andere organische Verbindungen bei 230 nm. Der Absorptionsmessung im Spektralphotometer liegt das sogenannte Lambert-Beersche Gesetz zugrunde, bei dem die Extinktion einer Probe, das heißt deren Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, in direkter Proportionalität zu der Stoffmengenkonzentration in dieser steht (siehe Abbildung 6). Indem die gemessene Absorption bei den verschiedenen Wellenlängen zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, lassen sich potenzielle Verunreinigungen erkennen. So bildet das $OD_{260/280}$ -Ratio das Verhältnis von RNA zu Proteinen ab. Dieses sollte bei 2,0 liegen. Das $OD_{260/230}$ -Ratio stellt das Verhältnis der RNA zu Salzen oder anderen organischen Stoffen dar und sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

Die Extinktionsmessung der RNA-Isolate erfolgte im *NanoDrop* 8000 Spektrophotometer. Als Referenz-Lösung diente HPLC-Wasser/ nuklease-freies Wasser. Durch Aufbringen von 2 μ l des jeweiligen RNA-Isolats konnte über Messung der Extinktion die Konzentration bestimmt werden.

Abbildung 6: Lambert-Beersches Gesetz.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} = gemessene Absorption der Probe für die Wellenlänge λ
 ε_{λ} = Extinktionskoeffizient der Probe
 c = Stoffmengenkonzentration der Probe
 d = optische Schichtdicke

3.2.4.3. Synthese von cDNA

(Nach Herstellerprotokoll des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Thermo Fisher Scientific)

Die Synthese von cDNA (Engl.: *Complementary DNA*, cDNA) erfolgte mittels des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Thermo Fisher Scientific. Diesem liegt das Prinzip zugrunde, dass isolierte Einzelstrang-RNA durch das Enzym *Reverse Transkriptase* in eine komplementäre Einzelstrang-DNA (Engl.: *Complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden kann. Dieser fusioniert mit dem RNA-Einzelstrang, der dann durch eine *RNase* abgebaut wird. Das Enzym *DNA-Polymerase* synthetisiert schließlich einen zum bereits bestehenden DNA-Einzelstrang komplementären DNA-Strang, sodass als Endprodukt eine doppelsträngige DNA entsteht.

Konkret wurde für die cDNA-Synthese zunächst ein sogenannter *Master Mix* angesetzt, welcher unter anderem die für das Umschreiben der RNA notwendigen Komponenten, wie die *Reverse Transkriptase*, Hexamer-Primer und Desoxyribonukleotide beinhaltet (siehe Tabelle 13). Die gesamten Bestandteile

des *Master Mixes* wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und deshalb zunächst auf Eis aufgetaut, um dann in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß zusammengefügt zu werden. Die eingesetzten Volumina der Bestandteile fügten sich zu einem Gesamtvolumen von $10\ \mu\text{l}$ zusammen und reichten somit für die cDNA-Synthese von bis zu 100 RNA-Isolaten aus.

Tabelle 13: Bestandteile und eingesetzte Volumina des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits von Thermo Fisher Scientific.

Kit-Bestandteil	Eingesetztes Volumen [μl]
10 x RT Puffer	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10 x RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
Nuklease-freies Wasser	4,2
Gesamt	10,0

Für jede der RNA-Proben wurde nun in einem 200- μl -PCR-Reaktionsgefäß $10\ \mu\text{l}$ des zuvor angesetzten *Master Mixes*, $2\ \mu\text{l}$ der jeweiligen isolierten RNA und $10\ \mu\text{l}$ nuklease-freien Wassers vermengt. Anschließend durchliefen die Reaktionsgemische in einem sogenannten *Thermocycler* ein 2,5-stündiges Programm, welches vier Temperatur-Stufen umfasste (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Durchlaufene Temperaturstufen des *Thermocycler*-Programms.

	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
Stufe 1	25	10
Stufe 2	37	120
Stufe 3	85	5
Stufe 4	4	∞

Nach Durchlaufen des Programms im *Thermocycler* wurde die synthetisierte cDNA nun in $180\ \mu\text{l}$ nuklease-freien Wassers suspendiert und konnte bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.2.4.4. Polymerase Kettenreaktion

(Nach Herstellerprotokoll des PowerUp™ SYBR® Green Master Mix von Applied Biosystems)

Die Polymerase Kettenreaktion (Engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten und hat vielfältige Anwendungsgebiete, zu welchen unter anderem auch der Nachweis der Expression verschiedener Gene zählt.

Ausgehend von einer zuvor synthetisierten einzelsträngigen cDNA können unter Zugabe von Gen-spezifischen Primer-Sequenzen (siehe

Tabelle 16) und Desoxyribonukleotiden in einem mehrschrittigen Zyklus die Vervielfältigung dieser Gen-Abschnitte erfolgen.

Ein Amplifikationszyklus umfasst drei sich in der Temperatur voneinander unterscheidende Schritte und muss je nach DNA-Menge circa 20 – 50 Mal durchlaufen werden (siehe Tabelle 15). Zuerst erfolgt die sogenannte Denaturierung, bei der durch Temperaturen von bis $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ zufällig aneinander gelagerte

(hybridisierte) cDNA-Einzelstränge wieder getrennt werden. Im zweiten Schritt wird beim sogenannten *Annealing* bei Temperaturen von 50 °C – 60 °C die Anlagerung der spezifischen Primer-Sequenzen an ihren komplementären Abschnitt des cDNA-Strangs ermöglicht. Zuletzt erfolgt bei der sogenannten *Elongation* bei Temperaturen von 70 °C die DNA-Synthese. Hierbei setzt das Enzym *DNA-Polymerase* an den 3'-OH-Enden der Primer an und verlängert diese, sodass ein DNA-Doppelstrang entsteht (HEINRICH et al., 2022i). Bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten *Real-Time Quantitative PCR* (RT-qPCR) wird während der Amplifikationszyklen in Echtzeit (Engl.: *Real Time*) analysiert, wie viel DNA-Menge im Kanal der jeweiligen Gens bereits entstanden ist. Dies wird durch die Verwendung des Färbemittels *SYBRTM Green* ermöglicht, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch ein Fluoreszenz-Signal generiert. Durch Verwendung von Geräten, welche über mehrere Kanäle für die Detektion eines Fluoreszenz-Signals verfügen, können mehrere Gene gleichzeitig gemessen werden. Zu diesen Genen zählt auch das sogenannte *Housekeeping Gene*, für welches eine stabile Expression bekannt ist und auf das die Daten bei der späteren Auswertung normiert werden können. Die Auswertung der Daten der untersuchten Gene erfolgt über Analyse des sogenannten Ct-Wert (Engl.: *Cycle Threshold*, Ct). Dieser Wert bezeichnet jenen n-ten Amplifikationszyklus, ab welchem die Menge der in der PCR entstandenen genspezifischen DNA in ein exponentielles Wachstum übergeht. Dieser Wert steht in Proportionalität zur Konzentration des untersuchten Gens in dem cDNA-enthaltenden Reaktionsansatz (NOLAN et al., 2006).

Tabelle 15: Amplifikationszyklus einer Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Schritt	Beschreibung	Temperatur [°C]
1) Denaturierung	Trennung der aneinandergelagerten cDNA-Einzelstränge	95
2) <i>Annealing</i>	Anlagerung der Primer-Sequenzen an ihren komplementären cDNA-Einzelstrang	50 – 60
3) Elongation	Verlängerung des Primers durch die DNA-Polymerase → Synthese doppelsträngiger DNA	70

Tabelle 16: Primer-Sequenzen der in der RT-qPCR analysierten Gene.

Gen	Protein	Forward Primer (5' – 3')	Reverse Primer (3' – 5')
FIS1	<i>Mitochondrial Fission 1 Protein</i>	TACGTCCGCGGGTTGCT	CCAGTTCCTTGGCCTGGTT
HPRT (HKG)	<i>Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
PINK1	<i>PTEN-induced Putative Kinase 1</i>	GGACGCTGTTCTCTGTTA	ATCTGCGATCACCAGCCA
SOD1	<i>Superoxiddismutase 1</i>	CAGCAGGCTGTACCAGTGC	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
SOD2	<i>Superoxiddismutase 2</i>	TACGTGAACAACCTGAACGT	CAAGCCATGTATCTTTCAGTTA

3.2.5. Elektronenmikroskopische Methoden

(Kooperation mit der Abteilung für Cytologie der Ruhr-Universität Bochum)

3.2.5.1. *Lipid Droplet*-Mikroskopie

Für die Durchführung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert. Nach dem Inkubationszeitraum von 48 Stunden hatten sie eine Konfluenz von 100 % erreicht, sodass die Fixierung mit 2 %-igem Formaldehyd, 2,5 %-igem Glutaraldehyd sowie 2 mM Calciumchlorid (CaCl_2) in 0,15 mM Cacodylat-Puffer erfolgen konnte. Die anschließende Färbung der Zellen wurden mit 1 %-igem Osmiumtetroxid in H_2O über einen Zeitraum von einer Stunde durchgeführt. Daraufhin konnten die Zellen unter Verwendung von Zellschabern vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt, für einen Zeitraum von drei Minuten bei 1.800 rpm zentrifugiert und schließlich in Agar-Agar (3 % in PB) eingebettet werden. Die darauffolgende Dehydrierung der Proben erfolgte mittels aufsteigender Ethanolreihe, zunächst mit 50 %-igem Ethanol und anschließender Inkubation über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C in 70 %-igem Ethanol, 1 %-igem Uranylacetat sowie 1 %-iger Phosphowolframsäure. Am darauffolgenden, zweiten Tag wurde die Inkubation mit der Ethanolreihe in aufsteigender Reihenfolge von 80 –100 % fortgesetzt. Für den Schritt der Einbettung wurden die Zellen zuerst in Propylenoxid und anschließend in einer Reihe aus Propylenoxid- und EPON-Mischungen inkubiert. EPON besteht aus Glycidylether, 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid und 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol in einem Mischungsverhältnis von 5,4 : 3,8 : 1,84 : 1. Für die Einbettung in der Propylenoxid- und EPON-Mischung wurden die Zellen zunächst im Propylenoxid/EPON-Verhältnis 3:1, anschließend 1:1 und zum Schluss 1:3 eingebettet, woraufhin sie über Nacht in reinem EPON bei einer Temperatur von 20 °C permeiert wurden.

Am folgenden, dritten Tag erfolgte die Erneuerung der EPON-Einbettung. Daraufhin wurden die eingebetteten Proben für zwei Tage bei einer Temperatur von 60 °C polymerisiert.

Schließlich konnten die Proben unter Verwendung eines *Ultracut E Reichert-Jung* sowie eines *DiATOME histo* Diamantmesser in ultradünne Scheiben mit einer Dicke von 70 nm geschnitten werden. Die Betrachtung der Proben erfolgte unter einem Transmissionselektronenmikroskop, welches mit einer Digitalkamera ausgestattet war.

3.2.5.2. Ausmessung von *Lipid Droplets* und Mitochondrien

Die in der Elektronenmikroskopie generierten Aufnahmen der verschiedenen Präparate wurden mit einer speziellen Anfärbung für *Lipid Droplets* generiert (siehe Kapitel 3.2.5.1). Für eine Ausmessung und genauere Analyse der durchschnittlichen Fläche von sowohl *Lipid Droplets* als auch Mitochondrien wurde die frei verfügbare Software *ImageJ* des US-amerikanischen Gesundheitsministeriums (Engl.: *National Institutes of Health*, NIH) in der Version *ImageJ 1,53k* verwendet.

Nach dem Öffnen der *ImageJ*-Software wurde die zu analysierende Elektronenmikroskopie-Aufnahme importiert. Anschließend erfolgte eine Kalibrierung der Maßeinheiten, indem die in der Aufnahme

angegebene Maßlänge als Skala in *ImageJ* importiert wurde. Nun konnten die, je nach Fragestellung relevanten, Organellen vermessen werden. Hierzu wurde das jeweilige Organell mittels *Freehand Selection* sorgfältig umfahren. Unter Anwählen von *Measure* wurde die hierbei gemessene Fläche unter *Results* erfasst und gespeichert. Dieser Vorgang konnte nun für beliebig viele Organellen durchgeführt werden, sodass unter *Results* eine tabellarische Auflistung aller vermessenen Organellen einsehbar war. Aus den dort aufgeführten Daten konnte zuletzt über die Berechnung des Mittelwertes eine Durchschnittsfläche berechnet werden.

3.2.6. Statistische Datenauswertung

Für die statistische Analyse der Daten wurden in der vorliegenden Arbeit die Programme *Excel* von Microsoft (Version 16.5 und 16.6) sowie *R* von *R-Project* (*Version R Core Team 2020*) verwendet. Die Auswertung erfolgte in Kooperationsarbeit mit Anna A. Lauer und Daniel Janitschke.

3.2.6.1. Auswertung der lipidanalytischen Daten der Massenspektrometrie

Die mittels massenspektrometrischer Messung gewonnenen Daten wurden mit der *Analyst 1.4.2. Software* von AB Sciex ausgewertet, indem diese die für jede Lipid-Subspezies detektierten „Zählungen pro Sekunde“ (Engl.: *counts per second*, cps) extrahierte. Diese konnten schließlich auf ihren spezifischen internen Lipidklassenstandard normiert werden, indem ein Quotient aus Lipid-Subspezies und Standard gebildet wurde: (cps Lipid – Subspezies/cps Lipidklassenstandard).

In der weiterführenden *Excel*-Auswertung konnten nun für jede Lipid-Subspezies aus den für dieselbe Inkubationsbedingung (z.B. Kontrollen) generierten normierten cps der verschiedenen Proben ein Mittelwert gebildet und gegen den Mittelwert der cps der Proben einer anderen Inkubationsbedingung (z.B. Aspartam) verrechnet werden. Hierfür wurden für jede Lipid-Spezies die Mittelwerte als Prozentzahl angegeben und im Sinne einer Veranschaulichung die Kontrollen rechnerisch auf 100 % gesetzt. Exemplarisch berechnete sich für TAG C48:0 für die prozentuale Veränderung der Kontrollen anhand $((0,604 \text{ cps}/0,604 \text{ cps}) \times 100)$, für Aspartam anhand $((0,977 \text{ cps}/0,604 \text{ cps}) \times 100)$ und für die Metabolite anhand $((0,760 \text{ cps}/0,604 \text{ cps}) \times 100)$.

Für die Fragestellung, ob bei einer einzelnen Lipid-Subspezies, beispielsweise TAG C48:0, ein signifikanter Unterschied für die inkubierten Proben versus Kontroll-Proben bzw. für die inkubierten Proben untereinander vorliegt, wurde als statistischer Hypothesentest ein zweiseitiger, unabhängiger T-Test (*Student's T-Test*) angewandt (dargestellt als einzelne *Dots* in den *Vulcano Plots*, siehe Abbildung 23, Abbildung 29, Abbildung 33, Abbildung 37). Dieser kann für Daten verwendet werden, bei denen beide Gruppen sowohl einer normalen Verteilung folgen als auch homogen sind. Zur Berechnung des p-Wertes bzw. der Effektstärke einer gesamten Lipidklasse, beispielsweise aller TAG-Subspezies, wurde ein Ein-Stichproben-T-Test durchgeführt, wohingegen bei der Berechnung des Effektes einer gesamten Lipidklasse zwischen zwei inkubierten Substanzen der zweiseitige, unabhängiger T-Test (*Student's T-Test*) verwendet wurde (dargestellt in den Säulendiagrammen in Abbildung 22, Abbildung 28, Abbildung 32, Abbildung 36).

Für die statistische Beurteilung der Effektstärke einer Lipid-Subspezies, die nach einer Inkubation mehr als der durchschnittliche Standardfehler (SEM) im Vergleich zu den Kontrollen verändert war, erfolgte die Berechnung des Binomial-Testes. Dieser dient der Feststellung, ob die Variable einer Stichprobe (beispielsweise als TAG C54:0), welche zwei mögliche *Outcomes* annehmen kann (hoch- vs. herunterreguliert), signifikant von dem hypothetisch erwarteten *Outcome* abweicht. Jenes *Outcome* wurde festgelegt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 dafür, dass die jeweilige Lipid-Subspezies erhöht ist. Um in diesem Rahmen auch die zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen untereinander zu

vergleichen, fand die Anwendung des *Fisher's Exact Testes* statt (siehe Abbildung 24, Abbildung 30, Abbildung 34, Abbildung 38)

3.2.6.2. Darstellung der Daten

Die Darstellung der verschiedenen Datensätze erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit mittels der im folgenden beschriebenen Programme.

Balkendiagramme sowie Venn-Diagramme wurden in *Excel* anhand der erhobenen Datensätze erstellt und schließlich durch den Import in *InkScape* (Version 1.2) graphisch aufgearbeitet. Die in den Balkendiagrammen aufgeführten Fehlerbalken stellen den mittleren Standardfehler (Engl.: *Standard Error of Mean*, SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt.

Die *Vulcano Plots* wurden in ihrer Grundversion mittels des *Enhanced Volcano* von *R* (Version 1.6.0) in Kooperation mit Dr. rer. nat. Anna A. Lauer generiert. Die weitere graphische Verfeinerung erfolgte in *InkScape*. Jene Diagramme dienen der Darstellung der Veränderung einer einzelnen Lipid-Subspezies im Vergleich zu den Kontrollen. Hierfür wird jede Lipid-Subspezies durch einen Punkt (Engl.: *Dot*) repräsentiert, welcher in Abhängigkeit von seiner x-fachen Veränderung/Effektstärke (siehe x-Achse) und in Abhängigkeit seines p-Wertes (siehe y-Achse) innerhalb des Diagrammes aufgetragen wird. Innerhalb des Koordinatensystems des *Vulcano Plots* wird der aus allen Lipid-Subspezies gemittelte SEM durch die zwei vertikalen Linien gekennzeichnet. Das mit $p \leq 0,05$ festgelegte statistische Signifikanzniveau wird durch die horizontale Linie dargestellt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Lipid-Subspezies nach Aspartam-Behandlung durch *Dots* in Rosatönen, jene Lipid-Subspezies nach Metabolite-Behandlung durch *Dots* in Blautönen graphisch repräsentiert. Hellblaue und hellrosa Punkte stellen keine signifikanten Veränderung dar. Mittelrosa oder mittelblaue Punkte zeigen eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler ist, jedoch nicht das festgelegte Signifikanzniveau erreichen. Dunkelrosa oder dunkelblaue Punkte repräsentieren eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler ist und zudem einen p-Wert von weniger als 0,05 aufweist. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisches Signifikanzniveau definiert.

4. Ergebnisse

Wie in Kapitel 2.4 einleitend beschrieben wurde, konnte in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass Aspartam mit der Entstehung oxidativen Stresses in Zusammenhang gebracht werden kann (ASHOK et al., 2015; IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012). Bis zum aktuellen Zeitpunkt erfolgte jedoch in humanen neuronalen Zelllinien noch keine experimentelle Untersuchung auf die Auswirkungen von Aspartam auf Parameter des oxidativen Stresses sowie die zelluläre Lipidhomöostase. In verschiedenen Untersuchungen konnten Hinweise gefunden werden, dass Aspartam unter physiologischen Bedingungen nach seiner oralen Aufnahme durch unspezifische Esterasen und Peptidasen des Gastrointestinaltraktes in die drei Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol gespalten wird (MAGNUSON et al., 2016.; HOOPER et al., 1994; STEGINK et al., 1987) (siehe Abbildung 7).

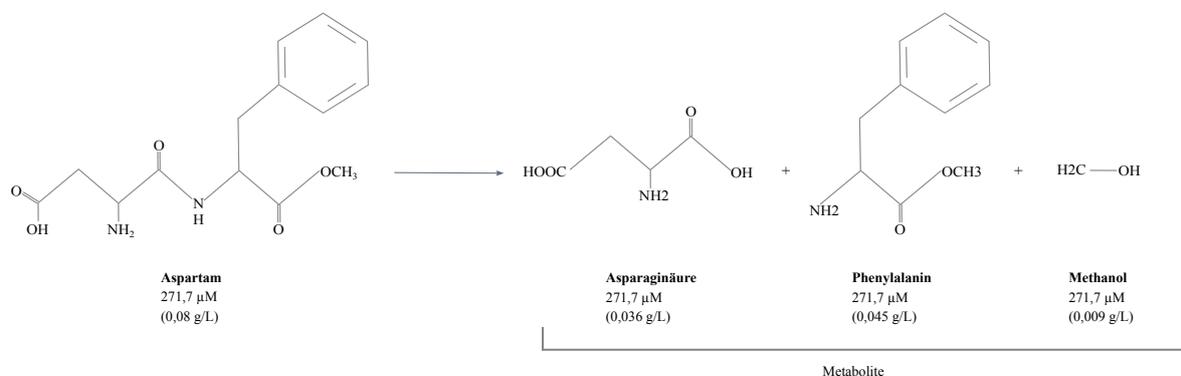


Abbildung 7: Schematische und vereinfachte graphische Darstellung des Aspartam-Metabolismus.

Das Molekül Aspartam wird durch unspezifische Peptidasen und Esterasen in seine Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol gespalten. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Bezüglich der gewählten Konzentration wurde sich sowohl an der von verschiedenen Organisationen empfohlenen maximalen Tagesdosis als auch an vorhandener Literatur orientiert (GEZGINCI-OKTAYOGLU et al., 2021; PARK et al., 2019; KAMENICKOVA et al., 2013). Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (Engl.: *European Food Safety Authority*, EFSA) empfiehlt eine maximale tägliche Aufnahme von 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Laut der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) soll der Konsum von Aspartam eine Menge von 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag nicht überschreiten (siehe Kapitel 2.3). Bei einem unter allen Durchschnittsgewicht von 80 Kilogramm (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2020) ergibt sich hieraus die Empfehlung zu einer maximalen täglichen Verzehrmenge von circa vier Gramm. In einem Blutverteilungsvolumen von circa fünf Litern (FELDSCHUH, ENSON, 1977) und der Annahme eines zehnstündigen Zeitraumes der Nahrungsaufnahme lässt sich folglich eine Konzentration bzw. Molarität von $0,08 \text{ g/L} = 271,7 \text{ μmol/L} = 271,7 \text{ μM}$ festlegen. Diese wurde in der hier vorliegenden Arbeit bei der Inkubation der Zellen angewandt. Im Falle der Aspartam-Metaboliten wurde mit

271,7 μM dieselbe Gesamtmolarität, wie bei der Inkubation mit dem Aspartam-Molekül verwendet, da pro aufgenommenem Aspartam-Molekül die Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol im Verhältnis 1:1:1 entstehen. Entsprechend des jeweiligen Molekulargewichts des Metabolits ergab sich so für Asparaginsäure eine Konzentration von 0,036 g/L, für Phenylalanin von 0,045 g/L und für Methanol von 0,009 g/L (siehe auch Kapitel 3.2.1.4.1). Als Zellmodell wurden Wildtyp-Zellen der immortalisierten, humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet (siehe auch Kapitel 3.1.3).

Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie wurden im März 2023 im Special Issue „*The Impact of Nutrition on Brain Metabolism and Disease*“ des Fachjournal *Nutrients* des MDPI-Verlages publiziert.

Griebsch, L.V.*; Theiss, E.L.*; Janitschke, D.; Erhardt, V.K.J.; Erhardt, T.; Haas, E.C.; Kuppler, K.N.; Radermacher, J.; Walzer, O.; Lauer, A.A.; Matschke, V.; Hartmann, T.; Grimm, M.O.W.; Grimm, H.S. *Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells*. *Nutrients* 2023, 15, 1467. <https://doi.org/10.3390/nu15061467>. PMID: 36986196 * diese Autoren haben gleichermaßen zur Studie beigetragen

4.1. Einfluss von Aspartam und seinen Metaboliten auf Zellorganellen

Zur Analyse des Einflusses von Aspartam oder seinen Metaboliten auf verschiedene Zellorganellen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Kapitel 3.2.5) in Kooperation mit der Abteilung für Cytologie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Kooperationen im Rahmen der Elektronenmikroskopie-Bilder.

Experiment	Kooperationspartner
Inkubation der Zellen	Lea V. Griebisch
Aufbereitung der Zellen (Fixierung, Färbung, Schneiden)	Dr. rer. nat. Veronika Matschke Elena L. Theiss Lea V. Griebisch
Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	Dr. rer. nat. Veronika Matschke
Auswertung der TEM-Bilder	Elena L. Theiss Lea V. Griebisch
Erstellung der Abbildungen	Elena L. Theiss
Betreuung und Koordination des Projektes	Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm Prof. Dr. rer. nat. Heike Grimm

In der elektronenmikroskopischen Betrachtung der Zellpräparate zeigten sich in den Aspartam- oder Metabolite-inkubierten Proben morphologische Unterschiede zu den Kontroll-Zellen. Es ließ sich ein Verlust der mitochondrialen Integrität sowie vergrößerte intrazelluläre Lipidtröpfchen (Engl.: *Lipid Droplets*, LDs) erkennen.

4.1.1. Untersuchung der *Lipid Droplets*

Bei *Lipid Droplets* handelt es sich um Organellen, welche intrazellulär im Zytoplasma, aber auch im Nucleus lokalisiert sind und Neutrallipide speichern (OLZMANN, CARVALHO, 2019; FARESE, WALTHER, 2016; OHSAKI et al., 2016; LISTENBERGER, BROWN, 2007). Ihr Vorkommen wurde in zahlreichen pro- und eukaryontischen Zellen nachgewiesen (THIAM, BELLER, 2017; WALTHER, FARESE, 2012; OHSAKI et al., 2014), so auch im Zentralen Nervensystem in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia- und Ependymzellen (ISLIMYE et al., 2022). Strukturelles Charakteristikum von *Lipid Droplets* ist ein hydrophober, mit Neutrallipide gefüllter Kern, welcher vor allem aus Triacylglyceriden (je nach Quelle ca. 44 % aller LD-Lipide) und Cholesterinestern (je nach Quelle ca. 34 % aller LD-Lipide) besteht. Dieser Kern wird von einer Monomembran aus Phospholipiden und bis zu hundert LD-assoziierten Proteinen umgeben (ZHANG, LIU, 2019; COHEN, 2018; WALTHER et al., 2017; BARTZ et al., 2007, JIANG, SERRERO, 1992). Der polare, hydrophile Kopf des jeweiligen Phospholipids grenzt an das Zytoplasma der Zelle, während das Fettsäure-Schwänzchen sich zum hydrophoben Kern der *Lipid Droplets* ausrichtet (siehe Abbildung 8). Die häufigsten Membran-Phospholipide der *Lipid Droplets* sind Phosphatidylcholin (ca. 45 mol% aller LD-Phospholipide) und Phosphatidylethanolamin (ca. 20 mol% aller LD-Phospholipide) (BARTZ et al., 2007) (siehe Abbildung 8).

Funktionell sind *Lipid Droplets* auf komplexe Art und Weise in den Metabolismus der Zelle involviert und dienen dort als Energiespeicher, indem sie Fettsäuren in Form der zuvor genannten Triacylglyceride einlagern (RALHAN et al., 2021; RAMBOLD et al., 2015; FARESE, WALTHER, 2009).

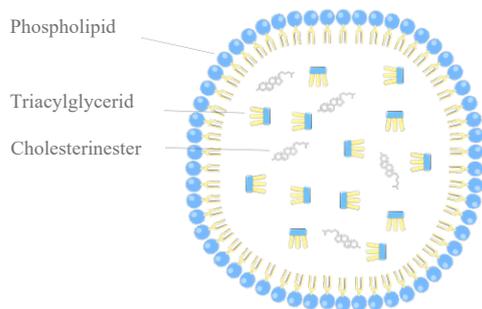


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus eines *Lipid Droplets*.

Eine Monomembran aus Phospholipiden umgibt den hydrophoben Kern, in welchem sich vor allem Neutrallipide (Triacylglyceride, Cholesterinester) befinden. Angelehnt an (RALHAN et al., 2021).

Die Darstellbarkeit der *Lipid Droplets* wurde durch die in Kapitel 3.2.5. methodisch beschriebene Fixier- und Färbemethode ermöglicht. Für die vergleichende Analyse der Aspartam- und Kontroll-Proben wurde die jeweilige Fläche der in den Zellpräparaten angefärbten *Lipid Droplets* ausgemessen und so eine durchschnittliche Fläche ermittelt. Hierfür wurden bei den Aspartam-Proben 36 elektronenmikroskopische Aufnahmen betrachtet, in welchen insgesamt 642 *Lipid Droplets* ausgemessen wurden; für die Kontrollen waren dies 59 Aufnahmen mit 834 *Lipid Droplets*. In den Aspartam-Proben zeigte sich eine intrazelluläre Akkumulation von *Lipid Droplets*, welche sich in ihrer durchschnittlichen Fläche mit 145,8 % signifikant größer als jene der auf 100 % Kontroll-Proben darstellten. Dieses Ergebnis war mit einem T-Test von $p \leq 0,001$ hochsignifikant (siehe Abbildung 9).

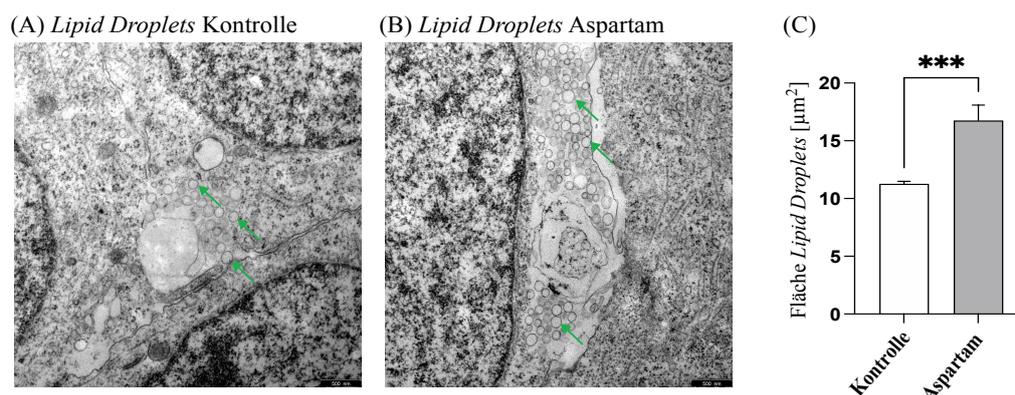


Abbildung 9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von *Lipid Droplets* in Kontroll- und Aspartam-Proben.

(A) Kontroll-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. *Lipid Droplets* werden exemplarisch durch die grünen Pfeile markiert. (B) Aspartam-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. *Lipid Droplets* werden exemplarisch durch die grünen Pfeile markiert. (C) Säulendiagramm zur vergleichenden Darstellung der durchschnittlichen Fläche der *Lipid Droplets* in Kontroll- und Aspartam-Proben. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Bei den Metabolite-Proben zeigte sich bei Betrachtung der Präparate ein ähnliches Bild zu jenen von Aspartam. Zur Analyse des Effektes der Metabolite auf *Lipid Droplets* wurden 18 Abbildungen betrachtet, in welchen insgesamt 605 *Lipid Droplets* ausgemessen wurden. Von den dazugehörigen Kontroll-Proben wurden 20 Abbildungen mit 579 *Lipid Droplets* analysiert.

Die durchschnittliche *Lipid Droplet*-Fläche bei den Metabolite-Proben betrug 131,7 % im Vergleich zu der auf 100 % gesetzten Kontroll-Proben. Auch dieses Ergebnis war mit einem T-Test $\leq 0,001$ signifikant (siehe Abbildung 10).

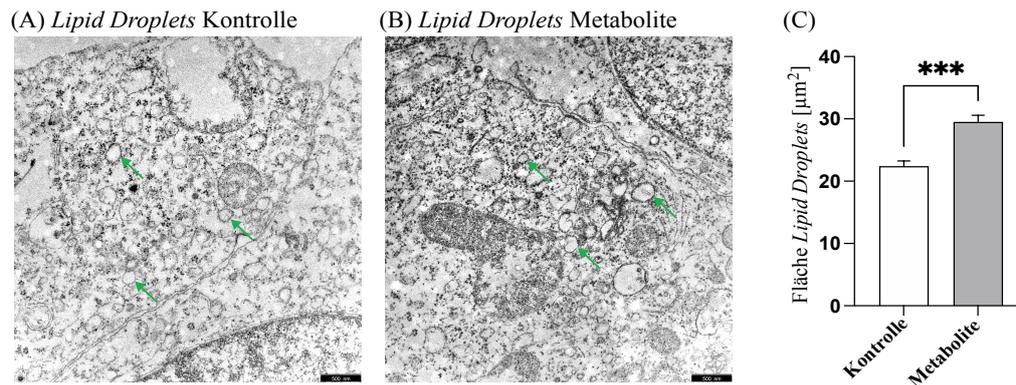


Abbildung 10: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von *Lipid Droplets* in Kontroll- und Metabolite-Proben.

(A) Kontroll-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. *Lipid Droplets* werden exemplarisch durch die grünen Pfeile markiert. (B) Metabolite-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. *Lipid Droplets* werden exemplarisch durch die grünen Pfeile markiert. (C) Säulendiagramm zur vergleichenden Darstellung der durchschnittlichen Fläche der *Lipid Droplets* in Kontroll- und Metabolite-Proben. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.1.2. Untersuchung der Mitochondrien

Für die vergleichende Analyse der Mitochondrien in Aspartam- oder Metabolite-Proben im Vergleich zu den Kontrollen wurde die Fläche der Mitochondrien – analog zu der Methode der *Lipid Droplets* (beschrieben in Kapitel 3.2.5.2) – ausgemessen und hieraus ein durchschnittlicher Wert ermittelt.

Bei den Präparaten der Aspartam-Proben wurde hierfür 35 Aufnahmen betrachtet, in welchen 275 Mitochondrien vermessen wurden. Bei den Kontroll-Präparaten waren es 41 Aufnahmen mit insgesamt 232 Mitochondrien. Es zeigte sich, dass bei Aspartam eine signifikante Vergrößerung der durchschnittlichen, mitochondrialen Fläche auf 123,0 % im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen ($p = 0,0187$) feststellbar war (siehe Abbildung 11). Zudem ließ sich ein struktureller Integritätsverlust der Organellen detektieren.

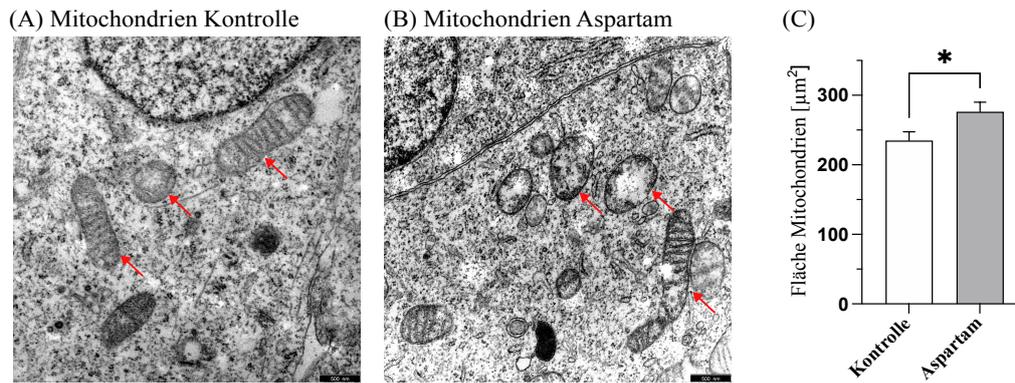


Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von Mitochondrien in Kontroll- und Aspartam-Proben.

(A) Kontroll-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. Mitochondrien werden exemplarisch durch die roten Pfeile markiert. (B) Aspartam-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. Mitochondrien werden exemplarisch durch die roten Pfeile markiert. (C) Säulendiagramm zur vergleichenden Darstellung der durchschnittlichen Fläche der Mitochondrien in Kontroll- und Aspartam-Proben. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Im Falle der Metabolite-Präparate wurden 29 Aufnahmen betrachtet, in welchen 198 Mitochondrien vermessen wurden. Analog hierzu wurden 28 Aufnahmen der Kontroll-Präparate betrachtet, in welchen insgesamt 177 Mitochondrien vermessen wurden. Auch hier zeigte sich eine Beeinflussung der mitochondrialen Durchschnittsfläche. Die Mitochondrien der Metabolite waren im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen signifikant auf 118,8 % vergrößert ($p = 0,0188$) (siehe Abbildung 12).

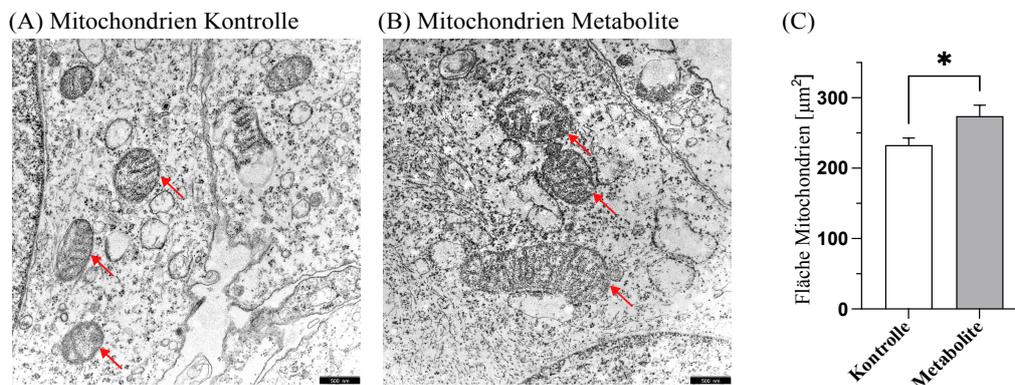


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung von Mitochondrien in Kontroll- und Metabolite-Proben.

(A) Kontroll-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. Mitochondrien werden exemplarisch durch die roten Pfeile markiert. (B) Metabolite-Proben bei 12.000-facher Vergrößerung. Mitochondrien werden exemplarisch durch die roten Pfeile markiert. (C) Säulendiagramm zur vergleichenden Darstellung der durchschnittlichen Fläche der Mitochondrien in Kontroll- und Metabolite-Proben. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.2. Einfluss von Aspartam und seinen Metaboliten auf die mitochondriale Integrität

Mitochondrien werden auch als die „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da in ihnen durch den Prozess der oxidativen Phosphorylierung die Gewinnung von ATP stattfindet (ZONG et al., 2016; SIEKEVITZ, 1957). Mit ihrem Aufbau aus einer zweifachen Lipiddoppelmembran haben die Mitochondrien eine im Vergleich zu anderen Organellen einzigartige Struktur. Die äußere Mitochondrienmembran (Engl.: *Outer Mitochondrial Membrane*, OMM) grenzt das Organell zum Zytoplasma hin ab. Die innere Mitochondrienmembran (Engl.: *Inner Mitochondrial Membrane*, IMM) grenzt an die mitochondriale Matrix im Inneren des Organells. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der sogenannte *Intermembranous Space*. Die OMM ist reich an Phosphatidylcholin (ca. 54 % aller OMM-Lipide) und Phosphatidylethanolamin (ca. 29 % aller OMM-Lipide). Die IMM zeigt mit ihrer Existenz verschiedener Protein(komplex)e, insbesondere jener der Atmungskette, sowie mit dem Vorhandensein des Glycerophospholipids Cardiolipin einen speziellen Aufbau (POULAKI, GIANNOULI, 2022; HORVATH, DAUM, 2013).

Cardiolipin – auch Diphosphatidylglycerin genannt – ist ein Glycerophospholipid, dessen „Rückgrat“ durch den dreiwertigen Alkohol Glycerin ($C_3H_5(OH)_3$) gebildet wird, von welchem die Hydroxyl/OH-Gruppen des C1 und C3-Atoms jeweils über eine Phosphatgruppe mit zwei Fettsäuren verestert sind. Eine Phosphatgruppe plus zwei Fettsäuren wird auch Phosphatidsäure genannt. Mit seinen insgesamt vier Fettsäureresten nimmt Cardiolipin eine konische/kegelförmige Form ein, die sich damit von der üblichen Struktur der Phospholipide mit zwei Fettsäureresten unterscheidet und bei einer Aneinanderreihung in Membranen zur Ausbildung von negativen Krümmungen führt (siehe Abbildung 13) (FALABELLA et al., 2021; HEINRICH et al., 2022k; HEINRICH et al., 2022e).

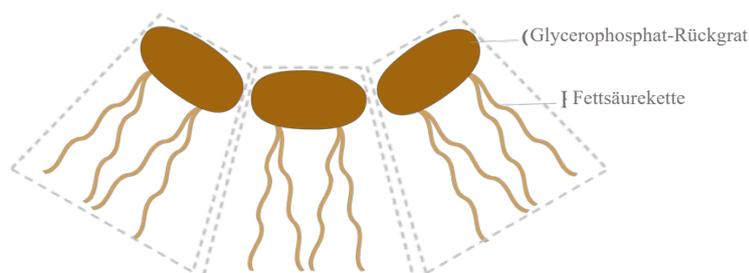


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus von Cardiolipin.

Das Rückgrat des Glycerophospholipids wird durch Glycerin gebildet. Dieses ist jeweils an seiner C1 und C3-Hydroxylgruppe über eine Phosphatgruppe mit zwei Fettsäuren verestert. Angelehnt an (FALABELLA et al., 2021).

Circa 10 – 15 % aller mitochondrialen Phospholipide werden durch Cardiolipin repräsentiert, welches zu einem überwiegenden Anteil in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist (BASU BALL et al., 2018; KREBS et al., 1979; COLBEAU et al., 1971). Hier ist es maßgeblich an der Stabilisierung der Komplexe der Atmungskette beteiligt (MILEYKOVSKAYA, DOWHAN, 2014; SCHWALL et al., 2012; PFEIFFER et al., 2003). So konnte für den Komplex IV der Atmungskette – der *Cytochrom-c-Oxidase* – in bovinen Myokardzellen eine Assoziation zu Cardiolipin nachgewiesen werden. Bei einer experimentell induzierten Hydrolyse des Cardiolipins durch die *Phospholipase A2* kam es sowohl zu einer Dissoziation der Komplex-IV-Untereinheiten im Sinne eines Verlustes der Quartärstruktur, als auch zu einer Abnahme der physiologischen Elektronentransportaktivität, welche für die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser benötigt wird (SEDLAK, ROBINSON, 1999; ROBINSON, 1993). In *Saccharomyces cerevisiae* konnten spezifische Bindestellen für Cardiolipin an Atmungsketten-Komplexen nachgewiesen werden (ARNAREZ et al., 2013).

Im Zusammenhang mit mitochondrialer Integrität muss auch der Begriff der Mitophagie definiert werden (VARGAS et al., 2023; KILLACKEY et al., 2020). Mitophagie ist eine Form der sogenannten selektiven (Makro)autophagie. Die Autophagie (Griech.: *auto* = selbst, *phagie* = Verdauung) beschreibt einen intrazellulären Prozess, bei dem verschiedene – für die Zelle nicht verwertbare oder potentiell gefährliche – zytosolische Bestandteile von einer Lipidmembran umschlossen und durch die Fusion mit Lysosomen enzymatisch durch Hydrolasen abgebaut werden (VARGAS et al., 2023; HE, KLIONSKY, 2009; DE DUVE, WATTIAUX, 1966). Dies wird durch die sogenannte Ubiquitinierung ermöglicht, bei welcher es zur Übertragung des Polypeptids Ubiquitin auf abzubauen Moleküle oder Organelle, wie beispielsweise Mitochondrien, Ribosomen, Peroxisomen, Glykogen, aggregierten Proteinen oder Ferritin kommt (VARGAS et al., 2023; HEINRICH et al., 2022f). Bei der Mitophagie im Spezifischen, werden dysfunktionale Mitochondrien selektiv gekennzeichnet und abgebaut, wodurch ihr zellschädigender Effekt reduziert werden kann (ONISHI et al., 2021; HAMACHER-BRADY, BRADY, 2016). Der Prozess der Mitophagie beinhaltet eine konservierte Signalkaskade, welcher im Folgenden skizziert werden soll: Die Initiierung der Mitophagie begründet sich darin, dass es bei beschädigten Mitochondrien zu einem Verlust des Membranpotentials kommt, was zu einer Stabilisierung der Kinase PINK1 (Engl.: *PTEN-induced Putative Kinase 1*) an der äußeren Mitochondrienmembran führt (JIN et al., 2010). Hier sorgt PINK1 für eine Phosphorylierung des Serins 65 (Ser65) von Ubiquitinketten, die sich an verschiedenen OMM-Proteinen befinden (KAZLAUSKAITE et al., 2014; KOYANO et al., 2014). Dadurch wird *Parkin*, eine E3 Ubiquitin Ligase, die an phosphorylierte Ser65-Ubiquitinketten bindet, aus dem Zytosol zu den Mitochondrien rekrutiert (KONDAPALLI et al., 2012). *Parkin*, das von PINK1 auch selbst an seiner Ser65 Domäne phosphoryliert wird, geht in einen aktiven Zustand über, in dem es nun verschiedene OMM-Proteine ubiquitiniert (ORDUREAU et al., 2014; SARRAF et al., 2013). Jene werden wiederum durch PINK1 phosphoryliert, was zur vermehrten Rekrutierung von *Parkin* zu den Mitochondrien führt. Dieser sich selbstverstärkende Mechanismus führt zur Rekrutierung und Stabilisierung verschiedener Rezeptorprotein-Komplexen zu und an den beschädigten Mitochondrien, wo sie mittels ihrer für Ubiquitin spezifischen Bindestelle an die Ubiquitinketten binden

können. So kann beispielsweise der aktivierte ULK1-Komplex über den NDP52-Adaptor seinerseits Mediatoren rekrutieren, die *De novo*-Biogenese der Isolationsmembran zu fördern, mit welcher das Mitochondrium schließlich eingeschlossen wird (KIRKIN, ROGOV, 2019; SHI et al., 2020).

In der hier vorliegenden Forschungsarbeit hatte sich in der elektronenmikroskopischen Analyse eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Ultrastruktur im Sinne einer Fragmentierung und damit einhergehenden Vergrößerung der mitochondrialen Gesamtläche gezeigt (genauer beschrieben in 4.1.2), weshalb im Folgenden auch der Aspekt der „mitochondrialen Spaltung“ genauer beschrieben werden soll.

Der Prozess der sogenannten mitochondrialen Spaltung (Engl.: *Mitochondrial Fission*) gilt als ein mit der Mitophagie im Zusammenhang stehender Mechanismus und ist an der dynamischen Regulation der Morphologie der Mitochondrien mitbeteiligt (ADEBAYO et al., 2021; BORDI et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; HAMACHER-BRADY, BRADY, 2016). Um die zelluläre Homöostase zu erhalten, initiieren die hoch stoffwechselaktiven Organellen bei Akkumulation von ROS bzw. Schädigung verschiedene Prozesse (HAMACHER-BRADY, BRADY, 2016): Einerseits kann es zur Einleitung der sogenannten Fusion, sprich der Vereinigung zweier dysfunktionaler Mitochondrien kommen, worauf im Folgenden aber nicht genauer eingegangen werden soll. Zum anderen kommt es zum Prozess der *Mitochondrial Fission*, d.h. der Spaltung eines geschädigten Mitochondriums in zwei separate Teile. Die *Fission* wird durch verschiedene Proteine mediiert: an der OMM sitzende Rezeptorproteine, wie Mff (Engl.: *Mitochondrial Fission Factor*) oder FIS1 (Engl.: *Mitochondrial Fission Protein 1*), rekrutieren die zytosolische GTPase Drp1 (Engl.: *Dynamitin Related Protein 1*) an die OMM. Dort angekommen, bildet sie eine ringartige Struktur um das Mitochondrium, und es erfolgt die GTP-Hydrolyse des Drp1. Das Protein DNM2 (Engl.: *Dynamitin 2*) wird in den kontrahierten Bereich rekrutiert, lagert sich dort an und vollendet schließlich die Teilung des Mitochondriums. Der Prozess der mitochondrialen Spaltung gilt als entscheidend, um geschädigte Mitochondrien mittels Mitophagie aus der Zelle zu entfernen (ADEBAYO et al., 2021; MISHRA, CHAN, 2016).

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die mitochondriale Integrität in verschiedenen Experimenten untersucht. Die hierbei involvierten Kooperationspartner sind in der folgenden Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Kooperationen im Rahmen der Untersuchung der mitochondrialen Integrität.

Experiment	Kooperationspartner
Inkubation der Zellen	Lea V. Griebisch Vincent K. J. Erhardt
Cardiolipin-Assay	Lea V. Griebisch Dr. rer. nat. Anna A. Lauer
APF-Assay	Lea V. Griebisch
Analyse der Genexpression (RNA-Isolation, cDNA-Synthese, rtPCR, Datenauswertung)	Lea V. Griebisch Vincent K. J. Erhardt Elodie C. Haas Dr. rer. nat. Anna A. Lauer Juliane Rademacher Oliver Walzer
Erstellung der Abbildungen	Lea V. Griebisch
Betreuung und Koordination des Projektes	Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm Prof. Dr. rer. nat. Heike Grimm

4.2.1. Untersuchung des Cardiolipin-Levels

Zur quantitativen Bestimmung der Cardiolipin-Konzentration in den Zelllysaten wurde ein auf Fluoreszenz basierendes Cardiolipin-Assay verwendet (siehe Kapitel 3.2.3.1). Hier zeigte das Cardiolipin-Level in den Proben der mit Aspartam inkubierten Zellen eine signifikante Reduktion auf $56,7 \% \pm 5,6 \%$ ($p = 0,011$) im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontroll-Zellen. Auch die Inkubation mit den Aspartam-Metaboliten führte zu einer Verminderung des Cardiolipin-Levels auf $77,9 \% \pm 11,8 \%$ ($p = 0,104$) (siehe Abbildung 14).

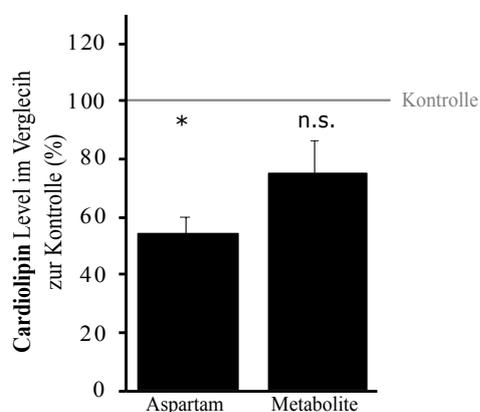


Abbildung 14: Fluoreszenzbasierte Bestimmung des zellulären Cardiolipin-Levels nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.

Die Säulendiagramme dienen der Darstellung der jeweiligen prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.2.2. Untersuchung der Genexpression von Mitochondrien-assoziierten Proteinen

Zur weiteren Analyse der Auswirkungen von Aspartam oder seinen Metaboliten auf die mitochondriale Integrität wurde die Genexpression des, im obenstehenden Kapitel 4.2, genauer beschriebenen, Mitophagie-vermittelnden Enzyms PINK1 sowie des die mitochondriale Spaltung vermittelnden Proteins FIS1 untersucht.

Die Genexpression von PINK1 war in den mit Aspartam inkubierten Proben signifikant auf $117,0 \% \pm 3,2 \%$ ($p \leq 0,001$) erhöht. Die Behandlung mit den Aspartam-Metaboliten resultierte in einer Erhöhung der Expression von PINK1 auf $110,9 \% \pm 8,5 \%$ ($p = 0,229$), jedoch ohne das statistische Signifikanzniveau zu erreichen (siehe Abbildung 15).

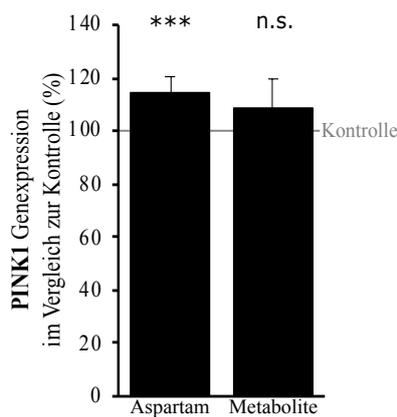


Abbildung 15: Mittels rtPCR gemessene Genexpression von PINK1 nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.

Die Säulendiagramme dienen der Darstellung der jeweiligen prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

FIS1 zeigt sich in seiner Genexpression sowohl bei den mit Aspartam als auch bei den mit Aspartam-Metaboliten behandelten Proben signifikant erhöht auf $123,5 \% \pm 4,2 \%$ ($p \leq 0,001$) bzw. $118,6\% \pm 4,0\%$ ($p \leq 0,001$), respektive (siehe Abbildung 16).

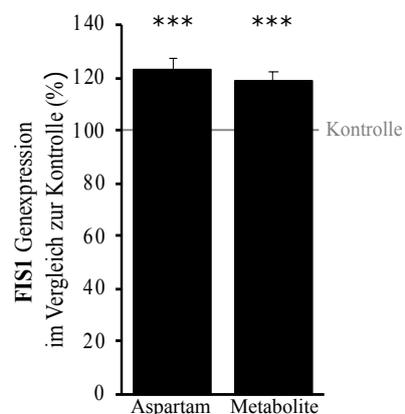


Abbildung 16: Mittels rtPCR gemessene Genexpression von FIS1 nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.

Die Säulendiagramme dienen der Darstellung der jeweiligen prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.3. Einfluss von Aspartam und seinen Metaboliten auf oxidativen Stress

Wie bereits im einleitenden Kapitel 2.2 beschrieben wurde, gelten Mitochondrien aufgrund der Tatsache, dass in ihnen die oxidative Phosphorylierung stattfindet, als einer der maßgeblicher Orte innerhalb der Zelle, an dem reaktive oxidative Spezies generiert werden (BALABAN et al., 2005). ROS lassen sich mit verschiedenen Methoden, welche in der hier vorliegenden Forschungsarbeit angewandt wurden, direkt und indirekt nachweisen.

4.3.1. Untersuchung der APF-Fluoreszenz

Zum quantitativen Nachweis von ROS wurde ein fluoreszenzbasiertes Assay mit *Aminophenylfluorescein* (APF) verwendet, welches ein Molekül ist, das bei Kontakt mit Sauerstoffradikalen ein Fluoreszenzsignal generiert (genaue Beschreibung siehe Kapitel 3.2.1.7). Die Zellproben, welche mit Aspartam inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals auf $114,7 \% \pm 4,0 \%$ ($p = 0,013$); die mit den Aspartam-Metaboliten inkubierten Zellen auf $118,2 \% \pm 6,2 \%$ ($p = 0,018$) (siehe Abbildung 17).

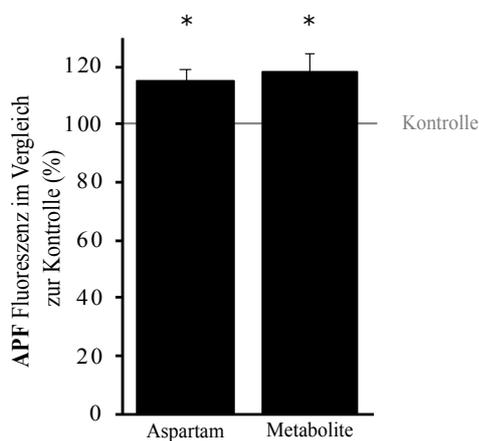


Abbildung 17: Fluoreszenzbasierte Bestimmung der zellulären APF-Levels nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.

Die Säulendiagramme dienen der Darstellung der jeweiligen prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.3.2. Untersuchung der Genexpression ROS-assoziiierter Enzyme

Um die Ergebnisse des APF-Assays auf einer weiteren molekularen Ebene zu bestätigen, wurde die Genexpression der antioxidativ wirkenden Enzyme der Gruppe der *Superoxiddismutasen* (SOD1, SOD2) mittels der Polymerase-Kettenreaktion überprüft (siehe Kapitel 3.2.4.4). Die *Superoxiddismutase 1* (SOD1) wird intrazellulär im Zytoplasma, die *Superoxiddismutase 2* (SOD2) in der mitochondrialen Matrix exprimiert (ZELKO et al., 2002). Beide Enzyme katalysieren dieselbe Reaktion: die Umwandlung zweier Superoxidradikale (O_2^-) zu einem Molekül Sauerstoff (O_2) und einem Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Letzteres kann in seiner ebenfalls schädigenden Wirkung dann durch die *Katalase* zu Wasser (H_2O) und einem halben Molekül Sauerstoff (O_2) abgebaut werden (siehe Abbildung 18) (HEINRICH et al., 2022g).

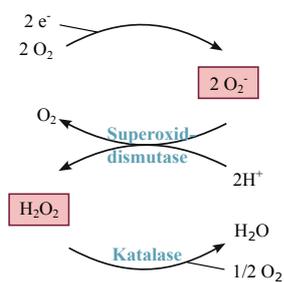


Abbildung 18: Schematische Darstellung der durch die *Superoxiddismutasen* katalysierte Reaktion. Angelehnt an (HEINRICH et al., 2022g).

Die Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten resultierte in einer Erhöhung der Genexpression beider *Superoxiddismutasen*, d.h. von SOD1 und SOD2. Aspartam führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von SOD1 auf $121,7 \% \pm 9,6 \%$ ($p = 0,047$) und SOD2 auf $176,9 \% \pm 11,1 \%$ ($p \leq 0,001$). Nach Inkubation mit den Aspartam-Metaboliten war die Expression von SOD1 auf $110,3 \% \pm 11,2 \%$ ($p = 0,048$) und SOD2 auf $163,1 \% \pm 8,5 \%$ ($p \leq 0,001$) erhöht (siehe Abbildung 19).

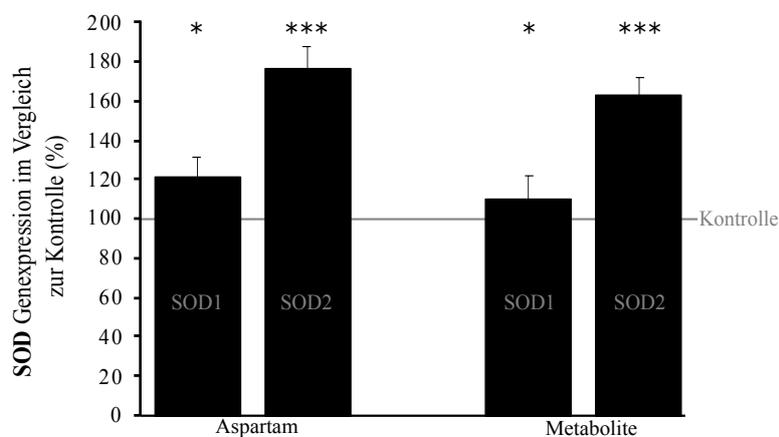


Abbildung 19: Mittels rtPCR gemessene Genexpression der Enzyme *Superoxiddismutase 1* (SOD1) und *Superoxiddismutase 2* (SOD2) nach Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten.

Die Säulendiagramme dienen der Darstellung der jeweiligen prozentualen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen den durchschnittlichen Standardfehler (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Für die Überprüfung, ob sich die Generierung der reaktiven oxidativen Spezies in Proportionalität zu der eingesetzten Aspartam-Konzentration verhält, wurde die Genexpression der *Superoxiddismutase 1* in Zellpräparaten verglichen, welche mit sich um den Faktor 10 unterscheidenden Konzentrationen inkubiert wurden. Im Vergleich zu den Kontrollpräparaten (0 μM Aspartam) zeigte sich für alle verwendeten Aspartam-Konzentrationen eine erhöhte SOD1-Genexpression. Zur Auswertung wurde die standardmäßig angewandte Aspartam-Konzentration (271,7 μM) auf 100 % gesetzt und die anderen beiden Konzentrationen mit ihren Veränderungen in Abhängigkeit hiervon berechnet. So zeigte sich für eine Inkubation mit 27,17 μM eine Erniedrigung der Genexpression auf $85,9\% \pm 4,3\%$ ($p = 0,039$), welche aber dennoch über jener der 0 μM Inkubation lag. Bei der Inkubation mit 2.717 μM Aspartam ließ sich eine relative Erhöhung der SOD1-Expression auf $115,3\% \pm 6,5\%$ ($p = 0,047$) detektieren (siehe Abbildung 20).

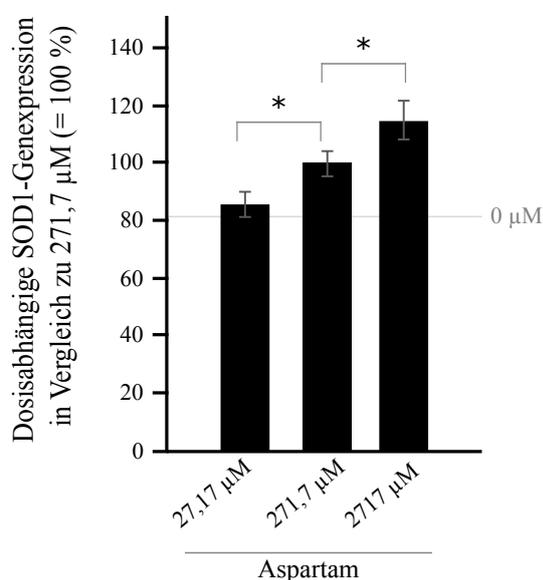


Abbildung 20: Mittels rtPCR gemessene Genexpression des Enzyms *Superoxiddismutase 1* (SOD1) nach Inkubation mit Aspartam in verschiedenen Konzentrationen.

Die Aspartam-Dosierungen wurden jeweils um den Faktor 10 erniedrigt (27,17 μM) bzw. erhöht (2.717 μM) und in Relation zur Konzentration von 271,7 μM gesetzt, die in dieser Studie durchgehend verwendet wurde. Die Normalisierung erfolgte auf eine Konzentration von 0 μM . Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.4. Einfluss von Aspartam und seinen Metaboliten auf die Lipidhomöostase

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich eine Vermehrung von *Lipid Droplets* in den Präparaten der mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten behandelten Zellen. Um jene Ergebnisse genauer zu spezifizieren und herauszufinden, inwiefern bestimmte Lipidklassen oder -subspezies von diesen Effekten betroffen sind, wurde eine semi-quantitative massenspektrometrische Lipidanalyse, welche mehr als 100 verschiedene Parameter untersuchte, durchgeführt (genaue Beschreibung siehe Kapitel 3.2.3).

Hierbei lag der Fokus zum einen auf Phospholipiden, welche als die wichtigste Lipidklasse der verschiedenen zellulären Membranen gelten. Zum anderen erfolgte die Analyse von Neutrallipiden, wie Triacylglyceriden und Carnitinen, welche insbesondere im Energiehaushalt der Zelle relevant sind.

Die bei den Untersuchungen der Lipidhomöostase involvierten Kooperationspartner sind in der folgenden Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Kooperationen im Rahmen der Untersuchung der Lipidhomöostase

Experiment	Kooperationspartner
Inkubation der Zellen	Lea V. Griebisch Elena L. Theiss
Lipidextraktion	Lea V. Griebisch Dr. rer. nat. Anna A. Lauer Elena E. Theiss
Durchführung der Massenspektrometrie sowie Datenextraktion	Lea V. Griebisch Daniel Janitschke Dr. rer. nat. Anna A. Lauer
Statistische Auswertung	Lea V. Griebisch Daniel Janitschke Dr. rer. nat. Anna A. Lauer
Erstellung der Abbildungen	Lea V. Griebisch Elena L. Theiss
Betreuung und Koordination des Projektes	Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm Prof. Dr. rer. nat. Heike Grimm

4.4.1. Untersuchung der Triacylglycerid-Spezies

Triacylglyceride (TAGs) spielen eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus: Sie gelten als der mengenmäßig größte Energiespeicher des menschlichen Organismus und kommen in den Zellen verschiedenster Gewebe vor. In diesen können die Triacylglyceride, unter anderem in *Lipid Droplets* (siehe Kapitel 4.1.1), gespeichert und in Zeiten des Energiemangels mittels Lipolyse zu energiereichen Substraten abgebaut werden. Strukturell setzt sich ein Triacylglycerid-Molekül aus dem dreiwertigen Alkohol Glycerin ($C_3H_5(OH)_3$) zusammen, welches über jede seiner Hydroxylgruppen mit je einer Fettsäure verestert ist (siehe Abbildung 21) (HEINRICH et al., 2022d; HEINRICH et al., 2022c).

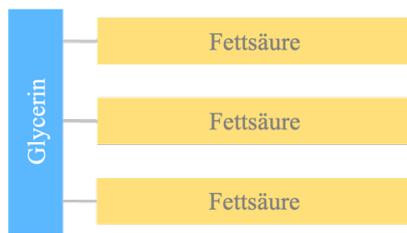


Abbildung 21: Schematischer Aufbau eines Triacylglycerids.

Das Rückgrat des Triacylglycerids wird durch Glycerin gebildet, welches an seinen C1-, C2- und C3-Hydroxylgruppen jeweils mit einer Fettsäure verestert ist. Angelehnt an (BERG et al., 2014b).

In der massenspektrometrischen Untersuchung der Zellpräparate wurden insgesamt 18 Triacylglycerid-Subspezies analysiert. Bei diesen handelte es sich um TAG C48:0, C50:0, C50:1, C50:2, C50:3, C52:0, C52:1, C52:2, C52:3, C52:4, C52:5, C52:6, C54:2, C54:3, C54:4, C54:5, C54:8 und C58:3. Der Mittelwert der in diesen Subspezies gemessenen Veränderungen zeigte in den Zellen, welche mit Aspartam behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung auf $166,8 \% \pm 19,3\%$ ($p \leq 0,001$). Die Behandlung mit den Aspartam-Metaboliten resultierte in einer Erhöhung des Mittelwertes auf $112,4\% \pm 9,9\%$ ($p = 0,014$). Hierbei zeigten die jeweilige Veränderung von Aspartam bzw. den Metaboliten auch einen hoch signifikanten Unterschied untereinander ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 22).

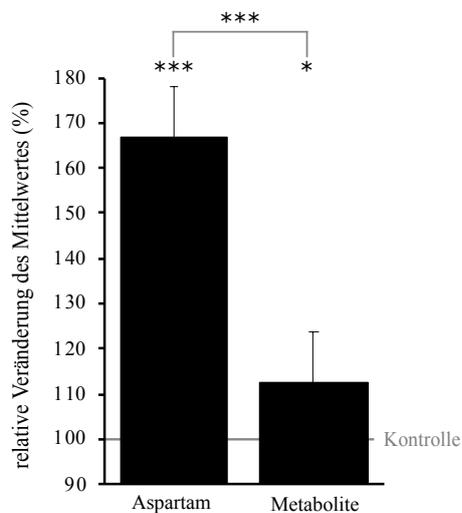


Abbildung 22: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Subspezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontrollzellen.

Das Balkendiagramm zeigt die relative Veränderung aller gemessenen Triacylglycerid-Subspezies nach Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

In einem *Vulcano Plot* lässt sich auf anschauliche Art und Weise die Verteilung der verschiedenen Triacylglycerid-Subspezies darstellen. Jede Lipid-Subspezies wird im Diagramm durch einen Punkt repräsentiert, welcher in Abhängigkeit von seiner Veränderung (x-Achse) und dem p-Wert (y-Achse) aufgetragen ist. Die Lipid-Subspezies der Aspartam-Proben wurden in Rosatönen dargestellt; jene der Aspartam-Metaboliten in Blautönen.

Im *Vulcano Plot* der TAG-Spezies (siehe Abbildung 23) lässt sich auf den ersten Blick erkennen, dass die Lipid-Subspezies nach der Aspartam-Inkubation eine Tendenz nach rechts, respektive eine relative Erhöhung aufzeigen: alle Subspezies waren oberhalb des mittleren Standardfehlers erhöht. Dies lässt sich im *Vulcano Plot* daran erkennen, dass sie rechts der vertikalen, gestrichelten Linie liegen. Einige Lipid-Subspezies erreichten sogar das Signifikanzniveau – sie liegen oberhalb der waagerechten gestrichelten Linie (TAG C48:0, C50:1, C50:2, C50:3, C52:0, C52:2, C52:3, C52:4, C52:5, C52:6, C54:2, C54:3, C54:4, C54:5). Die Subspezies nach Metaboliten-Inkubation zeigten ein etwas balancierteres Bild: Einige Subspezies waren kaum verändert und lagen mit ihrer Veränderung unterhalb des mittleren Standardfehlers. Im Diagramm sind sie zwischen den beiden vertikalen, gestrichelten Linie lokalisiert (TAG C50:0, C50:1, C50:2, C50:3, C52:1, C52:2, C52:3, C52:5, C54:3 und C58:3). Weniger Lipid-Subspezies waren über den mittleren Standardfehler erniedrigt (TAG C54:4) bzw. erhöht (TAG C48:0, C52:0, C52:4, C52:6, C54:2, C54:5 und C54:8). Hiervon erreichten einige das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 24).

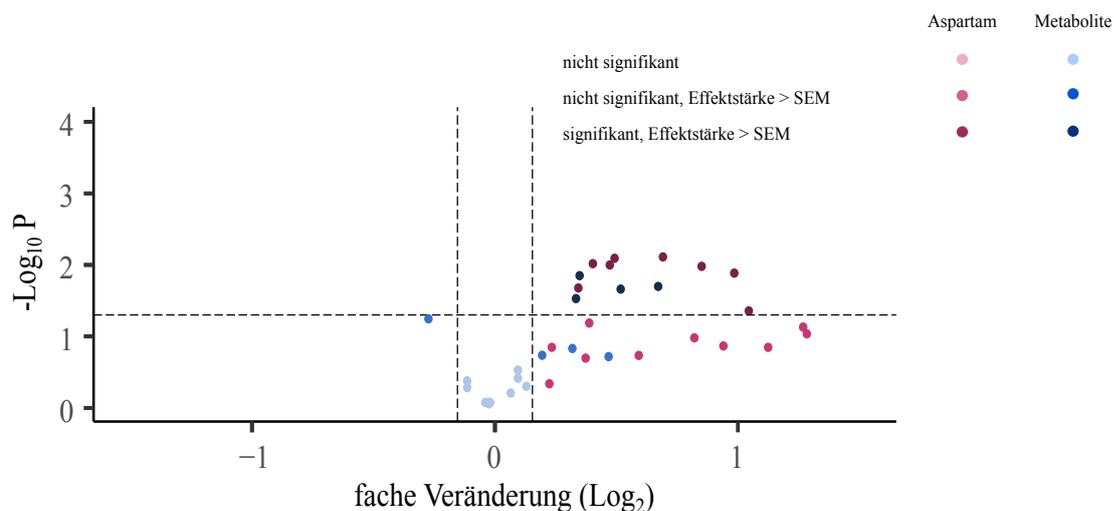


Abbildung 23: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Im *Vulcano Plot* ist jede Triacylglycerid-Subspezies durch einen rosa Punkt (nach Aspartam-Behandlung) oder blauen Punkt (nach Aspartam-Metabolite-Behandlung) repräsentiert. Dieser ist mit seiner Veränderung (x-Achse) gegen den entsprechenden p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Hellblaue und hellrosa Punkte stellen keine signifikante Veränderung dar. Mittelrosa oder mittelblaue Punkte repräsentieren eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, jedoch ohne das festgelegte Signifikanzniveau zu erreichen. Dunkelrosa oder dunkelblaue Punkte stehen für eine Veränderung, die größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisches Signifikanzniveau definiert. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

In den Aspartam-Proben zeigten alle der 18 vermessenen TAG-Subspezies eine Erhöhung mit einer Effektstärke größer als der mittlere Standardfehler (SEM). Hiervon erreichten acht Subspezies (TAG C48:0, C50:1, C50:2, C50:3, C52:0, C52:3, C52:5 und C52:6) das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. In den Zellen der Aspartam-Metabolite waren sieben Subspezies mit einer Effektstärke größer der SEM erhöht, wovon vier Spezies (TAG C48:0, C52:6, C54:2 und C54:5) einen p -Wert $\leq 0,05$ erreichten. Eine einzige Triacylglycerid-Subspezies – TAG C54:4 – zeigte nach Behandlung mit den Aspartam-Metaboliten eine Erniedrigung oberhalb der SEM zu $82,9 \% \pm 8,1 \%$ ($p = 0,059$).

Im folgenden Ergebnisteil soll bei den Lipid-Subspezies definitiv immer dann von einer Erhöhung bzw. Erniedrigung gesprochen werden, wenn die hierfür gemessene Effektstärke im Vergleich zu den Kontroll-Proben größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist. Liegt die gemessene Veränderung innerhalb der SEM, wurde die jeweilige Lipid-Subspezies als „unverändert“ definiert.

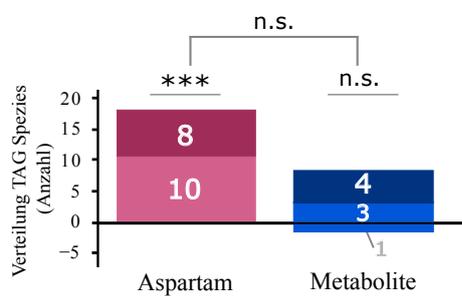


Abbildung 24: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Verteilungsdiagramm zur Darstellung der Anzahl erhöhter (y -Achse > 1) und erniedrigter (y -Achse < 1) Triacylglycerid-Subspezies. Der Anteil der Säule, welcher in mittelrosa oder mittelblau eingefärbt ist, repräsentiert jene Subspezies deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, aber nicht das Signifikanzniveau erreicht. Jener Teil der Säule, der dunkelrosa oder dunkelblau gefärbt ist, steht für die Subspezies, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p -Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Insgesamt ließen sich bei den in den TAG-Spezies gemessenen Effekten Ähnlichkeiten zwischen Aspartam und den Aspartam-Metaboliten erkennen: So waren sieben der insgesamt 18 vermessenen TAG-Subspezies nach beiden Behandlungen erhöht. Hierbei handelte es sich um TAG C48:0, C52:0, C52:4, C52:6, C54:2, C54:5 und C54:8. Hervorzuheben ist hier TAG 52:4, welches anteilig unter allen TAG-Subspezies prozentual besonders häufig vorkommt – in den Proben nach Aspartam-Inkubation zeigte es unter allen TAG-Subspezies einen Anteil von 24,9 %, in den Metabolite-Zellen von 18,7 % (siehe Abbildung 25).

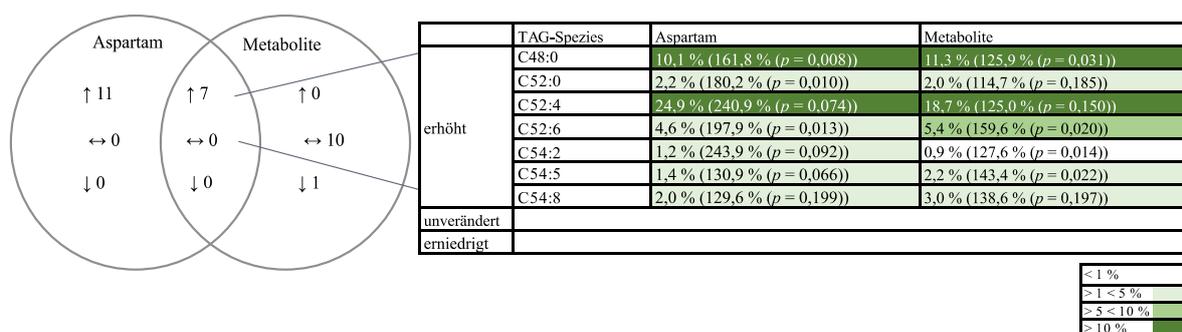


Abbildung 25: Massenspektrometrische Lipidomics Analyse zur Bestimmung von Triacylglycerid-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Venn-Diagramm zur vergleichenden Analyse der einzelnen Triacylglycerid-Subspezies. Als *erhöht* (\uparrow) oder *erniedrigt* (\downarrow) wurden jene Subspezies definiert, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist. *Unverändert* sind jene Subspezies, welche ihre Veränderung innerhalb des mittleren Standardfehlers (SEM) liegend haben. Lipid-Subspezies, bei denen sowohl nach Behandlung mit Aspartam als auch mit Aspartam - Metaboliten für die gemessene Veränderung dieselbe Tendenz existiert, sind im überlappenden Teil des Venn-Diagramms aufgeführt. In der nebenstehenden Tabelle sind diese nochmal genauer definiert. Hier ist aufgeführt, wie viel prozentualen Anteil die jeweilige Triacylglycerid-Subspezies an allen Triacylglycerid-Subspezies ausmacht. Triacylglycerid-Subspezies mit weniger als ein Prozent am Gesamtanteil sind in weiß hinterlegt, jene mit eins bis fünf Prozent in hellgrün, jene mit fünf bis zehn Prozent in mittelgrün und bei mehr als zehn Prozent am Gesamtanteil in dunkelgrün. In Klammer ist die jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen inklusive ihres dazugehörigen p-Wertes angegeben. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.4.2. Untersuchung der Phospholipid-Spezies

Phospholipide gelten als wichtige Strukturlipide, da sie die Hauptkomponente der Lipiddoppelschicht der äußeren Zellmembran darstellen (VAN DER VEEN et al., 2017). Darüber hinaus sind sie auch bei vielen weiteren intrazellulären Organellen, wie beispielsweise der Mitochondrien, der *Lipid Droplets* oder des Zellkerns membranbildend (OLZMANN, CARVALHO, 2019; HARAYAMA, RIEZMAN, 2018; VANCE, 2015) (siehe Kapitel 4.1.1).

Die Struktur eines Phospholipid-Moleküls setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen (siehe Abbildung 26). Exemplarisch soll dies anhand eines Glycerophospholipids, dem anteilig am häufigsten vorkommenden Phospholipid, veranschaulicht werden. Das strukturelle Rückgrat wird durch den dreiwertigen Alkohol Glycerin mit seinen drei Hydroxylgruppen (-OH) gebildet. An der C1- und C2-Hydroxylgruppe, auch *sn-1*- und *sn-2*-Position genannt, erfolgt mit je einer Fettsäure eine Veresterung über deren Acylgruppe (Carboxylgruppe, -COOH). An der C3-Hydroxylgruppe des Glycerins erfolgt eine Veresterung mit Phosphorsäure; das hierbei entstandene Phospholipid heißt demnach auch Phosphoglycerid. Häufig ist die Phosphatgruppe ihrerseits noch mit einem weiteren Alkohol, wie Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol, verestert. Folglich entstehen hierbei Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin oder -inositol.

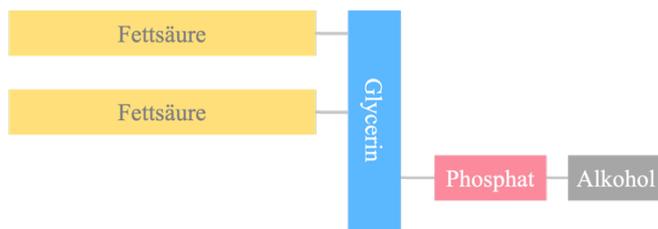


Abbildung 26: Schematischer Aufbau eines Phospholipids. Exemplarisch dargestellt anhand eines Phosphoglycerids.

Das Rückgrat des Phospholipids wird durch Glycerin gebildet, welches an seiner C1- und C2-Hydroxylgruppe jeweils mit einer Fettsäure verestert ist. An der C3-Hydroxylgruppe besteht eine Esterbindung mit Phosphorsäure, die ihrerseits häufig mit einem weiteren Alkohol verestert ist. Angelehnt an (BERG et al., 2014b).

Glycerin, Phosphatgruppe und organischer Rest bilden die hydrophile „Kopfgruppe“ des Phospholipids; die beiden Fettsäuren den hydrophoben „Rest“. Das Molekül ist also amphiphil. Im wässrigen Milieu lagern sich die Phospholipide spontan in sogenannten Lipiddoppelschichten zusammen, in welchen sich jeweils zwei Phospholipide mit ihren Fettsäure-Resten senkrecht gegenüberstehen. Der eine hydrophile Phosphatkopf zeigt so nach außen zum Extrazellulärraum, der zweite Phosphatkopf grenzt an den Intrazellulärraum (siehe Abbildung 27) (BERG et al., 2014a).

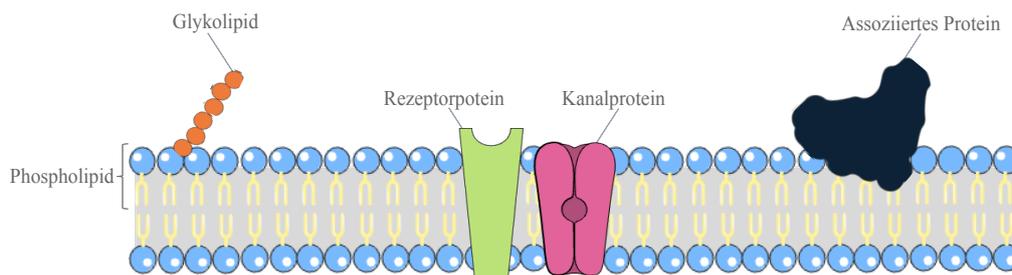


Abbildung 27: Schematischer Aufbau einer Lipiddoppelschicht.

Den Grundbaustein der Lipiddoppelschicht bilden die amphiphilen Phospholipide. Diese lagern sich in einer Doppelschicht an, in der die hydrophoben Fettsäureketten sich gegenüberstehen und die polaren Kopfgruppen nach außen ragen. Es existieren verschiedene membranassoziierte Moleküle wie bspw. Kanalproteine, Rezeptorproteine oder Glykolipide, welche die Doppelmembran durchspannen oder an diese angelagert sind. Angelehnt an (HARAYAMA, RIEZMAN, 2018).

Die am häufigsten in kernhaltigen Säugetierzellen vorkommenden Phospholipid-Spezies sind Phosphatidylcholin (45 – 55 %) und Phosphatidylethanolamin (15 – 25 %) (VANCE, 2015). *Lipidomics*-Analysen in menschlichen Gehirnen zeigten analog hierzu für Phosphatidylcholin einen Anteil von 32,8 %, für Phosphatidylethanolamin von 35,6 %, sowie für Phosphatidylserin von 16,6 % (NAUDI et al., 2015). Auch in den, in der hier vorliegenden Studie untersuchten, SH-SY5Y Neuroblastom-Zellen wurden Phosphatidylcholin-, ethanolamin- und serin mit 54,7 %, 17,8 % und 4,7 % als die anteilig häufigsten Phospholipid-Klassen identifiziert (JAKUBEC et al., 2019).

4.4.2.1. Phosphatidylcholin diacyl (acylacyl)

In der massenspektrometrischen Untersuchung wurden insgesamt 43 Phosphatidylcholin-Subspezies untersucht. Diese waren PC aa C20:0, C24:0, C26:0, C28:0, C28:1, C30:0, C30:2, C32:0, C32:1, C32:2, C32:3, C34:1, C34:2, C34:3, C34:4, C36:0, C36:1, C36:2, C36:3, C36:4, C36:5, C36:6, C38:0, C38:1, C38:3, C38:4, C38:5, C38:6, C40:0, C40:1, C40:2, C40:3, C40:4, C40:5, C40:6, C42:0, C42:1, C42:2, C42:4, C42:5, C42:6, C44:0, C48:0.

Der aus der jeweiligen Veränderung jeder Phosphatidylcholin-Subspezies gebildete Mittelwert ergab für die mit Aspartam inkubierten Zellen eine signifikante Erhöhung auf $118,7 \% \pm 8,1 \%$ ($p \leq 0,001$); der Mittelwert der mit den Aspartam-Metaboliten inkubierten Zellen auf $105,0 \% \pm 6,4\%$ ($p \leq 0,001$). Hier zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inkubationsbedingungen ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 28).

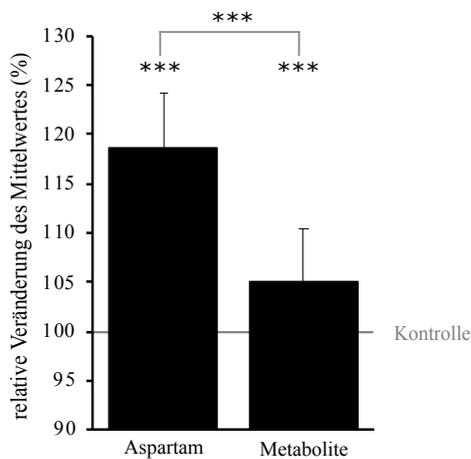


Abbildung 28: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Das Balkendiagramm zeigt die relative Veränderung aller gemessenen Phosphatidylcholin-Subspezies nach Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Bei Betrachtung des *Vulcano Plots* ließ sich der im Mittelwert beobachtete Effekt noch genauer spezifizieren (siehe Abbildung 29). Bei beiden Inkubationsbedingungen zeigte sich der Trend einer Erhöhung: Bei den Metaboliten waren im Vergleich zu Aspartam jedoch geringere Effektstärken und Signifikanzwerte erkennbar.

Bei den Subspezies nach Metaboliten-Inkubation zeigten 35 nur eine geringe – also innerhalb des mittleren Standardfehlers liegende – Erhöhung bzw. Erniedrigung. Acht Subspezies erreichten eine Erhöhung oberhalb des SEM.

Nach Aspartam-Inkubation zeigte sich bei nur vier Subspezies eine geringe Veränderung (PC aa C20:0, C24:0, C26:0 und C44:0). Alle anderen 39 Subspezies waren oberhalb des SEM liegend erhöht (siehe

auch Abbildung 30). Hervorzuheben sind die nach Aspartam-Inkubation gemessenen Veränderungen der Phosphatidylcholin-Subspezies C30:0 und C28:0, die mit einer Erhöhung auf $127,0\% \pm 7,2\%$ ($p = 0,009$) und $137,8\% \pm 8,9\%$ ($p = 0,005$) eine besonders hohe Effektstärke zeigten.

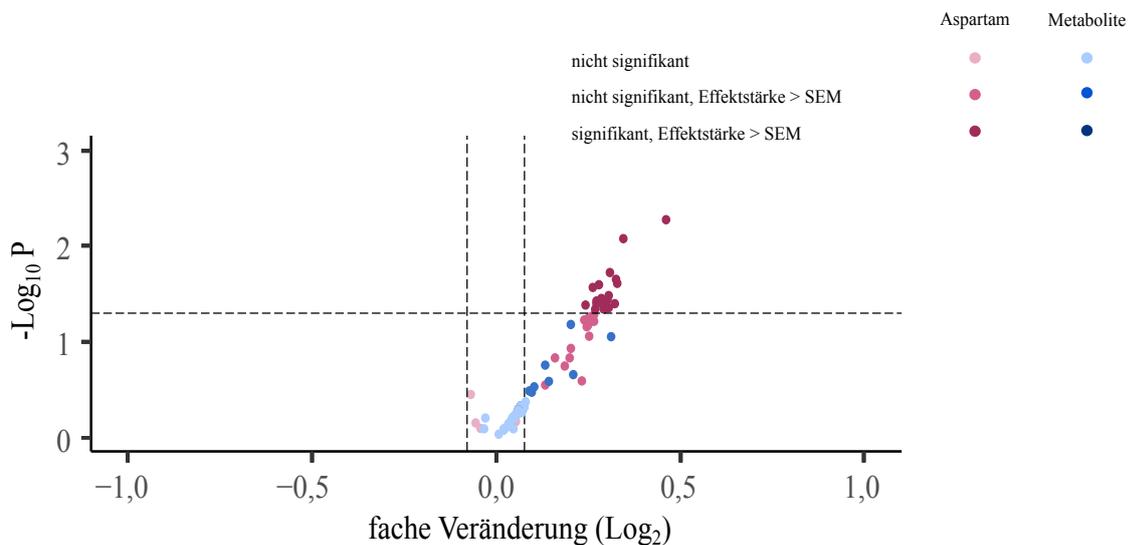


Abbildung 29: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Subspezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Im *Vulcano Plot* ist jede Phosphatidylcholin-Subspezies durch einen rosa Punkt (nach Aspartam-Behandlung) oder blauen Punkt (nach Aspartam-Metabolite-Behandlung) repräsentiert. Dieser ist mit seiner Veränderung (x-Achse) gegen den entsprechenden p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Hellblaue und hellrosa Punkte stellen keine signifikante Veränderung dar. Mittelrosa oder mittelblaue Punkte repräsentieren eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, jedoch ohne das festgelegte Signifikanzniveau zu erreichen. Dunkelrosa oder dunkelblaue Punkte stehen für eine Veränderung, die größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisches Signifikanzniveau definiert. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Die Inkubation mit Aspartam resultierte bei 39 der insgesamt 43 vermessenen Phosphatidylcholin-Subspezies in einer oberhalb des mittleren Standardfehlers (SEM) liegenden Erhöhung. Hiervon zeigten 22 Subspezies einen p-Wert kleiner gleich 0,05 – sie erreichten also das statistische Signifikanzniveau (siehe Abbildung 30). Bei diesen handelte es sich um PC aa C28:0, C30:0, C30:2, C32:0, C32:1, C32:2, C34:1, C34:2, C34:3, C34:4, C36:2, C36:3, C38:3, C38:6, C40:0, C40:2, C40:3, C40:4, C40:5, C42:4, C42:5 und C42:6.

In den Proben der Aspartam-Metaboliten zeigte sich eine Erhöhung von acht PC-Subspezies (PC aa C24:0, C26:0, C28:1, C34:4, C36:5, C40:0, C40:6 und C42:1), wovon jedoch keine das definierte statistische Signifikanzniveau erreichten.

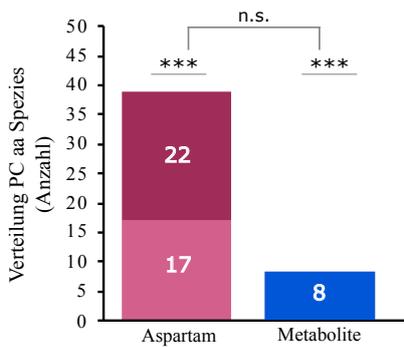


Abbildung 30: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Verteilungsdiagramm zur Darstellung der Anzahl erhöhter (y-Achse > 1) und erniedrigter (y-Achse < 1) Phosphatidylcholin-Subspezies. Der Anteil der Säule, welcher in mittelrosa oder mittelblau eingefärbt ist, repräsentiert jene Subspezies deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, aber nicht das Signifikanzniveau erreicht. Jener Teil der Säule, der dunkelrosa oder dunkelblau gefärbt ist, steht für die Subspezies, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Im direkten Vergleich der einzelnen Phosphatidylcholin-Subspezies zeigte sich, dass sechs Subspezies sowohl nach Aspartam-, als auch nach Behandlung mit Aspartam-Metaboliten erhöht waren (siehe Abbildung 31). Hierbei handelte es sich um PC aa C28:1, C34:4, C36:5, C40:0, C40:6 und C42:1. Bei beiden Inkubationsbedingungen machten die Subspezies jeweils nur einen Anteil von unter ein Prozent aller vermessenen Phosphatidylcholin-Subspezies aus. Lediglich PC C40:6 zeigte einen Anteil von knapp über einem Prozent (1,27 % in den Aspartam-Proben bzw. 1,34 % in Aspartam-Metabolite-Proben). Auch unter den als „unverändert“ definierten Subspezies gab es mit PC aa C20:0 und C44:0 Überschneidungen zwischen beiden Inkubationsbedingungen.

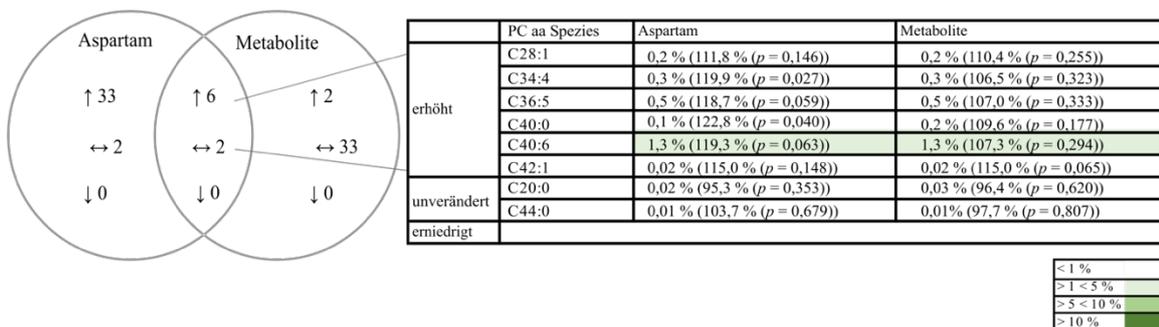


Abbildung 31: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylcholin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Venn-Diagramm zur vergleichenden Analyse der einzelnen Phosphatidylcholin-Subspezies. Als *erhöht* (\uparrow) oder *erniedrigt* (\downarrow) wurden jene Subspezies definiert, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist. *Unverändert* sind jene Subspezies, welche ihre Veränderung innerhalb des mittleren Standardfehlers (SEM) liegend haben. Lipidsubspezies, bei denen sowohl nach Behandlung mit Aspartam als auch mit Aspartam - Metaboliten für die gemessene Veränderung dieselbe Tendenz existiert, sind im überlappenden Teil des Venn-Diagramms aufgeführt. In der nebenstehenden Tabelle sind diese nochmal genauer definiert. Hier ist aufgeführt, wie viel prozentualen Anteil die jeweilige Phosphatidylcholin-Subspezies an allen Phosphatidylcholin-Subspezies ausmacht. Phosphatidylcholin-Subspezies mit weniger als ein Prozent am Gesamtanteil sind in weiß hinterlegt, jene mit eins bis fünf Prozent in hellgrün, jene mit fünf bis zehn Prozent in mittelgrün und bei mehr als zehn Prozent am Gesamtanteil in dunkelgrün. In Klammer ist die jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen inklusive ihres dazugehörigen p-Wertes angegeben. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.4.2.2. Phosphatidylethanolamin diacyl (acylacyl)

Die Untersuchung der Phosphatidylethanolamin-Subspezies ergab eine signifikante Erhöhung des aus allen vermessenen Subspezies gebildeten Mittelwertes. Durch die Inkubation mit Aspartam lag dieser bei $138,5 \% \pm 11,8 \%$ ($p \leq 0,001$), durch die Inkubation mit Aspartam-Metaboliten sogar bei $144,0 \% \pm 13,9 \%$ ($p \leq 0,001$). Hierbei zeigte sich im Mittelwert kein statistischer Unterschied zwischen Aspartam und den Aspartam-Metaboliten (siehe Abbildung 32).

Insgesamt wurden 35 Phosphatidylethanolamin-Subspezies vermessen. Diese waren PE aa C32:0, C32:1, C32:2, C34:0, C34:1, C34:2, C34:3, C34:4, C36:0, C36:1, C36:2, C36:3, C36:4, C36:5, C36:6, C38:0, C38:1, C38:2, C38:3, C38:4, C38:5, C38:6, C40:0, C40:1, C40:2, C40:3, C40:4, C40:5, C40:6, C42:0, C42:1, C42:2, C42:4, C42:5 und C42:6.

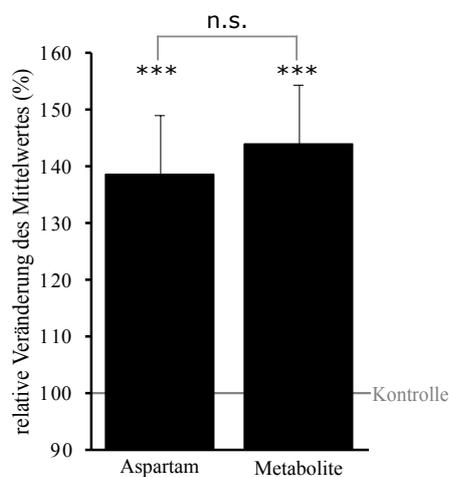


Abbildung 32: Massenspektrometrische Lipidomics-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Subspezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Das Balkendiagramm zeigt die relative Veränderung aller gemessenen Phosphatidylethanolamin-Subspezies nach Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Bei Betrachtung des *Vulcano Plots* verfestigt sich der, in der Bestimmung des Mittelwertes, gewonnene Eindruck (siehe Abbildung 33). Keine der vermessenen Subspezies zeigte eine innerhalb des SEM liegende Veränderung. Sowohl bei Aspartam als auch bei Aspartam-Metaboliten ließ sich für jede der vermessenen PE-Subspezies eine oberhalb des SEM liegende Erhöhung erkennen. Hierbei erreichten bei Aspartam 20 Subspezies das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 34). Eine besonders hohe Effektstärke zeigten PE aa C40:0 mit $194,5 \% \pm 13,9 \%$ ($p = 0,002$), PE aa C40:1 mit $185,2 \% \pm 12,4 \%$ ($p = 0,001$) und PE aa C42:4 mit $179,9 \% \pm 12,0 \%$ ($p = 0,001$). Bei den Aspartam-Metaboliten erreichten 14 Subspezies das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 34). Besonders hervorzuheben sind hier PE aa C40:2 mit $170,5 \pm 13,9 \%$ ($p = 0,008$), sowie PE aa C42:0 mit $163,1 \% \pm 13,1 \%$ ($p = 0,010$).

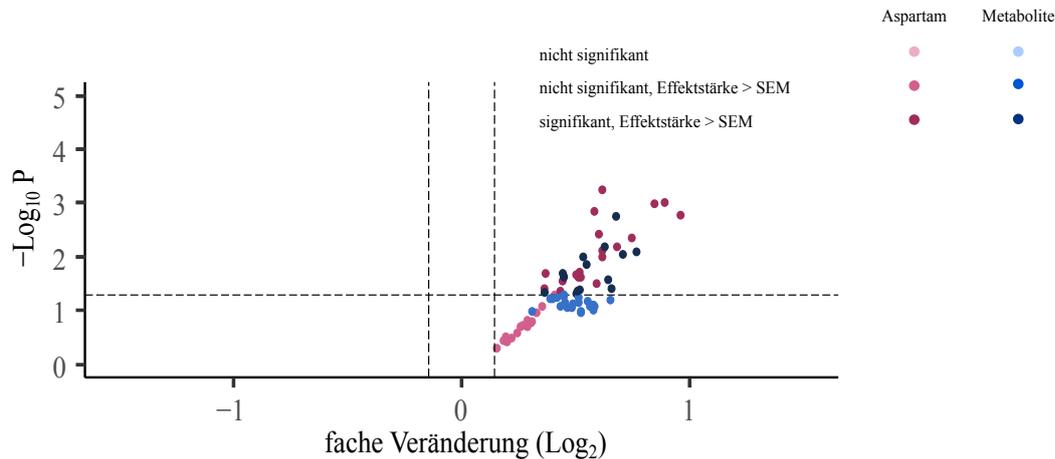


Abbildung 33: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Im *Vulcano Plot* ist jede Phosphatidylethanolamin-Subspezies durch einen rosa Punkt (nach Aspartam-Behandlung) oder blauen Punkt (nach Aspartam-Metabolite-Behandlung) repräsentiert. Dieser ist mit seiner Veränderung (x-Achse) gegen den entsprechenden p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Hellblaue und hellrosa Punkte stellen keine signifikante Veränderung dar. Mittelrosa oder mittelblaue Punkte repräsentieren eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, jedoch ohne das festgelegte Signifikanzniveau zu erreichen. Dunkelrosa oder dunkelblaue Punkte stehen für eine Veränderung, die größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisches Signifikanzniveau definiert. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

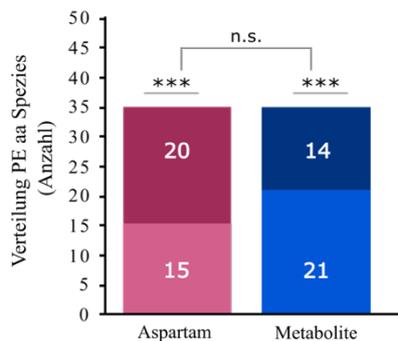


Abbildung 34: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Verteilungsdiagramm zur Darstellung der Anzahl erhöhter (y-Achse > 1) und erniedrigter (y-Achse < 1) Phosphatidylethanolamin-Subspezies. Der Anteil der Säule, welcher in mittelrosa oder mittelblau eingefärbt ist, repräsentiert jene Subspezies deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, aber nicht das Signifikanzniveau erreicht. Jener Teil der Säule, der dunkelrosa oder dunkelblau gefärbt ist, steht für die Subspezies, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Im direkten Vergleich zwischen Aspartam und Aspartam-Metaboliten ließen sich diese Ergebnisse für die jeweiligen Phosphatidylethanolamin-Subspezies weiter spezifizieren (siehe Abbildung 35). Wie im *Vulcano Plot* bereits ersichtlich wurde (siehe Abbildung 33), zeigten alle der insgesamt 35 vermessenen Subspezies sowohl nach Aspartam-Behandlung als auch nach der mit den Metaboliten eine über des mittleren Standardfehlers liegende Erhöhung.

Bei der anteiligen Betrachtung der PE-Subspezies an allen vermessenen PE-Subspezies ließen sich solche erkennen, die besonders häufig vorkamen. Diese waren die Subspezies PE C34:1 (Aspartam: 10,9 %, Metabolite: 10,6 %) und PE C36:1 (Aspartam: 14,5 %, Metabolite: 15,8 %) (dunkelgrün markiert in Abbildung 35). Die größte Effektstärke zeigte sich bei Aspartam-Inkubation für PE C40:0 mit einer hoch signifikanten Erhöhung auf 194,5 % ($p = 0,002$); jedoch einem anteiligen Vorkommen von nur 0,4 % an allen vermessenen PE-Subspezies. Bei den Aspartam-Metaboliten zeigte PE C42:0 mit einer Erhöhung auf 163,1 % ($p = 0,009$) die höchste Effektstärke. Auch bei dieser Subspezies war das anteilige Vorkommen mit 0,2 % jedoch relativ gering.

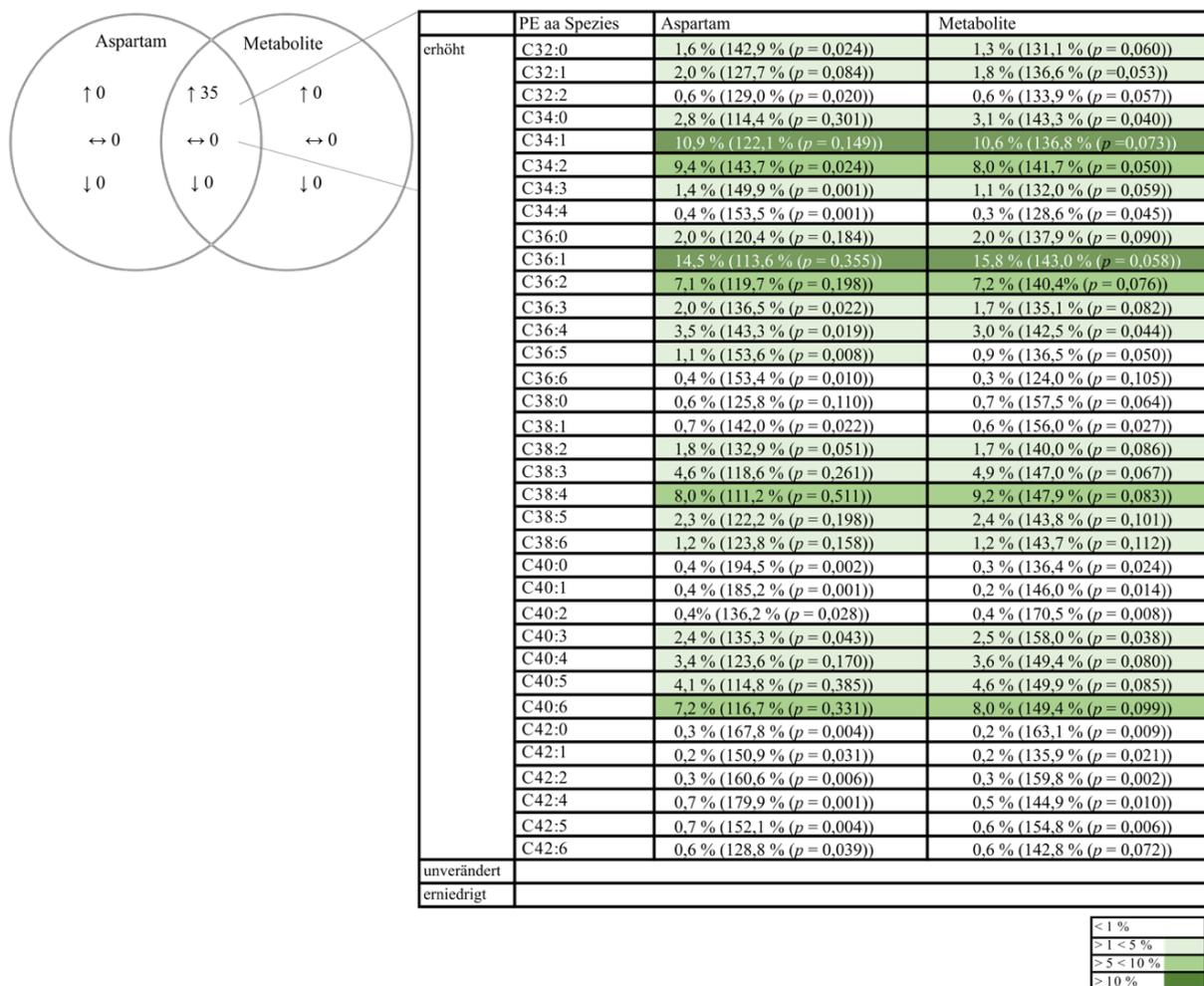


Abbildung 35: Massenspektrometrische Lipidomics-Analyse zur Bestimmung von Phosphatidylethanolamin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Venn-Diagramm zur vergleichenden Analyse der einzelnen Phosphatidylethanolamin-Subspezies. Als *erhöht* (\uparrow) oder *erniedrigt* (\downarrow) wurden jene Subspezies definiert, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist. *Unverändert* sind jene Subspezies, welche ihre Veränderung innerhalb des mittleren Standardfehlers (SEM) liegend haben. Lipid-Subspezies, bei denen sowohl nach Behandlung mit Aspartam als auch mit Aspartam-Metaboliten für die gemessene Veränderung dieselbe Tendenz existiert, sind im überlappenden Teil des Venn-Diagramms aufgeführt. In der nebenstehenden Tabelle sind diese nochmal genauer definiert. Hier ist aufgeführt, wie viel prozentualen Anteil die jeweilige Phosphatidylethanolamin-Spezies an allen Phosphatidylethanolamin-Subspezies ausmacht. Phosphatidylethanolamin-Subspezies mit weniger als ein Prozent am Gesamtanteil sind in weiß hinterlegt, jene mit eins bis fünf Prozent in hellgrün, jene mit fünf bis zehn Prozent in mittelgrün und bei mehr als zehn Prozent am Gesamtanteil in dunkelgrün. In Klammer ist die jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen inklusive ihres dazugehörigen p-Wertes angegeben. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.4.3. Untersuchung der Carnitin-Spezies

Carnitine spielen eine elementare Rolle im mitochondrialen Fettsäure-Stoffwechsel. Sie sind in die β -Oxidation involviert, welche in der mitochondrialen Matrix stattfindet und in deren Rahmen Fettsäuren mit dem Ziel der Energiegewinnung abgebaut werden. Carnitin fungiert hierbei als Transportmolekül (sogenannter *Carnitin-Shuttle*), an das die Fettsäuren konjugiert werden können, um dann mittels einer *Translokase* von der äußeren Mitochondrienmembran über die innere Mitochondrienmembran in die Matrix überführt zu werden. Dort wird die Fettsäuregruppe von Carnitin auf Coenzym-A übertragen und in einem mehrschrittigen Prozess abgebaut. Hierbei entsteht bei jedem Schritt ein Molekül Acetyl-CoA, welches seinerseits für die weitere Energiegewinnung in den Citratzyklus eingespeist wird (HEINRICH et al., 2022b). Es existieren verschiedene Formen des Carnitins. Zu diesen zählen der „Grundbaustein“ L-Carnitin (LC), welches aus den Aminosäuren Lysin und Methionin besteht und das physiologisch aktive Enantiomer des Carnitins ist (FLANAGAN et al., 2010; BREMER, 1983). Als *Acylcarnitin* wird das mit einer Fettsäure variabler Kettenlänge konjugierte Carnitin bezeichnet. Dementsprechend lassen sich in Abhängigkeit der Fettsäuren-Länge kurz-, mittel- und langkettige Carnitine unterscheiden. Carnitin lässt sich im menschlichen Körper in den verschiedensten Geweben nachweisen, wovon sich mengenmäßig am meisten im Muskelgewebe befindet. Auch in Leber, Nieren, Herz und Gehirn kommt Carnitin seiner Funktion nach. Eine mitochondriale Dysfunktion ist mit einer Veränderung der anteiligen Zusammensetzung des Carnitin-Pools assoziiert (MCCANN et al., 2021; REUTER, EVANS, 2012; NEAL et al., 2012; JONES et al., 2010).

Bei der Untersuchung der Carnitin-Spezies zeigte sich im Mittelwert bei Aspartam eine diskrete Verringerung zu $97,3 \% \pm 5,4\%$ ($p = 0,064$). Die Inkubation mit den Aspartam-Metaboliten führte zu einer signifikanten Reduktion des Mittelwertes zu $93,7 \% \pm 6,3\%$ ($p \leq 0,001$) (siehe Abbildung 36).

Insgesamt wurden in der massenspektrometrischen Analyse je Bedingung 41 Carnitin-Subspezies gemessen. Bei diesen handelte es sich um Carnitin C00, C02, C03, C03 OH, C03:1, C04, C04 OH bzw. C3-DC, C04:1, C05, C05 M DC, C05 OH bzw. C3-DC-M, C05:1, C05:1 DC, C06 bzw. C4:1-DC, C06 OH bzw. C5-DC, C06:1, C7X (C07 DC), C08, C08:1, C9X (C09), C10, C10:1, C10:2, C12, C12 DC, C12:1, C14, C14:1, C14:1 OH, C14:2, C14:2 OH, C16, C16 OH, C16:1, C16:1 OH, C16:2, C16:2 OH, C18:0, C18:1, C18:1 OH sowie C18:2.

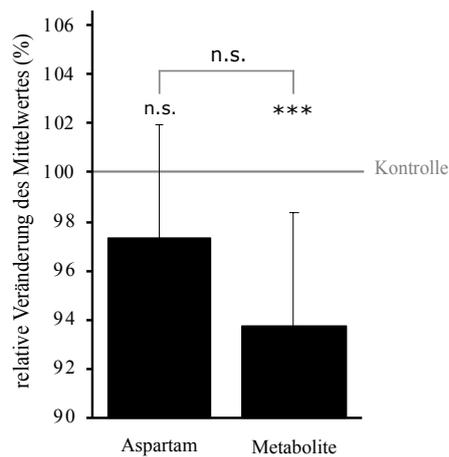


Abbildung 36: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Das Balkendiagramm zeigt die relative Veränderung aller gemessenen Carnitin-Subspezies nach Behandlung mit Aspartam oder Aspartam -Metaboliten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Im *Vulcano Plot* lässt sich bei erster Betrachtung bei sowohl erhöhten als auch erniedrigten Carnitin-Subspezies eine eher ausgeglichene Verteilung feststellen, wobei die Subspezies nach der Inkubation mit Aspartam-Metaboliten (blau) einen ausgeprägteren Links-*Shift*, respektive eine Erniedrigung im Vergleich zu den Kontrollen, zeigen (siehe Abbildung 37). Insgesamt wiesen 35 Subspezies eine oberhalb des SEM liegende Veränderung auf – hiervon sieben mit einer Erhöhung und 28 mit einer Erniedrigung. Nur sechs Carnitin-Subspezies lagen mit ihrer Veränderung innerhalb des mittleren Standardfehlers. Nach der Inkubation mit Aspartam zeigten 20 Carnitin-Subspezies eine nur leichte Erhöhung oder Erniedrigung und lagen damit innerhalb des SEM. Oberhalb des SEM lagen 21 Subspezies, wovon acht eine Erhöhung und dreizehn eine Erniedrigung aufwiesen (siehe Abbildung 38).

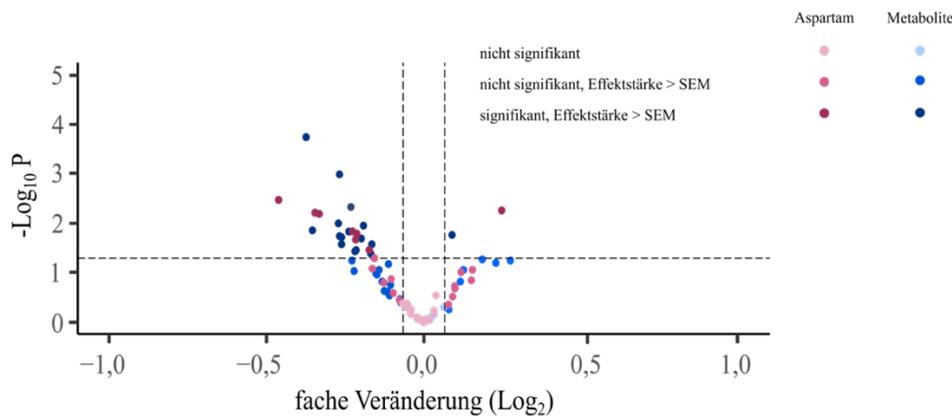


Abbildung 37: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Im *Vulcano Plot* ist jede Carnitin-Subspezies durch einen rosa Punkt (nach Aspartam-Behandlung) oder blauen Punkt (nach Aspartam-Metabolite-Behandlung) repräsentiert. Dieser ist mit seiner Veränderung (x-Achse) gegen den entsprechenden p-Wert (y-Achse) aufgetragen. Hellblaue und hellrosa Punkte stellen keine signifikante Veränderung dar. Mittelrosa oder mittelblaue Punkte repräsentieren eine Veränderung, welche größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, jedoch ohne das festgelegte Signifikanzniveau zu erreichen. Dunkelrosa oder dunkelblaue Punkte stehen für eine Veränderung, die größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisches Signifikanzniveau definiert. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Bei genauerer Analyse, ließe sich bei der Inkubation mit Aspartam-Metaboliten unter den 28 erniedrigten Carnitin-Subspezies bei 15 die Erreichung des Signifikanzniveaus erkennen. Bei diesen handelte es sich um Carnitin C03:1, C04:1, C05:1, C08:1, C10, C10:1, C10:2, C12:1, C14:1, C14:1 OH, C16, C16 OH, C16:1, C16:1 OH sowie C18:1. Eine Erhöhung ließ sich bei sieben Subspezies messen, wovon eine Subspezies signifikant erhöht war. Hierbei handelte es sich um Carnitin C05 M DC. Die Inkubation mit Aspartam resultierte in einer Erniedrigung von 13 Carnitin-Subspezies, inklusive sieben Subspezies, welche das Signifikanzniveau erreichten. Diese waren Carnitin C05:1, C7X (C07 DC), C10:1, C12 DC, C12:1, C16:1 OH sowie C16:2. Erhöht zeigten sich acht Subspezies, wovon Carnitin C04 eine signifikante Erhöhung zeigte.

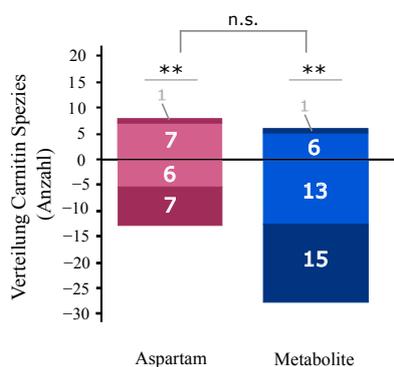


Abbildung 38: Massenspektrometrische *Lipidomics*-Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Verteilungsdiagramm zur Darstellung der Anzahl erhöhter (y-Achse > 1) und erniedrigter (y-Achse < 1) Carnitin-Subspezies. Der Anteil der Säule, welcher in mittelrosa oder mittelblau eingefärbt ist, repräsentiert jene Subspezies deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist, aber nicht das Signifikanzniveau erreicht. Jener Teil der Säule, der dunkelrosa oder dunkelblau gefärbt ist, steht für die Subspezies, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist und außerdem einen p-Wert von kleiner gleich 0,05 aufweist. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ festgelegt. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Im direkten Vergleich der Carnitin-Subspezies nach Inkubation mit Aspartam bzw. mit den Aspartam-Metaboliten ließen sich für insgesamt 15 Subspezies Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Inkubationsbedingungen erkennen (siehe Abbildung 39). Eine Erhöhung oberhalb des mittleren Standardfehlers war für eine einzige Subspezies – Carnitin C02 – messbar. Dieses zeigte unter allen gemessenen Carnitin-Subspezies mit einem relativen Vorkommen von 15,7 % bei den Aspartam-Proben bzw. 17,3 % bei den Metabolite-Proben auch ein recht häufiges Vorkommen. Eine bei beiden Inkubationsbedingungen auftretende, innerhalb des SEM liegende, Veränderung zeigte sich für drei Carnitin-Subspezies: Carnitin C08, C14:2 sowie C16:2 OH. Eine oberhalb des SEM liegende Erniedrigung zeigte sich für elf Subspezies. Mit einem anteilig häufigen Vorkommen von 8,7 % bei Aspartam bzw. 9,4 % bei den Metaboliten ist Carnitin C10:1 hervorzuheben. Auch Carnitin C12:1 zeigt ein relativ häufiges Vorkommen mit 7,5 % bei Aspartam und 8,0 % bei den Metaboliten.

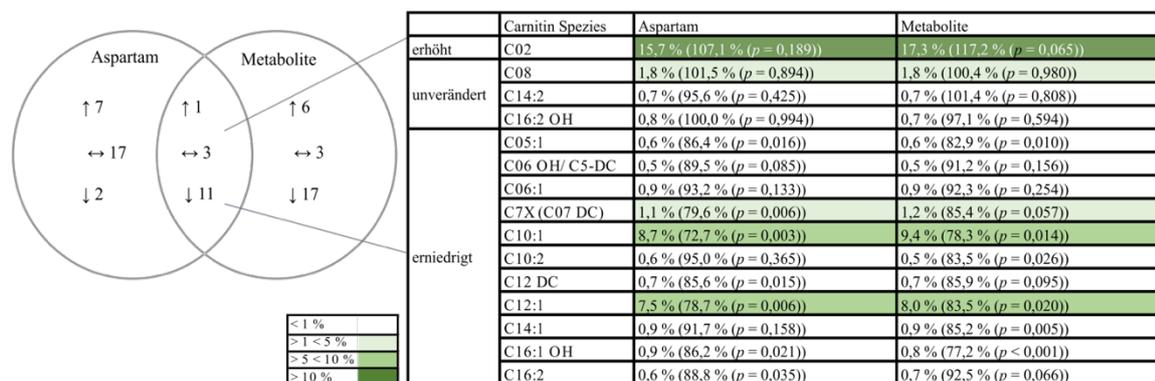


Abbildung 39: Massenspektrometrische Lipidomics-Analyse zur Bestimmung von Carnitin-Spezies nach einer Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Venn-Diagramm zur vergleichenden Analyse der einzelnen Carnitin-Subspezies. Als *erhöht* (\uparrow) oder *erniedrigt* (\downarrow) wurden jene Subspezies definiert, deren Veränderung größer als der mittlere Standardfehler (SEM) ist. *Unverändert* sind jene Subspezies, welche ihre Veränderung innerhalb des mittleren Standardfehlers (SEM) liegend haben. Lipid-Subspezies, bei denen sowohl nach Behandlung mit Aspartam als auch mit Aspartam-Metaboliten für die gemessene Veränderung dieselbe Tendenz existiert, sind im überlappenden Teil des Venn-Diagramms aufgeführt. In der nebenstehenden Tabelle sind diese nochmal genauer definiert. Hier ist aufgeführt, wie viel prozentualen Anteil die jeweilige Carnitin-Subspezies an allen Carnitin-Subspezies ausmacht. Carnitin-Subspezies mit weniger als ein Prozent am Gesamtanteil sind in weiß hinterlegt, jene mit eins bis fünf Prozent in hellgrün, jene mit fünf bis zehn Prozent in mittelgrün und bei mehr als zehn Prozent am Gesamtanteil in dunkelgrün. In Klammer ist die jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontrollen inklusive ihres dazugehörigen p-Wertes angegeben. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

4.4.4. Vergleich der Lipid-Subspezies

In einer zusammenfassenden Analyse wurden die über alle Lipidklassen vermessenen 137 Subspezies zwischen Aspartam-Metaboliten und Aspartam verglichen. Hierbei ließ sich erkennen, dass bei beiden Inkubationsbedingungen ähnliche Trends bezüglich der Effektstärke herrschen.

Bei der genaueren Betrachtung der insgesamt 114 Lipid-Subspezies zeigten sowohl bei Aspartam als auch bei den Aspartam-Metaboliten 93 Spezies eine Effektstärke größer als 100 %, waren also im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten Kontroll-Proben, hochreguliert (siehe Abbildung 40).

21 Lipidsubspezies zeigten nach beiden Inkubationsbedingungen eine Effektstärke kleiner als 100 %, waren also herunterreguliert im Vergleich zu den Kontrollen.

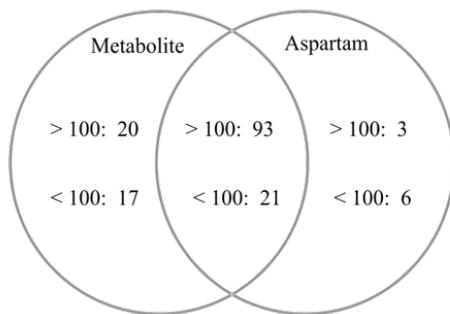


Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Lipid-Subspezies nach Inkubation mit Aspartam-Metaboliten bzw. mit Aspartam.

Venn-Diagramm zur vergleichenden Analyse der Veränderung der einzelnen Lipid-Subspezies. Im überlappenden Teil sind jene Lipid-Subspezies aufgeführt, welche unter beiden Inkubationsbedingungen dieselbe Tendenz aufwiesen. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

Nur bei 16 der insgesamt 137 vermessenen Subspezies zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Effektstärke zwischen den Aspartam-Metaboliten und Aspartam. Mit einer besonders starken Signifikanz sind hier TAG C52:0 ($p = 0,006$), Carnitin C05 OH ($p = 0,002$) sowie PC aa C28:0 ($p = 0,005$) zu nennen (siehe Abbildung 41).

Lipid-Subspezies	Metabolite (vs. Kontrolle in %)	Aspartam (vs. Kontrolle in %)	Signifikanz Aspartam vs. Metabolite
TAG C52:0	114,7	180,2	0,006
Carnitin C05 OH / C3-DC-M	113,8	89,8	0,002
TAG C50:2	106,7	140,7	0,013
PC aa C28:0	104,9	137,8	0,005
PC aa C30:0	104,1	127,0	0,031
PC aa C36:3	101,9	125,4	0,040
PC aa 32:1	100,6	124,0	0,029
TAG C50:3	98,7	127,2	0,014
TAG C50:1	98,5	132,5	0,011
Carnitin C18:2	93,0	111,4	0,011
Carnitin C14	90,6	108,8	0,007
Carnitin C06 / C4:1-DC	90,3	107,1	0,040
Carnitie C16:1	87,1	106,7	0,013
Carnitin C10	83,2	97,4	0,039
Carnitin C18:1	83,1	105,7	0,011
TAG C54:4	82,9	192,2	0,017

Abbildung 41: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Lipid-Subspezies nach Inkubation mit Aspartam-Metaboliten bzw. mit Aspartam.

Die Tabelle führt jene Lipid-Subspezies auf, welche sich in ihrer Effektstärke signifikant zwischen Aspartam und Aspartam-Metaboliten unterschieden. Abbildung modifiziert nach (GRIEBSCH et al., 2023).

5. Diskussion

5.1. Aspartam im aktuellen Kontext

Aspartam (Methyl L- α -aspartyl-L-phenylalaninat) ist ein Süßstoff, welcher seit mehreren Jahrzehnten aufgrund seiner potentiell gesundheitsschädlichen Wirkung sowohl in Wissenschaft als auch Politik kontrovers diskutiert wird. Im Juli 2023 stuften die Weltgesundheitsorganisation (Engl.: *World Health Organisation*, WHO) und die Internationale Agentur für Krebsforschung (Engl.: *International Agency for Research on Cancer*, IARC) Aspartam unter anderem durch Berufung auf neuste epidemiologische Studienergebnisse aus Frankreich, die untenstehend genauer beschrieben werden sollen, als „möglicherweise krebserregend“ ein und forderten aufgrund des Fehlens eindeutiger Daten weiterführende Untersuchungen (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023; RIBOLI et al., 2023). Wie bereits in der Einleitung der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (siehe Kapitel 2.3), existieren zahlreiche Studien, die teilweise uneindeutige oder sich widersprechende Daten zeigen (CZARNECKA et al., 2021; CHOUDHARY, PRETORIUS, 2017).

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit deuten – unter anderem durch das Entstehen oxidativen Stresses – auf eine zellschädigende Wirkung des Aspartams hin, was in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingeordnet und diskutiert werden soll.

Dem soll vorangestellt sein, dass bei der Recherche nach Studien mit spezifischen Aspartam-induzierten Effekten auffällig war, dass teilweise verallgemeinernde Aussagen über die Effekte von Süßstoffen getroffen werden und so Ergebnisse von Erhebungen anderer Substanzen wie beispielsweise Acesulfam-K oder Sucralose als allgemeingültige Aussage auf alle Süßstoffe (Engl.: *Non-nutritive Sweeteners*, NNS) übertragen werden. Auch, wenn Süßstoffe mitunter neuroendokrin und metabolisch vergleichbare Effekte induzieren, ist dennoch zu beachten, dass es sich bei verschiedenen NNS um (bio)chemisch unterschiedliche Substanzen handelt. Um eine Beurteilung und Einordnung der verschiedenen Studiendaten und Ergebnisse zu ermöglichen, ist es also von elementarer Bedeutung, Studientyp und -Qualität (d.h. beobachtend in einer Kohortenstudie vs. interventionell in einer randomisiert kontrollierten Studie), das Studienobjekt (d.h. Zellkultur vs. Tiermodell vs. humane Probanden), die eingesetzten Aspartam-Konzentrationen sowie die Dauer und Art der Applikation (d.h. oral vs. parenteral) zu berücksichtigen. Exemplarisch zeigen sich beispielsweise bei Kohortenstudien, in welchen Probanden nach ihrem Konsum von Aspartam befragt werden, verschiedene Schwierigkeiten, die sich aber nicht nur bei Süßstoffen, sondern auch bei der Erhebung anderer „Nahrungsgewohnheiten“ ergeben: Die retrograde Befragung von Probanden geschieht mitunter mit vielen Jahren Latenz, sodass ein sogenannter *Recall Bias* auftreten kann. Auch scheint es für Probanden schwierig zu sein, in der Retrospektive exakt zwischen dem Konsum von Süßstoffen im Allgemeinen und jenem von Aspartam im Spezifischen zu differenzieren. Darüber hinaus können sich Ungenauigkeiten ergeben, wenn beispielsweise nur der Konsum von Softdrinks erfragt wird, da im Laufe der Jahrzehnte Aspartam und andere NNS auch zunehmend in anderen Lebensmitteln verwendet wurden.

Um genau solche qualitativen Merkmale und Schwächen von Studien, insbesondere aber das Risiko für eine „Beeinflussung“ (Engl.: *Risk of Bias*, ROB) zu beurteilen, existieren verschiedene „Frameworks“, wie das *ROBINS-I Tool* (STERNE et al., 2016), das insbesondere bei der Erstellung von systematischen Reviews genutzt werden (GOODMAN et al., 2023).

5.2. Kanzerogenität und Zytotoxizität von Aspartam

Bezüglich eines möglichen zytotoxischen oder kanzerogenen Effektes von Aspartam wurden in der Vergangenheit verschiedene Erhebungen und Studien durchgeführt. *In vitro* konnte an menschlichen Blut-Lymphozyten gezeigt werden, dass eine 24-stündige Aspartam-Administration auch schon bei geringen Konzentrationen zu Chromosomen-Aberrationen führt (RENCUZOGULLARI et al., 2004). Bei der 48-stündigen Kultivierung der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa in verschiedenen Konzentrationen von 0,01 – 0,05 g/L zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität, jedoch ergaben sich eine dosisabhängige verminderte Expression des Tumorsuppressorgens *p53* und erhöhte Expression des Proliferationsmarkers *Ki67* (PANDURANGAN et al., 2016b).

Um in der hier vorliegenden Forschungsarbeit einen durch Aspartam induzierten zytotoxischen Effekt als Ursache für die im Verlauf gewonnenen Daten zu beurteilen, wurde zu Beginn der in dieser Forschungsarbeit durchgeführten Studie die Zellviabilität mittels LDH-Assays gemessen (siehe Kapitel 3.2.1.5). In diesem wurden Zellproben der verschiedenen Inkubationsbedingungen „Kontrollen“ vs. „Aspartam“ vs. „Aspartam-Metaboliten“ verglichen. Unter der für Aspartam bzw. die Aspartam-Metaboliten gewählten Konzentration von 0,08 g/L (= 271,7 μ M) zeigte sich im Vergleich zu den Kontroll-Zellen keine erhöhte LDH-Aktivität.

Neben Zellkultur-Untersuchungen existieren viele *in vivo*-Studien, welche die potentielle Toxizität von Aspartam evaluierten. Im Knochenmark von Mäusen konnten nach einer 18-stündigen oralen Aspartam-Gabe mittels Magensonde in einer Untersuchung der Knochenmarkzellen DNA-Schäden im Sinne von DNA-Strangbrüchen festgesellt werden (BANDYOPADHYAY et al., 2008). Des Weiteren zeigte eine epidemiologische Studie einen Zusammenhang zwischen Aspartam-Konsum und einem erhöhten Risiko für Männer an Leukämie oder Multiplem Myelom zu erkranken (SCHERNHAMMER et al., 2012). Neueste Daten einer in 2022 publizierten Kohortenstudie mit über 100.000 französischen Erwachsenen zeigten bei einem hohen Konsum von Aspartam ein allgemein gesteigertes Krebsrisiko; insbesondere aber für Brustkrebs und Adipositas-assoziierte Karzinome, ohne diese in der Publikation genauer zu definieren. Die Autoren der Studie kommunizieren potentielle Schwächen beziehungsweise Einschränkungen der Studie in Form einer möglichen Selektionsverzerrung (Engl.: *Selection Bias*) oder umgekehrten Kausalität, versuchten diese Effekte aber durch Anwendung einer Sensitivitätsanalyse auszugleichen (DEBRAS et al., 2022). Im Gegensatz hierzu konnte die Untersuchung einer italienischen Kohorte keinen Zusammenhang zwischen Aspartam-Konsum und einem Risiko für Magen- oder Pankreaskarzinome nachweisen (BOSETTI et al., 2009).

Immer wieder wird als eine potentielle Erklärung einer möglichen Kanzerogenität des Aspartams der Aspartam-Metabolit Methanol aufgeführt. Eine frühe Studie von Davoli et al. aus 1985 zeigte, dass ein einmaliger oraler Konsum von 500 mg Aspartam, was je nach Probanden zwischen 6 – 8,7 mg/kg Körpergewicht entsprach, zu interindividuell unterschiedlichen Anstiegen der Serum-Methanol-Konzentration führte, die im Durchschnitt Spitzenwerte von 3,1 mg/L (inklusive Ausreißern mit bis zu 8,4 mg/L) erreichten und stundenweise wieder abfielen (DAVOLI et al., 1986). Damit lagen die Werte deutlich über den heutzutage definierten Normwerten für Serum-Methanol von < 1,5 mg/L (BIOSCIENTIA MVZ LABOR KARLSRUHE, 2020). Bis zum heutigen Tage ist die Frage, ob Aspartam mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergeht, nicht eindeutig geklärt und bedarf – vermutlich mehr als jeder andere durch Aspartam vermutete Effekt – nicht nur neuer Studien, sondern auch der Re-Evaluierung der Qualität existierender Erhebungen.

5.3. Metabolische und (neuro)endokrine Effekte von Aspartam

Nicht nur eine potentielle Kanzerogenität dient als Anlass zur Untersuchung von Aspartam. Auch metabolische Effekte von Aspartam und anderen Süßungsmitteln wurden in den vergangenen Jahren in verschiedenen Studien adressiert. Dies geschah insbesondere vor dem Hintergrund, dass Aspartam eingesetzt wird, um den Zuckerkonsum bei übergewichtigen oder an mit Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Menschen zu reduzieren, die Regulation des Blutzuckerspiegels zu unterstützen und eine Gewichtsreduktion zu erleichtern. Interessanterweise fanden sich bereits 2013 im Tiermodell Hinweise auf einen gegenteiligen Effekt: Bei männlichen Ratten, welche einen mengenmäßig definierten und mit Aspartam-gesüßten Jogurt zusätzlich zu ihrem Standardfutter erhielten, führte zu einer Gewichtszunahme im Vergleich zu der mit Saccharose-gesüßten Kontrollgruppe. In der Analyse zeigte sich, dass die Aspartam-Gruppe zwar über den Jogurt weniger Kalorien als die Saccharose-Gruppe konsumierte, jedoch bezüglich des Kaloriengehalts mehr Standardfutter fraß (FEIJO et al., 2013). Auch in Metaanalysen von prospektiven Kohortenstudien zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von Aspartam und einem erhöhten Körpergewicht sowie dem Risiko an einem metabolischen Syndrom zu erkranken. Die Ergebnisse schränkten die Autoren aber unter anderem mit der Begründung ein, dass hier vielmehr eine Korrelation als Kausalität vermutet werden muss, da übergewichtige Menschen eher dazu tendieren Süßstoffe zu konsumieren (AZAD et al., 2017; WALBOLT, KOH, 2020). Randomisiert kontrollierte Studien, bei welchen Aspartam mit einer Saccharose-Kontrollgruppe verglichen wurde, erzielten auch widersprüchliche Ergebnisse (WILK et al., 2022). In einer Metaanalyse, welche sieben randomisiert-kontrollierte Studien inkludierte, in denen Aspartam mit einer Placebo- oder Wasser-Kontrollgruppe verglichen wurde, konnte bei den RCTs kein signifikanter Effekt auf den BMI vermerkt werden (AZAD et al., 2017). Eine Metaanalyse von Studien, die Süßstoffkonsum über einen längeren Zeitraum (> 30 Tage) untersuchten, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Zucker eine leichte Gewichtsreduktion (ROGERS et al., 2016).

Um potentielle neuroendokrine Mechanismen und in dessen Zuge die Auswirkungen des Aspartam-Konsums auf das Gehirn (siehe Kapitel 5.4) beurteilen zu können, bedarf es einem grundlegenden

Verständnis der Physiologie der Nahrungsaufnahme (LEE, OWYANG, 2017). Süße, bittere und umami schmeckende Geschmacksstoffe aktivieren Geschmacksrezeptor-Zellen vom Typ II, die einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Engl.: *G-Protein Coupled Receptor*, GPCR) exprimieren. Es lassen sich zwei Klassen dieser Geschmacksrezeptoren unterscheiden: *Taste Receptor Family 1* (T1R) und *Taste Receptor Family 2* (T2R). Der T1R besteht aus mehreren Untereinheiten (T1R2 und T1R3), die jeweils sieben Transmembran-Domänen umfassen und ist für das Süßempfinden verantwortlich. Aspartam bindet hierbei bevorzugt an die T1R2-Untereinheit (LIU et al., 2011; NIE et al., 2005). Die Rezeptoren werden sowohl in der Mundhöhle innerhalb der Zungen-Geschmacksknospen als auch in enteroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Nach Stimulation des Rezeptors werden Signalkaskaden aktiviert, welche über afferente Nervenfasern – im Mundraum über Geschmacksnerven, im GI-Trakt über den *N. vagus* – die Informationen zunächst über den *Ncl. tractus solitarii* der *Medulla oblongata* weiter in verschiedene Gehirnregionen leitet. Zu diesen Regionen zählen Amygdala, Hypothalamus und Thalamus (*Ncl. ventralis posterior thalami*), welche unter anderem auch in die Regulierung der Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme involviert sind (LEE, OWYANG, 2017). Im Zusammenhang mit den neuroendokrinen Mechanismen der Nahrungsaufnahme im Allgemeinen und mit Aspartam im Spezifischen, ist zudem die Sekretion verschiedener gastrointestinaler Hormone zu diskutieren. Zu diesen zählen unter anderem die sogenannten Inkretin-Hormone GLP-1 (Engl.: *Glucagon-like Peptide 1*) und GIP (Engl.: *Gastric Inhibitory Polypeptide*), welche zahlreiche hormonelle und metabolische Effekte aufzeigen. Die Ausschüttung der Inkretin-Hormone aus enteroendokrinen *L-Zellen* bzw. *K-Zellen* des Dünndarmes wird typischerweise durch oral aufgenommene Nahrungsbestandteile, insbesondere kurzkettige Kohlenhydrate als auch Fettsäuren getriggert. Zudem exprimieren die enteroendokrinen Zellen ebenfalls Geschmacksrezeptoren, die als Glucose-Sensoren fungieren und bei Aktivierung die Sekretion des GLP-1 modulieren (JANG et al., 2007). Eine ihrer hauptsächlichen Wirkungen vermitteln die Inkretin-Hormone über Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der β -Zellen des Pankreas: sie stimulieren die Insulin-Sekretion und sind somit an der Regulation des Blutglucose-Spiegels beteiligt. Darüber hinaus vermittelt GLP-1 über Bindung an zerebrale Rezeptoren, die unter anderem im Kortex, Hypothalamus und Thalamus nachgewiesen wurden (ALVAREZ et al., 2005), auch eine zentrale Modulation des Hunger- und Sättigungsempfindens (WILK et al., 2022; MULLER et al., 2019; ROZENGURT, STERNINI, 2007; THEODORAKIS et al., 2006). Inwiefern synthetische Süßstoffe diese metabolischen Effekte vermitteln können, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Cross-over-Studie von Maersk et al. randomisierte 24 übergewichtige Probanden in vier Gruppen. Die Probanden der ersten Gruppe nahmen ein mit Saccharose gesüßtes kalorisches Getränk zu sich; die Probanden der zweiten Gruppe ein mit Aspartam gesüßtes Getränk; die Probanden der dritten Gruppe halbfette Milch und die Probanden der vierten Gruppe Wasser. Die Hormon-Levels von GLP-1 wurden sowohl vor Konsum des Getränks als auch danach über einen vierstündigen Zeitraum mit kontinuierlichen Messungen bestimmt. Hierbei zeigte sich bei den Probanden des Saccharose-Getränks ein signifikant höherer Anstieg in den GLP-1-Levels, als bei dem Aspartam- oder Wasser-Getränk. In der Analyse des subjektiven Appetitempfindens der

Probanden ließ sich kein signifikanter Unterschied detektieren (MAERSK et al., 2012). Eine epidemiologische Studie an 14.000 US-amerikanischen Erwachsenen berichtete über eine Assoziation zwischen dem Konsum synthetischer Süßstoffe und dem kurzfristig innerhalb eines 24-stündigen Zeitraums gesteigerten Konsum kohlenhydratreicher Nahrungsmittel (MALEK et al., 2018). Ähnliches zeigte sich auch in einer kleineren randomisiert kontrollierten Studie mit 30 männlichen Probanden (TEY et al., 2017). Damit einhergehend zeigte Steinert et al., dass durch parenterale Gabe von Aspartam keine Veränderungen des GLP-1-Spiegels im Blutplasma detektierbar war und die Probanden gleichzeitig über ein kürzeres Sättigungsgefühl und somit schnelleres Wiederauftreten eines Hungergefühls berichteten als jene Probanden, die Glucose oder Fructose erhielten (STEINERT et al., 2011). Eine Studie von Higgins et al., die eine wiederholte orale Aufnahme von Aspartam über zwölf Wochen in einer randomisiert-kontrollierten doppelblinden Studie untersuchte, zeigte ebenso keine Auswirkungen auf die langzeitigen Blutlevels von GLP-1, GIP, Insulin, Appetit oder das Körpergewicht im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die Dextrose erhielt. Allerdings sind diese Daten aufgrund potentieller Interessenkonflikte kritisch zu evaluieren (HIGGINS et al., 2018).

5.4. Effekte von Aspartam auf das Gehirn

Süßstoffe im Allgemeinen und Aspartam im Speziellen werden also auch im Kontext neuroendokriner und neuronaler Prozesse diskutiert.

Um bewerten zu können, inwiefern Aspartam einen Einfluss auf neuronales Gewebe hat, soll nochmal kurz auf den Aspartam-Metabolismus eingegangen werden: In Studien an verschiedenen Säugetieren, wie Affen, Schweinen und Menschen wurden Hinweise dafür gefunden, dass Aspartam durch unspezifische Esterasen und Peptidasen in seine Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol gespalten wird (MAGNUSON et al., 2016; HOOPER et al., 1994; STEGINK et al., 1987; OPPERMANN et al., 1973). Nach der oralen Aufnahme und potentiellen Metabolisierung wird der Süßstoff über das intestinale Epithel absorbiert und kann in den Blutkreislauf gelangen. Nach dem oralen Konsum von Aspartam konnten im Serum erhöhte Levels seiner Metabolite Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol detektiert werden, jedoch – sofern die täglich empfohlene Maximaldosis für Aspartam eingehalten wurde – ohne mit toxischen Werten assoziiert zu sein. In einer Studie, in der Methanol-Blutlevels gemessen wurden, konnten bei missbräuchlichem Konsum von Aspartam mit > 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht mit einer durchschnittliche Serum-Methanol-Konzentration von > 1,2 mg/dl deutlich über der Norm (< 1,5 mg/l = 0,15 mg/dl) (siehe Kapitel 5.2) liegende Werte gemessen werden (STEGINK et al., 1987; STEGINK et al., 1981a; STEGINK et al., 1981b; STEGINK et al., 1981c). Auch die in Kapitel 5.2 zitierte Studie, welche die Auswirkungen der oralen Aufnahme von 500 mg Aspartam auf das Serum-Methanol evaluierte, zeigte über der Norm liegende Werte (DAVOLI et al., 1986). Die Metabolisierung von Aspartam ist ein häufiger Kritikpunkt an Studien, die sich mit den Effekten von Aspartam auf extra-gastrointestinale Organe, Gewebe oder Zellen beschäftigen: So gilt eine *in vitro* Exposition mit dem gesamten Aspartam-Molekül als nur teilweise

aussagekräftig für die potentiell *in vivo* stattfindende orale Aufnahme sowie enterale Metabolisierung und Absorption (MAGNUSON et al., 2007).

Um in der hier vorliegenden Forschungsarbeit eine experimentelle *in vitro*-Untersuchung durchzuführen, welche die orale Aspartam-Aufnahme beim Menschen und eine darauffolgende potentielle Exposition neuronaler Strukturen möglichst vergleichbar zu den *in vivo*-Bedingungen abbildet, wurde die in Kapitel 3 und Kapitel 4 beschriebene Behandlung der Zellen mit zwei separaten Zellpopulationen aber zeitgleich durchgeführten Inkubationsbedingungen vollzogen: Für die Bedingung, dass Aspartam nicht metabolisiert, also in Form eines kompletten Moleküls absorbiert würde, erfolgte die Inkubation der Zellen mit Aspartam. Um eine enterale Metabolisierung des Aspartam-Moleküls zu simulieren, erfolgte als zweite Bedingung eine Inkubation mit einer Kombination seiner drei Metaboliten, die in Summe äquimolar zur Konzentration des Aspartam-Moleküls ist. Die gewählte Konzentration von 0,08 g/L basierte auf der von der FDA empfohlenen maximalen Tagesdosis von 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht und dem sich daraus ergebenden Verteilungsvolumen eines durchschnittlich gewichtigen Erwachsenen (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2020) (siehe Kapitel 3.2.1.4.1).

In der Auswertung der durchgeführten Experimente zeigten sich im Trend vergleichbare Auswirkungen, unabhängig davon, ob die Inkubation mit dem vollständigen Aspartam-Molekül oder den drei Metaboliten durchgeführt wurde. Bei den meisten Experimenten waren die Effekte für die mit Aspartam behandelten Zellen jedoch stärker.

Es existieren verschiedene Studien, welche die Auswirkungen von Aspartam auf das Gehirn beziehungsweise neuronales Gewebe untersucht haben und im Kontext derer die in dieser Forschungsarbeit gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden sollen. Eine Vielzahl an Untersuchungen fand im Tiermodell statt, von welchen beispielhaft zwei genannt werden sollen: Ashok et al. wies nach, dass eine 90-tägige orale Gabe von Aspartam in einer Dosis von 75 mg pro Kilogramm Körpergewicht bei männlichen Ratten zu einem immobilisierenden und durch Angst geprägtes Verhalten führte (ASHOK et al., 2014). Andere Untersuchungen zeigten, dass eine zweiwöchige subkutane Gabe von Aspartam in der höchsten Dosis von 5,625 mg pro Kilogramm Körpergewicht zu einer signifikant schlechteren Gedächtnisleistung im *Water Maze Experiment* führte (ABDEL-SALAM et al., 2012).

5.4.1. Erzeugung oxidativen Stresses

Im selben Experiment konnte auch nachgewiesen werden, dass der Konsum hoher Mengen Aspartams, d.h. von täglich mehr als 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht im Gehirn von Mäusen (ABDEL-SALAM et al., 2012) oder Ratten sowohl bei akutem als auch bei chronischem Konsum (ASHOK et al., 2015; FINAMOR et al., 2014b; IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012) oxidativen Stress verursacht. Dies ließ sich unter anderem an intrazerebral erhöhten Markern für Lipidperoxide sowie einer gestiegenen Aktivität der Enzyme *Superoxiddismutase* und *Katalase*, sowie einer Erniedrigung von

GSH – der reduzierten Form des Tripeptids Glutathions - und des Proteins Thiol nachweisen, was oxidativen Stress begünstigt (IMD BERLIN MVZ, o.D.). Dieser Effekt konnte auch in anderen Geweben, wie beispielsweise murinem Nieren- (FINAMOR et al., 2014a), Leber- (LEBDA et al., 2017, ASHOK, SHEELADEVI, 2015) oder Herzmuskelgewebe (ANBARA et al., 2022) gezeigt werden. *In vitro*-Untersuchungen ließen sich vergleichsweise weniger als jene im Tiermodell finden. Insbesondere fehlt es zum aktuellen Zeitpunkt an Studien, die den Effekt von Aspartam auf neuronale Zelllinien analysieren. Eine *in vitro*-Studie an kultivierten Lymphozyten gesunder männlicher Probanden, bei der eine 48-stündige Inkubation mit Aspartam in Konzentrationen von bis zu 0,1 g/L durchgeführt wurde, zeigten sich zwar zytotoxische Effekte, jedoch kein detektierbarer oxidativer Stress (CADIRCI et al., 2020). Kultivierte Zervixkarzinom-Zellen (HeLa) zeigten bei Aspartam-Molaritäten von 10 mM bis 20 mM eine durch Aspartam induzierte, dosisabhängige Entstehung von ROS (PANDURANGAN et al., 2016a), die Konzentrationen lagen aber mit circa 2,9 g/L bis 5,9 g/L deutlich über der in dieser Forschungsarbeit angewandten Konzentration von 0,08 g/L (271,7 μ M). In den gesamten hier zitierten Untersuchungen im Zellkultur-Modell wurde Aspartam als Molekül, in seiner nicht-metabolisierter Form, untersucht.

In der hier vorliegenden Forschungsarbeit zeigten sowohl Aspartam als auch die Kombination seiner drei Metabolite, Effekte, welche zum Teil bereits in der Literatur vorbeschrieben sind. Zum einen ließen sich mittels des fluoreszenzbasierten APF-Assays ein erhöhtes ROS-Level nachweisen (siehe Kapitel 4.3.1). Zum anderen zeigten sich auch Effekte auf Genebene: So war die Genexpression der antioxidativ agierenden Enzyme *Superoxiddismutase 1* und *2* hochreguliert. Dieser Effekt wies auch eine Dosisabhängigkeit auf, wie exemplarisch für die *Superoxiddismutase 1* gezeigt wurde. Eine 10-fach niedrigere Konzentration zur angewandten Standardkonzentration von 271,7 μ M resultierte in einer signifikant niedrigeren Genexpression der SOD1, während eine 10-fach höhere Aspartam-Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression führte (siehe Kapitel 4.3.2).

Eine solche Hochregulation antioxidativ agierender Enzyme gilt als kompensatorischer Mechanismus bei Akkumulation von ROS und wird über das *Antioxidant Responsive Element* (ARE) reguliert, welches in der Promotorregion für antioxidative Enzyme wie der SOD präsent ist (SCANDALIOS, 2005). Im Falle von Aspartam könnte dies insbesondere durch seinen Metaboliten Methanol und hierdurch generierten oxidativen Stress vermittelt werden (IYYASWAMY, RATHINASAMY, 2012). Oxidativer Stress ist mit zahlreichen Krankheiten assoziiert: So ist er in die Pathogenese von Krebserkrankungen (JELIC et al., 2021), Diabetes mellitus (LUC et al., 2019) und Neurodegeneration (ANGELOVA, ABRAMOV, 2018), aber auch dem Altern (KUDRYAVTSEVA et al., 2016) involviert. Im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz wird angenommen, dass neben der Bildung von β -Amyloid-Plaques und *Neurofibrillary Tangles* auch oxidativer Stress ein pathophysiologisches Merkmal ist (ZHAO, ZHAO, 2013). Im Vergleich zu gesunden Probanden konnten in Gehirnen von Alzheimer-Patienten *post mortem* verschiedene mit ROS im Zusammenhang stehende Veränderungen festgestellt werden. Zu diesen zählen unter anderem eine vermehrte Oxidation von nukleärer DNA und

RNA (NUNOMURA et al., 1999; GABBITA et al., 1998) Proteinen (SULTANA et al., 2009; AKSENOV et al., 2001) und Lipiden (WILLIAMS et al., 2006; MARKESBERY, LOVELL, 1998).

5.4.2. Mitochondrialer Integritätsverlust

Darüber hinaus konnte im entorhinalen und frontalen Kortex von AD-Patienten eine reduzierte mitochondriale Aktivität im Sinne einer verminderten Expression von Genen der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe, als auch eine abnormale Morphologie der Organellen im Sinne einer Verlängerung aufgrund fehlender *Mitochondrial Fission* nachgewiesen werden (ARMAND-UGON et al., 2017; WANG et al., 2008). Mit der sogenannten mitochondrialen Kaskadenhypothese wird in diesem Rahmen der Zusammenhang zwischen einem Verlust der Mitochondrienfunktion und einer begünstigten $A\beta$ -Akkumulation beschrieben (TONNIES, TRUSHINA, 2017; SWERDLOW et al., 2014). Gleichzeitig zeigten *in vivo*- und *in vitro*-Daten an Neuronen von Alzheimer-Patienten, wie die Akkumulation von $A\beta$ zu mitochondrialer Dysfunktion, ROS-Produktion und synaptischer Degeneration führt (MANCZAK et al., 2016; CALKINS et al., 2011; CALKINS, REDDY, 2011). Auch Aspartam wird mit mitochondrialer Schädigung im Sinne eines Integritäts- und Funktionsverlustes in Zusammenhang gebracht. So konnte in HEPG2-Leberkarzinomzellen eine durch Aspartam induzierte, dosisabhängige und ab Dosen von 0,2 g/L einsetzende Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials gemessen werden (QU et al., 2019). In einer Studie von Chen et al. konnte in einer Kohorte von über 800 schwangeren Frauen in Zellen des Ovars eine mit dem Aspartam-Konsum korrelierende Schädigung der Mitochondrien gezeigt werden: So waren die Aktivität der Atmungsketten-Komplexe und die Kopienzahl mitochondrialer DNA verringert (CHEN et al., 2022).

Vergleichbare Effekte zeigten sich auch in der vorliegenden Forschungsarbeit: In der elektronenmikroskopischen Analyse ließen sich morphologisch beeinträchtigte Mitochondrien im Sinne eines strukturellen Integritätsverlustes und einer Fragmentierung sowie damit einhergehender Vergrößerung der Gesamtfläche detektieren (siehe Kapitel 4.1.2). Zudem zeigten sich das Cardiolipin-Level in den mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten inkubierten Proben als signifikant erniedrigt (siehe Kapitel 4.2.1).

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, gilt Cardiolipin aufgrund seiner in den Fettsäureresten befindlichen Doppelbindungen sowie der räumlichen Nähe zur mitochondrialen Atmungskette als besonders anfällig für eine durch ROS induzierte Lipidperoxidation (SHI, 2010; CHICCO, SPARAGNA, 2007). Es existieren Hinweise darauf, dass oxidiertes Cardiolipin seine Atmungskette-stabilisierende Effekte verliert. Dies konnte im Tiermodell insbesondere für die Komplexe I und III nachgewiesen werden (PARADIES et al., 2004; PARADIES et al., 2002; PARADIES et al., 2001). Weiter konnte gezeigt werden, dass ROS – beispielsweise in ischämischem Herzmuskelgewebe – zu einer Reduktion des zellulären Cardiolipin-Levels führen (LESNEFSKY et al., 2001). Umgekehrt führte im Rahmen einer Ischämie eine durch Blockade der Elektronentransportkette generierte Verringerung von oxidativem Stress zu einer Aufrechterhaltung des Cardiolipin-Gehaltes sowie Verringerung der mitochondrialen

Schädigung (LESNEFSKY et al., 2004). Studien in primären neuronalen Zellen aber auch SH-SY5Y-Zellen, wie sie auch in der hier vorliegenden Forschungsarbeit verwendet wurden, konnten zeigen, dass es bei mitochondrialem Stress zu einer Externalisierung des Cardiolipins von der IMM zur OMM kommt, wo es als Signal zur Initiierung der Mitophagie dient (CHU et al., 2013). Des Weiteren ist ein Verlust des membranstabilisierenden Cardiolipins, wie es beispielsweise bei Patienten mit Barth-Syndrom aufgrund der Mutation des *Tafazzin*-Gens der Fall ist, mit vergrößerten Mitochondrien sowie einer desorganisierten Cristae-Struktur assoziiert (DUDEK, 2017; ACEHAN et al., 2007; XU et al., 2006).

In der vorliegenden Forschungsarbeit ließ sich nach der Inkubation mit Aspartam, aber auch nach der Inkubation mit den Aspartam-Metaboliten sowohl eine Erniedrigung des zellulären Cardiolipin-Levels, als auch eine durch den Integritätsverlust entstehende Vergrößerung der mitochondrialen Gesamtfläche sehen.

5.4.3. Mitophagie und *Mitochondrial Fission*

Um die zu der Fragmentierung und Flächenvergrößerung der Mitochondrien führenden Mechanismen genauer zu verstehen, wurde in der hier vorliegenden Forschungsarbeit die Genexpression von Proteinen analysiert, welche in den dynamischen Umbau der Mitochondrien involviert sind. Wie im Ergebnisteil beschrieben (siehe Kapitel 4.2), werden im Rahmen der sogenannten Mitophagie dysfunktionale Mitochondrien zur Reduzierung ihres zytotoxischen Effektes selektiv gekennzeichnet und abgebaut (ONISHI et al., 2021; HAMACHER-BRADY, BRADY, 2016).

Eine Beeinträchtigung der Mitophagie konnte insbesondere im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit gezeigt werden (PICKRELL, YOULE, 2015; GEISLER et al., 2010): So zeigen sich bei hereditären Formen dieser Erkrankung das Signalprotein *Parkin* (ABBAS et al., 1999; HATTORI et al., 1998) und die Kinase PINK1 (VALENTE et al., 2004) mutiert, was in Konsequenz zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und damit einhergehender Zellschädigung führt (LIZAMA, CHU, 2021; GE et al., 2020). Im Rahmen der hier vorliegenden Forschungsarbeit zeigten sich in der Analyse der Genexpression von PINK1 nach der Aspartam-Behandlung eine signifikante Erhöhung; nach der Behandlung mit den Metaboliten war ein weniger ausgeprägter Effekt messbar.

Im Kontext der mitochondrialen Dynamik ist auch der Prozess der *Mitochondrial Fission* zu erwähnen, welcher in Kapitel 4.2 genauer beschrieben wird und eine Fragmentierung und anschließende Exozytose geschädigter Mitochondrien beschreibt. In einer Studie von Wang et al. konnte in kultivierten Zellen der Hippocampi von Alzheimer-Patienten sowohl auf Protein- als auch auf Genebene eine signifikant erhöhte Expression von FIS1 gezeigt werden. Bei der Induktion von A β -Toxizität in murinen hippocampalen Neuronen war keine Veränderung der Expression von Mfn1, Mfn2 oder FIS1, jedoch einer Erhöhung des Expressionslevels des für die mitochondriale Fragmentierung benötigte Drp1 detektierbar (PRADEEPKIRAN, REDDY, 2020; WANG et al., 2009). Manczak et al. zeigten analog zu Wang et al. in hippocampalen AD-Neuronen eine erhöhte Expression der Fission vermittelnden Gene Drp1 und FIS1 bei erniedrigter Expression der Fusion vermittelnden Gene Mfn1, Mfn2, Opa1 und

Tomm40 (MANCZAK et al., 2011). Aspartam ist im Zusammenhang mit der Mitophagie und *Mitochondrial Fission* bislang nur unzureichend untersucht worden. In der hier vorliegenden Forschungsarbeit ergab die Messung der Genexpression von FIS1 sowohl nach der Inkubation mit Aspartam als auch nach jener mit Aspartam-Metaboliten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Kapitel 4.2.2).

Resümierend lassen sich anhand der Kapitel 5.4.1, 5.4.2 und 5.4.3 erste Schlussfolgerungen aus den in dieser Forschungsarbeit gewonnenen Daten und den in der Literatur beschriebenen, pathomechanistischen Vorgängen neurodegenerativer Erkrankungen, wie der Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit ziehen: Es zeigen sich Überschneidungen zwischen den *in vitro* durch Aspartam generierten Effekten mit pathophysiologischen Mechanismen der Alzheimer Demenz in Form einer mitochondrialen Dysfunktion sowie erhöhten Levels reaktiver oxidativer Sauerstoffspezies.

Hierbei ist nochmals zu betonen, dass die hier für Aspartam gewonnenen Daten in einer Zellkultur-Studie generiert wurden und in jedem Fall *in vivo* weiter überprüft werden müssen. Als erste Konsequenz ließe sich dennoch kritisch schlussfolgern, dass die Exposition neuronaler Zellen mit Aspartam solche Effekte induziert, die auch im Rahmen der AD als pathophysiologisch gelten. Insbesondere bei einer bereits existierenden Erkrankung oder auch im Falle einer reinen Prädisposition für AD wäre der Konsum von Aspartam, vorausgesetzt, dass dieses in dieser Form im Gehirn ankommt, risikobehaftet.

5.4.4. Lipidhomöostase

5.4.4.1. *Lipid Droplets*, Triacylglyceride und Phospholipide

Im Zuge des nach Aspartam-Inkubation detektierten oxidativen Stresses ist auch die zelluläre Lipidhomöostase inklusive der *Lipid Droplet*-Bildung zu diskutieren, da diese untereinander in engem Zusammenhang stehen. So zeigt sich, dass *Lipid Droplets* im Rahmen ihrer Integrierung in die Regulation des zellulären Metabolismus auch einen kompensatorischen Mechanismus bei oxidativem Stress darstellen können (RALHAN et al., 2021; JARC, PETAN, 2019). Verschiedene *in vitro*-Studien konnten eine hochregulierte Triacylglycerid-Synthese sowie begünstigte Akkumulation von *Lipid Droplets* bei zellulärem Stress und Nährstoffmangel zeigen (JARC, PETAN, 2019; RAMBOLD et al., 2015; GUBERN et al., 2009). Lee et al. wies bei Mäusen in verschiedenen Geweben, wie dem Lungenepithel und Herzmuskelzellen, eine durch Stress – in Form von Hyperoxie, Hypoxie, Nährstoffmangel – bedingte mitochondriale Dysfunktion inklusive *Mitochondrial Swellings* mit begünstigter Bildung von *Lipid Droplets* nach (LEE et al., 2013). Cabodevilla et al. konnte *in vitro* in verschiedenen, unter anderem auch neuronalen Zelllinien nachweisen, dass unter Nährstoffmangel eine Biogenese von *Lipid Droplets* begünstigt wird und, dass das Zellüberleben in Abhängigkeit von einer β -Oxidation der aus LDs mobilisierten Fettsäuren aufrechterhalten wird (CABODEVILLA et al., 2013). In Gliazellen von *Drosophila*, welche oxidativem Stress ausgesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass Zellmembran-Phospholipide vor einer Peroxidation geschützt werden, indem sie in die *Lipid Droplets* transferiert wurden (BAILEY et al., 2015). Einhergehend mit diesen Erkenntnissen wurde mittlerweile

vielfach nachgewiesen, dass *Lipid Droplets* mit verschiedenen Organellen, darunter auch Mitochondrien, interagieren (COHEN et al., 2018; SCHULDINER, BOHNERT, 2017). Ihre einzigartige Phospholipid-Monomembran ermöglicht eine Ausbildung von proteinhaltigen Kontaktbrücken (u.a. durch *Perilipin5*) (WANG et al., 2011), über welche Lipide ausgetauscht werden können und es so zu einer Expansion der Mitochondrien-assoziierten *Lipid Droplets* kommt (GATTA, LEVINE, 2017; BENADOR et al., 2018; RAMBOLD et al., 2015). Nguyen et al. konstatierten, dass *Lipid Droplets* als Puffer-System interagieren, indem Fettsäuren nach der Degradation membranhaltiger Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien, in neu synthetisierte *Lipid Droplets* geleitet werden (NGUYEN et al., 2017).

Die Membran der *Lipid Droplets* besteht zu einem überwiegenden Teil aus Phosphatidylcholin- und ethanolamin-Spezies, während ihr Kern vor allem durch Triacylglyceride und Cholesterinester gebildet wird (beschrieben in Kapitel 4.1.1). Auch die Lipiddoppelschicht, welche die Zelle als Gesamtes nach außen hin begrenzt, wird in mamillären Zellen größtenteils durch Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin gebildet (siehe Kapitel 4.4.2). Eine Untersuchung der Effekte von Aspartam auf intrazelluläre Lipidveränderungen hatte bisher nur unzureichend stattgefunden. Es ist aber beschrieben, dass Aspartam und auch andere Süßstoffe auf „makroskopischer“ Ebene einen Effekt auf Serum-Lipidlevels eines Organismus haben. So konnte bei männlichen Ratten, welche über einen Zeitraum von neun Wochen in eine Aspartam-Gruppe und eine Wasser-Gruppe randomisiert wurden, bei der Aspartam-Gruppe, welche orale Dosierungen von 15 – 35 mg pro Kilogramm Körpergewicht erhielt, eine signifikante Erhöhung der Serumlevels von Cholesterin, Triacylglyceriden und des *Low Density Lipoprotein* (LDL), nachgewiesen werden (ADARAMOYE, AKANNI, 2016).

In der hier vorliegenden Forschungsarbeit ließen sich nach der Behandlung mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten einerseits eine elektronenmikroskopisch detektierte Vergrößerung von *Lipid Droplets* sehen (siehe Kapitel 4.1.1). Damit einhergehend zeigte sich in der massenspektrometrischen Messung ein signifikanter Anstieg des TAG-Levels (siehe Kapitel 4.4.1). Ein potentiell zugrundeliegender reduzierter TAG-Verbrauch könnte sich aus der durch Aspartam induzierten mitochondrialen Dysfunktion begründen. Darüber hinaus zeigte sich in der massenspektrometrischen Analyse ein signifikanter Anstieg der Phospholipid-Spezies (siehe Kapitel 4.4). Die gemessenen Effekte ließen sich sowohl in den mit Aspartam als auch in den mit den Aspartam-Metaboliten behandelten Proben sehen.

Die Relevanz der Lipidhomöostase für zerebrale Mechanismen ergibt sich schon allein aus der Tatsache, dass das menschliche Gehirn zu mehr als 50 % seines Trockengewichts aus Lipiden besteht, womit es nach dem Fettgewebe das lipidreichste Organ darstellt (SASTRY, 1985). Lipide sind nicht nur in die Pathomechanismen von Erkrankungen involviert, sondern können sich auch im alternden Gehirn als dysfunktionales Merkmal darstellen. Marschallinger et al. konnte im Hippocampus gealterter Mäuse in Mikroglia eine Akkumulation von *Lipid Droplets*, inklusive der vermehrten Ausschüttung verschiedener Zytokine, wie beispielsweise des Interleukins-6 nachweisen (MARSCHALLINGER et

al., 2020). Auch im Zusammenhang mit dem Risiko für die Alzheimer-Erkrankung ließen sich LD-Auffälligkeiten sehen: Farmer et al. konnten in einer *in vitro*-Studie an Astrozyten, welche das Alzheimerisiko erhöhende ApoE4-Allel exprimierten, im Vergleich zu ApoE3-exprimierenden Astrozyten eine erhöhte Anzahl von *Lipid Droplets* mit pro Zelle insgesamt erhöhtem LD-Volumen sehen. Die Fläche eines einzelnen *Lipid Droplets* zeigte sich jedoch als verkleinert (FARMER et al., 2019).

5.4.4.2. Carnitin-Spezies

Wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben wurde, spielen Carnitine eine maßgebliche Relevanz für den in den Mitochondrien stattfindenden Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation. Nur durch die von der *Carnitin-Palmitoyl-Transferase I* katalysierte Konjugation mit Carnitin können Fettsäuren als Acylcarnitine über die mitochondrialen Membranen transportiert (*Carnitin-Shuttle*) und zu Acetyl-CoA abgebaut werden, welches dann unter anderem in den Citratzyklus zur Generierung von ATP eingeschleust werden kann.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der massenspektrometrischen Messung nach Aspartam-Inkubation im Mittelwert aller Carnitin-Subspezies eine Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen. Acetyl-Carnitin zeigte sich nach Aspartam-Inkubation hingegen leicht erhöht. (siehe Kapitel 4.4.3).

Acetyl-L-Carnitin (ALC) kann über seinen Acetyl- und Carnitin-Bestandteil verschiedene biologische Wirkungen vermitteln: Der Acetyl-Bestandteil kann einen mitochondrialen Acetyl-CoA-Spiegel generieren, was die durch den Citratzyklus vermittelte Energiegewinnung ermöglicht; Carnitin ermöglicht die β -Oxidation der Fettsäuren (PETTEGREW et al., 2000). Acetyl-L-Carnitin kann von exogen über die Nahrung zugeführt werden oder auch endogen in der mitochondrialen Matrix durch das Enzym *Carnitin-Acetyltransferase* gebildet werden: Acetyl-CoA, wird durch die β -Oxidation generiert; Carnitin wird aus dem *Carnitin-Shuttle* (*Carnitin-Palmitoyl-Transferase II*) frei. Die *Carnitin-Acetyltransferase* ist mit der *Cholin-Acetyltransferase* verknüpft, welche die intrazelluläre Bildung von Acetylcholin katalysiert (FURLONG, 1996).

Bei an der Alzheimer Demenz erkrankten Patienten zeigt sich die cholinerge Neurotransmission mittels des Neurotransmitters Acetylcholin als beeinträchtigt. Dieser ist physiologisch in verschiedene zerebrale Prozesse wie Gedächtnis, Aufmerksamkeit oder Regulierung des Schlafes involviert (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Der bei der AD beobachtete fortschreitende Verlust von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn geht mit erniedrigten Levels des Neurotransmitters und entsprechenden klinischen Symptomen einher (DAVIES, MALONEY, 1976). In Studien der frühen 2000er-Jahre konnte nachgewiesen werden, dass Medikamente, welche den Abbau des Acetylcholins über das Enzym *Acetylcholinesterase* inhibieren, die kognitiven Symptome der AD-Patienten signifikant verbessern konnten. Heutzutage werden *Acetylcholinesterase-Inhibitoren* wie Donepezil oder Rivastigmin in der klinischen Praxis zur symptomatischen Therapie der AD-Patienten eingesetzt (HAMPEL et al., 2018). Carnitine scheinen in diesem Zusammenhang die cholinerge Neurotransmission und mitochondriale Funktion positiv zu beeinflussen (ALHASANIAH, 2023; PENNISI et al., 2020). In Studien konnte

gezeigt werden, dass die Supplementation von Acetyl-L-Carnitin den progressiven Verlust kognitiver Fähigkeiten von Alzheimer Patienten verlangsamen konnte (PETTEGREW et al., 1995; SPAGNOLI et al., 1991). Eine Metaanalyse, die 21 RCTs inkludierte, zeigte insgesamt uneindeutige Effekte, was sich unter anderem auch durch die Heterogenität der Studiendesigns inklusive sich unterscheidender Dosierungen und Applikationen erklären lässt. In Summe ließ sich für die Carnitin-Substitution im Vergleich zum Placebo dennoch ein positiver Effekt auf die klinischen Symptome verzeichnen (MONTGOMERY et al., 2003). Eine aktuellere Studie von Cristofano et al. bestimmte bei verschiedenen Gruppen mit kognitiver Beeinträchtigung – hierunter auch Alzheimer Patienten – die Serumlevels von Acylcarnitin-Spezies analog zu jenen in der hier vorliegenden Arbeit vermessenen Carnitin-Spezies. Die AD-Patienten zeigten hierbei im Vergleich zu den gesunden Probanden im Mittel signifikant niedrigere Carnitin-Serumlevels (CRISTOFANO et al., 2016). Damit einhergehend wiesen González-Domínguez et al. im Gehirn eines Alzheimer-Mausmodells (APP/PS1) im Kortex und Hippocampus die Verringerung verschiedener Acylcarnitin-Spezies nach (GONZALEZ-DOMINGUEZ et al., 2014).

Vor dem Hintergrund des bei Alzheimer Demenz beeinträchtigten Carnitin-Stoffwechsels können – wie auch schon bei den in Kapitel 5.4.4.1 besprochenen Lipid-Spezies – die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Carnitin-Daten kritisch eingeordnet werden, und den Konsum von Aspartam bei Alzheimer-Patienten – wie auch in Kapitel 5.4.3 angemerkt – kritisch evaluieren.

5.5. Einordnung

5.5.1. Aspartam-Konsum *in vivo*: Relevanz der *Gut-* und *Blood-Brain-Barrier*

Als Grundlage für die Einordnung der hier gewonnen und diskutierten Daten ist zu betonen, dass die im Rahmen dieser Forschungsarbeit durch die Inkubation mit Aspartam oder Aspartam-Metaboliten gewonnenen Daten anhand eines *in vitro*-Modells generiert wurden, womit eine enterale Metabolisierung des Süßstoffes, wie sie *in vivo* stattfindet, nur in Grundzügen simuliert werden kann. Umso mehr ist es von Relevanz, die gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* zu re-evaluieren, wo insbesondere die Tatsache, dass Aspartam bzw. seine Metabolite nach der oralen Aufnahme verschiedene „Barrieren“ (*Gut-Barrier* und *Blood-Brain-Barrier*) überwinden müssen, bevor sie die potentiellen Effekte im Gehirn an neuronalen und auch nicht-neuronalen Zellen vermitteln, berücksichtigt werden muss.

Nach seiner oralen Aufnahme wird Aspartam im Gastrointestinaltrakt potentiell zunächst durch Esterasen und Peptidasen in seine Metaboliten hydrolysiert, (MAGNUSON et al., 2016; HOOPER et al., 1994; STEGINK et al., 1987; OPPERMAN et al., 1973) um dann anschließend über das gastrointestinale Epithel (Engl.: *Gut Barrier*) absorbiert zu werden.

Shil et al. konnten zeigen, dass Aspartam *in vitro* bei niedrigen Konzentrationen von 100 μM die Permeabilität intestinaler Epithelzellen erhöht, indem es zu einer verminderten Expression von Claudin-3 und Claudin-15 führt (SHIL et al., 2020). Bei diesen handelt es sich um Transmembranproteine, die als Teil von sogenannten *Tight Junctions* einen engen Kontakt zwischen Zellen herstellen, somit die Separierung des Darmlumen vom Blutstrom unterstützen und damit unter anderem die Absorption von

Mikro- und Makronährstoffen regulieren (CAMILLERI, 2019). Des Weiteren wird Claudin-3 auch in den *Tight Junctions* der sogenannten *Blood Brain Barrier* (BBB) exprimiert (REINHOLD, RITTNER, 2017). In ihrer Studie konnten Shil et al. auch eine Korrelation zwischen der verringerten Expression von Claudin-3 und einer durch Aspartam generierten ROS-Produktion darstellen.

Diese Daten sind insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass eine Vielzahl von Erkrankungen mit einer beeinträchtigten *Gut Barrier* einhergehen, was wiederum den Influx von Bakterien oder anderen Toxinen in den Körperkreislauf ermöglicht und so selbstverstärkend zur Pathogenese der Erkrankungen beitragen kann (DI TOMMASO et al., 2021). So gibt es in verschiedenen *in vivo*-Modellen Hinweise darauf, dass bei Erkrankungen, wie beispielweise der Zöliakie (FASANO, 2012; FASANO et al., 2000), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (MICHIELAN, D'INCA, 2015; SALIM, SODERHOLM, 2011), Diabetes mellitus Typ 2 (THAISS et al., 2018; COX et al., 2017; PATTERSON et al., 2016), oder auch der Multiplen Sklerose (CAMARA-LEMARROY et al., 2018; BUSCARINU et al., 2017; YACYSHYN et al., 1996) und Parkinson (DODIYA et al., 2020; SCHWIERTZ et al., 2018) die *Gut Barrier* beeinträchtigt ist. Neben der *Gut Barrier* zeigt sich auch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (Engl.: *Blood Brain Barrier*, BBB) bei zahlreichen, insbesondere neurodegenerativen, Erkrankungen als beeinträchtigt (SWEENEY et al., 2018).

Die BBB ist eine hoch-selektive, aus mehreren Zelltypen und Schichten bestehende „Schranke“ zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralen Nervensystem. Sie ermöglicht einen selektiven Übertritt von Nährstoffen aus den das Gehirn versorgenden Gefäßen in dieses selbst und schützt es vor Pathogenen oder potentiell toxischen Bestandteilen aus dem Blut (SWEENEY et al., 2019; ABBOTT et al., 2006). Auf mikroskopischer Ebene wird diese Schutzbarriere insbesondere durch das Endothel der Blutkapillaren mitsamt seiner *Tight Junctions*, Adhäsionsmoleküle und speziellen Transportmechanismen ermöglicht (ALAHMARI, 2021; MOKGOKONG et al., 2014; LUISSINT et al., 2012). An die Blutendothel-Zellen lagern sich zum einen die neuronalen Perizyten an (KADRY et al., 2020; SWEENEY et al., 2016; BALABANOV, DORE-DUFFY, 1998), welche durch ihre phagozytierende Aktivität potentiell schädigende Partikel oder Proteine abbauen können und zudem auch die kapillären Endothelzellen in ihrer Permeabilität für unter anderem Wasser modulieren (SAGARE et al., 2013; ARMULIK et al., 2010). Auch Astrozyten bilden einen Teil der Blut-Hirn-Schranke (ABBOTT et al., 2006), indem sie sich mit ihren „Endfüßen“ an den Blutendothelien anlagern und dort maßgeblich den zerebralen Metabolismus beeinflussen, indem sie beispielsweise die Enge der endothelialen *Tight Junctions* (RUBIN et al., 1991), die Expression von Transportern wie P-Glykoprotein (PGP) (SCHINKEL, 1999) oder die Ionen- und Wasserkanälen regulieren (AMIRY-MOGHADDAM, OTTERSEN, 2003).

Eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht einen erleichterten Influx potentiell schädlicher Blutkomponenten, während gleichzeitig im Gehirn anfallende Stoffwechselprodukte anders, als physiologisch vorgesehen, nicht ausgeschleust werden können (SWEENEY et al., 2019; ZHAO et al., 2015).

Auch bei der Alzheimer Demenz zeigt sich die Blut-Hirn-Schranke als beeinträchtigt: Als zugrundeliegende Mechanismen werden durch die im Rahmen der AD auftretenden $A\beta$ -Plaques und Tau-Fibrillen entstehende, durch oxidativen Stress vermittelte, inflammatorische und zytotoxische Effekte diskutiert, welche zu einem Integritätsverlust der Blut-Hirn-Schranke führen (CARRANO et al., 2011). Hierbei werden die in der Umgebung der zerebralen Blutgefäße akkumulierende $A\beta$ -Plaques auch als sogenannte *Cerebral Amyloid Angiopathy* (CAA) beschrieben (VISWANATHAN, GREENBERG, 2011). Diese Angiopathie kann in vielfältiger Weise die Komponenten der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen: In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von Endothelzellen aus dem Kortex von Ratten mit $A\beta_{42}$ zu einer erniedrigten Expression des *Tight Junction*-Proteins Occludin führte (MARCO, SKAPER, 2006).

Vor diesem Hintergrund ist die bereits zitierte Studie von Shil et al., die nach einer *in vitro* stattfindenden Aspartam-Inkubation eine reduzierte Expression von Claudin-3 nachwies, besonders interessant, um den Zusammenhang zwischen Aspartam-Exposition und neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD herzustellen. In diesem Zuge ist deshalb auch noch eine Erkrankung zu diskutieren, in deren Rahmen Aspartam immer noch besonders häufig verwendet wird: Diabetes mellitus Typ 2. Auch diese Erkrankung ist mit einer Erhöhung des Risikos an einer Alzheimer Demenz zu erkranken, korreliert.

5.5.2. Einordnung der Studie anhand des Zusammenhangs zwischen der Alzheimer-Krankheit und Diabetes mellitus

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben wurde, lässt sich eine Assoziation zwischen der Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 und Demenz im Allgemeinen – aber auch der der Alzheimer-Krankheit im Speziellen – erkennen. Verschiedene Studien zeigen, dass eine diabetogene Stoffwechsellage ein signifikant erhöhtes Risiko an einer Alzheimer Demenz zu erkranken, darstellt (XUE et al., 2019; BUTTERFIELD et al., 2014; BIESSELS et al., 2006; ARVANITAKIS et al., 2004). Gleichzeitig konnte bei AD-Patienten eine im Vergleich zu Kontrollen eine höhere Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 sowie pathologische Nüchternblutglucosewerte gefunden werden (JANSON et al., 2004).

Bei Diabetes mellitus kann ein pathomechanistisch Kontinuum beschrieben werden, in dessen Zentrum die Unfähigkeit des Körpers zur Aufrechterhaltung physiologischer Blutglucose-Levels liegt. Dies zeigt sich an pathologischen Nüchternblutglucosewerten im Blutplasma von $> 7,0$ mmol/L (= 126 mg/dL) (REED et al., 2021). Die Beibehaltung einer physiologischen Blutglucose-Konzentration nach Nahrungsaufnahme wird beim Menschen maßgeblich durch das in den β -Zellen des Pankreas synthetisierte Peptidhormon Insulin generiert. Das Hormon bindet in peripheren Geweben – wie beispielsweise dem Fettgewebe, der Muskulatur und selektiv auch im Gehirn – an den membranständigen Insulin-Rezeptor (IR) (POMYTKIN et al., 2018; SOTO et al., 2019). Dieser besteht aus vier Untereinheiten, zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Insulin bewirkt durch seine Bindung an den extrazellulären Teil des Rezeptors dessen Konformationsänderung, wodurch eine an seiner transmembranösen β -Untereinheit befindliche Tyrosinkinase aktiviert wird. Jene Tyrosinkinase phosphoryliert zunächst im Rahmen einer „Autophosphorylierung“ den Insulin-Rezeptor selbst und

dann anschließend zum IR gehörende Adapterproteine, die sogenannten Insulinrezeptorsubstrate (IRS). Dies führt nun zur Initiation verschiedener Signalwege, von welchen hier in erster Linie der „PI3-Kinase-Weg“ beleuchtet werden soll. Dieser mündet über Aktivierung der *Proteinkinase B* (PKB) in eine intrazelluläre Erniedrigung des cAMP-Spiegels, welche die über das Insulinhormon begründeten metabolischen Effekte vermittelt. So führt der in der jeweiligen Zelle erniedrigte cAMP-Spiegel unter anderem zum Einbau von Glucosetransportern (GLUT) in die Zellmembran, was für eine passive Aufnahme von Glucose aus dem Blutstrom nach intrazellulär sorgt (BOUCHER et al., 2014). Wie auch in peripheren Geweben vermitteln sowohl Insulin und auch der *Insulin-like Growth Factor* (IGF) im Gehirn ihre Wirkung über die Bindung an den Insulin-Rezeptor oder *Insulin-like Growth Factor*-Rezeptor. Eine besonders hohe Expression des IR konnte im Hypothalamus sowie im limbischen System inklusive des Hippocampus, der Amygdala und des piriformen Kortexes festgestellt werden (KLEINRIDDERS et al., 2014). Da vor allem letztere als Zentren höherer kognitiver Funktionen und insbesondere des Lernens gelten, wurde schon früh eine Rolle des Insulins in Lernprozessen diskutiert (WICKELGREN, 1998). Exemplarisch konnte in einer Studie an murinen Neuronen des Hippocampus gezeigt werden, dass Insulin die für Lernprozesse relevante Langzeitdepression (Engl.: *Long Time Depression*, LTD) unterstützt, indem es über Aktivierung der PI3K Signalkaskade die Expression von NMDA-Rezeptoren induziert (VAN DER HEIDE et al., 2005). Heute ist bekannt, dass Insulin in zahlreiche zentrale Prozesse involviert ist und neben der klinisch messbaren Verbesserung kognitiver Leistungen (KERN et al., 2001) auch an der zentralen Regulation des Körpergewichts beteiligt ist (DODD, TIGANIS, 2017). Bei der Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 zeigen sich als ätiopathogenetisch zugrundeliegende Faktoren unter anderem eine hochkalorische Ernährung, Bewegungsmangel und damit einhergehendes Übergewicht (GALICIA-GARCIA et al., 2020; DALE et al., 2017). Letzteres gilt als maßgeblicher Faktor für die Induktion einer peripheren Insulinresistenz, welche sich durch auf den Zielzellen herunterregulierte Expression der Insulin-Rezeptoren und Insulin-Rezeptor-Substrate zeigt. Die Insulinresistenz kann im Sinne der Erhaltung einer Normoglykämie zunächst durch die pankreatischen β -Zellen kompensiert werden, indem diese zum einen ihre Anzahl und zum anderen die Insulinsekretions-Rate erhöhen (LINNEMANN et al., 2014). Nach einer gewissen Zeit können die β -Zellen dies jedoch nicht mehr aufrechterhalten. In der Konsequenz zeigen sie eine dysfunktionale Insulinprozessierung- und sekretion oder gehen zum Teil in Apoptose, was durch verschiedene Stressoren wie oxidativen oder inflammatorischen Stress zusätzlich begünstigt wird (BOLAND et al., 2017; VANGIPURAPU et al., 2015). Dies führt zu verschiedenen – durch die fehlende Insulin-Wirkung vermittelte – Konsequenzen, wie erhöhte Blutglucose-Levels, aber beispielsweise auch zu vermehrter hepatischer Glucose-Aufnahme (BUTTERFIELD et al., 2014).

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben wurde, zeigte sich in den letzten Jahrzehnten ein starker Inzidenz- und Prävalenz-Anstieg an Adipositas und T2D-Erkrankungen (REED et al., 2021). Eine in 146 Ländern und an über vier Millionen Erwachsenen durchgeführte Erhebung ergab zwischen 1980 und 2014 einen Prävalenz-Anstieg an Diabetes-Erkrankungen von 5,0 % auf 7,9 % bei Frauen und von 4,3 % auf 9,0 % bei Männern. Im Jahr 2014 existierten weltweit in absoluten Zahlen 422 Millionen Diabeteskranke; für

2025 werden über 700 Millionen Erkrankte erwartet. Hieraus ergeben sich, wie auch bei der Alzheimer Demenz (siehe Kapitel 2.1), enorme ökonomische Belastungen in Form von direkten und indirekten Kosten. Für das Jahr 2014 wurden die weltweit auf Diabetes zurückführbaren Kosten auf 825 Milliarden Dollar geschätzt (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Eine Überschneidung zwischen der Alzheimer-Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 zeigt sich bei verschiedenen pathophysiologischen Aspekten (MICHAILIDIS et al., 2022), so auch bei der chronischen Inflammation (MOYSE et al., 2019). T2D geht mit einer systemischen Inflammation einher – die Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) und von Interleukin 6 (IL-6) konnten in Studien als prädiktive Faktoren für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ausgemacht werden (FREEMAN et al., 2002). Fishel et al. konnten in einer kleinen RCT an gesunden Senioren zeigen, dass eine mittels intravenöser Applikation erzeugte periphere Hyperinsulinämie mit einem Anstieg von Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α) und auch von A β 42 sowohl im Liquor als auch im Serum einhergeht (FISHEL et al., 2005). So wird diskutiert, dass eine Insulinresistenz die Alzheimer Demenz unter anderem aufgrund inflammatorischer Prozesse exazerbiert (WEI et al., 2021). Wichtige Faktoren sind hierbei die Aktivierung von Mikrogliazellen, eine Störung der *Blood-Brain-Barrier* (MCCAULLEY, GRUSH, 2017), sowie sogenannte *Advanced Glycation Endproducts* (AGE). Bei diesen AGE handelt es sich um nicht-enzymatisch glykierte Proteine oder Lipide, deren Entstehung durch das Vorhandensein der Hyperglykämien gefördert wird. Sie begünstigen eine Produktion von ROS, was wiederum die APP-Prozessierung beeinflusst (KANDIMALLA et al., 2017; LIAO et al., 2004).

Als einen weiteren möglichen zugrundeliegenden Mechanismus für den Zusammenhang zwischen T2D und AD wird unter anderem ein dysfunktionales „Insulindegradierendes Enzym“ (Engl.: *Insulin Degrading Enzyme*, IDE) diskutiert (SOUSA et al., 2021). Dieses bewirkt in peripheren Geweben, wie der Leber, dem Fettgewebe oder der Skelettmuskulatur einen Abbau des Peptidhormons Insulins. Ein Funktionsverlust des IDE führt in murinen Modellen zu einem diabetischen Phänotyp (FARRIS et al., 2004). Auch Beobachtungen an humanen Probanden unterstützen diese Hypothese: In der Kohorte der *Framingham Heart Study* mit über 1.500 Teilnehmern konnte ein Zusammenhang zwischen IDE-Polymorphismen und T2D bzw. einem erhöhten HbA_{1c}-Wert nachgewiesen werden (KARAMOHAMED et al., 2003). Zusätzlich wird IDE auch im Gehirn exprimiert und ist dort neben dem Abbau der Peptidhormone Insulin oder Glukagon auch für die Degradation des A β -Peptids verantwortlich (HULSE et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass IDE sowohl die intrazelluläre APP-Prozessierung als auch die extrazelluläre Akkumulation von A β beeinflusst (VENUGOPAL et al., 2007). Die Rolle des IDE bei der Alzheimer Demenz wurde lange kontrovers diskutiert. Eine im Jahre 2018 veröffentlichte Metaanalyse, die die Untersuchung verschiedener Autopsieproben inkludierte, ergab, dass das IDE-Proteinlevel in Hippocampus und Kortex bei AD im Vergleich zu Kontrollen signifikant erniedrigt waren, während für die Aktivität und die mRNA-Levels kein signifikanter Unterschied gemessen werden konnte (ZHANG et al., 2018). In einem Alzheimer-Mausmodell zeigte sich, dass eine erste Akkumulation von A β mit einer Erhöhung der Levels der IDE-mRNA und des IDE-Proteinlevels einherging (VEPSALAINEN et al., 2008). Eine hiermit im Einklang stehende

Überexpression des Enzyms in $A\beta$ -Ablagerungen selbst (LEAL et al., 2006) lässt im murinen Modell (Tg2576) einen hinter dem IDE stehenden Kompensationsmechanismus zur Verhinderung der $A\beta$ -Akkumulation vermuten. Gleichzeitig scheint oxidativer Stress, wie er durch weitere Zunahme von $A\beta$ -Plaques ausgelöst wird, die proteolytische Aktivität des IDE zu verringern (SHINALL et al., 2005). Einen möglichen direkten Zusammenhang bezüglich des IDE, T2D und AD konnte Farris et al. 2003 in einer Studie am murinen Modell zeigen, bei der durch eine homozygote Deletion des IDE-Gens auf Chromosom 10 neben einer peripheren Glucose-Intoleranz und Hyperinsulinämie auch eine signifikant erhöhte Akkumulation von $A\beta$ im Gehirn einherging (FARRIS et al., 2003). Hierbei wird eine Konkurrenz des Insulins und des $A\beta$ um das IDE diskutiert. Unterstützend dafür ist die Beobachtung, dass bei Ratten eine gleichzeitige intrazerebrale Verabreichung von Insulin und $A\beta$ den Abbau letzteres beeinträchtigt (SHIIKI et al., 2004).

Vor diesem Hintergrund wird eine, neben der peripher existierenden, hiervon aber gegebenenfalls unabhängig vorkommende, zerebrale Insulinresistenz im Zusammenhang mit der AD diskutiert (NGUYEN et al., 2020). Die Rolle des Insulins und einer möglichen zerebralen Insulinresistenz im Zusammenhang zur Alzheimer Demenz wurde durch Steen et. al als Diabetes mellitus Typ 3 im Sinne einer neuroendokrinen Störung bezeichnet, nachdem sie *post mortem* in Gehirnen von AD-Patienten eine verminderte Expression von für den Insulin- und *Insulin-Like-Growth-Factor*-Rezeptor (IGF1-R) kodierenden Genen nachweisen konnten (STEEN et al., 2005). In zahlreichen weiteren *post mortem*-Studien konnte ein Zusammenhang zwischen defekten Signalkaskaden des Insulin- oder IGF1-Rezeptors mit ihren Substraten (Insulin-Rezeptor-Substrat, IRS) und den mikroskopischen AD-typischen Pathologien hergestellt werden (YANG, 2022; MOLONEY et al., 2010). *In vitro* konnten hierbei verschiedene zugrundeliegende Mechanismen für den Zusammenhang zwischen einer zerebralen Insulinresistenz und den Alzheimer-typischen β -Amyloid-Plaques aufgezeigt werden. Gasparani et al. beschrieben, dass Insulin den Transport des $A\beta$ vom Golgi-Netzwerk zur Zellmembran beschleunigen und so die intrazelluläre Akkumulation von $A\beta$ reduzieren kann. Auch die Aktivität des IDE konnte durch die Anwesenheit von Insulin erhöht werden (GASPARINI et al., 2001). In einem AD-Mausmodell (Tg2576) konnte gezeigt werden, dass eine durch Nahrung induzierte Insulinresistenz zu einer zerebralen Amyloidose inklusive einer erhöhten γ -Sekretase-Aktivität und reduzierter Aktivität des IDE führt (HO et al., 2004). Zellen mit Insulinresistenz und dysfunktionalem Insulin-Signaling zeigten stark beeinträchtigte Funktionen. Eine zentrale Bedeutung kommt hierbei den Mitochondrien und der Generierung oxidativen Stresses zu (BUTTERFIELD et al., 2014). In einem murinen Alzheimer-Modell mit Streptozotocin-induzierter diabetogener Stoffwechsellage und zerebraler Insulinresistenz wurden nicht nur eine signifikante $A\beta$ -Akkumulation sowie erhöhte Levels von hyperphosphoryliertem Tau im Hippocampus gemessen, sondern auch eine mitochondriale Dysfunktion mit vermindertem Transmembran-Potential, reduzierter Aktivität der *Cytochrom-C-Oxidase* sowie einer Erhöhung der Levels an Wasserstoffperoxid und Lipidperoxidationen festgestellt (CORREIA et al., 2013). Carvalho et al. verglichen die zerebralen Mitochondrien von Wildtyp-Mäusen mit transgenen Alzheimer-Mäusen mit (3xTg-AD) und mit Wildtyp-Mäusen, welche für sieben Monate Saccharose-

Wasser erhielten. Bei den Alzheimer- und Saccharose-Mäusen zeigten sich bei den Mitochondrien vergleichbare strukturelle Anomalien, Beeinträchtigungen der Atmungskette sowie oxidativer Stress. Interessanterweise ließen sich bei den Saccharose-Mäusen signifikant erhöhte A β -Levels detektieren (CARVALHO et al., 2012).

5.5.3. Fazit

Zusammenfassend lassen sich zwischen der Erkrankung an Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus pathomechanistische „Gemeinsamkeiten“ im Sinne einer potentiellen zerebralen Insulinresistenz mit systemischer Inflammation, endothelialer und mitochondrialer Dysfunktion sowie oxidativem Stress erkennen (siehe Abbildung 42) (MARRANO et al., 2023; NGUYEN et al., 2020; CORREIA et al., 2012).

Auch, wenn viele Aspekte hinsichtlich eines Zusammenhanges den beiden Erkrankungen noch nicht endgültig geklärt sind, zeigt sich jedoch, dass es sich hierbei um gegenseitig bedingende Risikogruppen handelt.

Auf Grundlage der in dieser Forschungsarbeit gewonnenen Daten und der in Kapitel 5.5.2 diskutierten Zusammenhänge zwischen der Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus Typ 2 lässt sich ein Caveat für genau jene Patienten-Kohorten aussprechen. Bei beiden Erkrankungen zeigen sich pathophysiologische Mechanismen, die durch den Konsum von Aspartam möglicherweise weiter aggraviert werden könnten. Um eines Tages potentiell konkrete Empfehlungen aussprechen zu können, sind für die in dieser Forschungsarbeit generierten *in vitro*-Daten weiterführende *in vivo*-Studien erforderlich.

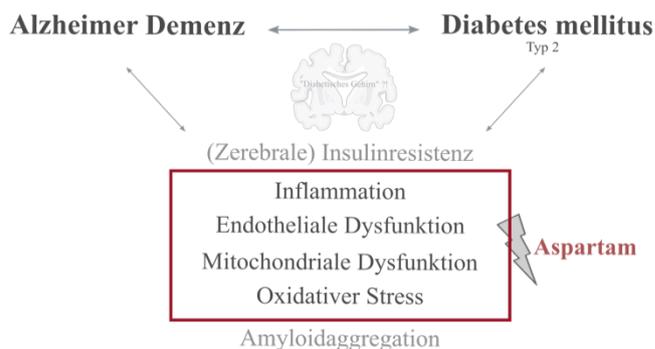


Abbildung 42: Zusammenfassende Darstellung pathophysiologischer Gemeinsamkeiten bei Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus.

Die beiden Erkrankungen zeigen Überschneidungen in der Pathophysiologie. Insbesondere das Auftreten einer systemischen Inflammation, endothelialer sowie mitochondrialer Dysfunktion und von oxidativem Stress. Angelehnt an (NGUYEN et al., 2020; CORREIA et al., 2012).

6. Publikationsliste

Griebsch LV *, Theiss EL *, Janitschke D, Erhardt VKJ, Erhardt T, Haas EC, Kuppler KN, Radermacher J, Walzer O, Lauer AA, Matschke V, Hartmann T, Grimm MOW, Grimm HS. *Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells*. *Nutrients*. 2023 Mar 18;15(6):1467. doi: 10.3390/nu15061467. PMID: 36986196; PMCID: PMC10053704.

Theiss EL *, **Griebsch LV ***, Lauer AA, Janitschke D, Erhardt VKJ, Haas EC, Kuppler KN, Radermacher J, Walzer O, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Vitamin B12 Attenuates Changes in Phospholipid Levels Related to Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells*. *Cells*. 2022 Aug 18;11(16):2574. doi: 10.3390/cells11162574. PMID: 36010649; PMCID: PMC9406929.

Janitschke D *, Lauer AA *, Bachmann CM, Winkler J, **Griebsch 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.

Lauer AA, **Griebsch LV**, Pilz SM, Janitschke D, Theiss EL, Reichrath J, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Valencak TG, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Impact of Vitamin D3 Deficiency on Phosphatidylcholine-/Ethanalamine, Plasmalogen-, Lyso-Phosphatidylcholine-/Ethanalamine, Carnitine- and Triacyl Glyceride-Homeostasis in Neuroblastoma Cells and Murine Brain*. *Biomolecules*. 2021 Nov 15;11(11):1699. doi: 10.3390/biom11111699. PMID: 34827697; PMCID: PMC8615687.

Mett J, Lauer AA, Janitschke D, **Griebsch LV**, Theiss EL, Grimm HS, Koivisto H, Tanila H, Hartmann T, Grimm MOW. *Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance A β Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme*. *Cells*. 2021 Oct 29;10(11):2941. doi: 10.3390/cells10112941. PMID: 34831163; PMCID: PMC8616162.

Kurokin I *, Lauer AA *, Janitschke D *, Winkler J, Theiss EL, **Griebsch LV**, Pilz SM, Matschke V, van der Laan M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model*. *Biomedicines*. 2021 Aug 21;9(8):1062. doi: 10.3390/biomedicines9081062. PMID: 34440266; PMCID: PMC8393816.

* trugen gleichermaßen zu der Publikation bei

7. Literaturverzeichnis

1. Abbas N, Lucking CB, Ricard S, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Bohme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A (1999) A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet* 8:567-574
2. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53
3. Abdel-Salam OM, Salem NA, El-Shamarka ME, Hussein JS, Ahmed NA, El-Nagar ME (2012) Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:2092-2101
4. Acehan D, Xu Y, Stokes DL, Schlame M (2007) Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab Invest* 87:40-48
5. Adaramoye OA, Akanni OO (2016) Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27:29-37
6. Adebayo M, Singh S, Singh AP, Dasgupta S (2021) Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *FASEB J* 35:e21620
7. Agilent Technologies (2016). Massenspektrometrie Theoretische Grundlagen (https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_DEE.pdf)
8. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103:373-383
9. Alahmari A (2021) Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plast* 2021:6564585
10. Alhasaniah AH (2023) L-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci* 30:103555
11. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6923-6928
12. Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vazquez P, Maldonado A, de Caceres J, Desco M, Pozo MA, Blazquez E (2005) The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 92:798-806
13. Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*
14. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4:991-1001
15. Anbara H, Kian M, Darya GH, Sheibani MT (2022) Long-term intake of aspartame-induced cardiovascular toxicity is reflected in altered histochemical parameters, evokes oxidative stress, and trigger P53-dependent apoptosis in a mouse model. *Int J Exp Pathol* 103:252-262
16. Angelova PR, Abramov AY (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett* 592:692-702
17. Apovian CM (2016) Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 22:s176-185
18. Ardanaz CG, Ramirez MJ, Solas M (2022) Brain Metabolic Alterations in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23
19. Armand-Ugon M, Ansoleaga B, Berjaoui S, Ferrer I (2017) Reduced Mitochondrial Activity is Early and Steady in the Entorhinal Cortex but it is Mainly Unmodified in the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 14:1327-1334
20. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557-561

21. Arnarez C, Mazat JP, Elezgaray J, Marrink SJ, Periolo X (2013) Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc1. *J Am Chem Soc* 135:3112-3120
22. Arroyo-Johnson C, Mincey KD (2016) Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am* 45:571-579
23. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol* 61:661-666
24. Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D (2014) Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4:39-43
25. Ashok I, Sheeladevi R (2015) Oxidant stress evoked damage in rat hepatocyte leading to triggered nitric oxide synthase (NOS) levels on long term consumption of aspartame. *J Food Drug Anal* 23:679-691
26. Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D (2015) Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. *J Biomed Res* 29:390-396
27. Asmat U, Abad K, Ismail K (2016) Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* 24:547-553
28. Avila J (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 580:2922-2927
29. Ayodele T, Rogaeva E, Kurup JT, Beecham G, Reitz C (2021) Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research? *Curr Neurol Neurosci Rep* 21:4
30. Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, Mann A, Jeyaraman MM, Reid AE, Fiander M, MacKay DS, McGavock J, Wicklow B, Zarychanski R (2017) Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *CMAJ* 189:E929-E939
31. Bächer S (2014) *Massenspektrometrische Methoden in der Laboratoriumsmedizin*, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
32. Bailey AP, Koster G, Guillemier C, Hirst EM, MacRae JJ, Lechene CP, Postle AD, Gould AP (2015) Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163:340-353
33. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495
34. Balabanov R, Dore-Duffy P (1998) Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 53:637-644
35. Balin BJ, Hudson AP (2014) Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 14:417
36. Bandyopadhyay A, Ghoshal S, Mukherjee A (2008) Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug Chem Toxicol* 31:447-457
37. Bartolini M, Naldi M, Fiori J, Valle F, Biscarini F, Nicolau DV, Andrisano V (2011) Kinetic characterization of amyloid-beta 1-42 aggregation with a multimethodological approach. *Anal Biochem* 414:215-225
38. Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, Chapman KD (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 48:837-847
39. Basu Ball W, Neff JK, Gohil VM (2018) The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Lett* 592:1273-1290
40. Baumkotter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S (2012) Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp Brain Res* 217:389-395
41. Benador IY, Veliova M, Mahdavian K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, Acin-Perez R, Shum M, Oliveira MF, Cinti S, Sztalryd C, Barshop WD, Wohlschlegel JA, Corkey BE, Liesa M, Shirihai OS (2018) Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27:869-885 e866
42. Berg JM, L. J, Stryer TL (2014a). *Lipide und Zellmembranen*. In *Stryer Biochemie* (Berlin, Springer), pp. 348.
43. Berg JM, L. J, Stryer TL (2014b) *Stryer Biochemie, Vol 7* (Berlin, Springer).

44. Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279:36562-36569
45. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74
46. Bioscientia MVZ Labor Karlsruhe (2020). Methanol
47. Bird TD (1993). Alzheimer Disease Overview. In GeneReviews((R)), Adam MP, DB Everman, GM Mirzaa, RA Pagon, SE Wallace, LJH Bean, KW Gripp, A Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
48. Blom ES, Holmans P, Arepalli S, Adighibe O, Hamshere ML, Gatz M, Pedersen NL, Bergem AL, Owen MJ, Hollingworth P, Goate A, Williams J, Lannfelt L, Hardy J, Wavrant-De Vrieze F, Glaser A (2008) Does APOE explain the linkage of Alzheimer's disease to chromosome 19q13? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:778-783
49. Bode DC, Freeley M, Nield J, Palma M, Viles JH (2019) Amyloid-beta oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. *J Biol Chem* 294:7566-7572
50. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS (2017) The dynamic plasticity of insulin production in beta-cells. *Mol Metab* 6:958-973
51. Bordi M, Nazio F, Campello S (2017) The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer. *Front Oncol* 7:81
52. Bosetti C, Gallus S, Talamini R, Montella M, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C (2009) Artificial sweeteners and the risk of gastric, pancreatic, and endometrial cancers in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2235-2238
53. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR (2014) Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6
54. Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128:617-630
55. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
56. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10:1089-1099
57. Breijyeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25
58. Bremer J (1983) Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev* 63:1420-1480
59. Brion J PH, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Mise en evidence immunologique de la proteine tau au niveau des lesions de degeneration neurofibril-laie de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* 229-235
60. Buscarinu MC, Cerasoli B, Annibali V, Policano C, Lionetto L, Capi M, Mechelli R, Romano S, Fornasiero A, Mattei G, Piras E, Angelini DF, Battistini L, Simmaco M, Umeton R, Salvetti M, Ristori G (2017) Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Mult Scler* 23:442-446
61. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E (2014) Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta* 1842:1693-1706
62. Cabodevilla AG, Sanchez-Caballero L, Nintou E, Boiadjieva VG, Picatoste F, Gubern A, Claro E (2013) Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled beta-oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* 288:27777-27788
63. Cadirci K, Ozdemir Tozlu O, Turkez H, Mardinoglu A (2020) The in vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human blood cells. *Turk J Med Sci* 50:448-454
64. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 20:4515-4529
65. Calkins MJ, Reddy PH (2011) Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochim Biophys Acta* 1812:507-513

66. Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V (2018) The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain* 141:1900-1916
67. Camilleri M (2019) Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut* 68:1516-1526
68. Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120
69. Carrano A, Hoozemans JJ, van der Vies SM, Rozemuller AJ, van Horsen J, de Vries HE (2011) Amyloid Beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxid Redox Signal* 15:1167-1178
70. Carroll CM, Li YM (2016) Physiological and pathological roles of the gamma-secretase complex. *Brain Res Bull* 126:199-206
71. Carvalho C, Cardoso S, Correia SC, Santos RX, Santos MS, Baldeiras I, Oliveira CR, Moreira PI (2012) Metabolic alterations induced by sucrose intake and Alzheimer's disease promote similar brain mitochondrial abnormalities. *Diabetes* 61:1234-1242
72. Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, Ferrari C, Guerra UP, Paghera B, Muscio C, Bianchetti A, Volta GD, Turla M, Cotelli MS, Gennuso M, Prella A, Zanetti O, Lussignoli G, Mirabile D, Bellandi D, Gentile S, Belotti G, Villani D, Harach T, Bolmont T, Padovani A, Boccardi M, Frisoni GB, Group I-F (2017) Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging* 49:60-68
73. Chandra S, Sisodia SS, Vassar RJ (2023) The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored. *Mol Neurodegener* 18:9
74. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846
75. Chasseigneaux S, Allinquant B (2012) Functions of Aβeta, sAPPα and sAPPβeta : similarities and differences. *J Neurochem* 120 Suppl 1:99-108
76. Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R (2014) Artificial sweeteners - a review. *J Food Sci Technol* 51:611-621
77. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38:1205-1235
78. Chen J, Li Q, Wang J (2011) Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14813-14818
79. Chen Y, Strickland MR, Soranno A, Holtzman DM (2021) Apolipoprotein E: Structural Insights and Links to Alzheimer Disease Pathogenesis. *Neuron* 109:205-221
80. Chen YC, Yeh YC, Lin YF, Au HK, Hsia SM, Chen YH, Hsieh RH (2022) Aspartame Consumption, Mitochondrial Disorder-Induced Impaired Ovarian Function, and Infertility Risk. *Int J Mol Sci* 23
81. Chetelat G (2018) Multimodal Neuroimaging in Alzheimer's Disease: Early Diagnosis, Physiopathological Mechanisms, and Impact of Lifestyle. *J Alzheimers Dis* 64:S199-S211
82. Chicco AJ, Sparagna GC (2007) Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C33-44
83. Choudhary AK, Pretorius E (2017) Revisiting the safety of aspartame. *Nutr Rev* 75:718-730
84. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, Tyurin VA, Yanamala N, Shrivastava IH, Mohammadyani D, Wang KZQ, Zhu J, Klein-Seetharaman J, Balasubramanian K, Amoscato AA, Borisenko G, Huang Z, Gusdon AM, Cheikhi A, Steer EK, Wang R, Baty C, Watkins S, Bahar I, Bayir H, Kagan VE (2013) Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* 15:1197-1205
85. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U (2011) Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* 32:275-279
86. Clemente-Suarez VJ, Beltran-Velasco AI, Redondo-Florez L, Martin-Rodriguez A, Tornero-Aguilera JF (2023) Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients* 15

87. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM (2018) 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol* 15:490-503
88. Cohen S (2018) Lipid Droplets as Organelles. *Int Rev Cell Mol Biol* 337:83-110
89. Cohen S, Valm AM, Lippincott-Schwartz J (2018) Interacting organelles. *Curr Opin Cell Biol* 53:84-91
90. Colbeau A, Nachbaur J, Vignais PM (1971) Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim Biophys Acta* 249:462-492
91. Collin F (2019) Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 20
92. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923
93. Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ (2006) The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol* 23:111-122
94. Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI (2012) Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res* 1441:64-78
95. Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, Lamanna JC, Perry G, Smith MA, Moreira PI (2013) Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10:406-419
96. Cox AJ, Zhang P, Bowden DW, Devereaux B, Davoren PM, Cripps AW, West NP (2017) Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 43:163-166
97. Cristofano A, Sapere N, La Marca G, Angiolillo A, Vitale M, Corbi G, Scapagnini G, Intrieri M, Russo C, Corso G, Di Costanzo A (2016) Serum Levels of Acyl-Carnitines along the Continuum from Normal to Alzheimer's Dementia. *PLoS One* 11:e0155694
98. Cuchillo-Ibanez I, Seereeram A, Byers HL, Leung KY, Ward MA, Anderton BH, Hanger DP (2008) Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J* 22:3186-3195
99. Cwiklik L, Jungwirth P (2010) Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chemical Physics Letters* 486
100. Czarnecka K, Pilarz A, Rogut A, Maj P, Szymanska J, Olejnik L, Szymanski P (2021) Aspartame-True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products. *Nutrients* 13
101. Dale CE, Fatemifar G, Palmer TM, White J, Prieto-Merino D, Zabaneh D, Engmann JEL, Shah T, Wong A, Warren HR, McLachlan S, Trompet S, Moldovan M, Morris RW, Sofat R, Kumari M, Hypponen E, Jefferis BJ, Gaunt TR, Ben-Shlomo Y, Zhou A, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Consortium U, Consortium M, Mutsert R, Noordam R, Caulfield MJ, Jukema JW, Worrall BB, Munroe PB, Menon U, Power C, Kuh D, Lawlor DA, Humphries SE, Mook-Kanamori DO, Sattar N, Kivimaki M, Price JF, Davey Smith G, Dudbridge F, Hingorani AD, Holmes MV, Casas JP (2017) Causal Associations of Adiposity and Body Fat Distribution With Coronary Heart Disease, Stroke Subtypes, and Type 2 Diabetes Mellitus: A Mendelian Randomization Analysis. *Circulation* 135:2373-2388
102. Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403
103. Davoli E, Cappellini L, Airolidi L, Fanelli R (1986) Serum methanol concentrations in rats and in men after a single dose of aspartame. *Food Chem Toxicol* 24:187-189
104. De Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28:435-492
105. Debras C, Chazelas E, Srour B, Druesne-Pecollo N, Esseddik Y, Szabo de Edelenyi F, Agaesse C, De Sa A, Lutchia R, Gigandet S, Huybrechts I, Julia C, Kesse-Guyot E, Alles B, Andreeva VA, Galan P, Hercberg S, Deschasaux-Tanguy M, Touvier M (2022) Artificial sweeteners and cancer risk: Results from the NutriNet-Sante population-based cohort study. *PLoS Med* 19:e1003950
106. Denkbar (2018). *Der Massenspektrometer* (https://www.youtube.com/watch?v=Om_BajCKd34)
107. Desjardins P, Conklin D (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*

108. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (2016). S3-Leitlinie "Demenzen" (https://register.awmf.org/assets/guidelines/038-0131_S3-Demenzen-2016-07.pdf)
109. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR (2021) Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health* 18
110. Dodd GT, Tiganis T (2017) Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol* 29
111. Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, Engen PA, Patel J, Shaikh M, Green SJ, Naqib A, Roy A, Kordower JH, Pahan K, Shannon KM, Keshavarzian A (2020) Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 135:104352
112. Dodson M, Wani WY, Redmann M, Benavides GA, Johnson MS, Ouyang X, Cofield SS, Mitra K, Darley-Usmar V, Zhang J (2017) Regulation of autophagy, mitochondrial dynamics, and cellular bioenergetics by 4-hydroxynonenal in primary neurons. *Autophagy* 13:1828-1840
113. Dorszewska J, Predecki M, Oczkowska A, Dezor M, Kozubski W (2016) Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 13:952-963
114. Dudek J (2017) Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol* 5:90
115. Dulin F, Leveille F, Ortega JB, Mornon JP, Buisson A, Callebaut I, Colloc'h N (2008) P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582:1865-1870
116. Enzo Life Sciences (2023). APF - Fluorescent probe for hROS detection (<https://www.enzolifesciences.com/ALX-620-075/apf/>)
117. European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive (<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/3496?etrans=de>)
118. European Food Safety Authority (EFSA) (2021). Call for data on genotoxicity data on sweeteners (<https://www.efsa.europa.eu/en/call/call-data-genotoxicity-data-sweeteners>)
119. Ezquerro M, Lleo A, Castellvi M, Queralt R, Santacruz P, Pastor P, Molinuevo JL, Blesa R, Oliva R (2003) A novel mutation in the PSEN2 gene (T430M) associated with variable expression in a family with early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:1149-1151
120. Falabella M, Vernon HJ, Hanna MG, Claypool SM, Pitceathly RDS (2021) Cardiolipin, Mitochondria, and Neurological Disease. *Trends Endocrinol Metab* 32:224-237
121. Farese RV, Jr., Walther TC (2009) Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855-860
122. Farese RV, Jr., Walther TC (2016) Lipid droplets go nuclear. *J Cell Biol* 212:7-8
123. Farias G, Cornejo A, Jimenez J, Guzman L, Maccioni RB (2011) Mechanisms of tau self-aggregation and neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res* 8:608-614
124. Farmer BC, Kluemper J, Johnson LA (2019) Apolipoprotein E4 Alters Astrocyte Fatty Acid Metabolism and Lipid Droplet Formation. *Cells* 8
125. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278:1349-1356
126. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4162-4167
127. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ (2004) Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* 164:1425-1434
128. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE (2000) Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355:1518-1519
129. Fasano A (2012) Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42:71-78
130. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin

- strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856-5861
131. Feijo FM, Ballard CR, Foletto KC, Batista BAM, Neves AM, Ribeiro MFM, Bertoluci MC (2013) Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite* 60:203-207
132. Feldschuh J, Enson Y (1977) Prediction of the normal blood volume. Relation of blood volume to body habitus. *Circulation* 56:605-612
133. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* 14:101-115
134. Finamor I, Pavanato MA, Pes T, Ourique G, Saccol E, Schiefelbein S, Llesuy S, Partata W (2014a) N-acetylcysteine protects the rat kidney against aspartame-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 75 Suppl 1:S30
135. Finamor IA, Ourique GM, Pes TS, Saccol EM, Bressan CA, Scheid T, Baldisserotto B, Llesuy SF, Partata WA, Pavanato MA (2014b) The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochem Res* 39:1681-1690
136. Findeis MA (2007) The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 116:266-286
137. Fiore F, Zambrano N, Minopoli G, Donini V, Duilio A, Russo T (1995) The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 270:30853-30856
138. Fishel MA, Watson GS, Montine TJ, Wang Q, Green PS, Kulstad JJ, Cook DG, Peskind ER, Baker LD, Goldgaber D, Nie W, Asthana S, Plymate SR, Schwartz MW, Craft S (2005) Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and beta-amyloid in normal adults. *Arch Neurol* 62:1539-1544
139. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q (2010) Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)* 7:30
140. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O (2012) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:1363-1373
141. Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV (o.D.). Massenspektrometrie (<https://www.ivv.fraunhofer.de/de/recycling-umwelt/umweltanalytik/massenspektrometrie.html>)
142. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N, West of Scotland Coronary Prevention S (2002) C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 51:1596-1600
143. Freshney (2011) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, John Wiley & Sons).
144. Frieden C, Garai K (2012) Structural differences between apoE3 and apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:8913-8918
145. Funderburk SF, Marcellino BK, Yue Z (2010) Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77:59-68
146. Furlong JH (1996) *Acetyl-L-Carnitine: Metabolism and Applications in Clinical Practice*. *Alternative Medicin Review* 1:85-93
147. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71:2034-2040
148. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martin C (2020) Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 21
149. Gaschler MM, Stockwell BR (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482:419-425
150. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H (2001) Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci* 21:2561-2570

151. Gatta AT, Levine TP (2017) Piecing Together the Patchwork of Contact Sites. *Trends Cell Biol* 27:214-229
152. Ge P, Dawson VL, Dawson TM (2020) PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 15:20
153. Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, Kahle PJ, Springer W (2010) The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6:871-878
154. Gezgin-Oktayoglu S, Ercin M, Sancar S, Celik E, Koyuturk M, Bolkent S, Bolkent S (2021) Aspartame induces cancer stem cell enrichment through p21, NICD and GLI1 in human PANC-1 pancreas adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 153:112264
155. 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
156. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16:4491-4500
157. Gonzalez-Dominguez R, Garcia-Barrera T, Vitorica J, Gomez-Ariza JL (2014) Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:2395-2402
158. Goodman JE, Anneser EG, Khandaker A, Boon DN (2023) The role of study quality in aspartame and cancer epidemiology study reviews. *Glob Epidemiol* 5:100110
159. Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A (2020) Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 61:636-654
160. Green DE, Oda T (1961) On the unit of mitochondrial structure and function. *J Biochem* 49:742-757
161. Griebisch LV, Theiss EL, Janitschke D, Erhardt VKJ, Erhardt T, Haas EC, Kuppler KN, Radermacher J, Walzer O, Lauer AA, Matschke V, Hartmann T, Grimm MO, Grimm HS (2023) Aspartame and Its Metabolites Cause Oxidative Stress and Mitochondrial and Lipid Alterations in SH-SY5Y Cells. *Nutrients* 15
162. Grimm MO, Grosgen 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
163. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Grosgen S, Hauptenthal VJ, Blumel T, Hundsdorfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Muller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77
164. Gross JH (2013). *Elektrospray-Ionisation*. In *Massenspektrometrie* (Berlin Heidelberg, Springer-Verlag).
165. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917
166. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, George L, Tung YC, Kim KS, Wisniewski HM (1989) Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2853-2857
167. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE (2014) Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 103:137-149
168. Gubern A, Barcelo-Torns M, Casas J, Barneda D, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E (2009) Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem* 284:5697-5708
169. Gupta M (2018) Sugar Substitutes: Mechanism, Availability, Current Use and Safety Concerns-An Update. *Open Access Maced J Med Sci* 6:1888-1894
170. Haass C, Selkoe DJ (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75:1039-1042

171. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270
172. Haley S (2012). Sugar and Sweeteners Outlook: June 2012 (<https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=39310>)
173. Hamacher-Brady A, Brady NR (2016) Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci* 73:775-795
174. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS (2018) The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141:1917-1933
175. Hamze R, Delangre E, Tolu S, Moreau M, Janel N, Bailbe D, Movassat J (2022) Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Shared Molecular Mechanisms and Potential Common Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 23
176. Harayama T, Riezman H (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:281-296
177. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185
178. Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y (1998) Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 44:935-941
179. He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67-93
180. Heeren J, Scheja L (2021) Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol Metab* 50:101238
181. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022a). Ernährungsstatus. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 905.
182. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022b). Die β -Oxidation von Fettsäuren. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 344-349.
183. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022c). Lipide. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Germany, Springer), pp. 41-45.
184. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022d). Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren und Nucleotide - Bausteine des Lebens. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Germany, Springer), pp. 33.
185. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022e). Aufbau und Eigenschaften von Biomembranen. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 199-204.
186. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022f). Markierung für den Abbau. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 819-822.
187. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022g). In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. S. 332 ff.
188. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022h). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS). In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 332-335.
189. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022i). PCR – Die Polymerasekettenreaktion. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 868-870.
190. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022j). Eigenschaften der Leukocyten. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 1171-1174.
191. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022k). Lösungsverhalten von Lipiden. In Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie (Berlin, Springer), pp. 45-48.
192. Higgins KA, Considine RV, Mattes RD (2018) Aspartame Consumption for 12 Weeks Does Not Affect Glycemia, Appetite, or Body Weight of Healthy, Lean Adults in a Randomized Controlled Trial. *J Nutr* 148:650-657
193. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs CV, Hof PR, Pasinetti GM (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:902-904
194. Hochschule München (o.D.). Massenspektrometrie (http://dodo.fb06.fh-muenchen.de/maier/analytik/Blaetter/N151_MS_IonenquellenDetektoren_b_BAneu.pdf)

195. Hoffmann J, Twiesselmann C, Kummer MP, Romagnoli P, Herzog V (2000) A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol* 79:905-914
196. Hooper NM, Hesp RJ, Tiekou S (1994) Metabolism of aspartame by human and pig intestinal microvillar peptidases. *Biochem J* 298 Pt 3:635-639
197. Horvath SE, Daum G (2013) Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 52:590-614
198. Hsia HE, Tushaus J, Brummer T, Zheng Y, Scilabra SD, Lichtenthaler SF (2019) Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cell Mol Life Sci* 76:3055-3081
199. Huang YR, Liu RT (2020) The Toxicity and Polymorphism of beta-Amyloid Oligomers. *Int J Mol Sci* 21
200. Hulse RE, Ralat LA, Wei-Jen T (2009) Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme. *Vitam Horm* 80:635-648
201. Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9439-9443
202. Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99:1807-1810
203. IMD Berlin MVZ (o.D.). Der Thiol-Status im Serum als Screeningtest für die antioxidative und metaldetoxifizierende Kapazität (https://www.imd-berlin.de/fileadmin/user_upload/Diag_Info/354_Thiol-Status.pdf)
204. Institute for Health Metrics and Evaluation (2019). Cause of death or injury (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>)
205. Islimye E, Girard V, Gould AP (2022) Functions of Stress-Induced Lipid Droplets in the Nervous System. *Front Cell Dev Biol* 10:863907
206. Iyyaswamy A, Rathinasamy S (2012) Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. *J Biosci* 37:679-688
207. Jakubec M, Barias E, Kryuchkov F, Hjernevik LV, Halskau O (2019) Fast and Quantitative Phospholipidomic Analysis of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Cultures Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and (31)P Nuclear Magnetic Resonance. *ACS Omega* 4:21596-21603
208. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolske RF, Egan JM (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15069-15074
209. Jansen WJ, Ossenkuppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ, Amyloid Biomarker Study G, Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavado E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM, Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Forster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gomez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkowicz-Mrowiec A, Klunk WE, Kohler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleó A, Madsen K, Maier W, Marcusson J, Mattsson N, de Mendonca A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL, Mollergard HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A, Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O, Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C, Rinne JO, Rodrigue KM, Rodriguez-Rodriguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Ruther E, Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schroder J, Schutte C, Seo SW, Soetewey F, Soinen H, Spuru L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenberghe R, Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G, Wallin A, Wallin AK, Wiltfang J, Wolk DA, Zboch M, Zetterberg H (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA* 313:1924-1938
210. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC (2004) Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53:474-481

211. Janssen JC, Lantos PL, Fox NC, Harvey RJ, Beck J, Dickinson A, Campbell TA, Collinge J, Hanger DP, Cipolotti L, Stevens JM, Rossor MN (2001) Autopsy-confirmed familial early-onset Alzheimer disease caused by the I153V presenilin 1 mutation. *Arch Neurol* 58:953-958
212. Jarc E, Petan T (2019) Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J Biol Med* 92:435-452
213. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU (2021) Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther* 17:22-28
214. Jena AB, Samal RR, Bhol NK, Duttaroy AK (2023) Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomed Pharmacother* 162:114606
215. Jiang HP, Serrero G (1992) Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7856-7860
216. Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191:933-942
217. Jones LL, McDonald DA, Borum PR (2010) Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res* 49:61-75
218. Juan CA, Perez de la Lastra JM, Plou FJ, Perez-Lebena E (2021) The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* 22
219. Juebin Huang (2023). Alzheimer-Krankheit (<https://www.msmanuals.com/de-de/heim/stoerungen-der-hirn-,rueckenmarks-und-nervenfunktion/delirium-und-demenz/alzheimer-krankheit>)
220. Jung S, Bae H, Song WS, Jang C (2022) Dietary Fructose and Fructose-Induced Pathologies. *Annu Rev Nutr* 42:45-66
221. Kadry H, Noorani B, Cucullo L (2020) A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* 17:69
222. Kagawa Y, Racker E (1966) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J Biol Chem* 241:2475-2482
223. Kamenickova A, Pecova M, Bachleda P, Dvorak Z (2013) Effects of artificial sweeteners on the AhR- and GR-dependent CYP1A1 expression in primary human hepatocytes and human cancer cells. *Toxicol In Vitro* 27:2283-2288
224. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH (2017) Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:1078-1089
225. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736
226. Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ (2020) Lipids and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21
227. Karamohamed S, Demissie S, Volcjak J, Liu C, Heard-Costa N, Liu J, Shoemaker CM, Panhuysen CI, Meigs JB, Wilson P, Atwood LD, Cupples LA, Herbert A, Study NFH (2003) Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* 52:1562-1567
228. Karlsruhe Institute of Technology (KIT) (o.D.). Analytik von Serumproteinen durch massenspektrometrische Identifikation „peptide mass fingerprint“ (https://www.ioc.kit.edu/luy/downloads/Theorieversuch_Masse.pdf)
229. Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, Alessi DR, Knebel A, Trost M, Muqit MM (2014) Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* 460:127-139
230. Kehoe P, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P, Fenton I, Spurlock G, Norton N, Williams H, Williams N, Lovestone S, Perez-Tur J, Hutton M, Chartier-Harlin MC, Shears S, Roehl K, Booth J, Van Voorst W, Ramic D, Williams J, Goate A, Hardy J, Owen MJ (1999) A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8:237-245
231. Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74:270-280
232. Khan S, Barve KH, Kumar MS (2020) Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 18:1106-1125

233. Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE (2020) Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol* 219
234. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6382-6387
235. Kirkin V, Rogov VV (2019) A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell* 76:268-285
236. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR (2014) Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes* 63:2232-2243
237. Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, Knebel A, Alessi DR, Muqit MM (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2:120080
238. Kopp W (2019) How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12:2221-2236
239. Koren SA, Hamm MJ, Meier SE, Weiss BE, Nation GK, Chishti EA, Arango JP, Chen J, Zhu H, Blalock EM, Abisambra JF (2019) Tau drives translational selectivity by interacting with ribosomal proteins. *Acta Neuropathol* 137:571-583
240. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510:162-166
241. Kraepelin E (1913) *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, Vol 8*.
242. Krebs JJ, Hauser H, Carafoli E (1979) Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 254:5308-5316
243. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV (2016) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget* 7:44879-44905
244. Kuhlbrandt W (2019) Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu Rev Biochem* 88:515-549
245. Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020-3032
246. Kumari S, Dhapola R, Reddy DH (2023) Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. *Apoptosis* 28:943-957
247. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, Mykkanen L, Helkala EL, Vanhanen M, Hanninen T, Pyorala K, Kesaniemi YA, Riekkinen P, et al. (1994) Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ* 309:636-638
248. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453
249. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927
250. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6:39
251. Laude AJ, Prior IA (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* 21:193-205
252. Leal MC, Dorfman VB, Gamba AF, Frangione B, Wisniewski T, Castano EM, Sigurdsson EM, Morelli L (2006) Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:976-987
253. Lebda MA, Tohamy HG, El-Sayed YS (2017) Long-term soft drink and aspartame intake induces hepatic damage via dysregulation of adipocytokines and alteration of the lipid profile and antioxidant status. *Nutr Res* 41:47-55

254. Lee AA, Owyang C (2017) Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients* 9
255. Lee JH, Yang DS, Goulbourne CN, Im E, Stavrides P, Pensalfini A, Chan H, Bouchet-Marquis C, Bleiwas C, Berg MJ, Huo C, Peddy J, Pawlik M, Levy E, Rao M, Staufenbiel M, Nixon RA (2022) Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of Aβ in neurons, yielding senile plaques. *Nat Neurosci* 25:688-701
256. Lee SJ, Zhang J, Choi AM, Kim HP (2013) Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013:327167
257. Lee YH, Tharp WG, Maple RL, Nair S, Permana PA, Pratley RE (2008) Amyloid precursor protein expression is upregulated in adipocytes in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 16:1493-1500
258. Lemkul JA, Bevan DR (2011) Lipid composition influences the release of Alzheimer's amyloid β-peptide from membranes. *Protein Sci* 20:1530-1545
259. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hoppel CL (2001) Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2770-2778
260. Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL (2004) Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem* 279:47961-47967
261. Li QX, Fuller SJ, Beyreuther K, Masters CL (1999) The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol* 66:567-574
262. Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS (2004) Tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interferon-γ stimulate γ-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem* 279:49523-49532
263. Linnemann AK, Baan M, Davis DB (2014) Pancreatic β-cell proliferation in obesity. *Adv Nutr* 5:278-288
264. Listenberger LL, Brown DA (2007) Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 24:Unit 24 22
265. Liu B, Ha M, Meng XY, Kaur T, Khaleduzzaman M, Zhang Z, Jiang P, Li X, Cui M (2011) Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners. *J Neurosci* 31:11070-11076
266. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 9:106-118
267. Lizama BN, Chu CT (2021) Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease. *Mol Aspects Med* 82:100972
268. Lopez-Suarez L, Awabdh SA, Coumoul X, Chauvet C (2022) The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology* 92:131-155
269. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP (2019) Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol* 70
270. Luissint AC, Federici C, Guillonneau F, Chretien F, Camoin L, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO (2012) Guanine nucleotide-binding protein Gα_{i2}: a new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:860-873
271. Maersk M, Belza A, Holst JJ, Fenger-Gron M, Pedersen SB, Astrup A, Richelsen B (2012) Satiety scores and satiety hormone response after sucrose-sweetened soft drink compared with isocaloric semi-skimmed milk and with non-caloric soft drink: a controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 66:523-529
272. Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, Spencer PS, Waddell WJ, Walker R, Williams GM (2007) Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol* 37:629-727
273. Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG (2016) Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr Rev* 74:670-689
274. Mahley RW, Rall SC, Jr. (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:507-537

275. Malek AM, Hunt KJ, DellaValle DM, Greenberg D, St Peter JV, Marriott BP (2018) Reported Consumption of Low-Calorie Sweetener in Foods, Beverages, and Food and Beverage Additions by US Adults: NHANES 2007-2012. *Curr Dev Nutr* 2:nzy054
276. Malik R, Georgakis MK, Neitzel J, Rannikmae K, Ewers M, Seshadri S, Sudlow CLM, Dichgans M (2021) Midlife vascular risk factors and risk of incident dementia: Longitudinal cohort and Mendelian randomization analyses in the UK Biobank. *Alzheimers Dement* 17:1422-1431
277. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:2495-2509
278. Manczak M, Kandimalla R, Fry D, Sesaki H, Reddy PH (2016) Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 25:5148-5166
279. Marco S, Skaper SD (2006) Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci Lett* 401:219-224
280. Markesbery WR, Lovell MA (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19:33-36
281. Marquez F, Yassa MA (2019) Neuroimaging Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener* 14:21
282. Marrano N, Biondi G, Borrelli A, Rella M, Zambetta T, Di Gioia L, Caporusso M, Logroscino G, Perrini S, Giorgino F, Natalicchio A (2023) Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: The Emerging Role of Cellular Lipotoxicity. *Biomolecules* 13
283. 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
284. Maschkowski G, Lobitz R, Rempe C (2022). Süßungsmittel - Zusatzstoffe mit nahezu kalorienfreier Süßkraft (Bundeszentrum für Ernährung)
285. Max-Rubner-Institut (2017) Ernährungsphysiologische Bewertung und Auswirkungen des Isoglukosekonsums auf die menschliche Gesundheit.
286. McCann MR, George De la Rosa MV, Rosania GR, Stringer KA (2021) L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites* 11
287. McCaulley ME, Grush KA (2017) Seeking a New Paradigm for Alzheimer's Disease: Considering the Roles of Inflammation, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Prion Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2017:2438901
288. Mett (2017) Die Regulation Abeta-degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase, Homburg.
289. 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 Abeta Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme. *Cells* 10
290. Michaels TCT, Saric A, Curk S, Bernfur K, Arosio P, Meisl G, Dear AJ, Cohen SIA, Dobson CM, Vendruscolo M, Linse S, Knowles TPJ (2020) Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's Abeta42 peptide. *Nat Chem* 12:445-451
291. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V (2022) Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 23
292. Michielan A, D'Inca R (2015) Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm* 2015:628157
293. Michos ED, McEvoy JW, Blumenthal RS (2019) Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 381:1557-1567
294. Mileyskoykaya E, Dowhan W (2014) Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids* 179:42-48
295. Minopoli G, Gargiulo A, Parisi S, Russo T (2012) Fe65 matters: new light on an old molecule. *IUBMB Life* 64:936-942
296. Mishra P, Chan DC (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* 212:379-387

297. Mokgokong R, Wang S, Taylor CJ, Barrand MA, Hladky SB (2014) Ion transporters in brain endothelial cells that contribute to formation of brain interstitial fluid. *Pflugers Arch* 466:887-901
298. Moll T, Marshall JNG, Soni N, Zhang S, Cooper-Knock J, Shaw PJ (2021) Membrane lipid raft homeostasis is directly linked to neurodegeneration. *Essays Biochem* 65:999-1011
299. Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging* 31:224-243
300. Montgomery SA, Thal LJ, Amrein R (2003) Meta-analysis of double blind randomized controlled clinical trials of acetyl-L-carnitine versus placebo in the treatment of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Int Clin Psychopharmacol* 18:61-71
301. Moreira OC, Estebanez B, Martinez-Florez S, de Paz JA, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J (2017) Mitochondrial Function and Mitophagy in the Elderly: Effects of Exercise. *Oxid Med Cell Longev* 2017:2012798
302. Moyse E, Haddad M, Benlabiod C, Ramassamy C, Krantic S (2019) Common Pathological Mechanisms and Risk Factors for Alzheimer's Disease and Type-2 Diabetes: Focus on Inflammation. *Curr Alzheimer Res* 16:986-1006
303. Müller C (2004) Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg.
304. Muller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, Holst JJ, Langhans W, Meier JJ, Nauck MA, Perez-Tilve D, Pocai A, Reimann F, Sandoval DA, Schwartz TW, Seeley RJ, Stemmer K, Tang-Christensen M, Woods SC, DiMarchi RD, Tschop MH (2019) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* 30:72-130
305. Muller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006288
306. N. C. D. Risk Factor Collaboration (2016) Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 387:1513-1530
307. N. C. D. Risk Factor Collaboration (2020) Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants. *Lancet* 396:1511-1524
308. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W (2019) The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 705:183-194
309. Naudi A, Cabre R, Jove M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otin M, Ferrer I, Pamplona R (2015) Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int Rev Neurobiol* 122:133-189
310. Neal EG, Zupec-Kania B, Pfeifer HH (2012) Carnitine, nutritional supplementation and discontinuation of ketogenic diet therapies. *Epilepsy Res* 100:267-271
311. Nguyen TB, Louie SM, Daniele JR, Tran Q, Dillin A, Zoncu R, Nomura DK, Olzmann JA (2017) DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev Cell* 42:9-21 e25
312. Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV (2020) Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21
313. Nie Y, Vignes S, Hobbs JR, Conn GL, Munger SD (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol* 15:1948-1952
314. Nissanka N, Moraes CT (2018) Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Lett* 592:728-742
315. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559-1582
316. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19:1959-1964
317. Nystrom T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24:1311-1317
318. O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185-204

319. Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T (2014) Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol* 21:86-96
320. Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa Y, Cheng J, Jokitalo E, Fujimoto T (2016) PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J Cell Biol* 212:29-38
321. Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:137-155
322. Onishi M, Yamano K, Sato M, Matsuda N, Okamoto K (2021) Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J* 40:e104705
323. Onyango IG, Jauregui GV, Carna M, Bennett JP, Jr., Stokin GB (2021) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 9
324. Oppermann JA, Muldoon E, Ranney RE (1973) Metabolism of aspartame in monkeys. *J Nutr* 103:1454-1459
325. Ordureau A, Sarraf SA, Duda DM, Heo JM, Jedrychowski MP, Sviderskiy VO, Olszewski JL, Koerber JT, Xie T, Beausoleil SA, Wells JA, Gygi SP, Schulman BA, Harper JW (2014) Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol Cell* 56:360-375
326. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53:1937-1942
327. Pandurangan M, Enkhtaivan G, Kim DH (2016a) Cytotoxic effects of aspartame on human cervical carcinoma cells. *Toxicol Res (Camb)* 5:45-52
328. Pandurangan M, Enkhtaivan G, Mistry B, Chandrasekaran M, Noorzai R, Kim DH (2016b) Investigation of role of aspartame on apoptosis process in HeLa cells -->. *Saudi J Biol Sci* 23:503-506
329. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2001) Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion* 1:151-159
330. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002) Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286:135-141
331. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM (2004) Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 94:53-59
332. Pardossi-Piquard R, Checler F (2012) The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1:109-124
333. Park S, Sethi S, Bouret SG (2019) Non-nutritive Sweeteners Induce Hypothalamic ER Stress Causing Abnormal Axon Outgrowth. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:876
334. Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L (2000) Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis* 2:289-301
335. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2016) Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J* 92:286-300
336. Peng Y, Chu S, Yang Y, Zhang Z, Pang Z, Chen N (2021) Neuroinflammatory In Vitro Cell Culture Models and the Potential Applications for Neurological Disorders. *Front Pharmacol* 12:671734
337. Pennisi M, Lanza G, Cantone M, D'Amico E, Fisicaro F, Puglisi V, Vinciguerra L, Bella R, Vicari E, Malaguarnera G (2020) Acetyl-L-Carnitine in Dementia and Other Cognitive Disorders: A Critical Update. *Nutrients* 12
338. Pettegrew JW, Klunk WE, Panchalingam K, Kanfer JN, McClure RJ (1995) Clinical and neurochemical effects of acetyl-L-carnitine in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 16:1-4
339. Pettegrew JW, Levine J, McClure RJ (2000) Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Mol Psychiatry* 5:616-632
340. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278:52873-52880
341. Philipps Universität Marburg (o.D.). Verfügbare Ionisierungsmethoden
342. Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S (2013) Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)* 5:167-177

343. Pickrell AM, Youle RJ (2015) The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* 85:257-273
344. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161
345. Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, Lesch KP, Ponomarev ED, Strekalova T (2018) Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther* 24:763-774
346. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464
347. Poulaki A, Giannouli S (2022) Mitochondrial Lipids: From Membrane Organization to Apoptotic Facilitation. *Int J Mol Sci* 23
348. Pradeepkiran JA, Reddy PH (2020) Defective mitophagy in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 64:101191
349. Puig KL, Combs CK (2013) Expression and function of APP and its metabolites outside the central nervous system. *Exp Gerontol* 48:608-611
350. Qu D, Jiang M, Huang D, Zhang H, Feng L, Chen Y, Zhu X, Wang S, Han J (2019) Synergistic Effects of The Enhancements to Mitochondrial ROS, p53 Activation and Apoptosis Generated by Aspartame and Potassium Sorbate in HepG2 Cells. *Molecules* 24
351. Ralhan I, Chang CL, Lippincott-Schwartz J, Ioannou MS (2021) Lipid droplets in the nervous system. *J Cell Biol* 220
352. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J (2015) Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell* 32:678-692
353. Ranney RE, Oppermann JA, Muldoon E, McMahon FG (1976) Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans. *J Toxicol Environ Health* 2:441-451
354. Rawat P, Sehar U, Bisht J, Selman A, Culberson J, Reddy PH (2022) Phosphorylated Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *Int J Mol Sci* 23
355. Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Owen SC (2006). Handbook on Pharmaceutical Experiments. In (Washington D.C., American Pharmaceutical Association), pp. S. 53-55.
356. Reed J, Bain S, Kanamarlapudi V (2021) A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes* 14:3567-3602
357. Reinhold AK, Rittner HL (2017) Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Pflugers Arch* 469:123-134
358. Rencuzogullari E, Tuylu BA, Topaktas M, Ila HB, Kayraldiz A, Arslan M, Diler SB (2004) Genotoxicity of aspartame. *Drug Chem Toxicol* 27:257-268
359. Reuter SE, Evans AM (2012) Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet* 51:553-572
360. Riboli E, Beland FA, Lachenmeier DW, Marques MM, Phillips DH, Schernhammer E, Afghan A, Assuncao R, Caderni G, Corton JC, de Aragao Umbuzeiro G, de Jong D, Deschasaux-Tanguy M, Hodge A, Ishihara J, Levy DD, Mandrioli D, McCullough ML, McNaughton SA, Morita T, Nugent AP, Ogawa K, Pandiri AR, Sergi CM, Touvier M, Zhang L, Benbrahim-Tallaa L, Chittiboyina S, Cuomo D, DeBono NL, Debras C, de Conti A, El Ghissassi F, Fontvieille E, Harewood R, Kaldor J, Mattock H, Pasqual E, Rigutto G, Simba H, Suonio E, Viegas S, Wedekind R, Schubauer-Berigan MK, Madia F (2023) Carcinogenicity of aspartame, methyleugenol, and isoeugenol. *Lancet Oncol* 24:848-850
361. Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M (2014) Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. *Biomed Res Int* 2014:908915
362. Robinson NC (1993) Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 25:153-163
363. Rogers PJ, Hogenkamp PS, de Graaf C, Higgs S, Lluch A, Ness AR, Penfold C, Perry R, Putz P, Yeomans MR, Mela DJ (2016) Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int J Obes (Lond)* 40:381-394

364. Rozengurt E, Sternini C (2007) Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol* 7:557-562
365. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, et al. (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115:1725-1735
366. Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, Zlokovic BV (2013) Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun* 4:2932
367. Salim S (2017) Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360:201-205
368. Salim SY, Soderholm JD (2011) Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17:362-381
369. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW (2013) Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496:372-376
370. Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176
371. Satou T, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res* 697:35-43
372. Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014
373. Scheff SW, Price DA (1993) Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33:190-199
374. Schernhammer ES, Bertrand KA, Birmann BM, Sampson L, Willett WC, Feskanih D (2012) Consumption of artificial sweetener- and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women. *Am J Clin Nutr* 96:1419-1428
375. Schinkel AH (1999) P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36:179-194
376. Schorb S, Gleiss K, Wedekind R, Suonio E, Kull AK, Kuntz M, Walch SG, Lachenmeier DW (2023) Assessment of Aspartame (E951) Occurrence in Selected Foods and Beverages on the German Market 2000-2022. *Foods* 12
377. Schuldiner M, Bohnert M (2017) A different kind of love - lipid droplet contact sites. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862:1188-1196
378. Schwall CT, Greenwood VL, Alder NN (2012) The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1817:1588-1596
379. Schwiertz A, Spiegel J, Dillmann U, Grundmann D, Burmann J, Fassbender K, Schafer KH, Unger MM (2018) Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 50:104-107
380. Sedlak E, Robinson NC (1999) Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* 38:14966-14972
381. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189
382. Shafer SAA, Mihailescu DF, Amuzescu B (2023) Aspartame Safety as a Food Sweetener and Related Health Hazards. *Nutrients* 15
383. Shi X, Chang C, Yokom AL, Jensen LE, Hurley JH (2020) The autophagy adaptor NDP52 and the FIP200 coiled-coil allosterically activate ULK1 complex membrane recruitment. *Elife* 9
384. Shi Y (2010) Emerging roles of cardiolipin remodeling in mitochondrial dysfunction associated with diabetes, obesity, and cardiovascular diseases. *J Biomed Res* 24:6-15
385. Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, Hosoya K, Terasaki T (2004) Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. *J Neurosci* 24:9632-9637
386. Shil A, Olusanya O, Ghufloor Z, Forson B, Marks J, Chichger H (2020) Artificial Sweeteners Disrupt Tight Junctions and Barrier Function in the Intestinal Epithelium through Activation of the Sweet Taste Receptor, T1R3. *Nutrients* 12

387. Shinall H, Song ES, Hersh LB (2005) Susceptibility of amyloid beta peptide degrading enzymes to oxidative damage: a potential Alzheimer's disease spiral. *Biochemistry* 44:15345-15350
388. Siegel G, Gerber H, Koch P, Bruestle O, Fraering PC, Rajendran L (2017) The Alzheimer's Disease gamma-Secretase Generates Higher 42:40 Ratios for beta-Amyloid Than for p3 Peptides. *Cell Rep* 19:1967-1976
389. Siekevitz P (1957) Powerhouse of the Cell. *Scientific American* 197:131-144
390. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
391. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39
392. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540
393. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G (2020) In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* 8:328
394. 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
395. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA (2019) ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2019:6175804
396. Soto M, Cai W, Konishi M, Kahn CR (2019) Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:6379-6384
397. Sousa L, Guarda M, Meneses MJ, Macedo MP, Vicente Miranda H (2021) Insulin-degrading enzyme: an ally against metabolic and neurodegenerative diseases. *J Pathol* 255:346-361
398. Spagnoli A, Lucca U, Menasce G, Bandera L, Cizza G, Forloni G, Tettamanti M, Frattura L, Tiraboschi P, Comelli M, et al. (1991) Long-term acetyl-L-carnitine treatment in Alzheimer's disease. *Neurology* 41:1726-1732
399. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7:63-80
400. Stegink LD, Brummel MC, McMartin K, Martin-Amat G, Filer LJ, Jr., Baker GL, Tephly TR (1981a) Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame. *J Toxicol Environ Health* 7:281-290
401. Stegink LD, Filer LJ, Jr., Baker GL (1981b) Plasma and erythrocyte concentrations of free amino acids in adult humans administered abuse doses of aspartame. *J Toxicol Environ Health* 7:291-305
402. Stegink LD, Koch R, Blaskovics ME, Filer LJ, Jr., Baker GL, McDonnell JE (1981c) Plasma phenylalanine levels in phenylketonuric heterozygous and normal adults administered aspartame at 34 mg/kg body weight. *Toxicology* 20:81-90
403. Stegink LD, Wolf-Novak LC, Filer LJ, Jr., Bell EF, Ziegler EE, Krause WL, Brummel MC (1987) Aspartame-sweetened beverage: effect on plasma amino acid concentrations in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria. *J Nutr* 117:1989-1995
404. Steinert RE, Frey F, Topfer A, Drewe J, Beglinger C (2011) Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr* 105:1320-1328
405. Sterne JA, Hernan MA, Reeves BC, Savovic J, Berkman ND, Viswanathan M, Henry D, Altman DG, Ansari MT, Boutron I, Carpenter JR, Chan AW, Churchill R, Deeks JJ, Hrobjartsson A, Kirkham J, Juni P, Loke YK, Pigott TD, Ramsay CR, Regidor D, Rothstein HR, Sandhu L, Santaguida PL, Schunemann HJ, Shea B, Shrier I, Tugwell P, Turner L, Valentine JC, Waddington H, Waters E, Wells GA, Whiting PF, Higgins JP (2016) ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ* 355:i4919
406. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY (2019) Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019:5080843

407. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA (2009) Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol* 118:131-150
408. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV (2016) Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* 19:771-783
409. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV (2018) Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14:133-150
410. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV (2019) Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev* 99:21-78
411. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2014) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1842:1219-1231
412. Sylvestsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB (2012) Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am J Clin Nutr* 96:640-646
413. Sylvestsky AC, Rother KI (2016) Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav* 164:446-450
414. Sylvestsky AC, Jin Y, Clark EJ, Welsh JA, Rother KI, Talegawkar SA (2017a) Consumption of Low-Calorie Sweeteners among Children and Adults in the United States. *J Acad Nutr Diet* 117:441-448 e442
415. Sylvestsky AC, Walter PJ, Garraffo HM, Robien K, Rother KI (2017b) Widespread sucralose exposure in a randomized clinical trial in healthy young adults. *Am J Clin Nutr* 105:820-823
416. Taskinen MR, Packard CJ, Boren J (2019) Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 11
417. Tey SL, Salleh NB, Henry J, Forde CG (2017) Effects of aspartame-, monk fruit-, stevia- and sucrose-sweetened beverages on postprandial glucose, insulin and energy intake. *Int J Obes (Lond)* 41:450-457
418. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, Braverman S, Tengeler AC, Barak O, Elazar M, Ben-Zeev R, Lehavi-Regev D, Katz MN, Pevsner-Fischer M, Gertler A, Halpern Z, Harmelin A, Amar S, Serradas P, Grosfeld A, Shapiro H, Geiger B, Elinav E (2018) Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* 359:1376-1383
419. Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM (2006) Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E550-559
420. Thiam AR, Beller M (2017) The why, when and how of lipid droplet diversity. *J Cell Sci* 130:315-324
421. Tisdale HD, Wharton DC, Green DE (1963) Studies of the electron transfer system. LIII. The isolation and composition of succinic-coenzyme Q reductase and succinic-cytochrome c reductase. *Arch Biochem Biophys* 102:114-119
422. Tonnies E, Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57:1105-1121
423. U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2023). Safe Levels of Sweeteners (<https://www.fda.gov/media/168517/download>)
424. Universität zu Köln (o.D.). ESI: Electrospray Ionisation (<http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm>)
425. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160
426. van der Flier WM, Scheltens P (2005) Epidemiology and risk factors of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76 Suppl 5:v2-7
427. van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GM (2005) Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* 94:1158-1166
428. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL (2017) The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859:1558-1572

429. Vance JE (2015) Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* 16:1-18
430. Vangipurapu J, Stancakova A, Kuulasmaa T, Kuusisto J, Laakso M (2015) Both fasting and glucose-stimulated proinsulin levels predict hyperglycemia and incident type 2 diabetes: a population-based study of 9,396 Finnish men. *PLoS One* 10:e0124028
431. Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, Youle RJ, Yoshimori T (2023) The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24:167-185
432. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741
433. Vatansever B (2007) Elektrospray-Ionisations- Massenspektrometrie als Tool für die Qualitative und die Quantitative Protein- und Peptidanalytik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
434. Velandia PP, Miller-Petrie MK, Chen C, Chakrabarti S, Chapin A, Hay S, Tsakalos G, Wimo A, Dieleman JL (2022) Global and regional spending on dementia care from 2000-2019 and expected future health spending scenarios from 2020-2050: An economic modelling exercise. *EClinicalMedicine* 45:101337
435. Venugopal C, Pappolla MA, Sambamurti K (2007) Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites. *Neurochem Res* 32:2225-2234
436. Vepsäläinen S, Hiltunen M, Helisalmi S, Wang J, van Groen T, Tanila H, Soininen H (2008) Increased expression of Abeta degrading enzyme IDE in the cortex of transgenic mice with Alzheimer's disease-like neuropathology. *Neurosci Lett* 438:216-220
437. Vercellino I, Sazanov LA (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:141-161
438. Viswanathan A, Greenberg SM (2011) Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol* 70:871-880
439. Walbolt J, Koh Y (2020) Non-nutritive Sweeteners and Their Associations with Obesity and Type 2 Diabetes. *J Obes Metab Syndr* 29:114-123
440. Walther TC, Farese RV, Jr. (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 81:687-714
441. Walther TC, Chung J, Farese RV, Jr. (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:491-510
442. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, Gong DW, Stanley WC, Sztalryd C (2011) Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res* 52:2159-2168
443. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25:1219-1225
444. Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X (2008) Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol* 173:470-482
445. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9090-9103
446. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1240-1247
447. Wei ML, Andreadis A (1998) Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 70:1346-1356
448. Wei Z, Koya J, Reznik SE (2021) Insulin Resistance Exacerbates Alzheimer Disease via Multiple Mechanisms. *Front Neurosci* 15:687157
449. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862
450. Wickelgren I (1998) Tracking insulin to the mind. *Science* 280:517-519
451. Wiktorowska-Owczarek A, Berezinska M, Nowak JZ (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* 24:931-941
452. Wilk K, Korytek W, Pelczynska M, Moszak M, Bogdanski P (2022) The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review. *Nutrients* 14

453. Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA (2006) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:1094-1099
454. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L (2007) Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 93:4225-4236
455. World Health Organization (WHO) (2017). Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025 (<https://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-the-public-health-response-to-dementia-2017---2025>)
456. World Health Organization (WHO) (2021). Obesity and overweight (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>)
457. World Health Organization (WHO) (2023). Aspartame hazard and risk assessment results released (<https://www.who.int/news/item/14-07-2023-aspartame-hazard-and-risk-assessment-results-released>)
458. Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GY, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, Jia J, Gauthier S (2012) Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci* 39:436-445
459. Xu Y, Condell M, Plesken H, Edelman-Novemsky I, Ma J, Ren M, Schlame M (2006) A Drosophila model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11584-11588
460. Xue M, Xu W, Ou YN, Cao XP, Tan MS, Tan L, Yu JT (2019) Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Res Rev* 55:100944
461. Yacyszyn B, Meddings J, Sadowski D, Bowen-Yacyszyn MB (1996) Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO+ B cells and increased intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 41:2493-2498
462. Yadav DK, Kumar S, Choi EH, Chaudhary S, Kim MH (2019) Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Sci Rep* 9:4496
463. Yang JJ (2022) Brain insulin resistance and the therapeutic value of insulin and insulin-sensitizing drugs in Alzheimer's disease neuropathology. *Acta Neurol Belg* 122:1135-1142
464. Yang LG, March ZM, Stephenson RA, Narayan PS (2023) Apolipoprotein E in lipid metabolism and neurodegenerative disease. *Trends Endocrinol Metab* 34:430-445
465. Yasumoto T, Takamura Y, Tsuji M, Watanabe-Nakayama T, Imamura K, Inoue H, Nakamura S, Inoue T, Kimura A, Yano S, Nishijo H, Kiuchi Y, Teplow DB, Ono K (2019) High molecular weight amyloid beta(1-42) oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *FASEB J* 33:9220-9234
466. Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87:257-263
467. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33:337-349
468. Zhang C, Liu P (2019) The New Face of the Lipid Droplet: Lipid Droplet Proteins. *Proteomics* 19:e1700223
469. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1:9-21
470. Zhang H, Liu D, Huang H, Zhao Y, Zhou H (2018) Characteristics of Insulin-degrading Enzyme in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Curr Alzheimer Res* 15:610-617
471. Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang YW (2014) The gamma-secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci* 8:427
472. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3
473. Zhao Y, Zhao B (2013) Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013:316523
474. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV (2015) Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163:1064-1078
475. Zhu XC, Tan L, Wang HF, Jiang T, Cao L, Wang C, Wang J, Tan CC, Meng XF, Yu JT (2015) Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Ann Transl Med* 3:38

476. Zong WX, Rabinowitz JD, White E (2016) Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* 61:667-676

8. Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich mit meinem aufrichtigen Dank an all jene Personen richten, die mich bei der Realisierung dieser Arbeit unterstützt haben und, ohne die ich sowohl aus wissenschaftlichen Gesichtspunkten, als auch auf persönlicher Ebene nicht dort wäre, wo ich heute bin.

Zunächst gebührt mein tiefer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm, der mich von der ersten Sekunde an mit seiner Leidenschaft angesteckt hatte, mit Expertise und Erfahrung über die gesamte Zeit hinweg beiseite stand und zeigte, was man mit Fleiß alles erreichen kann. Auch Prof. Dr. rer. nat. Heike Grimm möchte ich von Herzen für ihre stetige Unterstützung, Geduld und Fürsorge danken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Anna Lauer, die mich nicht nur in das experimentelle Arbeiten in unserem Labor einführte und Versuchsprotokolle erläuterte, sondern bei Fragen jeglicher Art beiseite stand, immer mit anpackte und zu einer Vertrauensperson wurde. In diesem Zuge möchte ich auch Elena Theiss danken, mit der ich viele gemeinsame Stunden im Labor verbrachte. Zusammen gingen wir durch die Höhen und Tiefen des Doktorandenlebens, gaben uns gegenseitig Kraft und verloren nie die nötige Portion Humor.

Darüber hinaus möchte ich Vincent Ehrhardt, Elodie Haas, Juliane Radermacher und Oliver Walzer danken, die sich als „nachfolgende“ Doktorandengeneration präzise in die bestehenden Versuchsprotokolle einarbeiteten und mich so bei nahender Deadline bei der Durchführung und Auswertung ausstehender Versuche unterstützten. Ich habe den Austausch mit euch immer geschätzt und euch sehr in mein Herz geschlossen.

Zuletzt möchte ich meine liebe Familie erwähnen, der ich diese Arbeit auch widmen möchte. Meine Dankbarkeit für euren Rückhalt und eure bedingungslose Liebe lassen sich kaum in Worte fassen.

9. Lebenslauf

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

